การจำแนกลำดับโมเลกุลการฉีกขาดของสายดีเอนเอ ของโรคมะเร็งปากมดลูก

นาย นครินทร์ กิตกำธร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN: 974-14-1970-8.

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DNA DOUBLE STRAND BREAKS IN CERVICAL CANCER

Mr. Nakarin Kitkumthorn

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Medical Microbiology

(Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN: 974-14-1970-8.

481682

Thesis Title	MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DNA DOUBLE STRAND BREAKS IN CERVICAL CANCER
By	Mr. Nakarin Kitkumthorn
Field of study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Professor Apiwat Mutirangura,M.D.,Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

.....Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R.Kalaya Tingsabadh,Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associated Professor Somatat Wongsawang,D.V.M.,Dr.med.vet.)

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

.....Member
(Assistant Professor Aumkhae Sukprasert,M.D.)

.....Member
(Associated Professor Nattiya Hirankarn,M.D.,Ph.D.)

.....Member
(Assistant Professor Kanitha Patarakul,M.D.,Ph.D.)

นครินทร์ กิตกำธร : การจำแนกลำดับโมเลกุลการฉีกขาดของสายดีเอนเอ ของโรคมะเร็งปากมดลูก. (MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DNA DOUBLE STRAND BREAKS IN CERVICAL CANCER) อ. ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร 121 หน้า. ISBN 974-14-1970-8.

โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นโรคที่ก่อให้เกิดการเสียชีวิตในสตรีทั่วโลก ไวรัสแปปิโลมา (HPV) มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งปากมดลูก นอกจากนี้การฉีกขาดของสายดีเอนเอ ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งในการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ปกติไปเป็นเซลล์มะเร็ง ในการศึกษานี้จะมุ่งศึกษา ยีน Cyclin A1 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการซ่อมแซมสายดีเอนเอหลังการฉีกขาด โดยตั้งสมมติฐานว่า ยีน Cyclin A1 เป็นยีนที่ต้านต่อการเกิดมะเร็ง จากการศึกษาของ Y. Tokumaru *et al.*, *Cancer Res* **64**, 5982-7 (Sep 1, 2004) แสดงให้เห็นว่าโรคมะเร็งศีรษะและลำคอชนิดสความัสเซลล์ มีความสัมพันธ์อย่างผกผันระหว่างเมทิลเลชั่นที่โปรโมเตอร์ของ ยีน Cyclin A1 และ ยีน TP 53 ที่เป็นชนิดกลายพันธุ์ ในมะเร็งปากมดลูกที่ติดเชื้อ HPV ก็มีการสูญเสียการทำงานของโปรตีน TP 53 เช่นกันโดยโปรตีน E6 ของ HPV เพราะฉะนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะศึกษาการเกิดเมทิลเลชั่นที่โปรโมเตอร์ของ ยีน Cyclin A1 ในระยะต่างๆของการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก โดยใช้วิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอนเอ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ที่จำเพาะต่อตำแหน่งที่มีเมทิลเลชั่น (methylation-specific PCR) จากการศึกษาทั้งในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและในชิ้นเนื้อของผู้ป่วย พบว่าโปรโมเตอร์เมทิลเลชั่นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการลดการแสดงออกของยีนนี้ นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดเมทิลเลชั่นมีความสัมพันธ์กับระยะต่างๆของการเกิดมะเร็งปากมดลูกด้วย โดยทำการศึกษาใน เม็ดเลือดขาว 43 ราย, ชิ้นเนื้อปากมดลูกปกติ 25 ราย, รอยโรคก่อนเกิดมะเร็ง 24 ราย, มะเร็งลุกลามระยะแรก (CIS) 5 ราย และมะเร็งระยะลุกลามของปากมดลูก (Invasive cancer) 30 ราย จากการศึกษาพบว่า ในเซลล์ปกติและรอยโรคระยะแรก (Low-grade SIL) จะไม่พบการเกิดเมทิลเลชั่น แต่พบเมทิลเลชั่น 36.6%,60% และ 93.3% ใน High-grade SIL, CIS และ invasive cancer ตามลำดับ

กล่าวโดยสรุปความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายีน Cyclin A1 น่าจะทำหน้าที่เป็นยีนที่ต้านต่อการเกิดมะเร็ง และองค์ความรู้ที่ได้สามารถที่จะพัฒนาไปเพื่อใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งปากมดลูกระยะแรกได้

สาขาวิชา.จุลชีววิทยาทางการแพทย์(สหสาขาวิชา). ลายมือชื่อนิสิต.....นครินทร์ กิตกำธร.....

ปีการศึกษา.....2548..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4175221030 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: DSB/ HPV / CERVICAL CANCER / *CCNA1* / CARCINOGENESIS

NAKARIN KITKUMTHORN : MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DNA DOUBLE STRAND BREAKS IN CERVICAL CANCER. THESIS ADVISOR : PROF. APIWAT MUTIRANGURA, Ph.D. 121 pp. ISBN 974-14-1970-8.

Cervical cancer is the major cause of death in woman worldwide. Carcinogenesis shows strong associated with HPV. DNA double strand breaks is another important caused of tumorigenesis. This study was to evaluate the potential of cyclin A1, which associated to DNA repairing mechanisms. We proposed *cyclin A1* to act as a tumor suppressor gene in human papillomavirus-associated cervical cancer. Y. Tokumaru *et al*., *Cancer Res* **64**, 5982-7 (Sep 1, 2004) demonstrated in head and neck squamous-cell cancer an inverse correlation between *cyclin A1* promoter hypermethylation and *TP53* mutation. Human papillomavirus-associated cervical cancer, however, is deprived of TP53 function by a different mechanism. Therefore, it was of interest to investigate the epigenetic alterations during multistep cervical cancer development. In this study, we performed duplex methylation-specific PCR and confirmed *cyclin A1* methylation to be commonly found in cervical cancer, both in vitro and in vivo, with its physiological role being to decrease gene expression. More importantly, this study demonstrated that not only is *cyclin A1* promoter hypermethylation strikingly common in cervical cancer, but is also specific to the invasive phenotype in comparison with other histopathological stages during multistep carcinogenesis. We investigated 43 samples of white blood cells, 25 normal cervices, and 24, 5 and 30 human papillomavirus-associated premalignant, microinvasive and invasive cervical lesions, respectively. None of the normal cells and low-grade squamous intraepithelial lesions exhibited methylation. In contrast, 36.6%, 60% and 93.3% of high-grade squamous intraepithelial lesions, microinvasive and invasive cancers, respectively, showed methylation. Therefore, this methylation study indicated that *cyclin A1* acts as a tumor suppressor gene and is a potential tumor marker for early diagnosis of invasive

Field of Study : Medical Microbiology (Inter-Department) Student's signature.....

Academic year .....2005.....Advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and sincere appreciation to my advisor, Professor Apiwat Mutirangura, for his excellent advice, guidance, criticism support and encouragement throughout the period of this study.

I am indepted to the entire staff of the Department of Obstetrics and Gynecology for their assistance in collecting and providing the tissue samples, Assistant Professor Dr. Virote Sriuranpong, Associate Professor Dr. Kiat Ruxrungthum and Associated Professor Dr. Mathurose Ponglikitmongkol for the CC cell lines, HeLa(S), HeLa(K) and SiHa, respectively, peripheral nerve research unit for assisting in microdissection, Ms Pattamawadee Yanatassanajit and Ms Chureerat Phokaew for their expertise in laboratory technique,valuable suggestions and the technical in structions. I would also like to express my gratitude to all my colleagues at the Molecular Biology and Genetics of Cancer Development Research Unit, Faculty of Medicine,Chulalongkorn University for their understanding and support during my study.

I am definitely indepted to the Royal Golden Jubilee Ph.D., the Thailand Research Funds for the scholarship support during this study, National Center for Biotechnology and Genetic Engineering (Thailand), and Molecular Biology and Genetics of Cancer Development research unit, Chulalongkorn University for supporting equipment and other utilities.

Finally, I would like to express my deepest gratefulness to my parents, my wife for their warmest understanding, encouragement and support throughout this study.

TABLE OF CONTENTS

Page

Abstract (Thai).....iv

Abstract (English).....v

Acknowledgement.....vi

Table of contents.....vii

List of Tables.....ix

List of Figures.....x

List of Abbreviation.....xii

Chapter

I Introduction.....1

Background and Rationale.....1

Objective.....3

Research Question.....4

Hypothesis.....4

Conceptual Framework.....5

Expected Benefit.....6

Research Methodology.....6

II Review of Related Literatures.....7

1. Cervical Cancer.....7
2. Human Papillomavirus.....10
3. DNA Double strand Breaks.....16
4. Epigenetics and DNA Methylation.....21
5. Cyclin A1.....28

III Materials and Methods.....32

1. Sample Specimens.....32
2. Materials.....34
3. Equipments.....35
4. Reagents.....36
5. Methods.....39

IV Results.....51

CCNA1 Methylation and Expression in Cell Lines.....51

CCNA1 Methylation and Expression in Cervical tissues.....55

CCNA1 Methylation incidence during multistep cervical carcinogenesis...58

CCNA1 Methylation and Clinicopathological Correlations.....61

CCNA1 Methylation and HPV status.....64

V Discussion and Conclusion.....66

References.....72

Appendices.....89

Appendix A Buffers and Reagents.....89

Appendix B Sequence of *CCNA1* and primer.....94

Appendix C Oligonucleotide sequences for HPV detection 96

Appendix D Oligonucleotide sequences and conditions for *CCNA1* PCR analyses 98

Appendix E Modification of FIGO staging of carcinoma of the cervix uteri...99

Biography.....121

LIST OF TABLE

Table Page

1. HPV classification by tissue tropism.....11

2. Functions assigned to the papillomavirus open reading frames.....12

3. *CCNA1* methylation and clinico-pathological correlation.....60

4. *CCNA1* methylation in KSCC and clinical correlation.....61

5. *CCNA1* methylation in NKSCC and clinical correlation.....62

6. *CCNA1* methylation in adenocarcinoma and clinical correlation.....63

7. *CCNA1* methylation in adenosquamous cell carcinoma and clinical correlation.....63

8. Percentage of *CCNA1* methylation in CC (HPV integrated form).....65

9. Percentage of *CCNA1* methylation in CC (HPV episomal form).....65

10. Tumor suppressor genes hypermethylated in cervical cancer.....71

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. Cervical squamous carcinoma precursors.....9

2. Genomic map of HPV-16.....11

3. Cytosine methylation.....23

4. Mechanisms of transcriptional repression by DNA methylation.....25

5. *CCNA1* promoter methylation status in human organs.....31

6. Cyclin A1 expression in human organs.....31

7. Bisulfite modification sequence and MSP primers..... 46

8. Schematic representation of inverse correlation between promoter methylation and expression of *CCNA1* in CC cell lines.....52

9. Intra- and inter-assay variation of the duplex MSP.....53

10. Bar graph of MSP intra- and inter-assay variation.....54

11. Exponential MSP graph curve and formula.....54

12. CCNA1 methylation and expression in microdissected cervical tissues.....56

13. Sample of bisulfite *CCNA1* sequence from normal cervix.....56

14. Sample of bisulfite *CCNA1* sequence from cervical cancer.....57

15. Bisulfite sequencing at the *CCNA1* promoter.....57

16. Schematic representation of methylation-specific PCR in cervical cancer...59

Figure Page

17. Bar graph demonstrating the frequency of DNA methylation in cervical carcinogenesis.....60

18. Graph demonstrating the *CCNA1* methylaion and HPV morphology.....64

LIST OF ABBREVIATIONS

CC	=	Cervical cancer
CCNA1	=	Cyclin A1 gene
CIN	=	Cervical intraepithelial hyperplasia
CIS	=	Carsinoma in situ
SILs	=	Squamous intraepithelial lesions
SCC	=	Squamous cell carcinoma
KSCC	=	Keratinized squamous cell carcinoma
NKSCC	=	Nonkeratinized squamous cell carcinoma
HPV	=	Human Papillomavirus
WBC	=	White blood cell
DSB	=	DNA double strand break
HR	=	Homologous recombination
NHEJ	=	Non homologous end joining
TSG	=	Tumor suppressor gene
CNT	=	Connective tissue
PBMC	=	Peripheral blood mononuclear cell
ORF	=	Open reading frame
CDK	=	Cyclin-dependent kinase

LIST OF ABBREVIATIONS (CONT.)

mRNA	=	Messenger RNA
TE	=	Tris-ethylene dianine tetraacetic acid
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
DEPC	=	Diethylpyrocarbonate
PCR	=	Polymerase chain reaction
Bp	=	Base pair
Taq	=	*Thermus aquaticus*
MSP	=	Methylation specific PCR
PBS	=	Phosphate buffered saline
FBS	=	Fetal bovine serum
UV	=	Ultraviolet
^{o}C	=	Degree Celsius
Kb	=	Kilobase
mg	=	Milligram
ml	=	Millilitre
µl	=	Microlitre
µM	=	Micromolar
rpm	=	Round per minute
SD	=	Standard deviatio

LIST OF ABBREVIATIONS (CONT.)

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
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
RNA	=	Ribonucleic acid