



รายงานการวิจัย

ความแตกต่างของเบสตำแหน่งเดียวกันในยีน RNF43 ในมะเร็งท่อน้ำดี (RNF43 polymorphism in cholangiocarcinoma)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

ความแตกต่างของเบสตำแหน่งเดียวกันในยีน RNF43 ในมะเร็งท่อน้ำดี
(RNF43 polymorphism in cholangiocarcinoma)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร.ชุตินา ตลับนิล

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. วิภา สุจินต์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณ ศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

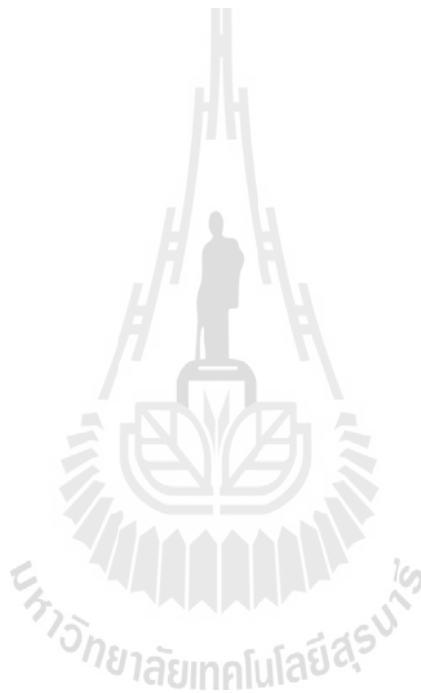
ขอขอบพระคุณ Professor Teh Bin Tean ที่ปรึกษาต่างประเทศที่กรุณาให้ความช่วยเหลือขณะทำการทดลอง โดยเฉพาะการสนับสนุนในด้านการวิเคราะห์ DNA sequencing

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.โสพิศ วงศ์คำ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะ และช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างทำการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2555

ชุตินา ตลับนิล

ธันวาคม 2556

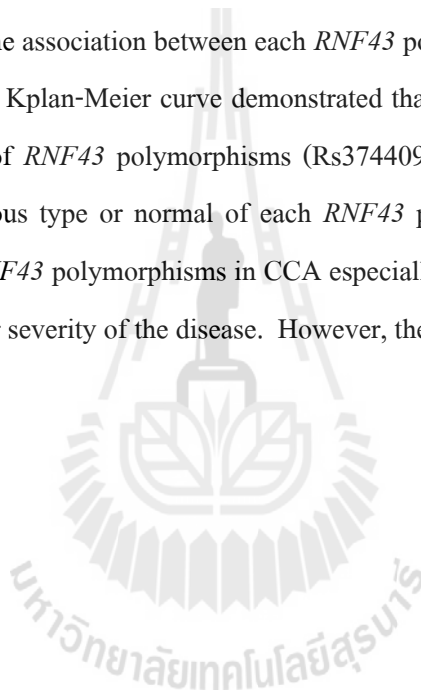


บทคัดย่อภาษาไทย

มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่มีความรุนแรงของโรครุนแรงและอัตราการเสียชีวิตด้วยมะเร็งชนิดนี้มีเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ปัจจุบันได้มีการค้นพบยีนกลายพันธุ์ที่เชื่อว่าจะน่าจะเป็นสาเหตุของการเจริญและพัฒนาของเซลล์มะเร็งชนิดนี้ได้แก่ *TP53*, *KRAS* และ *SMAD4* และนอกจากยีนกลายพันธุ์ทั้ง 3 ยีนดังที่กล่าวมาแล้ว ได้มีการค้นพบยีนกลายพันธุ์อื่นใหม่เพิ่มเติมโดยเป็นยีนที่ไม่เคยมีการรายงานมาก่อนคือ *RNF43* โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *RNF43* จะมีพยากรณ์โรคที่แย่กว่าผู้ป่วยที่ไม่มีการกลายพันธุ์ของยีนนี้ ณ ปัจจุบันความแตกต่างของเบสเพียงตำแหน่งเดียวในยีน (single nucleotide polymorphism) หรือเรียกว่า สนิป ถูกเชื่อว่าเป็นปัจจัยหนึ่งต่อการเกิดโรคต่างๆ รวมไปถึงการเป็นมะเร็ง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยต้องการศึกษาค้นหาสนิปของยีน *RNF43* ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีที่ได้จากผู้ป่วยจำนวน 51 ราย (102 alleles) โดยทำการค้นหาใน 10 exon ของยีน *RNF43* และใช้เทคนิคที่เรียกว่า PCR based-Capillary Sanger sequencing ผลการศึกษาพบสนิปของยีน *RNF43* จำนวน 3 ตำแหน่งที่เหมือนกับฐานข้อมูลสาธารณะ ได้แก่ exon2; Rs3744093 C>T; จำนวน 32 ราย, exon 3; Rs2257205 A>G จำนวน 37 ราย, และ exon 6; Rs2285990 A>G จำนวน 5 ราย และอีก 1 ตำแหน่งที่ยังไม่มีการรายงานในฐานข้อมูลสาธารณะ (exon9 อยู่บน cDNA ตำแหน่งที่ 2138 (c.2138) จำนวน 2 ราย ผลทำให้มีการแปลรหัสกรดอะมิโนลำดับที่ 713 จาก Glutamate เป็น Glycine) นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยทำการศึกษาความสัมพันธ์ของสนิปในยีน *RNF43* โดยเฉพาะตำแหน่ง Rs3744093 และ Rs2257205 กับระยะเวลาการรอดชีวิตและอาการทางพยาธิคลินิก พบว่าผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มี Rs3744093 หรือ Rs2257205 แบบ homozygous จะมีแนวโน้มของระยะรอดชีวิตที่สั้นเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่ไม่มีหรือมี Rs3744093 หรือ Rs2257205 แบบ heterozygous ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นการค้นพบสนิปของยีน *RNF43* ในมะเร็งท่อน้ำดีและสนิปบางตำแหน่งในยีน *RNF43* ได้แก่ Rs3744093 และ Rs2257205 น่าจะมีบทบาทสำคัญในการเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเป็นมะเร็งหรือมีผลต่อความรุนแรงของโรคมะเร็งท่อน้ำดี อย่างไรก็ตามสมมุติฐานดังกล่าวจะเป็นจริงได้นั้นทางคณะผู้วิจัยยังต้องทำการศึกษายาทบาทหน้าที่หรือลักษณะการแสดงออกของสนิปดังกล่าวต่อไป

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is devastating cancers and is increasing both worldwide incidence and mortality rate. A mutation landscape of CCA had been demonstrated that beside the major cancer genes including *TP53*, *KRAS* and *SMAD4*, there is a novel mutated gene, *RNF43*, which was showed poor prognosis in patient bearing *RNF43* mutation. Currently, single nucleotide polymorphism (SNP) consider as factor to play a more modest role in disease susceptibility including cancer. In present study, we determined genetic variation in *RNF43* of 51 CCA patients (102 alleles) by PCR based - Capillary Sanger sequencing for all their coding sequence (10 exon). High frequency of *RNF43* polymorphism were found on exon 2 (Rs3744093 C>T; 32/51), exon 3 (Rs2257205 A>G; 37/51), and exon 6 (Rs2285990 A>G; 5/51) respectively. One more position is novel SNPs that may be population specific (on exon9; c.2138, pE713G). We also investigated the association between each *RNF43* polymorphisms with overall survival and clinocopathological features. Kplan-Meier curve demonstrated that overall survival trend to worst in patients with homozygous type of *RNF43* polymorphisms (Rs3744093 or Rs2257205) comparing with those of patients with heterozygous type or normal of each *RNF43* polymorphisms respectively. This study provides insight into the *RNF43* polymorphisms in CCA especially Rs3744093 and Rs2257205 may have influence on susceptibility or severity of the disease. However, the functions of these polymorphisms need to be elucidated.



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
แหล่งที่มาของข้อมูล	4
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	4
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	5
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	7
บทที่ 4 ข้อวิจารณ์	
วิจารณ์ผลการวิจัย	15
บทที่ 5 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	16
บรรณานุกรม	17
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	18
ภาคผนวก ข	20
ประวัติผู้วิจัย	24



สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	จีโนไทป์ของ Rs3744093, Rs2257205 และ Rs2285990 และ RNF43 mutation ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 51 ราย	10
ตารางที่ 2	ความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละ RNF43 polymorphism - Rs3744093 กับอาการทางพยาธิคลินิก (clinocopathological feature) ของมะเร็งท่อน้ำดี	13
ตารางที่ 2	ความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละ RNF43 polymorphism – Rs2257205 กับอาการทางพยาธิคลินิก (clinocopathological feature) ของมะเร็งท่อน้ำดี	14



สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	trace data ที่บรรจุลำดับเบสของยีน RNF43 ที่ได้จากแต่ละตัวอย่างทั้งจาก มะเร็งและเนื้อเยื่อปกติมาเปรียบเทียบกับลำดับอ้างอิงของยีน RNF43 ที่ อยู่บนฐานข้อมูล nucleotide database	6
ภาพที่ 2	Germline mutation แบบ heterozygous และ Somatic mutationแบบ heterozygous หรือ homozygous ตามลำดับ	6
ภาพที่ 3	RNF43 polymorphism ทั้ง 4 ตำแหน่งบน coding sequences ลำดับที่ (exon) 2, 3, 6 และ 9 ในตัวอย่างดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี	7
ภาพที่ 4	Kplan-Meier Curve แสดง Overall survival time ของผู้มะเร็งท่อน้ำดีที่มี การแสดงออกของ RNF43 polymorphism – Rs3744093 แบบ homozygous และ heterozygous	12
ภาพที่ 5	Kplan-Meier Curve แสดง Overall survival time ของผู้มะเร็งท่อน้ำดีที่มี การแสดงออกของ RNF43 polymorphism – Rs2257205 แบบ homozygous และ heterozygous	12

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) หรือ สนิป คือ ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างมนุษย์แต่ละคนที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์เพียงหนึ่งตำแหน่ง โดยความแตกต่างนี้ต้องมีความถี่ที่พบในประชากรมากกว่า 1% ซึ่งความแตกต่างนี้เองเป็นผลที่ทำให้มนุษย์แต่ละคนหรือคนแต่ละกลุ่มประชากรมีความแตกต่างกัน ณ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่า สนิป เป็นเครื่องมือที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมของมนุษย์ ที่จะมียผลต่อ ความเสี่ยงต่อการเกิดโรค การตอบสนองต่อการรักษา และภาวะดื้อยาที่ใช้ในการรักษา ดังนั้นการจัดทำแผนที่สนิป (SNP maps) ของยีนที่คาดว่าเป็นสาเหตุของการเกิดโรค (candidate genes) จะสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์ความเสี่ยงของการเกิดโรคได้ และยังสามารถนำมาใช้ในงานทางด้านเภสัชพันธุศาสตร์ (pharmacogenomics) เพื่อใช้ค้นหาตัวใหม่ และนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพและผลข้างเคียงของยาเฉพาะบุคคล (personalized medicine) ได้

Ring finger protein 43 หรือ RING-type E3 ubiquitin ligase (RNF43) เป็นยีนที่ยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติหรือหน้าที่การทำงานอย่างชัดเจน โดยข้อมูล ณ ปัจจุบันพบว่า ยีนนี้ถูกนำมาศึกษาครั้งแรกในมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon cancer) เนื่องจากเป็นยีนที่มีการแสดงออกสูงในมะเร็งชนิดนี้ ทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน โดยเฉพาะในรูปของโปรตีนคัตหลัง และพบอีกว่า RNF43 ถูกพิจารณาเป็น tumor associated antigen ที่สามารถกระตุ้นการทำงานของ cytotoxic T lymphocyte เพื่อเพิ่มความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น (Uchida N et al., 2004) นอกจากนี้การศึกษาต่อมา รายงานว่า RNF43 สามารถจับกับโปรตีน NEDL1 และเป็นผลในการควบคุมการแสดงออกของยีน tumor suppressor p53 ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นกรณีที่มีเซลล์ที่มีความผิดปกติและมีการแสดงออกของยีน RNF43 สูง ส่งผลให้เซลล์ผิดปกติเหล่านั้นไม่ถูกทำลาย และเป็นผลให้เซลล์เหล่านั้นเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นและพัฒนาเป็นมะเร็งได้ (Shinada K et al., 2011) ถึงแม้ว่าความรู้เกี่ยวกับหน้าที่ของยีนยังคงไม่ชัดเจน แต่ ณ ปัจจุบันมีหลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่า RNF43 มีความสำคัญในมะเร็ง โดยเฉพาะมะเร็งตับอ่อน ที่พบว่า RNF43 polymorphism (rs2257205) สามารถบ่งชี้ต่อความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งตับอ่อน (Low SK et al., 2010) และในการศึกษาต่อมาในเนื้องอก (Benign tumor) ของมะเร็งตับอ่อน (Wu J et al., 2011) หรือในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี (Ong CK et al., in press) พบการกลายพันธุ์ของ RNF43 (RNF43 mutation) ประมาณ 10 % ของผู้ป่วยมะเร็ง จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ายีน RNF43 น่าจะเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดีและอาจเป็นเป้าหมายตัวใหม่ในใช้เป็นตัวบ่งชี้หรือใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

มะเร็งท่อน้ำดี คือมะเร็งที่เกิดจากเซลล์เยื่อบุผนังของท่อน้ำดีซึ่งรวมถึงท่อน้ำดีในตับ ภายในและภายนอกตับ แต่ไม่รวมถึงเยื่อบุของถุงน้ำดีและ Papilla of Vater ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท โดยขึ้นอยู่กับที่เกิดมะเร็งบริเวณภายในหรือนอกตับ คือมะเร็งท่อน้ำดีภายในตับ (Intrahepatic

cholangiocarcinoma) และมะเร็งท่อน้ำดีภายนอกตับ (Extrahepatic cholangiocarcinoma) มะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่พบได้น้อย (uncommon malignancy) คือ 1-2 ต่อ 100,000 คน (Landis et al., 1998) จากการศึกษาของ Parkin และหน่วยมะเร็งของโรงพยาบาลศรีนครินทร์จังหวัดขอนแก่นในปี พ.ศ. 2540 พบโรคนี้อุบัติการณ์สูงมากที่สุดในโลกที่จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย โดยเกิดในผู้ชายมากกว่าผู้หญิงคือ 88.1 ต่อ 100,000 ในชายและ 36.7 ต่อ 100,000 ในหญิง (Parkin et al., 1997 and Vatanasapt et al. 2002) ดังนั้นมะเร็งท่อน้ำดีจึงถูกพิจารณาว่าเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ณ ปัจจุบันเชื่อว่าสาเหตุของมะเร็งนี้น่าจะมีความสัมพันธ์กับการที่มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ (*Opisthorchis viverrini*) และการรับประทานอาหารหมักดองตัวอย่างเช่น ปลาร้า, ปลาจ่อม และปลาเจ้า ซึ่งจะมีสารที่เรียกว่า N-Nitrosocompound และ Nitrosamine โดยจากการทดลองบ่งบอกว่าจะสามารถเร่งให้เกิดมะเร็งได้เร็วขึ้น ธรรมชาติของมะเร็งท่อน้ำดีเป็นมะเร็งที่มีการเติบโตช้าแต่มีการแพร่ลุกลามสูง เนื่องจากไม่มีอาการแสดงที่ชัดเจนในระยะแรกของโรค ผู้ป่วยจึงมักมารับการรักษาเมื่อมะเร็งเข้าสู่ระยะท้าย จึงทำให้ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีส่วนใหญ่มีพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ด้วยเหตุการณ์ดังกล่าวข้างต้นนี้ ทำให้เห็นว่าการศึกษาวินิจฉัยค้นหาปัจจัยทางพันธุกรรมของผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งชนิดนี้ หรือการศึกษาค้นหาปัจจัยทางพันธุกรรมที่มีผลต่อการเลือกแผนการรักษาที่เหมาะสมกับผู้ป่วย น่าจะเป็นแนวทางที่จะลดและควบคุมการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี และน่าจะส่งผลทำให้การรักษาพยาบาลผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

งานวิจัยในครั้งนี้อย่างยิ่งต้องการศึกษา Polymorphism ของยีน RNF43 ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี เนื่องจากมีรายงานในมะเร็งตับอ่อน (Pancreatic cancer) พบว่า polymorphism ของยีน RNF43 สามารถบ่งชี้ความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งตับอ่อนได้ (Low SK et al., 2010) และจากข้อมูลพื้นฐานพบว่าท่อน้ำดีและตับอ่อนมีเซลล์ต้นกำเนิดใกล้เคียงกันหรืออาจมาจากแหล่งเดียวกัน ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลให้ผู้วิจัยต้องการศึกษา Polymorphism ของยีน RNF43 ที่จำเพาะต่อมะเร็งท่อน้ำดี เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้พยากรณ์ความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาความถี่ของความแตกต่างของเบสตำแหน่งเดียวกันในยีน RNF4 ในดีเอ็นเอ ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี
2. เพื่อศึกษาศักยภาพของความแตกต่างของเบสตำแหน่งเดียวกันในยีน RNF43 ในการบ่งบอกโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีหรือพยากรณ์ความรุนแรงของโรค

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาทางชีวเคมีในระดับโมเลกุลดังนี้

1. การค้นหา RNF43 polymorphism ในยีน RNF43 โดยเฉพาะส่วนของยีนที่สามารถแสดงออกได้ (coding sequence = exon) จำนวน 10 exon ในดีเอ็นเอของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี โดยเทคนิค DNA sequencing
2. การเปรียบเทียบ RNF43 polymorphism ในยีน RNF43 ระหว่างที่ค้นพบในการศึกษากับที่ถูกรายงานไว้ในฐานข้อมูลสาธารณะ (SNP Database version 131 และ 132)

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลสำเร็จที่ได้หลังจากเสร็จสิ้นโครงการงานวิจัยนี้คือ ค้นพบชนิดของยีน RNF43 (RNF43 polymorphism) ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งชนิดดังกล่าวจะถูกนำไปศึกษาต่อยอด เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ ในการอธิบายกลไกการเกิดและพัฒนาของมะเร็งท่อน้ำดี และเพื่อที่จะพัฒนาไปใช้เป็นตัวคัดกรองแก่ผู้ที่มีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งท่อน้ำดี นอกจากนี้ ผลของงานวิจัยครั้งนี้ได้ถูกนำไปเผยแพร่ในงานประชุมระดับนานาชาติ 1 ครั้ง ในรูปแบบของโปสเตอร์ (รายละเอียดดังภาคผนวก ข) และผลของงานวิจัยครั้งนี้จะถูกนำไปศึกษาต่อเพื่อเพิ่มองค์ความรู้ในแง่มุมอื่นๆ ในหน่วยงานของศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต่อไป



บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ใช้ดีเอ็นเอ (DNA) ที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี โดยเนื้อเยื่อมะเร็งดังกล่าวได้รับความอนุเคราะห์มาจากศูนย์พยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 51 ตัวอย่าง ได้มาจากการคนไข้ที่เข้ารับการรักษาด้วยการผ่าตัดที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และทุกตัวอย่างนี้ได้มีการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (Pathological examination) ยืนยันว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยคนเดียวกันจำนวนอย่างละ 51 ตัวอย่าง โดยเนื้อเยื่อดังกล่าวเป็นเนื้อเยื่อแช่แข็ง (frozen tissues) เนื้อเยื่อแต่ละตัวอย่างจะถูกนำมาบดให้ละเอียดด้วยครกและสาก (Mortar and pestle) ภายใต้อุณหภูมิเย็นจัดของไนโตรเจนเหลว และเมื่อแต่ละตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งถูกบดละเอียดแล้ว จะถูกนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดของ Qiagen genomic DNA kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany, Cat #10243) โดยการสกัดดีเอ็นเอจะเป็นไปตามขั้นที่ระบุในชุดสกัด

2. การตรวจหา RNF43 polymorphism ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) based capillary Sanger sequencing

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติอย่างละ 51 ตัวอย่างนั้น ถูกนำมาตรวจหา RNF43 polymorphism โดยการทำให้ polymerase chain reaction (PCR) based capillary Sanger sequencing ด้วยขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1: Polymerase chain reaction (PCR) นั้นจะต้องออกแบบ primer เพื่อให้ครอบคลุมบริเวณของยีน RNF43 ที่สามารถแสดงออกมาเป็นโปรตีน (coding sequence = exon) ได้ โดยยีน RNF43 นั้นมีขนาดประมาณ 2.352 kb และประกอบด้วย exon จำนวนทั้งหมด 10 exon ดังนั้นต้องออกแบบ primer จำนวน 10 คู่ ดังตารางในภาคผนวก Primer ทั้ง 10 คู่จะถูกนำมาใช้ทำ PCR ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 51 ตัวอย่าง โดยองค์ประกอบของการทำ PCR (PCR reaction) ใน primer แต่ละคู่ นั้น แสดงไว้ในภาคผนวก เมื่อได้ PCR reaction แล้วจะถูกนำไปใส่ด้วยเครื่อง ABI GeneAmp Thermal cycle โดยมี PCR condition คือ 1 รอบของ 95°C ใช้เวลา 10 นาที , 39 รอบของ 95°C, 30 วินาที; 58°C, 30 วินาที; 72°C, 1 นาที และเมื่อครบ 39 รอบ ตามด้วย 1 รอบของ 72°C, 10 นาที สิ้นสุดจะได้ PCR product ของแต่ละตัวอย่าง ซึ่งจะนำไปทำต่อในขั้นตอนที่ 2

ขั้นตอนที่ 2: Exonuclease-shrimp alkaline phosphatase clean-up ขั้นตอนนี้เป็นเตรียม PCR product ที่ได้ให้พร้อมก่อนนำไปทำ Sanger DNA sequencing โดย PCR product แต่ละตัวอย่างจะถูกเติมด้วย exonuclease และ shrimp alkaline phosphatase ดังแสดงในภาคผนวก และนำไปใส่ด้วยเครื่อง ABI GeneAmp Thermal cycle โดยบ่งที่ 37°C ใช้เวลา 60 นาที และตามด้วย 72 °C ใช้เวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาตัวอย่าง PCR product ดังกล่าวจะถูกนำไปทำต่อในขั้นตอนที่ 3

ขั้นตอนที่ 3:

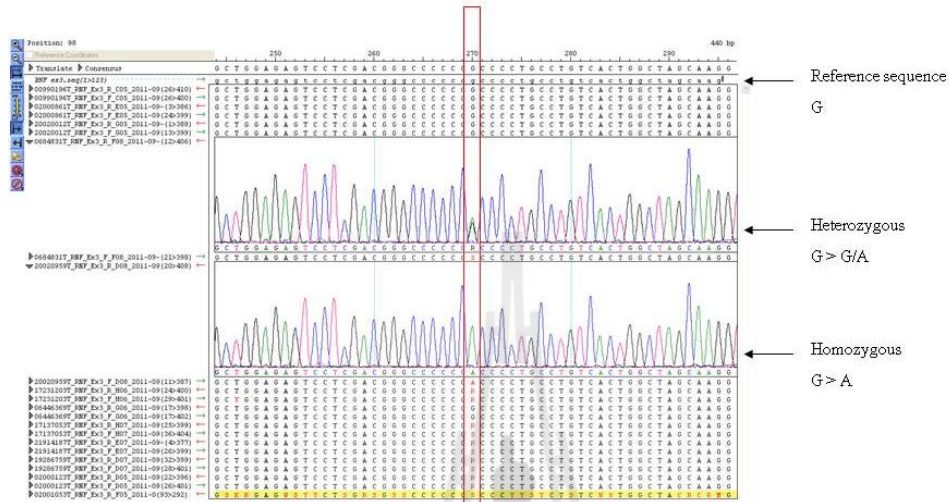
PCR product ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 จะถูกนำมาใช้ในขั้นตอน Sanger DNA sequencing โดยองค์ประกอบสารหลักที่ใช้คือ ABI BigDye Terminator v 3.1 Life technologies, Carlsbad, CA, USA, Cat 4337457) รายละเอียดของปฏิกิริยาดังแสดงในภาคผนวก เมื่อเตรียมปฏิกิริยาของแต่ละตัวอย่างแล้วจะนำไปใส่ในเครื่อง ABI GeneAmp Thermal cycle โดยมี Thermal cycle คือ 1 รอบของ 96°C, นาที; 29 รอบของ 96°C, 10 วินาที, 50°C, 5 วินาที, 60°C, 4 นาที เมื่อครบ 29 รอบแล้ว sequencing product จะถูกนำไปวิเคราะห์โดยเครื่อง ABI sequencer 3130 เพื่อได้ trace data ที่เป็น chromatogram แสดงลำดับ nucleotide ของ coding sequence ของยีน RNF43 จากนั้นข้อมูลดังกล่าวจะถูกนำไปวิเคราะห์หา RNF polymorphism ต่อไปด้วยโปรแกรม DNA star version

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

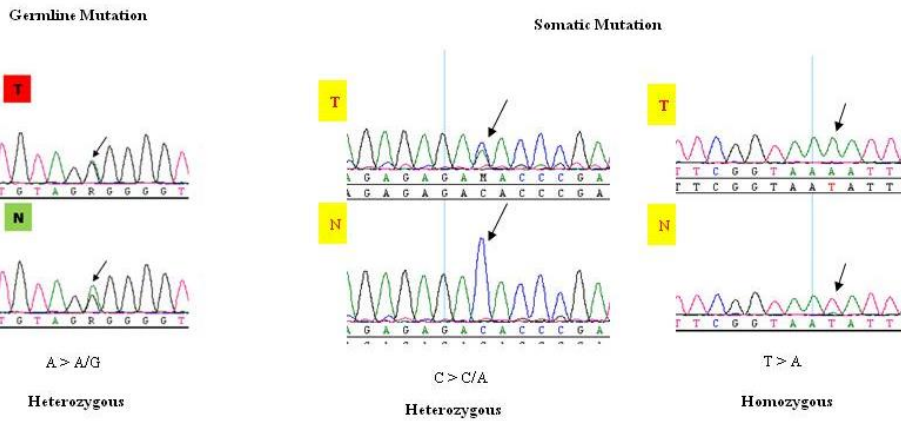
ดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติเมื่อผ่านกระบวนการ PCR based capillary Sanger sequencing และถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย ABI sequencer 3130 แล้ว เพื่อให้ได้ trace data (chromatogram) โดย trace data จากตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติจะถูกนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสตำแหน่งเดียวที่แตกต่างกันในยีน RNF43 (RNF43 polymorphism) โดยโปรแกรม DNA star version 6 (SeqMan) โปรแกรมจะทำการวิเคราะห์หา RNF43 polymorphism โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้

1. เอาแต่ละ trace data ที่บรรจุลำดับเบสของยีน RNF43 ที่ได้จากแต่ละตัวอย่างทั้งจากมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติ มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงของยีน RNF43 ที่อยู่บนฐานข้อมูล nucleotide database นั้น เมื่อลำดับเบสตำแหน่งใดแตกต่างจากลำดับเบสอ้างอิงจะถูกพิจารณาเบื้องต้นว่าเป็นความแตกต่างแบบ heterozygous (มีความผิดปกติเพียง 1 allele ของยีน RNF43 จากทั้งหมด 2 allele) หรือ homozygous (มีความผิดปกติทั้ง 2 alleles ของยีน RNF43) ตามแสดงดังรูปภาพที่ 1
2. ถ้าลำดับเบสตำแหน่งเดียวที่แตกต่างกันนั้นไม่ว่าจะเป็นแบบ heterozygous หรือ homozygous พบในดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีหรือเนื้อเยื่อปกติจากผู้ป่วยคนเดียวกันพิจารณาว่าเป็น Germline mutation ตามแสดงดังรูปภาพที่ 2 ดังนั้น Germline mutation จะพบในความถี่ต่ำ แต่ถ้าพบปรากฏการณ์นี้เช่นนี้ในความถี่สูงคือพบในเกือบทุกตัวอย่างอาจจะ Polymorphism ได้ จะพิสูจน์ว่าเป็น Polymorphism หรือไม่ โดยนำความแตกต่างนี้ไปตรวจสอบที่ฐานข้อมูล SNP database

3. ถ้าลำดับเบสตำแหน่งเดียวกันที่แตกต่างกันนั้นไม่ว่าจะเป็นแบบ heterozygous หรือ homozygous พบในดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีแต่ไม่พบในเนื้อเยื่อปกติจากผู้ป่วยคนเดียวกันพิจารณาว่าเป็น Somatic mutation ตามแสดงดังรูปภาพที่ 2



รูปภาพที่ 1 trace data ที่บรรจุลำดับเบสของยีน RNF43 ที่ได้จากแต่ละตัวอย่างทั้งจากมะเร็งและเนื้อเยื่อปกติ มาเปรียบเทียบกับลำดับอ้างอิงของยีน RNF43 ที่อยู่บนฐานข้อมูล nucleotide database

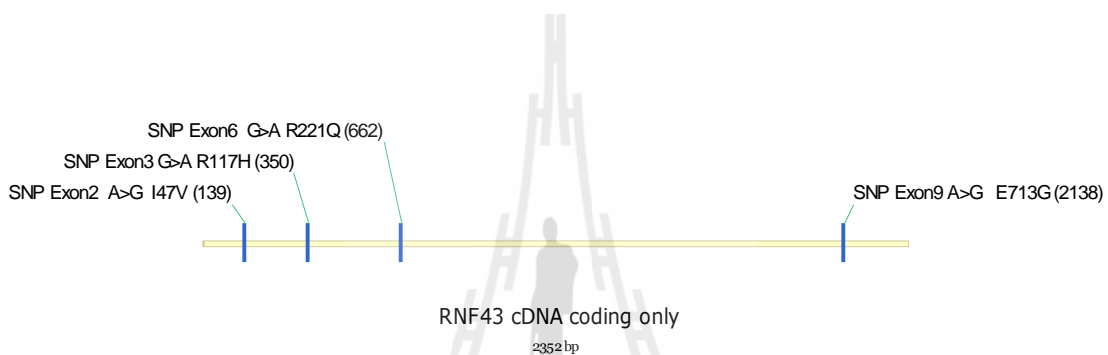


รูปภาพที่ 2 Germline mutation แบบ heterozygous และ Somatic mutationแบบ heterozygous หรือ homozygous ตามลำดับ

บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผล DNA sequencing ของ 10 coding sequence (exon) ในยีน RNF43 ในตัวอย่างดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 51 ราย

ผลการศึกษายพบลำดับเบสตำแหน่งเดียวที่แตกต่างกันทั้งแบบ heterozygous และ homozygous จำนวน 4 ตำแหน่งใน coding sequences ลำดับที่ 2, 3, 6 และ 9 ในตัวอย่างดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีด้วยความถี่แตกต่างกันในแต่ละตำแหน่งเบส และแต่ละตำแหน่งเบสดังกล่าวได้ตรวจสอบกับ SNP database version 131 และ version 132 ว่าเป็น Polymorphism ของยีน RNF43 นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังตรวจพบการกลายพันธุ์ของยีน RNF43 (RNF43 mutation) จำนวน 3 ราย โดยมีรายละเอียดดังรูปภาพที่ 3 และตารางที่ 1



รูปภาพที่ 3 RNF43 polymorphism ทั้ง 4 ตำแหน่งบน coding sequences ลำดับที่ (exon) 2, 3, 6 และ 9 ในตัวอย่างดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี

1.1 ลำดับเบสที่แตกต่างกันแบบ heterozygous ใน coding sequence ลำดับที่ 2 (Exon 2) มีการเปลี่ยนแปลงของเบส A ไปเป็นเบส G (A>G) โดยพบแบบ heterozygous (AG genotype) จำนวน 22/51 รายและ homozygous (GG genotype) จำนวน 10/51 ราย โดยมีรายละเอียดดังนี้

Reference sequence of RNF43 exon2 from nucleotide database

```
CCCTGGCTGCTGATGGCTACCCTGCAGGCAGGCTTTGGACGCACAGGACTGGTACTGGC
AGCAGCGGTGGAGTCTGAAAGATCAGCAGAACAGAAAGCTATTATCAGAGTGATCCCCT
TGAAAATGGACCCCACAGGAAAACCTGAATCTCACTTTGGAAGGTGTGTTTGCTGGTGTG
CTGAAATAACTCCAGCAGAAGGAAAATTAATGCA
```

Variant sequence of RNF43 exon2 from nucleotide database

```
CCCTGGCTGCTGATGGCTACCCTGCAGGCAGGCTTTGGACGCACAGGACTGGTACTGGC
AGCAGCGGTGGAGTCTGAAAGATCAGCAGAACAGAAAGCTGTTATCAGAGTGATCCCCT
TGAAAATGGACCCCACAGGAAAACCTGAATCTCACTTTGGAAGGTGTGTTTGCTGGTGTG
CTGAAATAACTCCAGCAGAAGGAAAATTAATGCA
```

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้บน cDNA พบอยู่บนตำแหน่งที่ 139 (c.139) ผลทำให้มีการแปลรหัส กรดอะมิโนลำดับที่ 47 จาก Isoleucine เป็น Valine (p.I47V) เมื่อตรวจสอบฐานข้อมูล SNP databases 132 พบว่ามีรายงานลำดับเบสดำแหน่งเดียวกันแล้วในฐานข้อมูลว่าเป็น RNF43 polymorphism – Rs3744093

- 1.2 ลำดับเบสที่แตกต่างกันแบบ heterozygous ใน coding sequence ลำดับที่ 3 (Exon 3) มีการเปลี่ยนแปลงของเบส G ไปเป็นเบส A (G>A) โดยพบแบบ heterozygous (GA genotype) จำนวน 23/51 รายและ homozygous (AA genotype) จำนวน 14/51 ราย โดยมีรายละเอียดดังนี้

Reference sequence of RNF43 exon3 from nucleotide database

TCCCACCCGCTGTACCTGTGCAATGCCAGTGATGACGACAATCTGGAGCCTGGATTCATC
AGCATCGTCAAGCTGGAGAGTCCTCGACGGGCCCCCGCCCCTGCCTGTCACTGGCTAG
CAAG

Variant sequence of RNF43 exon3 from nucleotide database

TCCCACCCGCTGTACCTGTGCAATGCCAGTGATGACGACAATCTGGAGCCTGGATTCATC
AGCATCGTCAAGCTGGAGAGTCCTCGACGGGCCCCCACCCCTGCCTGTCACTGGCTAG
CAAG

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้บน cDNA พบอยู่บนตำแหน่งที่ 350 (c.350) ผลทำให้มีการแปลรหัส กรดอะมิโนลำดับที่ 117 จาก Arginine เป็น Histidine (p.R117H) เมื่อตรวจสอบฐานข้อมูล SNP databases 132 พบว่ามีรายงานลำดับเบสดำแหน่งเดียวกันแล้วในฐานข้อมูลว่าเป็น RNF43 polymorphism –Rs2257205

- 1.3 ลำดับเบสที่แตกต่างกันแบบ heterozygous ใน coding sequence ลำดับที่ 6 (Exon 6) มีการเปลี่ยนแปลงของเบส C ไปเป็นเบส T (C>T) โดยพบแบบ heterozygous (CT genotype) จำนวน 3/51 รายและ homozygous (TT genotype) จำนวน 2/51 ราย โดยมีรายละเอียดดังนี้

Reference sequence of RNF43 exon6 from nucleotide database

CGGCCTGCTGTGGCGGGGGCGGCACCGGATGCGCAGCACCGAAGCCAGGATGATCACA
AAGATGGTGCCCACCACTGTCATTAGGATCCACACATCATAATCTGG

Variant sequence of RNF43 exon6 from nucleotide database

CGGCCTGCTGTGGCGGGGGCGGCACTGGATGCGCAGCACCGAAGCCAGGATGATCACA
AAGATGGTGCCCACCACTGTCATTAGGATCCACACATCATAATCTGG

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้บน cDNA พบอยู่บนตำแหน่งที่ 662 (c.662) ผลทำให้มีการแปลรหัส กรดอะมิโนลำดับที่ 221 จาก Arginine เป็น Glutamine (p.R221Q) เมื่อตรวจสอบฐานข้อมูล SNP databases 131 พบว่ามีรายงานลำดับเบสดำแหน่งเดียวกันแล้วในฐานข้อมูลว่าเป็น RNF43 polymorphism –Rs2285990

1.4 ลำดับเบสที่แตกต่างกันแบบ heterozygous ใน coding sequence ลำดับที่ 9 (Exon 9) มีการเปลี่ยนแปลงของเบส A ไปเป็นเบส G (A>G) โดยพบแบบ heterozygous (AG genotype) จำนวน 2/51 ราย โดยมีรายละเอียดดังนี้

Reference sequence of RNF43 exon9 from nucleotide database

CTTGATCTGTGGACCTCCAGGCCTGGACAAGAGGCTGCTACCAGAAACCCCAGGCCCT
GTTACTCAAATTCACAGCCAGTGTGGTTGTGCCTGACTCCTCGCCAGCCCCTGGAACCAC

Variant sequence of RNF43 exon9 from nucleotide database

CTTGATCTGTGGACCTCCAGGCCTGGACAAGAGGCTGCTACCAGGAACCCCAGGCCCT
GTTACTCAAATTCACAGCCAGTGTGGTTGTGCCTGACTCCTCGCCAGCCCCTGGAACCAC

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบน cDNA พบอยู่บนตำแหน่งที่ 2138 (c.2138) ผลทำให้มีการแปลรหัสกรดอะมิโนลำดับที่ 713 จาก Glutamate เป็น Glycine (p.E713G) เมื่อตรวจสอบฐานข้อมูล SNP databases 131 และ 132 ไม่พบว่ามีรายงานลำดับเบสตำแหน่งเดียวกันดังกล่าวแล้วในฐานข้อมูล



ตารางที่ 1 จีโนไทป์ของ Rs3744093, Rs2257205 และ Rs2285990 และ RNF43 mutation ในผู้ป่วยมะเร็ง
ท่อน้ำดี 51 ราย

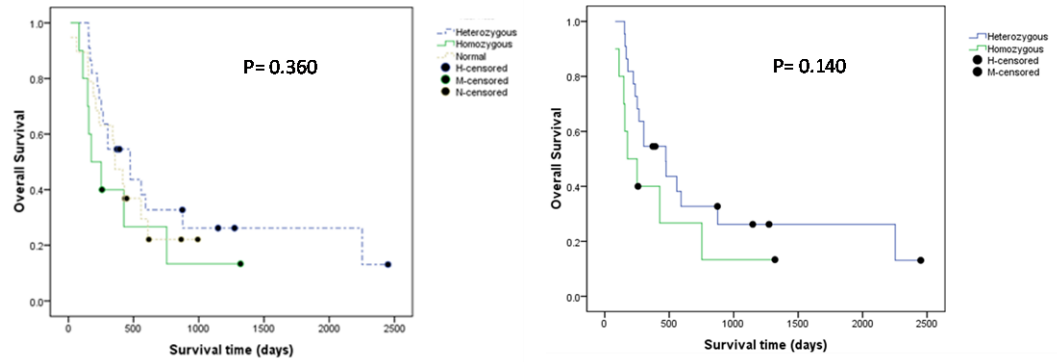
Code	Rs3744093 A>G	Rs2257205 G>A	Rs2285990 Rs C>T	RNF43 Mutation
A028	AG	GA	CC	
A035	AG	GG	CC	
A039	AG	GA	CC	
A042	AA	GA	CT	
A043	GG	GA	CC	
A074	AA	AA	CC	c.611 C>G, p.T204R
A105	AG	GA	CC	
A106	AA	AA	CC	
A107	AG	GA	CC	
A119	AA	AA	CC	
A120	GG	GG	CC	
A128	AG	GA	CT	
A142	AG	GG	CC	
A159	AG	AA	CC	c.337 C>T, p.R113X
A162	AA	GA	CC	
B032	AA	GA	CC	
B048	AG	AA	CC	
B064	AA	AA	CC	
B070	AA	GA	CC	
B083	AG	GA	CC	
B085	GG	GG	CC	
B087	AG	GG	CC	
B099	AG	GA	CC	
B113	GG	GA	CC	
B149	GG	GG	CC	
R100	GG	GA	CC	
R134	AG	GA	CT	
R149	AG	GA	CC	
T003	AG	GA	CC	
T151	AA	AA	CC	
T157	AA	GG	CC	
T160	AG	GA	CC	
U027	GG	GA	CC	
W012	AA	AA	CC	c.2167 C>T, p.Q723X
W039	AA	AA	TT	
Y002	GG	GG	CC	
Y008	GG	GG	CC	
Y019	AA	GG	CC	
Y020	AG	AA	CC	
Y023	AG	GG	CC	
Y032	AA	GG	CC	
Y033	AG	GA	CC	
Y035	GG	GG	CC	
Y057	AA	AA	CC	
Y065	AA	GG	CC	
Y072	AG	GA	CC	
Y074	AG	GA	CC	
Y091	AA	AA	CC	
Y123	AA	AA	TT	
Y140	AA	AA	CC	
Y149	AG	GA	CC	

2. ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างของเบสตำแหน่งเดียวกันในยีน RNF43 (RNF43 polymorphism) ของแต่ละตำแหน่งกับระยะรอดชีวิต (overall survival time) และอาการทางพยาธิคลินิก (clinocopathological feature) ของมะเร็งท่อน้ำดี
- 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละ RNF43 polymorphism (Rs3744093 และ Rs2257205) กับระยะรอดชีวิต (overall survival time) ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

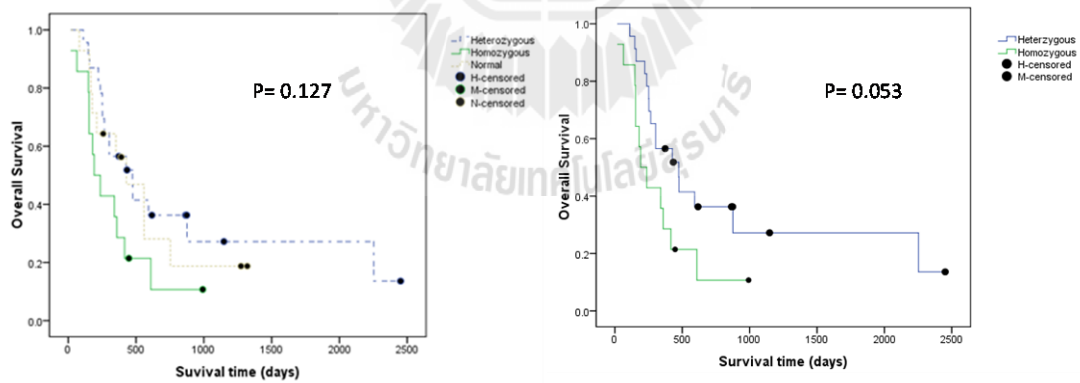
ผลของ RNF43 polymorphism Rs3744093 หรือ Rs2257205 ของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีจำนวน 51 ราย ถูกนำมาวิเคราะห์กับระยะรอดชีวิต (survival analysis) ของผู้ป่วย ด้วยการวิเคราะห์ของ Kaplan-Meier Curve พบว่า

2.1.1. ผู้ป่วยที่มี Rs3744093 แบบ homozygous (GG genotype) จำนวน 10 ราย (Median survival time = 176 ± 75 วัน) มีแนวโน้มของระยะเวลาการรอดชีวิตที่สั้นกว่าผู้ป่วยที่ไม่มี Rs3744093 (AA genotype; Median survival time = 358 ± 55 วัน) และมี Rs3744093 แบบ heterozygous (AG genotype; Median survival time = 474 ± 113 วัน) แต่ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติที่ $P = 0.360$ และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการรอดชีวิตระหว่างผู้ป่วยที่มี Rs3744093 แบบ homozygous กับ heterozygous เท่านั้น พบว่าผู้ป่วยที่มี Rs3744093 แบบ homozygous (GG genotype) มีระยะเวลาการรอดชีวิตที่สั้นกว่าผู้ป่วยที่มี Rs3744093 แบบ heterozygous (AG genotype) อย่างเห็นได้ชัด แต่ทางผู้วิจัยไม่พบนัยสำคัญทางสถิติ $P = 0.140$ อาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนน้อย แสดงดังรูปภาพที่ 4

2.1.2. ผู้ป่วยที่มี Rs2257205 แบบ homozygous (AA genotype) จำนวน 14 ราย (Median survival time = 191 ± 53 วัน) มีแนวโน้มของระยะเวลาการรอดชีวิตที่สั้นกว่าผู้ป่วยที่ไม่มี Rs2257205 (GG genotype; Median survival time = 429 ± 156 วัน) และมี Rs2257205 แบบ heterozygous (GA genotype; Median survival time = 474 ± 122 วัน) แต่ไม่พบนัยสำคัญทางสถิติที่ $P = 0.127$ และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการรอดชีวิตระหว่างผู้ป่วยที่มี Rs2257205 แบบ homozygous กับ heterozygous เท่านั้น พบว่าผู้ป่วยที่มี Rs2257205 แบบ homozygous (AA genotype) มีระยะเวลาการรอดชีวิตที่สั้นกว่าผู้ป่วยที่มี Rs2257205 แบบ heterozygous (GA genotype) อย่างเห็นได้ชัด โดยพบนัยสำคัญทางสถิติ $P = 0.053$ แสดงดังรูปภาพที่ 5



รูปภาพที่ 4 Kplan-Meier Curve แสดง Overall survival time ของผู้มะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของ RNF43 polymorphism – Rs3744093 แบบ homozygous และ heterozygous



รูปภาพที่ 5 Kplan-Meier Curve แสดง Overall survival time ของผู้มะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออกของ RNF43 polymorphism – Rs2257205 แบบ homozygous และ heterozygous

2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละ RNF43 polymorphism (Rs3744093 หรือ Rs2257205) กับอาการทางพยาธิ
คลินิก (clinocopathological feature) ของมะเร็งท่อน้ำดี

ผลการวิเคราะห์ด้วยสถิติ chi-square test เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละ RNF43 polymorphism (Rs3744093 หรือ Rs2257205) กับอาการทางพยาธิคลินิก (clinocopathological feature) ของมะเร็งท่อน้ำดี ไม่พบความสัมพันธ์ของแต่ละ RNF43 polymorphism กับ เพศ อายุ ลักษณะทางจุลพยาธิ (Histological type) และระยะของโรค (Stage) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละ RNF43 polymorphism - Rs3744093 กับอาการทางพยาธิคลินิก (clinocopathological feature) ของมะเร็งท่อน้ำดี

ปัจจัยทางคลินิก	RNF43 polymorphism-Rs3744093			P value
	Normal (n = 19)	Heterozygous (n = 22)	Homozygous (n = 10)	
อายุ				
< 56 ปี	11	7	6	0.164
≥ 56 ปี	8	15	4	
เพศ				
ชาย	6	8	6	0.308
หญิง	13	14	4	
ลักษณะทางจุลพยาธิ (Histological type)				
Papillary type	7	8	6	0.402
Non-papillary type	12	14	4	
ระยะของโรค (Stage)				
I-II-III	5	8	4	0.899
IIIA-IIIB	3	3	2	
IVA-IVB	11	11	4	

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างแต่ละ RNF43 polymorphism – Rs2257205 กับอาการทางพยาธิคลินิก (clinocopathological feature) ของมะเร็งท่อน้ำดี

ปัจจัยทางคลินิก	RNF43 polymorphism-Rs2257205			P value
	Normal (n = 14)	Heterozygous (n = 23)	Homozygous (n = 14)	
อายุ				
< 56 ปี	5	14	8	0.309
≥ 56 ปี	9	9	6	
เพศ				
ชาย	6	8	6	0.841
หญิง	8	15	8	
ลักษณะทางจุลพยาธิ (Histological type)				
Papillary type	6	5	10	0.887
Non-papillary type	8	9	13	
ระยะของโรค (Stage)				
I-II-III	5	8	4	0.985
III A-III B	2	4	2	
IV A-IV B	7	11	8	

บทที่ 4

ข้อวิจารณ์

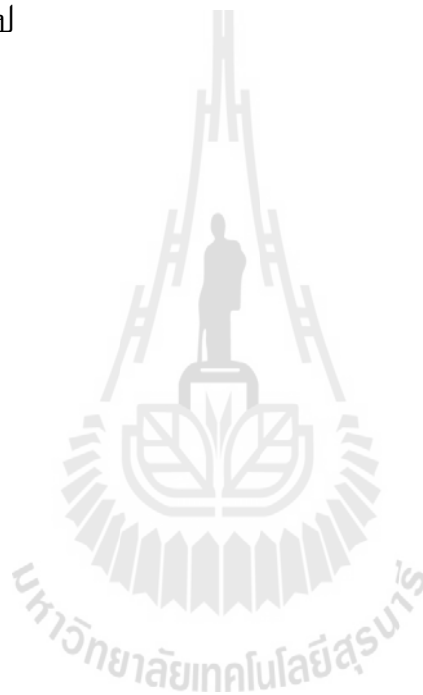
คณะผู้วิจัยทำการตรวจหาสลับของยีน RNF43(RNF43 polymorphism) ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี จำนวน 51 ราย โดยในการศึกษาคั้งนี้คณะผู้วิจัยพบสลับของยีน RNF43 ใน coding sequence (exon) ที่ 2, 3, 6 และ 9 จำนวน 4 ตำแหน่งตามลำดับ โดยที่ 3 ใน 4 ตำแหน่งดังกล่าวมีการรายงานในฐานข้อมูลสาธารณสุข (dbSNP database) แล้วและให้รหัส คือ Rs3744093 (c.139 A>G) Rs2257205 (c.350 G>A) และ Rs2285990 (c.662 C>T) สลับทั้งสามตำแหน่งนี้พบว่า Rs2257205 (c.350 G>A) มีความถี่สูงที่สุดคือ 72 % การพบ Rs2257205 มีความถี่สูงสุดในมะเร็งท่อน้ำดีนี้ ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษา Genome wide associated study (GWAS) ในมะเร็งตับอ่อนเทียบกับคนปกติ โดยพบว่าผู้ที่มี Rs2257205 จะมีความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับอ่อนโดยมีค่า odds ratio เท่ากับ 1.25 (Low SK et al., 2010) ซึ่งหลักฐานดังกล่าวทำให้สนับสนุนว่า Rs2257205 น่าจะมีความสำคัญกับความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งท่อน้ำดี เนื่องจากมะเร็งท่อน้ำดี และมะเร็งตับอ่อนมีรอยโรคเกิดขึ้นที่บริเวณอวัยวะใกล้เคียงกัน และยังมีการศึกษาที่สนับสนุนว่าเซลล์ท่อน้ำดีและเซลล์ตับอ่อนน่าจะมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน (Cardinale, V. et al., 2010 and Nakanuma, Y., 2010) และมากกว่านั้นยังมีรายงานการกลายพันธุ์ของยีน RNF43 ด้วยความถี่สูงในทั้งมะเร็งท่อน้ำดีและมะเร็งตับอ่อน (Ong CK et al., 2012 and Wu J et al., 2011) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยพบว่าผู้ป่วยที่มี Rs3744093 แบบ homozygous (GG genotype) หรือผู้ป่วยที่มี Rs2257205 แบบ homozygous (AA genotype) จะมีความสัมพันธ์กับระยะรอดชีพสั้น ซึ่งข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในยีน RNF43 อาจมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน RNF43 เป็นผลต่อการทำงานของยีนนี้ เนื่องจาก ยีน RNF43 นั้นถูกพิจารณาว่าเป็น tumor suppressor gene มีหน้าที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นถ้ายีน RNF43 มีความบกพร่องคือทำหน้าที่ได้มากขึ้นก็อาจส่งผลกระทบต่อส่งเสริมการพัฒนากาการเกิดมะเร็งได้ โดยการทดลองในมะเร็งตับพบว่าถ้ามีการยับยั้งการทำงานของยีน RNF43 มีผลให้เซลล์มะเร็งระดับหยุดการเพิ่มจำนวนและตาย (Xing C et al., 2013) เช่นเดียวกับผลการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยก็พบว่าเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีจะหยุดการเพิ่มจำนวนเมื่อการยับยั้งการทำงานของยีน RNF43 แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของ Rs2257205 และ Rs3744093 น่าจะเป็นหลักฐานที่สามารถยืนยันความสำคัญของสลับของยีน RNF43 ดังกล่าวได้ดี ซึ่งทางผู้วิจัยได้มีแผนในการศึกษาต่อไป

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปและข้อเสนอแนะ

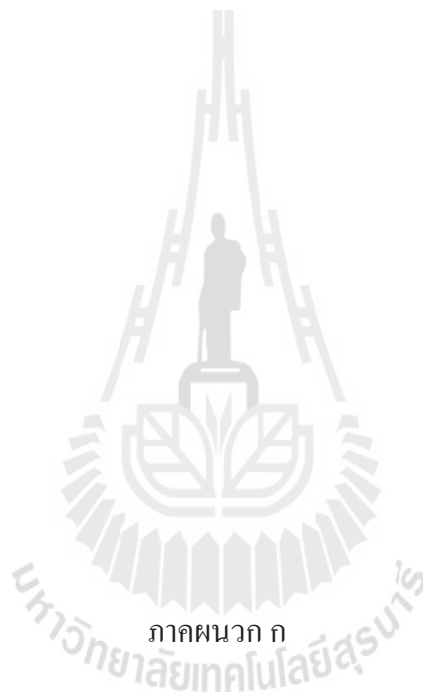
ในการศึกษาของคณะผู้วิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่ามีการกระจายของสนิปหลายๆตำแหน่ง ในยีน RNF43 และแต่ละตำแหน่งมีความถี่ของการตรวจพบในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีแตกต่างกัน โดยตำแหน่งที่พบว่ามีความถี่สูงในมะเร็งท่อน้ำดีคือ Rs2257205 ซึ่งสนิปนี้อาจจะถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้เพื่อพยากรณ์ความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีได้ในอนาคต ถ้าได้มีการศึกษาเพิ่มเติมในจำนวนตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งที่มากขึ้น และกลุ่มคนปกติ เนื่องจะทำให้ได้หลักฐานข้อมูลที่ต้องการแม่นยำ และการทำการทดลองในแง่บทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของ Rs2257205 ก็จะเป็นส่วนที่ช่วยยืนยันความสำคัญของสนิปนี้ในบทบาทการส่งเสริมการเป็นมะเร็งท่อน้ำดีต่อไป



บรรณานุกรม

1. Landis, S., Murray, T., Bolden, S., and Wingo, P. (1998). "Cancer statistics, 1998". *CA Cancer J Clin.* 48 (1): 6–29.
2. Parkin DM., Whelan SL., Ferlay J et al., (1997) "Cancer incidence in five continents" IARC Sci Publ. 143
3. Vatanasapt, V., Sriamporn, S., and Vatanasapt, P. (2002). "Cancer control in Thailand". *Jap. J. Clin. Oncol.* 32 Suppl :S82–91.
4. Low SK., Kuchiba A., Zembutsu H., et al., (2010) "Genome-Wide Association Study of Pancreatic Cancer in Japanese Population" *Plos One* 5 (7)
5. Uchida N., Tsunoda T., Wada S., et al., (2004) " Ring finger protein 43 as a target for cancer immunotherapy" *Clin Cancer Res.* 10 : 8577-86.
6. Shinada K., Tsukiyama T., Sho T., et al., (2011) "RNF43 interact with NEDL1 and regulate p53-mediated transcription" *Biochemical and Biophysical communication.* 404:143-47.
7. Wu J., Jiao Y., Molin MD., et al., (2011) " Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways" *PNAS.* 108(52), 21183-93.
8. Ong, C.K., Subimerb, C., Pairojkul, C., Wongkham, S., Cutcutache, I., Yu, W., McPherson, J.R., Allen, G.E., Ng, C.C.Y., Wong, B.H., Myint, S.S., Rajasegaran, V., Heng, H.L., Gan, A., Zang, Z.J., Wu, Y., Wu, J., Lee, M.H., Huang, D., Ong, P., Chan-On, W., Cao, Y., Qian, C.-N., Lim, K.H., Ooi, A., Dykema, K., Furge, K., Kukongviriyapan, V., Sripan, B., Wongkham, C., Yongvanit, P., Futreal, P.A., Bhudhisawasdi, V., Rozen, S., Tan, P., Teh, B.T. (2012) Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma *Nature Genetics*, 44 (6), pp. 690-693
9. Cardinale, V. et al. (2010). Multipotent stem cells in the biliary tree. *Ital J Anat Embryol* 115, 85-90
10. Nakanuma, Y. (2010) A novel approach to biliary tract pathology based on similarities to pancreatic counterparts: is the biliary tract an incomplete pancreas? *Pathol Int* 60, 419-29.
11. Wu J et al. (2011), Whole-exome sequencing of neoplastic cysts of the pancreas reveals recurrent mutations in components of ubiquitin-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(52):21188-93

12. Xing C et al., (2013) Reversing effect of ring finger protein 43 inhibition on malignant phenotypes of human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 12(1):94-103.



ตารางแสดง Primer สำหรับ polymerase chain reaction based capillary Sanger sequencing ของยีน RNF43

Primer Name	Primer sequence 5' - 3'	Exon region	PCR product (bp)
RNF-Ex2-F	GACTTGGCTTTCTGAAACGGAAG	Exon2 (coding start)	526
RNF-Ex2-R	GAATGCCAATAAGGCAGTATCTACTC	Exon2 (coding start)	
RNF-Ex3-F	CAGTGGTCACTAGCTTACTAAGAGG	Exon3	442
RNF-Ex3-R	CCACTTCTCTCAGACCAGTCATGG	exon3	
RNF-Ex4&5-F	CTTGCATAGGTAGATGTGAGTGTGC	Exon 4+5	598
RNF-Ex4&5-R	ATGAAGTTGGACTAGAGGGTTCCAG	Exon 4+5	
RNF-Ex6-F	CCACTTGCAGGTTCTCTCCATCC	Exon6	410
RNF-Ex6-R	CTGCTGGAAATCAACAAAGACAGACG	Exon6	
RNF-Ex7-F	GAACTCCTAAGGATGTTCAACTGG	Exon7	484
RNF-Ex7-R	CAATAGTGCTCTTCACTGGAAGG	Exon7	
RNF-Ex8-F	CTGTTAAGAAAGTTGCCAACGTC	Exon8	464
RNF-Ex8-R	GTGAGGCACTCTGGAGCAGTGATC	Exon8	
RNF-Ex9-1F	GAACAAAGGAGTCCCAGAGCACAG	Exon9	734
RNF-Ex9-1R	CAAAGTCACTGCTTAGGGAGCTGC	Exon9	
RNF-Ex9-2F	AGAGCAGCAGCGCCTGGCAGGAG	Exon9	614
RNF-Ex9-2R	CTGCTGAGTTGGATCTGGTGACTTGC	Exon9	
RNF-Ex9-3F	GTTTCCAGCCATGTCCACTACCAC	Exon9	509
RNF-Ex9-3R	TCTGGTAGCAGCCTCTTGCCAGG	Exon9	
RNF-Ex9-4F	CAGTACCAGCAGTCTGTTCAACTTG	Exon9	534
RNF-Ex9-4R	TTGGTTGTCATCTCTGCTGTATCC	Exon9	
RNF-Ex10-F	CCTTAGCTTTCAATCTAACCACC	Exon10	344
RNF-Ex10-R	CACCAGTCTCTCCAGTGCTTCTAG	Exon10	



Abstracts

P09 – Genomics and Proteomics

landscape of CCA had been demonstrated that beside the major cancer genes including TP53, KRAS and SMAD4, there is a novel mutated gene, RNF43, which was shown poor prognosis in patient bearing RNF43 mutation. Single nucleotide polymorphism (SNP) may play a more modest role in CCA susceptibility. We determined genetic variation in RNF43 of 52 CCA patients by PCR based – Capillary Sanger sequencing for all their coding sequence. High frequency of RNF43 polymorphism were found on exon 2 (Rs3744093 C>T; 36/52) and exon 3 (Rs2257205 A>G; 40/52) respectively. To determine whether RNF43, RING-type E3 ubiquitin ligase, involve in cell growth and survival, RNAi of the gene was performed. Knocking down of RNF43 in CCA cell lines (M214 and M156) lead to cell cycle arrest in G1. We also found that silencing RNF43 encouraged increasing level of p53 dependent transcription of p21. These preliminary data further elucidate the potential risk of genetic variation in RNF43 for CCA susceptibility and suggest that p53 pathway may regulated by RING – type E3 ubiquitin ligase in tumor progression and survival.

P09-34
Effect of silver nanoparticles at molecular level in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*

A. Burchardt¹, R. N. Carvalho¹, D. Gilliland², F. Rossi² and T. Lettieri¹

¹European Commission, Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability, Ispra, Italy, ²European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italy

Silver nanoparticles (AgNP) are among the most frequently used nanomaterials due to their antiseptic properties (1). Their application ranges from the industrial to the medical field and the release of silver nanoparticles to the aquatic environment is a major concern (2). It is expected that the use of nanoparticles will further increase in the future. Consequently, it is crucial to assess the potential toxic effects of AgNP on the aquatic organisms. In our studies the diatom *Thalassiosira pseudonana*, an ecological relevant organism (3) was used to investigate the effect of silver nanoparticles. We showed that the AgNP inhibited the growth of the diatoms and similar studies were performed as well with silver nitrate (AgNO₃). To investigate the mechanism of toxicity, we studied the response at molecular level. Based on the observed growth inhibition, concentrations of 10 and 1 μM for AgNP and 1 and 0.1 μM for AgNO₃ were selected for DNA microarray, corresponding approximately to the EC50 and 1/10 EC50, respectively. The transcriptomics profiles of AgNP and silver nitrate were compared and linked to the observed cytotoxicity, to understand the metabolic pathways involved and potentially to identify molecular biomarkers.

References

- [1] Nowack, B., H.F. Kring, and M. Height. 120 Years of nano-silver history: implications for policy makers. *Environ Sci Technol* 2011. 45(4): 1177–1183.
- [2] Fabrega, J., et al., Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ Int* 2010. 37(2): 517–31.
- [3] Carvalho, R.N., S.K. Bopp, and T. Lettieri. Transcriptomics responses in marine diatom *Thalassiosira pseudonana* exposed to the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene. *PLoS One*, 2011. 6(11): e26985.

P09-35
Proteomic profiles of gastro-intestinal neuroendocrine tumors

M. Aschie¹, A. F. Mitroiu², I. Poinareanu³ and D. Aschie⁴

¹Pathology Department, Faculty of Medicine, Ovidius University Constanta, Clinical County Emergency Hospital Constanta Romania, Constanta, Romania, ²Clinical County Emergency Hospital Constanta, Constanta, Romania, ³Pathology Department, Faculty of Medicine, Ovidius University Constanta, Constanta, Romania, ⁴Carol Davila Medical University Bucharest, Bucharest, Romania

Introduction: Neuroendocrine tumors are rare tumors of the interface between the endocrine and nervous system. Digestive tract neuroendocrine tumors account for 95% of all neuroendocrine tumors. In gastro-intestinal tract, carcinoids represent 20% of all digestive neoplasms and 6% of colorectal neoplasms. The estimated incidence is 8–100 000 individuals. **Materials and Methods:** In our study we investigated 22 cases of neuroendocrine digestive tumors hospitalized in Emergency Clinical County Hospital of Constanta. In these patients we determined pathologic and proteomic profiles of neuroendocrine tumors using markers like synaptophysin, neuron-specific enolase, Ki-67, PGP 9.5, chromogranin and broad-spectrum cytokeratins. **Results:** Our data suggested that neuroendocrine digestive tumors present variable localization with large intestine predominance. Grading of neuroendocrine tumors correlate with loco-regional and vascular invasion and positive diagnosis of neuroendocrine tumors was emphasized by immunohistochemical profile of these tumors. Primary tumor was identified in 95% cases and in 5% of cases was identified carcinoid invasion. Immunohistochemical profile for synaptophysin was intense positive in 58% of cases and moderate positive in 42% of cases regardless localization. Chromogranin A expression was moderate positive in 42% of cases, low positive in 40% of cases and negative in 18% of cases (neuroendocrine tumors with large intestinal localization). **Conclusions:** Neuroendocrine digestive tumors present variable localization with large intestine predominance localization. Grading of neuroendocrine tumors correlate with loco-regional and vascular invasion. Positive diagnosis of neuroendocrine tumors was emphasized by immunohistochemical profile of these tumors.

P09-36
Effect of endoglin isoforms on the monocyte proteome composition. Functional implications

M. Aristorena¹, F. J. Blanco², M. L. Ojeda², M. Casas¹,

A. Corbi¹, L. M^a. Botella¹ and C. Bernabeu¹

¹Centro de Investigaciones Biológicas – CSIC, Madrid, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

Endoglin (CD 105, TGF-β receptor III) is a homodimeric transmembrane glycoprotein that plays a crucial role in vascular remodeling and angiogenesis and is involved in important physiopathological processes such as hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT), preeclampsia or cancer. Two different alternatively spliced isoforms of endoglin have been reported, L-endoglin and S-endoglin. Endoglin expression is up-regulated during the monocyte/macrophage transition, but little is known about its role in the immune system. Interestingly, an increased expression of the S-endoglin isoform during senescence of the monocyte-macrophage lineage, in both human and murine models, was observed. To assess the individual effect of endoglin isoforms on the monocyte lineage, we performed a stable isotope labeling of amino

P09-30**An oligonucleotide-based microarray to detect and monitor mobile genetic elements**

H. D. Maldonado, M. M. Paz, V. P. García, P. S. M. Uriz, M. J. Gómez and F. J. López de Saro

Departamento de Evolución Molecular, Centro de Astrobiología (INTA-CSIC), Torrejón de Ardoz, Spain

Insertion sequences (IS) are regarded as the simplest type of transposons and, frequently, they contain a unique gene coding for the transposase required for their proliferation (by transposition) within the host genome. IS are modular elements that, when expanded, can promote recombination and chromosomal rearrangements, contributing to genome plasticity and genetic variability in bacterial populations.

We have designed and constructed an oligonucleotide-based microarray of transposase genes present in the genomes of acidophilic organisms. This microarray has allowed us to detect and quantify changes over time in the population of transposases of bacteria in environmental samples from the Tinto river (Huelva), an extremely acidic (pH 2) habitat. We have also used the array to detect expression of transposase genes.

Additionally, we have used the microarray to monitor changes in genomic IS abundance in a strain of *Acidiphilium* sp. grown in culture over three years (2007–2011). *Acidiphilium* sp. contains a large number of transposases in its genome which probably contribute to genomic plasticity. Although most ISs remained stable over this time period, we observed the disappearance of some ISs and the proliferation of others.

The results indicate that the IS microarray is a useful tool for studying the dynamics of transposons and other mobile elements in bacterial populations.

P09-31**Single nucleotide polymorphisms in relation to reduced bone mineral density and osteoporotic fractures in a young Caucasian woman**B. Aydinol¹, K. Nas² and M. M. Aydinol³*¹Biochemistry Department, Medical Faculty, Dicle University, Diyarbakir, Turkey, ²Physical Therapy and Rehabilitation, Medical Faculty, Dicle University, Diyarbakir, Turkey, ³Medical Doctor, Diyarbakir, Turkey*

Osteoporosis is a common disease which is characterised by reduced bone mass and increased risk of fracture. Osteoporosis is a highly heritable trait. Many candidate genes have been proposed as being involved in regulating bone mineral density (BMD). Candidate genes which have been studied in relation to BMD and osteoporotic fractures include collagen type1 gene, calcitonin receptor gene, estrogen receptor gene and vitamin D receptor gene. We present here a case of 32 years old a young woman who is Caucasian origin, who lives in Diyarbakir now. Her BMD in the lumbar spine and femur were -3.2 T score and -2.4 T score respectively. We used Dual x-ray absorptiometry (DEXA) for measuring BMD. We used Clinical arrays Meta-Bone assay) to detect polymorphisms. This method is based a low density chip at the bottom of an classical 2 ml tube. DNA was extracted from blood with EDTA. DNA amplification, denaturation, hybridization and the other steps were carried out respectively. Biochemical analysis, complete blood analysis and complete hormonal measurements were recorded to exclude an underlying secondary cause of osteoporosis. We analysed Col1A1-SP1, polymorphism for collagen type1 gene, CTR-ALU1 polymorphism, for calcitonin receptor gene, ESR1X-XBAI,

ESR1P-PVUII polymorphisms for estrogen receptor gene, VDRF-FOKI, and VDRB-BSMI polymorphisms for vitamin D receptor gene. The analysis showed us that her genotype was SS, aa, PP, Xx, BB, FF. (Normal genes are indicated by capital letters). Positive associations between these single nucleotide polymorphisms (SNPs) and bone density were reported by several studies. These type of studies will help us to take clinical decision and support certain therapies, especially for early age fractures and early treatment for bone prevention.

Keywords: osteoporosis, BMD, estrogen, vit D, calcitonin, receptor gene, Col1A1, SNP.

P09-32**Saccharomyces cerevisiae genome-wide screen for the identification of K2 killer toxin effectors**E. Serviene¹, I. Orentaite¹, J. Lukša¹, M. Podoliankaite¹,I. Galvonaite¹, D. L. J. Lafontaine² and J. Urbonavicius²*¹Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania, ²CMMI, Académie Wallonie-Bruxelles, Charleroi-Gosselies, Belgium, ³Institute of Biochemistry, Vilnius University, Vilnius, Lithuania*

Biotoxins are widespread molecules involved in microbial pathogenicity and self-defense mechanisms, directly relevant to human health and the food industry. Understanding how they work is of prime importance to clinical and applied research. The budding yeast (*S. cerevisiae*) killers serve as a good model to study the activity of biotoxins. The characterization of such toxins has consistently provided significant insights into the basic mechanisms of self-defense and therefore immunity, in the mechanisms of virus-host cell interactions and toxin entry into eukaryotic target cells.

In order to identify gene products modulating the sensitivity to K2 killer toxin, we conducted several concurrent genome-wide screens in *S. cerevisiae* and identified 205 genes involved in resistance and 127 in sensitivity. We conclude that the gene products involved in resistance and sensitivity strikingly belong to distinct gene ontology families. Importantly, most genes identified in our screens (~70%) had not previously been linked to the biology of K1 and K28 killer toxins, indicating strong specificity towards K2 toxin. K2 effectors are involved in cell wall structure/biogenesis, stress-induced cell signaling, ion and pH homeostasis, and the generation of ATP. Our work demonstrates that despite the fact that K1 and K2 toxins share some aspects of their killing strategies they rely on strikingly different molecular actors to do so.

P09-33**Aberrant Ring finger protein 43 (RNF43) and their proliferative role in cholangiocarcinoma**C. Talabnin¹, C. K. Ong², C. Pairojikul³, S. Wongkham⁴ and B. T. Teh⁵*¹School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Muang, Thailand, ²NCCS-VARI Translational Research Laboratory, Division of Medical Sciences, National Cancer Centre, Singapore, Singapore, ³Department of Pathology and Liver fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khonkaen, Thailand, ⁴Department of Biochemistry and Liver fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khonkaen, Thailand, ⁵NCCS-VARI Translational Research Laboratory, Division of Medical Sciences, National Cancer Centre, Singapore, Singapore*

Cholangiocarcinoma (CCA) is devastating cancers and is increasing both worldwide incidence and mortality rate. A mutation

Aberrant Ring finger protein 43 (RNF43) and their proliferative role in cholangiocarcinoma



Chutima Talabnini¹, Choon Kiat Ong^{2,6}, Chawalit Pairojku^{3,4}, Sopi Wongkham^{5,4}, Bin Tean Teh^{5,6}

¹School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University, 30000, Thailand; ²Department of Biochemistry, Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002, Thailand; ³Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, 40002, Thailand; ⁴NCCS-VART Translational Research Laboratory, Division of Medical Sciences, National Cancer Centre, 11 Hospital Drive, #11-01, Singapore; ⁵Laboratory of Cancer Therapeutics, Division of Cancer and Stem Cell Biology, DUKE-NUS Graduate Medical School, 8 College Road, 116867, Singapore

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is devastating cancers and is increasing both worldwide incidence and mortality rate. A mutation landscape of CCA had been demonstrated that beside the major cancer genes including TP53, KRAS and SMAD4, there is a novel mutated gene, RNF43, which was showed poor prognosis in patient bearing RNF43 mutation. Single nucleotide polymorphism (SNP) may play a more modest role in CCA susceptibility. Preliminary study, we determined genetic variation in RNF43 of 52 CCA patients by PCR based - Capillary Sanger sequencing for all their coding sequence. High frequency of RNF43 polymorphism were found on exon 2 (Rs3744093 C>T, 96.9%) and exon 3 (rs2297205 A>G, 40.8%) respectively. To further determined biological functions whether RNF43, RING-type E3 ubiquitin ligase, involve in cell growth and survival through regulation of p53 pathway. Knocking down of RNF43 in CCA cell lines (KKU-M214 with TP53 wild type) lead to cell cycle arrest in G1 but not KKU-M139 with TP53 deletion. We also showed that RNF43 knockdown encouraged increasing level of p53 dependent transcription of p21. These preliminary data further elucidate the potential risk of genetic variation in RNF43 for CCA susceptibility and suggest that p53 pathway may regulated by RING-type E3 ubiquitin ligase in tumor progression and survival.

Material and Method

Genomic DNA was extracted using a Qiagen genomic DNA kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany, Cat #10243). Extracted DNA samples were whole genome amplified with Qiagen's REPLI-g WGA system (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany, Cat #150046). The coding sequences of RNF43 genes were Sanger sequenced to determine somatic mutation frequencies and single nucleotide polymorphism (SNP).

Knockdown of RNF43 in CCA cell lines were performed with RNF43 siRNA duplex (Santa Cruz, Cat. Sc94184) and Control siRNA-A (Santa Cruz, Cat. Sc47007) and checked for phenotypes changes via DNA contents analysis by flow cytometer (FACS Calibur, BD, USA). Western blot was performed, to check the pathway of RNF43 activation.

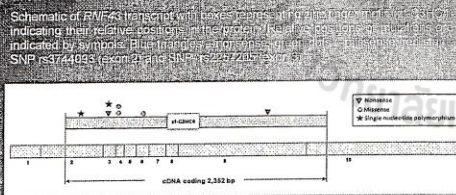
Result

Table 1. Frequently somatic mutated genes identified in 54 OV-associated CCA

Genes	Number of subjects harboring non-synonymous mutation (N=54)		
	Total Mutation subjects	Missense	Nonsense, Splice site, or Indel
TP53	24 (44.4%)	13 (54.2%)	11 (45.8%)
KRAS	9 (16.67%)	8 (100%)	0
SMAD4	9 (16.67%)	5 (55.6%)	4 (44.4%)
MLL3	8 (14.8%)	2 (25%)	6 (75%)
ROBO2	5 (9.3%)	2 (40%)	3 (60%)
GNAS	5 (9.3%)	5 (100%)	0
RNF43	5 (9.3%)	3 (60%)	2 (40%)

**Data from Chutima Talabnini et al.

Figure 1. Somatic mutation and single nucleotide polymorphism of RNF43



Discussion and Conclusion

Cholangiocarcinoma (CCA) is devastating cancers and is increasing both worldwide incidence and mortality rate. A mutation landscape of CCA had been demonstrated that beside the major cancer genes including TP53, KRAS and SMAD4, there is a novel mutated gene, RNF43, which was showed poor prognosis in patient bearing RNF43 mutation. Single nucleotide polymorphism (SNP) may play a more modest role in CCA susceptibility. Preliminary study, we determined genetic variation in RNF43 of 52 CCA patients by PCR based - Capillary Sanger sequencing for all their coding sequence. High frequency of RNF43 polymorphism were found on exon 2 (Rs3744093 C>T, 96.9%) and exon 3 (rs2297205 A>G, 40.8%) respectively. To further determined biological functions whether RNF43, RING-type E3 ubiquitin ligase, involve in cell growth and survival through regulation of p53 pathway. Knocking down of RNF43 in CCA cell lines (KKU-M214 with TP53 wild type) lead to cell cycle arrest in G1 but not KKU-M139 with TP53 deletion. We also showed that RNF43 knockdown encouraged increasing level of p53 dependent transcription of p21. These preliminary data further elucidate the potential risk of genetic variation in RNF43 for CCA susceptibility and suggest that p53 pathway may regulated by RING-type E3 ubiquitin ligase in tumor progression and survival.

Table 2. Clinicopathological characteristics of patients with RNF43 mutations

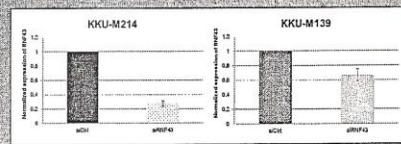
Sample	Sex	Age	Histology	Stage	RNF43 mutation	TP53 mutation
A574	M	55	WD tubular adenocarcinoma	NA	Missense	Wild type
A1E9	M	55	Papillary carcinoma	IIb	Nonsense	Nonsense
R104	F	64	WD tubular adenocarcinoma	III	Missense	Wild type
U544	M	57	Papillary carcinoma	IIIb	Missense	Nonsense
W012	F	61	WD tubular adenocarcinoma	III	Nonsense	Missense

Table 3. Frequency of RNF43 polymorphism in 52 CCA patients

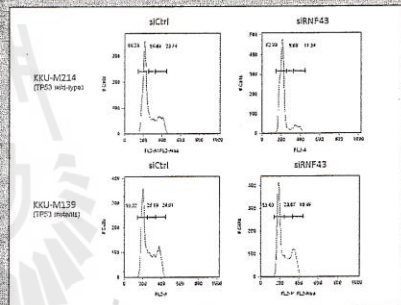
SNP (dbSNP132)	Nucleotide alteration	Frequency of RNF polymorphism	Remarkable
Rs3744093	C > T	36 (69%)	High frequency in patients with pancreatic cancer by Grewal, et al., PLoSOne, 2010
rs2297205	A > G	40 (77%)	

Figure 2. Knockdown of RNF43 expression in CCA cell line

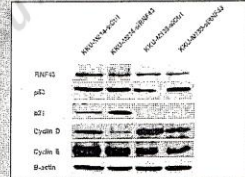
A. Verification of RNF43 knockdown by Real-time RT-PCR



B. Silencing RNF43 induces cell cycle arrest in silencing KKU-M214 with wild type TP53, but not KKU-M139 with a TP53 deletion mutation



C. Knockdown of RNF43 encourages p53 dependent activation of p21 in silencing pathway



ประวัติผู้วิจัย

ดร.ชุตินา ตลับนิล เป็นอาจารย์สาขาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เกิดเมื่อวันที่ 13 เมษายน พ.ศ. 2525 สถานที่เกิดจังหวัดนครราชสีมา การศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีที่สำเร็จการศึกษา พ.ศ. 2547 และระดับปริญญาเอก ปรัชญาคุณวุฒิบัณฑิต (ชีวเคมีทางการแพทย์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีที่สำเร็จการศึกษา พ.ศ. 2553 หลังจบการศึกษาระดับปริญญาเอก ทำงานเป็นนักวิจัยที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติประเทศสิงคโปร์ (National Cancer Centre Singapore) เป็นเวลา 18 เดือน ก่อนมารับตำแหน่งเป็นอาจารย์ สาขาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ สถานที่ติดต่อ อาคารวิชาการ 2 ชั้น 4 ห้อง C2 406 สาขาวิชาเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000 โทร. 044 224 254 แฟกซ์ 044 224 648 หรือ Email: chutima.sub@sut.ac.th, chutima_kku@yahoo.com

ผลงานตีพิมพ์ (ย้อนหลัง 5 ปี)

- ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ
Bhudhisawasdi V, Khuntikeo N, Chur-in S, Pugkhem A, Talabnin C, Wongkham S.
Cholangiocarcinoma: Experience of Srinagarind Hospital (2012) Srinagarind Med J, 27, pp 331-9
- ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ
Chusorn P., Namwat N., Loilome W., Techasen A., Pairojkul C., Khuntikeo N., Dechakhamphu A., Talabnin C., Chan-On W., Ong C. K., Teh BT., Yongvanit P. Overexpression of microRNA-21 regulating PDCD4 during tumorigenesis of liver fluke-associated cholangiocarcinoma contributes to tumor growth and metastasis. Tumor Biology. DOI 10.1007/s13277-013-0688-0 (Published online 17 February 2013)
- Bhudhisawasdi, V., Pugkhem, A., Talabnin, C., Khuntikeo, N., Seow, OT., Chur-in, S., Wongkham, S. Evaluation of postoperative adjuvant chemotherapy for intrahepatic cholangiocarcinoma patients with R1 and R2 resections (2012) Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, (13), KGU supplement pp.169-174.
- Ong, C.K., Subimerb, C., Pairojkul, C., Wongkham, S., Cutcutache, I., Yu, W., McPherson, J.R., Allen, G.E., Ng, C.C.Y., Wong, B.H., Myint, S.S., Rajasegaran, V., Heng, H.L., Gan, A., Zang, Z.J., Wu, Y., Wu, J., Lee, M.H., Huang, D., Ong, P., Chan-On, W., Cao, Y., Qian, C.-N., Lim, K.H., Ooi, A., Dykema, K., Furge, K., Kukongviriyapan, V., Sripa, B., Wongkham, C., Yongvanit, P., Futreal, P.A., Bhudhisawasdi, V., Rozen, S., Tan, P., Teh, B.T. Exome

sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma (2012) *Nature Genetics*, 44 (6), pp. 690-693.

Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C.K., Stephens, P., Davies, H., Jones, D., Lin, M.-L., Teague, J., Bignell, G., Butler, A., Cho, J., Dalgliesh, G.L., Galappaththige, D., Greenman, C., Hardy, C., Jia, M., Latimer, C., Lau, K.W., Marshall, J., McLaren, S., Menzies, A., Mudie, L., Stebbings, L., Largaespada, D.A., Wessels, L.F.A., Richard, S., Kahnoski, R.J., Anema, J., A.tuveson, D., Perez-Mancera, P.A., Mustonen, V., Fischer, A., Adams, D.J., Rust, A., Chan-On, W., Subimerb, C., Dykema, K., Furge, K., Campbell, P.J., Teh, B.T., Stratton, M.R., Futreal, P.A. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma (2011) *Nature*, 469 (7331), pp. 539-542.

Subimerb, C., Pinlaor, S., Lulitanond, V., Khuntikeo, N., Okada, S., McGrath, M.S., Wongkham, S. Circulating CD14⁺CD16⁺ monocyte levels predict tissue invasive character of cholangiocarcinoma (2010) *Clinical and Experimental Immunology*, 161 (3), pp. 471-479.

Subimerb, C., Pinlaor, S., Khuntikeo, N., Leelayuwat, C., Morris, A., McGrath, M.S., Wongkham, S. Tissue invasive macrophage density is correlated with prognosis in cholangiocarcinoma (2010) *Molecular Medicine Reports*, 3 (4), pp. 597-605.