

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพิสูจน์การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ชาวไทย

ผู้เขียน นายวรกาญจน์ วงศ์จันทร์คำ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ถักษณา มกรแก้วเกษร	ประธานกรรมการ
ดร. วิโรจน์ ต้นติเวชอภิกุล	กรรมการ
รศ. สุมาลี ศิริอังกุล	กรรมการ

#### บทคัดย่อ

มะเร็งรังไข่เป็นมะเร็งที่พบบ่อยในระบบอวัยวะสืบพันธุ์สตรีเนื่องจากมะเร็งรังไข่ไม่แสดงอาการจึงไม่ได้รับวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งในระยะเริ่มแรก ผู้ป่วยจะทราบหลังจากมีการลุกลามของมะเร็งแล้ว มะเร็งรังไข่จะพบการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่ง codon 12 และ codon 13 โดยเฉพาะพบมากในมะเร็งรังไข่ชนิด mucinous และเชื่อว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวมีส่วนสำคัญในเกิดมะเร็งรังไข่ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่ง codon 12 และ codon 13 ในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ชาวไทยและความสัมพันธ์กับลักษณะทางพยาธิวิทยา โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อมะเร็ง 82 ตัวอย่าง ด้วยวิธี salting out และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่ง codon 12 และ codon 13 ในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ โดยใช้เทคนิค amplified created restriction site (ACRS) ร่วมกับ polymerase chain reaction -restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ทำการขยายยีนโดยใช้ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดจุดตัดของเอนไซม์ *Bst*VI (codon 12) และ *Hea*III (codon 13) ในอัลลิลปกติ พบการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่ง codon 12 และ codon 13 จำนวน 15 ใน 82 รายคิดเป็น 18.29% ซึ่ง 14 รายมีกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง codon 12 และมีเพียง 1 รายมีกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง codon 13 การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่ง codon 12 พบจำนวน 8 รายเป็นมะเร็งรังไข่ชนิด mucinous tumors of LMP คิดเป็น 53.33%, 2 รายเป็นชนิด

mucinous adenocarcinomas คิดเป็น 13.33%, จำนวน 2 ใน 5 รายของมะเร็งรังไข่ชนิด serous tumors of low malignant potential (LMP) คิดเป็น 13.33%, 1 รายเป็นชนิด endometrioid tumors of LMP (6.67%), และ 1 รายเป็น metastatic adenocarcinoma (6.67%) การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ที่ตำแหน่ง codon 13 พบเพียง 1 รายในมะเร็งรังไข่ชนิด mixed epithelial tumors of LMP คิดเป็น 6.67% จะเห็นว่าการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในมะเร็งรังไข่ชนิด mucinous (จำนวน 10 ใน 15 ราย คิดเป็น 66.67%) มีจำนวนมากกว่าที่พบในมะเร็งรังไข่ชนิดอื่น (จำนวน 5 ใน 15 ราย คิดเป็น 33.33%) และการกลายพันธุ์ยังพบบ่อยในระยะ low malignant potential (จำนวน 12 ใน 15 รายคิดเป็น 80%) มากกว่าในระยะ malignant (จำนวน 3 ใน 15 ราย คิดเป็น 20%) นอกจากนี้ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดเบสที่ตำแหน่ง codon 12 และ 13 ของยีน *K-ras* โดยการหาลำดับเบสด้วยวิธี dideoxynucleotides chain termination ลำดับเบสปกติของ codon 12 และ 13 ของยีน *K-ras* คือ GGT และ GGC การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง codon 12 ประกอบด้วย 5 รายที่มีการกลายพันธุ์จาก GGT ไปเป็น GAT (ไกลซีน → กรดแอสปาดิก), 4 รายที่มีการกลายพันธุ์จาก GGT ไปเป็น GTT (ไกลซีน → วาลีน), 3 รายที่มีการกลายพันธุ์จาก GGT ไปเป็น GCT (ไกลซีน → อะลานีน), และ 2 รายที่มีการกลายพันธุ์จาก GGT ไปเป็น CGT (ไกลซีน → อาร์จินีน) พบ 1 รายมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 13 จาก GGC ไปเป็น GAC (ไกลซีน → กรดแอสปาดิก) การเปลี่ยนแปลงชนิดเบสพบมากในตำแหน่งเบสตัวที่สองของทั้ง codon 12 และ codon 13 การกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ทำให้เกิดการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนในบริเวณที่สำคัญอันอาจมีผลต่อโปรตีน Ras

ความรู้จากการศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *K-ras* ในครั้งนี้ เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการที่จะศึกษาต่อไปในด้านกลไกของการเกิดมะเร็งรังไข่ในประชากรไทย

**Thesis Title** Identification of *K-ras* Mutation in Thai Ovarian Cancer Patients

**Author** Mr. Worakarn Wongchankham

**Degree** Master of Science (Biochemistry)

**Thesis Advisory Committee**

Assoc. Prof. Dr. Luksana Makonkawkeyoon Chairperson

Dr. Wirort Tuntiwechapikul Member

Assoc. Prof. Sumalee Siriaungkul Member

**Abstract**

Ovarian cancer is the second common malignancy of the female genital tract, which is the leading cause of death from gynecological malignancies. Most of ovarian cancer patients are diagnosed at the advanced stages of disease because lacking of clear definable symptoms. Mutations at codon 12 and codon 13 of *K-ras* gene have been reported in ovarian cancer, particularly with high frequency in mucinous subtype, and they are believed to play an important role in ovarian cancer development. The present study was designed to investigate the presence of the mutations at codon 12 and codon 13 of *K-ras* gene in Thai ovarian cancer patients. The results were subsequently correlated with clinicopathological data. The 82 Thai genomic DNA samples were extracted from ovarian cancer tissue by salting out technique and precipitation with ethanol. The mutations at codon 12 and codon 13 of *K-ras* gene were examined by using amplified created restriction site (ACRS) with polymerase chain reaction (PCR) – restriction fragment length polymorphism (RFLP). The mismatched forward primer (codon 12) and reverse primer (codon 13) were used to amplified created restriction site for *Bst*NI (codon 12) and *Hea*III (codon 13) restriction endonuclease in the normal allele. The total *K-ras* mutation at codon 12 and codon 13 were 18.29% (15 of 82), including 14 cases of mutation at codon 12 and one case of mutation at codon 13. The mutations at codon 12 of *K-ras* gene were found in 8 mucinous

tumors of low malignant potential (LMP) (53.33%), 2 mucinous adenocarcinomas (13.33%), 2 serous tumors of LMP (13.33%), one endometrioid tumors of LMP (6.67%), and one metastatic adenocarcinoma (6.67%). One mutation at codon 13 of *K-ras* gene was found in mixed epithelial tumors of LMP (6.67%). The high incidence of *K-ras* mutations was observed in mucinous ovarian tumors (66.67%: 10 of 15) than nonmucinous ovarian tumors (33.33%: 5 of 15), and was frequently detected in the tumors of low malignant potential (80%: 12 of 15) than malignant ovarian tumors (20%: 3 of 15). The nucleotide substitutions at codon 12 and codon 13 of *K-ras* gene were confirmed by DNA sequencing using dideoxynucleotides chain termination method. The normal nucleotide sequence at codon 12 and codon 13 of *K-ras* gene were GGT and GGC, respectively. The point mutation at codon 12 included five cases of mutation from GGT to GAT (Glycine→Aspartate), four cases of mutation from GGT to GTT (Glycine→Valine), three cases of mutation from GGT to GCT (Glycine→Alanine), and two cases of mutation from GGT to CGT (Glycine→Arginine). For the only mutation at codon 13, the codon was changed from GGC to GAC (Glycine→Aspartate). The high frequencies nucleotide changes were detected in the second position of both codon 12 and codon 13. The point mutation of *K-ras* gene has an altered amino acid at the critical position.

This knowledge of the *K-ras* mutation will use to be an initial database for further studies in the mechanism of ovarian tumorigenesis in Thai population.