

Thesis Title *TP53* Gene Mutation of Lung Cancer Patients in Northern Thailand and Its Association with Risk Factors

Author Mrs. Kanokkan Bumroongkit

Degree Doctor of Philosophy (Biology)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Daorong Kangwanpong Chairperson
 Assoc. Prof. Samreung Rangdaeng, M.D. Member
 Prof. Dr. Bruce Rannala Member

ABSTRACT

TP53 mutations were observed in about 40-70% of lung cancer tissues. Mutations of this gene, causing by environmental carcinogens, have been detected at the early stage of lung cancer. Most of the mutations are found in exons 5 to 8. Distinct *TP53* mutational patterns have been reported to be different among populations. The ethnic difference, variation of the exogenous carcinogen exposure, or difference in life style may be responsible for these differences. The present research aims to identify the environmental risk factors that influence *TP53* gene mutation in lung cancer patients residing in the northern part of Thailand, where lung cancer incidence is higher than in the other parts of the country. Since there are evidences from previous studies that the

carriers of *TP53* gene germline mutations may be at increased risk for carcinoma of the lung, the comparison study of exons 5-8 of *TP53* germline mutation transmission, between patients, their families (first-degree relative and sibling) and control group, was also performed. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes of the patients, their relatives and the control, as well as the cancerous and normal lung tissues of each patient. The *TP53* gene at exons 5-8 were amplified and sequenced. DNA sequences were then compared with the reference DNA sequence of the *TP53* gene from GenBank (accession no. X54156).

The result from 55 patients, 57 controls and 8 patients' parents showed that there was no *TP53* germline mutation in DNA extracting from peripheral blood leucocytes. It indicated that *TP53* germline mutation at exon 5-8 was not exclusively responsible for cancer predisposition in this group of lung cancer patients. However, 19 somatic mutations were found in 18 patients (32.7%). Of these, 6 (31.6%), 2 (10.5%), 3 (15.8%) and 6 (31.6%) mutations were in exon 5, 6, 7 and 8 respectively, while the rest was observed at splice donor site and splice acceptor site of intron 7 (10.5%). The majority of mutations were transitional base substitutions G to A. Most of the mutations were found in the squamous cell carcinoma. No characteristic hotspot codon was observed. The **GCC→ACC** at codon 138 of exon 5 (position 13091), **GTG→GTA** at codon 217 of exon 6 (position 13411), and **CTG→CGG** at codon 265 of exon 8 (position 14463) observing in this research project were not reported in the latest updated IARC somatic mutation database R12 and UMD p53 database 2007_R1c. Thus, it is possible that the mentioned mutations are novel mutations never be reported in lung cancer. The data suggested that

TP53 mutations in the studied group were induced by exposure to substances other than tobacco smoke. Pesticide exposure, habitation in poorly ventilated houses i.e., cement house, or having kitchen inside the house, were significantly associated with *TP53* mutations.

Apart from the mutations found in the exons, there were 9 polymorphisms in the intron 7. All of these polymorphisms, except those at positions 14181 and 14201, had different base pair from the reference sequence in all patients and controls, whereas the base pair at positions 14181 and 14201 varied among each individual. Allele frequencies at position 14181 and 14201 in the studied population were consistent with the previously reported Asian populations, and these polymorphisms did not contribute to the susceptibility of lung cancer.

The features of *TP53* mutations in this research were both consistent and different comparing to other reports. Different ethnicity and environmental mutagen might influence the occurrence of *TP53* mutations which lead to lung cancer development. It is possible that *TP53* mutations are induced by a different exposure other than tobacco smoke. The *TP53* gene mutation spectrum from this study is the valuable data for future study of lung cancer prevention.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การกลายพันธุ์ของยีน ทีพี53 ของผู้ป่วยมะเร็งปอดใน ภาคเหนือของประเทศไทยและความสัมพันธ์กับปัจจัยเสี่ยง		
ผู้เขียน	นางกนกกาญจน์ บำรุงกิจ		
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)		
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ดาวรุ่ง	กังวานพงศ์	ประธานกรรมการ
	รศ. นพ. สำเริง	รางแดง	กรรมการ
	Prof. Dr. Bruce Rannala		กรรมการ
	บทคัดย่อ		

การกลายพันธุ์ของยีน ทีพี53 พบได้มากประมาณ 40-70% ในเนื้อเยื่อมะเร็งปอด การกลายพันธุ์ของยีนนี้ สามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ในระยะแรกๆ ของมะเร็งปอด ซึ่งอาจเป็นผลจากการได้รับสารก่อมะเร็งในสภาพแวดล้อม การกลายพันธุ์ของยีนนี้พบได้มากในบริเวณแอกซอน 5 ถึง 8 มีรายงานวิจัยหลายชิ้นระบุว่า จำนวนและรูปแบบการกลายพันธุ์ของยีน ทีพี53 มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากร ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิดจากเชื้อชาติที่ต่างกัน หรือได้รับสารก่อมะเร็งในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน รวมไปถึงลักษณะการดำเนินชีวิตที่ต่างกัน งานวิจัยนี้จึงประสงค์ที่จะศึกษาถึงผลของปัจจัยต่างๆ ในสิ่งแวดล้อมต่อการกลายพันธุ์ของยีนทีพี53 ในผู้ป่วยมะเร็งปอดที่อาศัยอยู่ในภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอุบัติการณ์ของมะเร็งปอดสูงกว่าส่วนอื่นของประเทศ และเนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ผู้ที่มี germline mutation ของยีนทีพี53 มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งปอดเพิ่มขึ้น การวิจัยนี้จึงศึกษาเปรียบเทียบการถ่ายทอด germline mutation ของยีนนี้ที่แอกซอน 5 ถึง 8 ในผู้ป่วยมะเร็งปอดและครอบครัว (ญาติสายตรงและพี่น้องผู้ป่วย) กับกลุ่มควบคุม เพื่อดูว่า germline mutation มีผลต่อการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งปอดของประชากรกลุ่มนี้หรือไม่ ดำเนินการวิจัยโดยสกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย ญาติผู้ป่วย และ กลุ่มควบคุม กับสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อมะเร็งปอด และเนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยแต่ละราย แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่แอกซอน 5 ถึง 8 ของยีนทีพี53 กับหาลำดับเบส จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงจาก GenBank (accession no. X54156)

ผลการศึกษาจากผู้ป่วย 55 รายและกลุ่มควบคุม 57 ราย รวมทั้งจากบิดา-มารดาของผู้ป่วยอีก 8 ราย ไม่พบ germline mutation ในดีเอ็นเอที่สกัดจากเม็ดเลือดขาว ซึ่งให้เห็นว่า germline *TP53* mutation ในส่วนของแอกซอนนี้ ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปอดในผู้ป่วยกลุ่มนี้ แต่พบว่ามี somatic mutation 19 ตำแหน่ง ในดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อมะเร็งปอดของผู้ป่วย 18 ตัวอย่าง (ร้อยละ 32.7) โดยพบที่แอกซอน 5 จำนวน 6 ตำแหน่ง (ร้อยละ 31.6) แอกซอน 6 จำนวน 2 ตำแหน่ง (ร้อยละ 10.5) แอกซอน 7 จำนวน 3 ตำแหน่ง (ร้อยละ 15.8) และ แอกซอน 8 จำนวน 6 ตำแหน่ง (ร้อยละ 31.6) ที่เหลือพบที่ splice donor site และ splice acceptor site ของ อินทรอน 7 บริเวณละ 1 ตำแหน่ง (ร้อยละ 10.5) การกลายพันธุ์ชนิดที่พบมากที่สุด คือการแทนที่ของเบสแบบ G to A transition และการกลายพันธุ์ส่วนใหญ่พบในมะเร็งปอดชนิด squamous cell carcinoma ไม่มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งใดๆ ซ้ำกันเป็น hot spot การกลายพันธุ์ชนิด GCC→ACC ที่โคดอน 138 ของแอกซอน 5 (ตำแหน่งคู่เบสที่ 13091), GTG→GTA ที่โคดอน 217 ของแอกซอน 6 (ตำแหน่งคู่เบสที่ 13411), และ CTG→CGG ที่โคดอน 265 ของแอกซอน 8 (ตำแหน่งคู่เบสที่ 14463) ซึ่งพบในงานวิจัยนี้ ไม่ปรากฏในฐานข้อมูล IARC somatic mutation database R12 and UMD p53 database 2007_R1c ที่ปรับปรุงครั้งล่าสุด จึงน่าจะเป็นไปได้ว่าการกลายพันธุ์ทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นการกลายพันธุ์ชนิดใหม่ ที่ยังไม่มีผู้ใดรายงานมาก่อนในผู้ป่วยมะเร็งปอด เมื่อทดสอบผลของปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมต่อการกลายพันธุ์ พบว่าการใช้ยาฆ่าแมลงหรือสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และการอาศัยอยู่ในบ้านที่มีอากาศถ่ายเทไม่ดี ได้แก่บ้านซีเมนต์หรือบ้านที่มีห้องครัวอยู่ภายในบ้าน มีผลต่อการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่พี 53 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากพบการกลายพันธุ์ที่แอกซอนแล้ว งานวิจัยนี้ยังพบพอลิมอร์ฟิซึมในอินทรอน 7 อยู่ 9 ตำแหน่ง โดยพบว่าทุกตำแหน่งของพอลิมอร์ฟิซึมในผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมทุกคน ยกเว้นที่ตำแหน่งคู่เบสที่ 14181 และ 14201 มีคู่เบสที่แตกต่างไปจากลำดับเบสอ้างอิง ในขณะที่คู่เบสตำแหน่ง 14181 และ 14201 ของแต่ละคนจะแตกต่างกัน โดยค่าความถี่อัลลีลในพอลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่งคู่เบส 14181 มีค่าเท่ากับที่ตำแหน่ง 14201 และมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มประชากรอื่นของเอเชียที่เคยรายงานไว้ พอลิมอร์ฟิซึมเหล่านี้ไม่มีผลต่อการเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งปอด

ลักษณะการกลายพันธุ์ของยีนที่พี 53 ในงานวิจัยนี้ มีทั้งที่สอดคล้องและแตกต่างกับงานวิจัยอื่นๆที่รายงานไว้ แต่ก็พอสรุปได้ว่า ความแตกต่างระหว่างเชื้อชาติและสารก่อกลายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการกลายพันธุ์ของยีน ซึ่งนำไปสู่การเกิดมะเร็งปอด จึงเป็นไปได้ว่าการกลายพันธุ์ของยีนที่พี 53 อาจเกิดจากปัจจัยอื่น นอกเหนือไปจากการสูบบุหรี่ ซึ่งหากรู้ถึงปัจจัยที่มีผลต่อการกลายพันธุ์ ก็จะมีประโยชน์ต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งปอดต่อไปได้ในอนาคต