รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

โอ-กลุคแนกซิลเลลั่นและหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดี

(O-GlcNAcylation and the associated functions in cholangiocarcinoma)

โดย

นายอาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์

30 มิถุนายน 2557

สัญญาเลขที่ MRG5580031

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ โอ-กลุคแนกซิลเลลั่นและหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดี

O-GlcNAcylation and the associated functions in cholangiocarcinoma

นายอาทิตย์ ศิลป์ศิริ่วานิชย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่น

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยภายใต้โครงการพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปี พ.ศ. 2555 จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยมีระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี (2555 - 2256) โดยระหว่างดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยได้เผยแพร่ผลงานจากโครงการวิจัยนี้ โดยการตีพิมพ์ในวารสารวิจัยนานาชาติAsian Pacific Journal of Cancer Prevention ปี 2012 เรื่อง Overexpression of O-GlcNAc-Transferase Associates with Aggressiveness of Mass-Forming Cholangiocarcinoma และได้นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติและระดับนานาชาติ 5 ครั้ง และอยู่ระหว่างการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อจัดเตรียมเป็นบทความวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิจัยนานาชาติต่อไป

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนทุนวิจัยแก่โครงการนี้ กราบขอบพระคุณศาสจาราจารย์ ดร. โสพิศ วงศ์คำ อาจารย์ที่ปรึกษาที่อนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัย พร้อมทั้งคำแนะนำที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิจัย ขอบพระคุณศูนย์วิจัยพยาธิใบไม้ตับและมะเร็งท่อน้ำดี ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยและเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี และภาควิชาชีวเคมี และฝ่ายวิจัยฯ คณะแพทยศาสตร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัยครั้งนี้

นายอาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์
ผู้วิจัย
30 มิถุนายน 2557

บทคัดย่อ

Project Code: MRG55080031

Project Title: โอ-กลุคแนกซิลเลลั่นและหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับมะเร็งท่อน้ำดี

Investigator: นายอาทิตย์ ศิลป์ศิริวานิชย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address: atitsil@kku.ac.th

Project Period: 2 ปี (พ.ศ. 2555 – 2556)

ปัญหาสำคัญสำหรับโรคมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) ในปัจจุบัน คือ การวินิจฉัยโรคที่ล่าช้า ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการวินิจฉัยเมื่อโรคดำเนินเข้าสู่ระยะที่มีการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะสำคัญอื่นๆ แล้ว ส่งผลให้การรักษาไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร การศึกษาในปัจจุบัน พบว่า การทำงานของโปรตีนหลายชนิดในมะเร็งท่อน้ำดีมีความผิดปกติ อันเนื่องมาจาก ความผิดปกติของกระบวนการปรับแต่งโปรตีนภายหลังการแปลรหัสพันธุกรรม (post-translational modification) เช่น phosphorylation และ glycosylation เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี พบว่า มะเร็งท่อน้ำดีมีกระบวนการ O-GlcNAcylation เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับท่อทางเดินน้ำดีปกติ อันเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ O-GlcNac transferase (OGT) ที่ร่วมกับการลดระดับของเอนไซม์ O-GlcNAcse (OGA) เป็นผลให้มี O-GlcNAcyated proteins (OGP) เพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดีนี้สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วย การศึกษาบทบาทของ O-GlcNAcylation ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-M139 และ KKU-M213 พบว่าระดับ O-GlcNAcylation ในเซลล์ทั้งสองชนิดลดลงเมื่อทำการยับยั้งเอนไซม์ OGT ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ OGT และระดับ O-GlcNAcylation เพิ่มขึ้นเมื่อยับยั้งเอนไซม์ OGA ด้วย siRNA ที่จำเพาะต่อ OGA ซึ่งสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับความสามารถในการเคลื่อนที่ (migration) และการรุกรานเนื่อเยื่อข้างเคียง (invasion) ของเซลล์ กล่าวคือเมื่อทำการยับยั้ง O-GlcNAcyaltion ด้วย siOGT ทำให้การเคลื่อนที่และการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียงของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีลดลง และให้ผลตรงกันข้ามเมื่อส่งเสริม O-GlcNAcyaltion ด้วย siOGA โดยไม่มีผลต่อการเจริญ (proliferation) และการต้านการตายแบบ apoptosis (apoptotic resistance) ของเซลล์ทั้งสองชนิด

โดยสรุปการศึกษานี้แสดงให้เห็นความสำคัญของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการแพร่กระจายลุกลาม (metastasis) อย่างไรก็ตาม การศึกษาเชิงลึกเพื่อให้เข้าใจกลไกการควบคุมการแพร่กระจายลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี โดยกระบวนการ O-GlcNAcylation ยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อให้เข้าใจ ชีววิทยาของมะเร็งท่อน้ำดีมากขึ้น ซึ่งความรู้ที่ได้จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพื่อพัฒนาปรับปรุงการตรวจวินิจฉัย และเป็นแนวทางการการรักษาผู้ป่วยให้มีประสิทธิภาพ ต่อไปได้

Keywords: Cholangiocarcinoma, Glycosylation, O-GlcNAcylation, OGT, OGA

Abstract

Project Code: MRG55080031

Project Title: O-GlcNAcylation and the associated functions in cholangiocarcinoma

Investigator: Atit Silsirivanit, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

E-mail Address: atitsil@kku.ac.th

Project Period: 2 years (2555 – 2556)

Late daignosis is an important problem of cholangiocarcinoma (CCA). Most of CCA patients were diagnosed when the tumor has been metastasized to other organs, resulting in an ineffective treatment. Alteration of post-translatonal modifiifactions; such as phosphorylation, glycosylation, and etc.; has been pointed out in many studies to be an important event involving in tumor development and progression. This study is aimed to investigate the roles of O-GlcNAcyaltion in CCA. Our result showed that O-GlcNAcyaltion was significantly enhanced in CCA, comparing with normal bile ducts ($P < 0.05$), using immunohistochemsitry staining of CCA tissues. Elevation of O-GlcNAcylation level in CCA was associated with the increase of O-GlcNAc transferase (OGT) and decrease of O-GlcNAcase (OGA), resulting in the elevation of O-GlcNAcylated proteins (OGP). High level of O-GlcNAcyaltion in CCA tissues was associated with poor cinical outcomes of the patients. The functional analysis revealed that O-GlcNAcyaltion was involved in migration and invasion of CCA cell lines (KKU-M129 and KKU-M213). Suppression of O-GlcNAcylation using siOGT signififcantly decrease the migration and invasion of CCA cell lines ($P < 0.05$), while the abilities of cells to migrate and invade were signififcantly enhanced by siOGA treatment. However, neither siOGT nor siOGA treatment affected the prolferation and apoptotic resistance of KKU-M139 and KKU-M213 CCA cell lines. These results emphasized the important role of O-GlcNAcyaltion in metastasis of CCA.

In conclusion, our study has demonstrated the evelation O-GlcNAcylation in CCA and it plays an important role in metastasis of CCA. However, the mechanism by which O-GlcNAcylation control metastasis of CCA is still unclear. The further studies, how O-GlcNAcylation regulate the metastasis of CCA, is needed for the more understanding on CCA bilogy. The knowledge obatined from the studies may facilitate the improvement of CCA diagnosis and treatment in near future.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Glycosylation, O-GlcNAcylation, OGT, OGA

1. บทนำ

โรคมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) เป็นปัญหาสาธารณาสุขที่สำคัญของประเทศไทย ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะจังหวัดขอนแก่นและอุดรธานี ถือเป็นพื้นที่ที่มีอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดีสูงสุดในโลก ธรรมชาติของมะเร็งชนิดนี้มีการเจริญเติบโตช้า แต่มีการแพร่กระจายลุกลามที่รวดเร็ว ปัญหาสำคัญสำหรับโรคมะเร็งท่อน้ำดีในปัจจุบัน คือ การวินิจฉัยโรคทำได้ล่าช้าหรือเมื่อโรคดำเนินเข้าสู่ระยะลุกลาม ที่มีการแพร่กระจายของมะเร็งไปยังอวัยวะสำคัญอื่นๆ แล้ว ส่งผลให้การรักษาไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร โดยผู้ป่วยเหล่านี้จะตอบสนองต่อการรักษาด้วยการผ่าตัดต่ำ[1-3] แม้จะมีการให้ยาเคมีบำบัดร่วมด้วย แต่ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดียังคงตอบสนองต่อยาเคมีในระดับต่ำเช่นกัน[4] การศึกษาในปัจจุบัน พบว่า การแสดงออกของจีนและการทำงานของโปรตีนหลายชนิดมีความผิดปกติในมะเร็งท่อน้ำดี[5-7] โดยทั่วไปการทำงานของโปรตีนเหล่านี้ถูกควบคุมด้วยกระบวนการปรับแต่งภายหลังการแปลรหัสพันธุกรรม (post-translational modification) หรือกระบวนการปรับแต่งโปรตีน เช่น phosphorylation, acetylation, และ O-GlcNAcylation เป็นต้น

O-GlcNAcylation เป็นกระบวนการเติมหมู่น้ำตาล N-acetylglucosamine (GlcNAc) ที่หมู่ hydroxyl (OH) ของกรดอะมิโน serine (Ser) หรือ threonine (Thr) โดยอาศัยการทำงาน ของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ O-linked β-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) และ β-N-acetylglucosaminidase (OGA) หรือ O-GlcNAcase ซึ่งทำหน้าที่เติมและตัด GlcNAc ออกจากโปรตีนตามลำดับ[8,9] กระบวนการ O-GlcNAcylation ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของโปรตีนในกระบวนการสำคัญต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น transcription translation proliferation apoptosis และ signal transduction เป็นต้น โดยกระบวนการ O-GlcNAcylation ทำหน้าทีเกี่ยวข้องกับการเพิ่มหรือลดกิจกรรม (activity) ความคงตัว (stability) ของโปรตีนหลายชนิด[8,9] หากการควบคุมกระบวนการ O-GlcNAcylation ในเซลล์สูญเสียไปจะส่งผลให้การทำงานของโปรตีนเหล่านี้เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นความผิดปกติในกระบวนการ O-GlcNAcylation จึงมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของโรคต่างๆ รวมทั้งโรคมะเร็งด้วย[10-12] การศึกษาในมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งปอด และมะเร็งเซลล์ตับ เป็นต้น พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงระดับ O-GlcNAcylation และเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวน การเจริญเติบโต และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งดังแสดง ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแสดงออกของ O-GlcNAc modified protein (OGP) OGT และ OGA ในมะเร็งชนิดต่างๆ

Cancer	OGP	OGT	OGA	Effect	References
Colon	↑	↑	↔	Increase proliferation	13
Lung	↑	↑	↔	Increase proliferation	13
Liver	↑	↑	↓	Increase cell viability, migration, invasion, and tumor recurrence	14
Thyroid	↓	**NA**	↑	Increase tumeriginicity	15
Prostate	↑	↑	**NA**	Increase invasion, Angiogenesis, and metastasis	16

NA= not analyzed

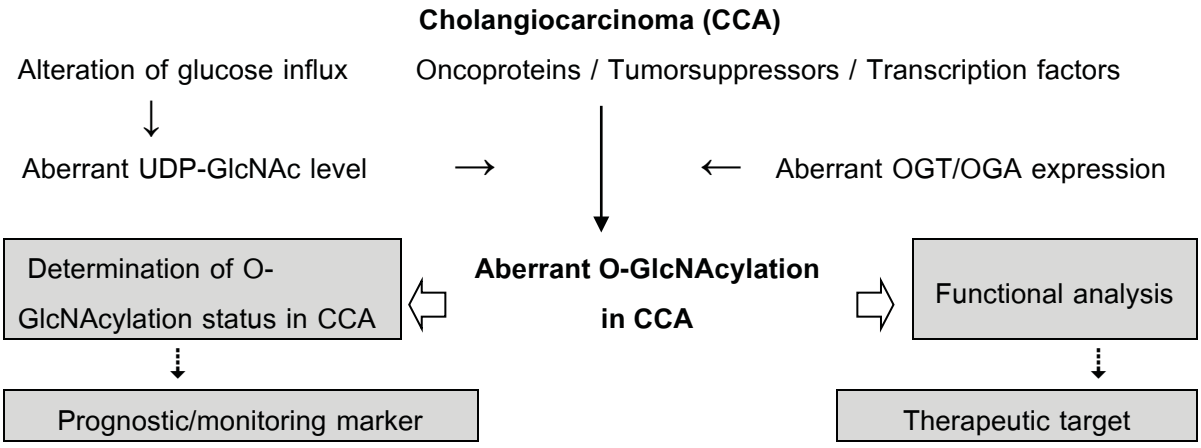
อย่างไรก็ตาม แม้จะมีรายงานความผิดปกติของกระบวน O-GlcNAcylation ในมะเร็งต่างๆ หลายชนิด แต่ในมะเร็งท่อน้ำดี ยังไม่พบรายงานความผิดปกติของกระบวนการปรับแต่งโปรตีนดังกล่าว ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี รวมทั้งศึกษาบทบาทของกระบวนการ O-GlcNAcylation ต่อการพัฒนาและการแพร่กระจายลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งมีสมมุติฐานว่า มะเร็งท่อน้ำดีมีความผิดปกติของกระบวน O-GlcNAcylation และสัมพันธ์กับการพัฒนาและการแพร่กระจายลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี โดยมุ่งหวังว่าผลการศึกษาที่ได้ จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยและการรักษามะเร็งท่อน้ำดีที่มีประสิทธิภาพต่อไป

วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อศึกษาการการเปลี่ยนแปลงกระบวนการ O-GlcNAcylation ในผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี

1.2 เพื่อศึกษาบทบาทหน้าที่ของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี

Conceptual framework



2. วิธีการทดลอง

การศึกษานี้ได้วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี รวมทั้ง ศึกษาบทบาทของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในการพัฒนาและการแพร่กระจายลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดี

การศึกษาทั้งหมดแบ่งเป็น 2 ระยะ (รวม 2 ปี) โดย

ระยะที่ 1 (พ.ศ. 2555) เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระบวน O-GlcNAcylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี เปรียบเทียบกับ ท่อทางเดินน้ำดีปกติ โดยทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ O-GlcNAc modified proteins (OGP) และเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เอนไซม์ O-GlcNAc transferase (OGT) และเอนไซม์ O-GlcNAcase (OGA) ด้วยวิธี immunohistochemistry

ระยะที่ 2 (พ.ศ. 2556) เป็นการศึกษาบทบาทของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี ได้ทำการศึกษาผลของการยับยั้งหรือส่งเสริมกระบวนการ O-GlcNAcylation ในเซลล์เพาะเลี้ย มะเร็งท่อน้ำดีในหลอดทดลอง (*in vitro*)

2.1 ศึกษาการการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี โดยทำการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ OGT และ OGA รวมทั้งระดับของ OGP ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีโดยวิธี Immunohistochemistry และวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับข้อมูลทางคลินิกของผู้ป่วย เช่น อายุ เพศ histophatology และอัตราการรอดชีพของผู้ป่วย เป็นต้น

O-GlcNAcylation status in CCA

↓

O-GlcNAcylation status in CCA tissues comparing with normal bile ducts

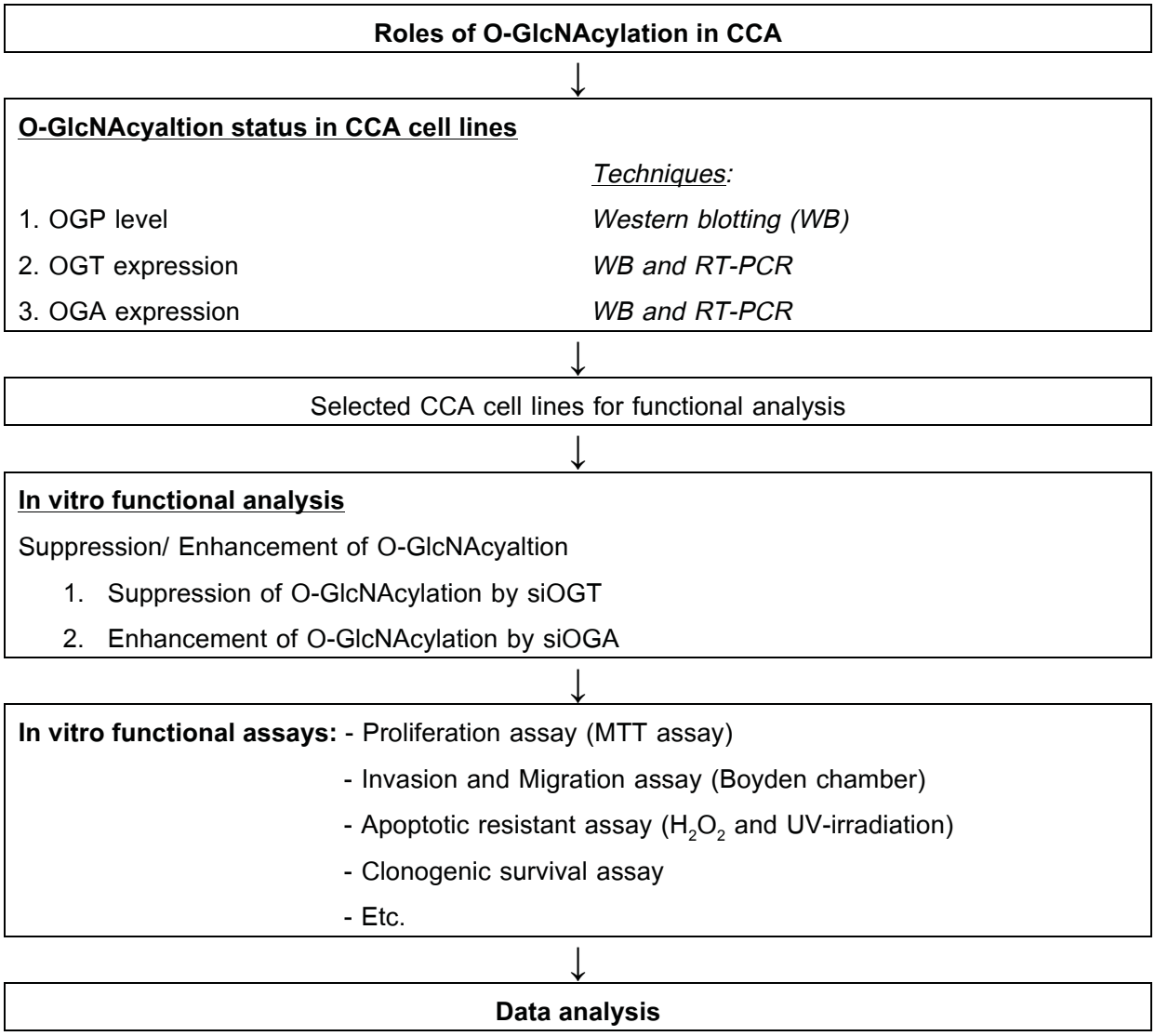
	Techniques:
1. OGP level	*Immunohistochemistry (IHC)*
2. OGT expression	*IHC*
3. OGA expression	*IHC*

↓

Data analysis

1. Descriptive analysis: expression level (increased/decreased), localization of CCA tissues vs. normal bile duct
2. Correlation of O-GlcNAcylation status in CCA tissues with clinical data of CCA patients

2.2 การศึกษาบทบาทของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี ได้ทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยการยับยั้งกระบวนการ O-GlcNAcylation ด้วย siRNA ต่อเอนไซม์ OGT และส่งเสริมกระบวนการ O-GlcNAcylation ด้วย siRNA ต่อเอนไซม์ OGA แล้วทำการวิเคราะห์ความสามารถของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี ในการแบ่งตัว (proliferation) การเคลื่อนที่ (migration) การรุกราน (invasion) และการเกาะติด (adhesion) เป็นต้น



3. ผลการทดลอง

3.1 สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาการแสดงออกของ O-GlcNAc modified proteins (OGP), O-GlcNAc transferase (OGT) และ **O-GlcNAcase (OGA) ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี immunohistochemistry**

ได้ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาการแสดงออกของ O-GlcNAc modified proteins (OGP), O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA) ด้วยวิธี immunohistochemistry ในชิ้นเนื้อ ผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี 2 ราย (W100 และ W176) โดยทำการทดสอบกับแอนติบอดีต่อ OGP (clone RL2), OGT (clone F12) และ OGA (clone L14) ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากการศึกษาได้สภาวะที่เหมาะสมในการ ศึกษาการแสดงออกของ O-GlcNAc modified proteins (OGP), O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA) ด้วยวิธี immunohistochemistry ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาการแสดงออกของ O-GlcNAc modified proteins (OGP), O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA) ด้วยวิธี immunohistochemistry

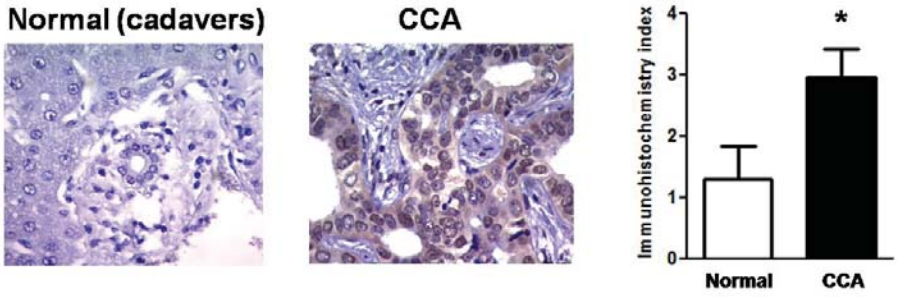
Proteins	Primary Ab	Secondary Ab
OGP	1:10, RT, O/N	Envision, RT, 1 h
OGT	1:10, RT, O/N	Envision, RT, 1 h
OGA	1:200, RT, O/N	Envision, RT, 1 h

RT=room temeperature, O/N = over night

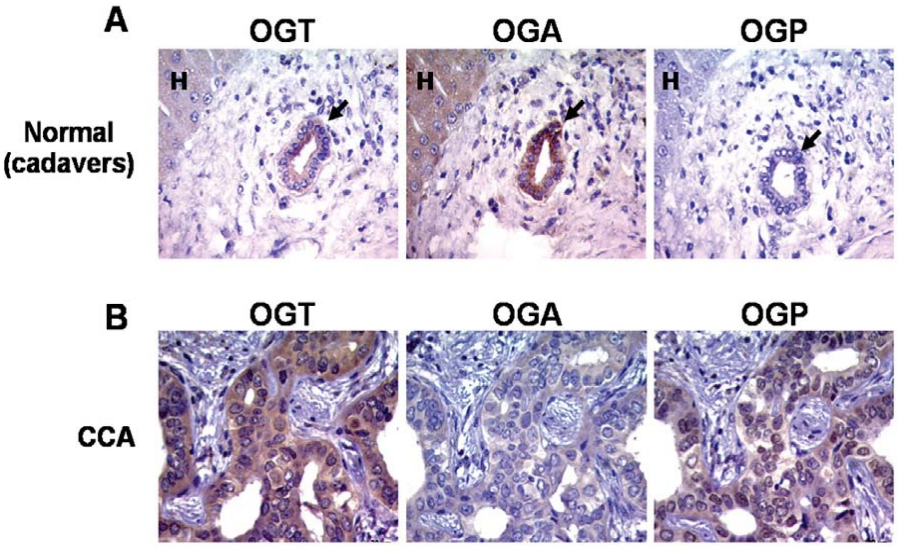
3.2 ศึกษาการแสดงออกของ OGP OGT และ **OGA ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี immunohistochemistry และวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับลักษณะพยาธิวิทยาและอาการแสดงของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี**

ได้ทำการศึกษากระบวนการ O-GlcANcylation ในเยื่อบุท่อทางเดินน้ำดี โดยทำการตรวจการแสดงออกของ OGP ในเยื่อบุท่อทางเดินน้ำดีปกติจากเนื้อเยื่อตับผู้เสียชีวิตจากอุบัติเหตุจำนวน 10 ราย เปรียบเทียบ กับเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีจากผู้ป่วย 20 ราย พบว่า ระดับการแสดงออกของ OGP ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี สูงกว่าเยื่อบุท่อทางเดินน้ำดีปกติอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงใน รูปที่ 1 จากนั้นได้ทำการตรวจการแสดงออกของเอ็นไซม์ OGT และ OGA ในเนื้อเยื่อชุดเดียวกันนี้ พบว่า การแสดงออกของเอ็นไซม์ OGT ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี สูงกว่าท่อทางเดินน้ำดีปกติ ซึ่งแปลผันตามระดับการแสดงออกของ OGP ส่วนเอ็นไซม์ OGA มีระดับการแสดงออกในเนื่อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี ต่ำกว่าท่อทางเดินน้ำดีปกติ ดังแสดงใน รูปที่ 2

จากข้อมูลดังกล่าว สรุปได้ว่า มะเร็งท่อน้ำดีมีกระบวนการ O-GlcNAcylation เพิ่มขึ้นเทียบกับ ท่อทางเดินน้ำดีปกติจากเนื้อเยื่อตับผู้เสียชีวิตจากอุบัติเหตุ โดยพิจารณาจากระดับ OGT ที่เพิ่มขึ้นร่วมกับระดับ OGA ที่ลดลง เป็นผลให้มี OGP เพิ่มขึ้น



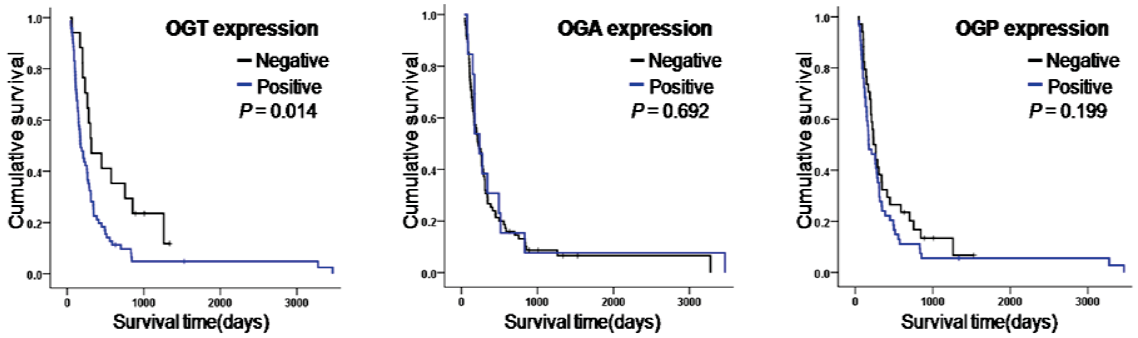
รูปที่ 1 การศึกษาการแสดงออกของ OGP โดยวิธี Immunohistochemistry พบว่า เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออก ของ OGP สูงกว่าเยื่อบุท่อทางเดินน้ำดีปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 2 การแสดงออกของ OGT OGA และ OGP ใน (A) ท่อทางเดินน้ำดีปกติ และ (B) เนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดี พบว่า ท่อทางเดินน้ำดีปกติในเนื้อเยื่อตับผู้ที่เสียชีวิตจากอุบัติเหตุ มีการแสดงออกของ OGT และ OGP ต่ำและ OGA สูง ส่วนเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีการแสดงออก OGT และ OGP สูงและ OGA ต่ำ

จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของ OGP OGT และ OGA ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีชนิด mass-forming จำนวน 88 ราย พบว่า การเพิ่มขึ้นของ OGP ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ OGT แต่ไม่สัมพันธ์กับการลดลงของ OGA ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของกระบวน O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดี อาจเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์ OGT มากกว่าการลดลงของเอ็นไซม์ OGA อย่างไรก็ตาม แม้การแสดงออกของ OGP จะไม่สัมพันธ์กับการแสดงออกของ OGA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จากข้อมูลที่พบ แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของ OGP มีแนวโน้มที่จะสัมพันธ์กับการลดลงของ OGA

นอกจากนี้ ยังพบว่าการแสดงออกของ OGT ที่ เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีพที่ต่ำของผู้ป่วยอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$; รูปที่ 3) และการแสดงออกของ OGP ในเนื้อเยื่อมะเร็ง ท่อน้ำดีมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพยาธิวิทยาชิ้นเนื้อ (histopathology) ชนิด non-papillary มากกว่าชนิด papillary อย่างมีนัยสำคัญด้วย ($P < 0.05$; ตารางที่ 3) และเนื่องจากอัตราการรอดชีพของผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดี ชนิด non-papillary มักต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะพยาธิวิทยาชิ้นเนื้อชนิด papillary ข้อมูลนี้จึงแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดีสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วย



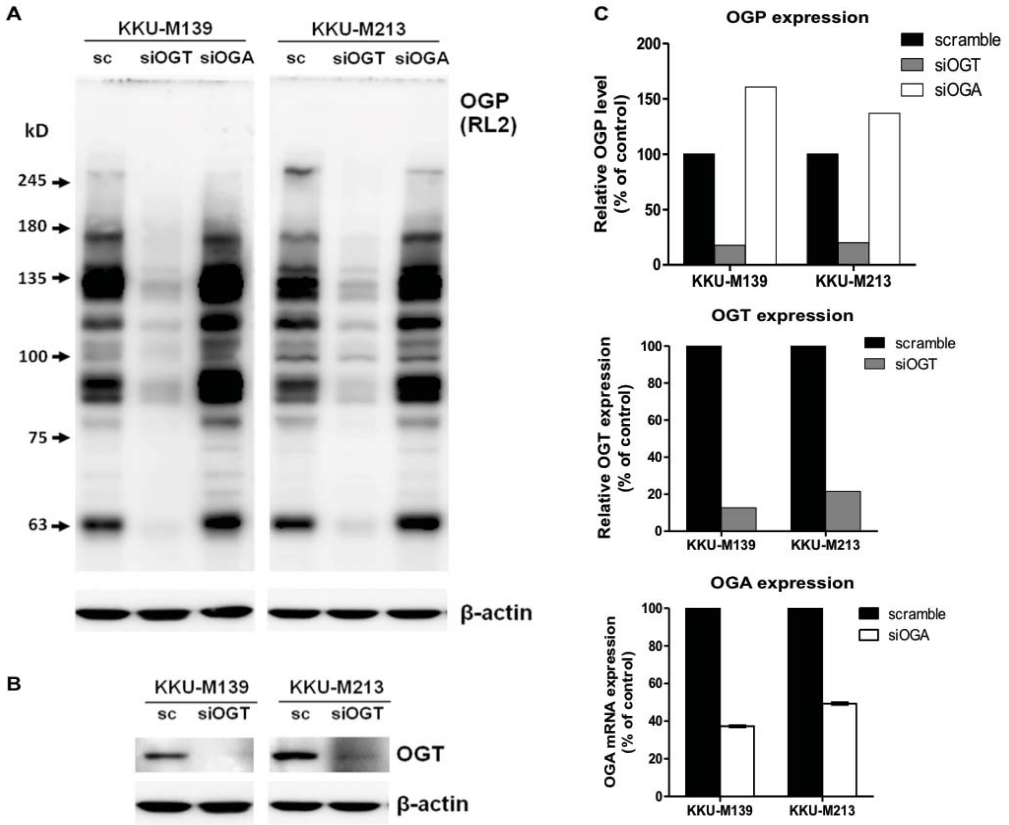
รูปที่ 3 Kaplan Meier Plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ OGP OGT และ OGA ในเนื้อเยื่อผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีกับการรอดชีพ (survival rate) ของผู้ป่วย เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยมะเร็งท่อน้ำดีที่มีการแสดงออก (----) และกลุ่มที่ไม่แสดงออก (----) ของ OGP OGT และ OGA ในเนื้อเยื่อมะเร็ง ด้วย Log Rank Test

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ OGP OGT และ OGA ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีกับข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย

Variation	OGP expression		P-value
	Negative	Positive	
OGT expression (n=88)			
Negative (n=17)	11	6	0.014
Positive (n=71)	23	48	
OGA expression (n=88)			
Negative (n=75)	32	43	0.055
Positive (n=13)	2	11	
Age (n=88)			
≤ 56 (n=38)	14	24	0.763
> 56 (n=50)	20	30	
Sex (n=88)			
Male (n=57)	18	39	0.065
Female (n=31)	16	15	
Histological type (n=88)			
Papillary (n=25)	14	11	0.035
Non-papillary (n=63)	20	43	
Lymph node metastasis (n=59)			
Metastasis (n=27)	9	18	0.291
Non-metastasis (n=32)	15	17	
Gall bladder metastasis (n=75)			
Metastasis (n=60)	22	38	0.477
Non-metastasis (n=15)	7	8	

3.3 ศึกษาบทบาทของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในการเจริญ (proliferation) การเคลื่อนที่ (migration) และการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี (CCA cell lines)

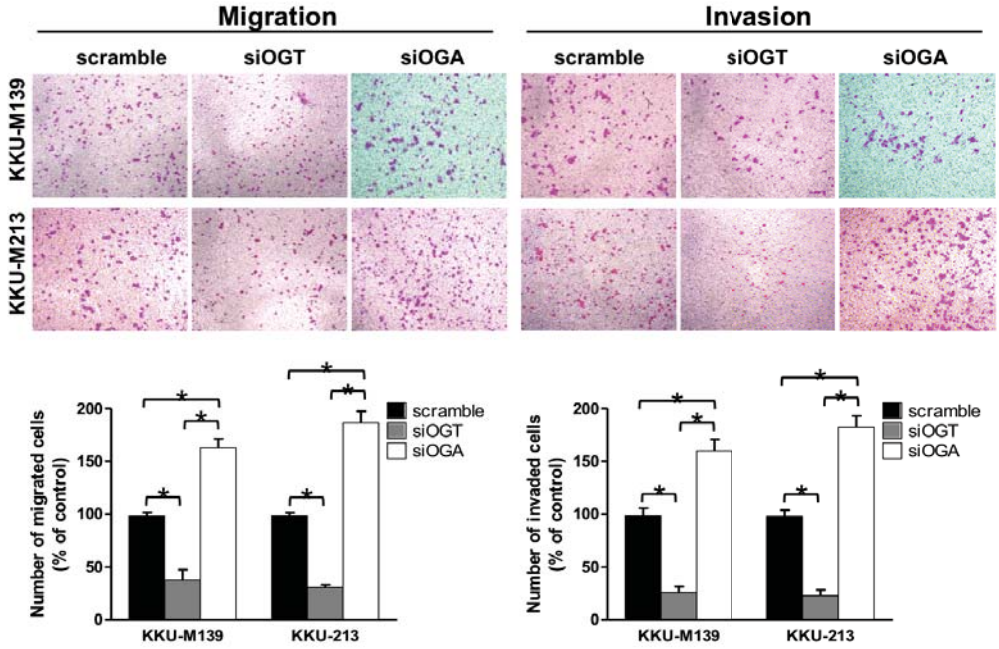
ได้ทำการศึกษาระดับ OGP, OGT และ OGA ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด คือ KKU-M139 และ KKU-M213 และทำการรบกวนกระบวนการ O-GlcNAcylation ในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิด พบว่า ระดับของ OGP ลดลงเมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ OGT ด้วย siOGT และ ระดับของ OGP เพิ่มขึ้นเมื่อทำการยับยั้งการแสดงออกของเอนไซม์ OGA ด้วย siOGA (รูปที่ 4)



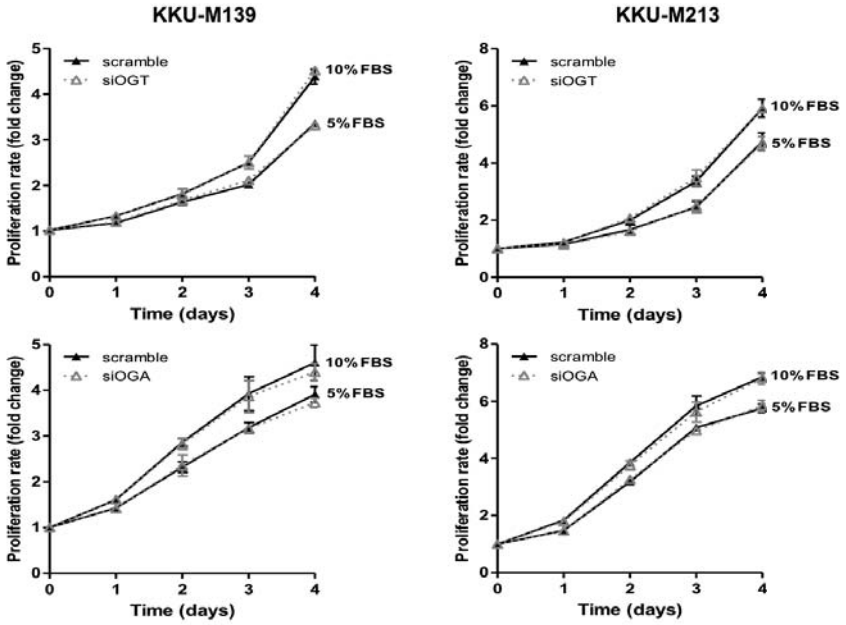
รูปที่ 4 **ผลของการยับยั้งเอนไซม์ OGT และ OGA ด้วย siRNA ที่จำเพาะ** ระดับ OGP ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-M139 และ KKU-M213 ลดลงเมื่อทำการยับยั้งเอนไซม์ OGT และเพิ่มขึ้นเมื่อทำการยับยั้งเอนไซม์ OGA (A, C) Western blot analysis พบว่าระดับเอนไซม์ OGT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ถูก treat ด้วย siOGT (B) เอนไซม์ OGT และ OGA เมื่อตรวจวัดด้วยวิธี Real time-RT PCR พบว่า มีระดับลดลง เมื่อเซลล์ถูก treat ด้วย siOGT และ siOGA ตามลำดับ

จากนั้นได้ทำการศึกษาผลของการยับยั้งกระบวนการ O-GlcNAcylation ต่อการเคลื่อนที่ (migration) การรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) การเจริญ (proliferation) clonogenic survival และการต้านการตายแบบ apoptosis (apoptotic resistance) ของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีทั้งสองชนิด พบว่า การเคลื่อนที่ การรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง และ clonogenic survival ของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการยับยั้งกระบวนการ O-GlcNAcylation ด้วย siRNA ต่อ OGT

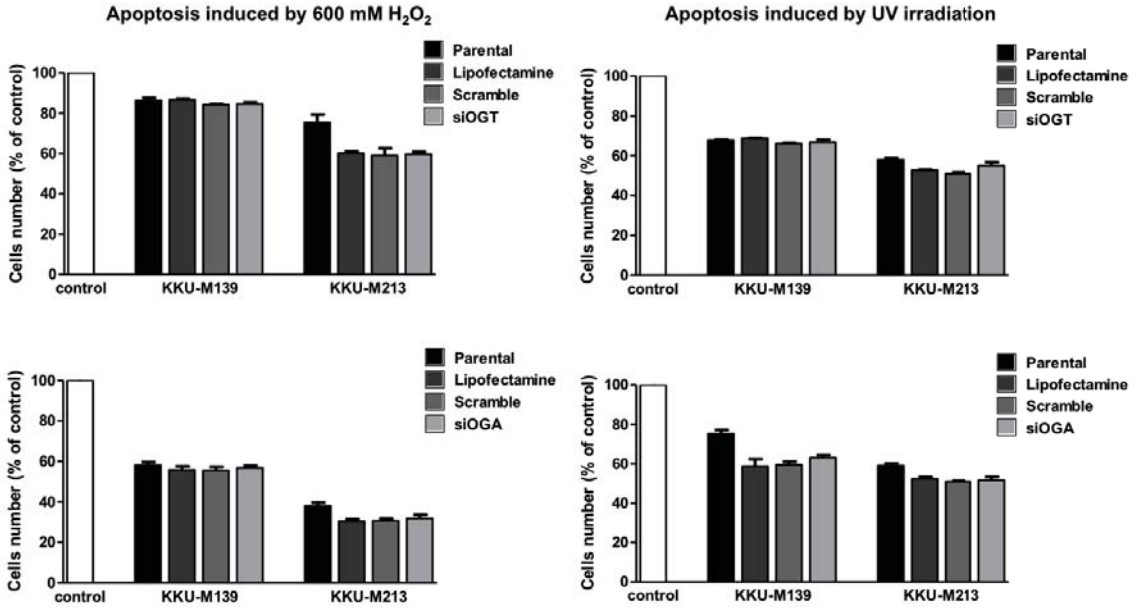
และเพิ่มขึ้นเมื่อทำการกระตุ้นกระบวนการ O-GlcNAcylation ด้วย siRNA ต่อ OGA (รูปที่ 5 และ 8) โดยไม่มีผลต่อการเจริญ (รูปที่ 6) และการต้านการตายแบบ apoptosis (รูปที่ 7) ของเซลล์



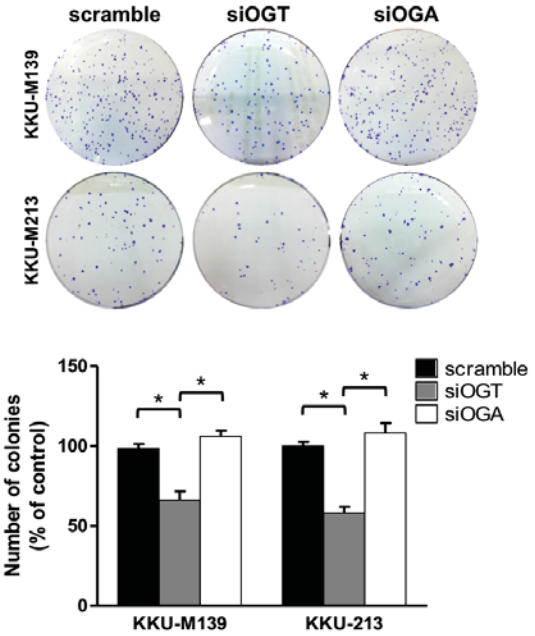
รูปที่ 5 การเคลื่อนที่ (migration) และการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) ของเซลล์เพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-M139 และ KKU-M213 ลดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ถูกยับยั้งกระบวนการ O-GlcNAcylation ด้วย siOGT และเพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นกระบวนการ O-GlcNAcylation ด้วย siOGA



รูปที่ 6 การเจริญ (proliferation) ของเซลล์เพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-M139 และ KKU-M213 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ทั้งในภาวะที่เซลล์ถูกยับยั้งกระบวนการ O-GlcNAcylation ด้วย siOGT หรือกระตุ้นกระบวนการ O-GlcNAcylation ด้วย siOGA



รูปที่ 7 การต้านการตายแบบ apoptosis (apoptotic resistance) ของเซลล์เพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-M139 และ KKU-M213 ต่อการกระตุ้นด้วย H_2O_2 และ UV-irradiation ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งในภาวะที่เซลล์ถูกยับยั้งกระบวนการ O-GlcNAcylation ด้วย siOGT หรือกระตุ้นกระบวนการ O-GlcNAcylation ด้วย siOGA



รูปที่ 8 Clonogenic survival ของเซลล์เพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี KKU-M139 และ KKU-M213 ลดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์ถูกยับยั้งกระบวน การ O-GlcNAcylation ด้วย siOGT

4. บทสรุปและวิจารณ์

O-GlcNAcylation เป็นกระบวนการ post-translational modification ที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ กระบวนการ O-GlcNAcylation ทำหน้าทีเกี่ยวข้องกับการเพิ่มหรือลดกิจกรรม (activity) ความคงตัว (stability) ของโปรตีนหลายชนิด[8,9] หากการควบคุมกระบวนการ O-GlcNAcylation ในเซลล์สูญเสียไป จะส่งผลให้การทำงานของโปรตีนเหล่านั้นเสียไปด้วย ดังนั้นความผิดปกติในกระบวนการ O-GlcNAcylation จึงมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของโรคต่างๆ รวมทั้งโรคมะเร็งด้วย[10-12] การศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ O-GlcNAcylation รวมทั้งบทบาทในมะเร็งท่อน้ำดี โดยพบว่า มะเร็งท่อน้ำดีมีกระบวนการ O-GlcNAcylation เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับท่อทางเดินน้ำดีปกติ อันเป็นผลมาจาดระดับ OGT ที่เพิ่มขึ้นร่วมกับระดับ OGA ที่ลดลง เป็นผลให้มี O-GlcNAcyated proteins (OGP) หรือ กระบวนการ O-GlcNAcylation โดยรวมเพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในมะเร็งท่อน้ำดีนี้สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของผู้ป่วย ซึ่งจากการศึกษานี้ บ่งชี้ว่าอาจสามารถนำระดับ O-GlcNAcylation ในเนื้อเยื่อมะเร็งท่อน้ำดีไปใช้ในการพยากรณ์โรคสำหรับผู้ป่วยต่อไปได้

จากนั้นได้ทำการศึกษาบทบาทของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี พบว่าการเคลื่อนที่และการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียงของเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดีลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการยับยั้งกระบวนการ O-GlcNAcylation แสดงให้เห็นถึงบทบาทของกระบวนการ O-GlcNAcylation ในการแพร่กระจายลุกลาม (metastasis) ของมะเร็งท่อน้ำดี อย่างไรก็ตามการศึกษาเชิงลึก เพื่อให้เข้าใจบทบาทและกลไกในการควบคุมแพร่กระจายลุกลามของมะเร็งท่อน้ำดีโดยกระบวนการ O-GlcNAcylation ยังคงต้องดำเนินต่อไป เพื่อให้เข้าใจถึงชีววิทยาของมะเร็งท่อน้ำดี ซึ่งความรู้ที่ได้ จะสามารถนำไปใช้เพื่อพัฒนาแนวทางการรักษาต่อไปได้

5. เอกสารอ้างอิง

1. Sripa B, Pairojkul C. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. Curr Opin Gastroenterol 2008;24(3):349-56.

2. Uttaravichien T, Bhudhisawasdi V, Pairojkul C, Pugkhem A. Intrahepatic cholangiocarcinoma in Thailand. J Hepatobiliary Pancreat Surg 1999;6(2):128-35.

3. Vatanasapt V, Uttaravichien T, Mairiang EO, Pairojkul C, Chartbanchachai W, Haswell-Elkins M. Cholangiocarcinoma in north-east Thailand. Lancet 1990;335(8681):116-7.

4. Thongprasert S. The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma. Ann Oncol 2005;16 Suppl 2:ii93-6.

5. Isomoto H. Epigenetic alterations associated with cholangiocarcinoma (review). Oncol Rep 2009;22(2):227-32.

6. Tischoff I, Wittekind C, Tannapfel A. Role of epigenetic alterations in cholangiocarcinoma. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2006;13(4):274-9.

7. Sawanyawisuth K. Genes and cholangiocarcinoma. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2009;40(4):701-12.

8. Zachara NE, Hart GW. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! Biochim Biophys Acta 2006;1761(5-6):599-617.

9. Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. Nature 2007;446(7139):1017-22.

10. Slawson C, Copeland RJ, Hart GW. O-GlcNAc signaling: a metabolic link between diabetes and cancer? Trends Biochem Sci 2010;35(10):547-55.

11. Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. Annu Rev Biochem 2011;80:825-58.

12. Slawson C, Hart GW. O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. Nat Rev Cancer 2011;11(9):678-84.

13. Mi W, Gu Y, Han C, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. Biochim Biophys Acta 2011;1812(4):514-9.

14. Zhu Q, Zhou L, Yang Z, et al. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. Med Oncol 2011.

15. Krzeslak A, Pomorski L, Lipinska A. Elevation of nucleocytoplasmic beta-N-acetylgluco saminidase (O-GlcNAcase) activity in thyroid cancers. Int J Mol Med 2010;25(4):643-8.

16. Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ. Critical role of O-GlcNAc transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis and metastasis. J Biol Chem 2012.

6. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Phoomak C, **Silsirivanit A***, Wongkham C, Sripa B, Puapairoj A, Wongkham S*. Overexpression of O-GlcNAc-Transferase Associates with Aggressiveness of Mass-Forming Cholangiocarcinoma. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13 Suppl:101-5. (*Corresponding authors)

7. ผลงานอื่น ๆ เช่น การไปเสนอผลงาน การได้รับเชิญไปเป็นวิทยากร

- **Atit Silsirivanit**, Chatchai Phoomak, Anucha Puapairoj, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham; Aberrant O-GlcNAcylation associates with development and progression of cholangiocarcinoma; *Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists (FAOBMB) congress; Bangkok, Thailand: Nov 25-29, 2012 (Oral presentation)*

- **Atit Silsirivanit**, Chatchai Phoomak, Somchai Pinlaor, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham; Role of O-GlcNAcylation in cholangiocarcinoma; *The 4th Conference of Asian Communication of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG); Jeju, Korea: Oct 28-31,2012 (Oral presentation)*

- Chatchai Phoomak, **Atit Silsirivanit**, Anucha Puapairoj, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham; Up-regulated O-GlcNAcylation promotes cholangiocarcinoma metastasis; *The Second Symposium of Specific Health Problem in Greater Mekong Sub-region (SHeP-GMS), Health Cluster, The National Research University Project, Khon Kaen, Thailand: Mar 29, 2013 (Poster presentation)*

- Chatchai Phoomak, **Atit Silsirivanit**, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham; O-GlcNAcylation involved in metastasis of cholangiocarcinoma; *The 5th Conference of Asian Communication of Glycobiology and Glycotechnology (ACGG); Khon Kaen, Thailand: Oct 14-18, 2013 (Poster presentation)*

- Chatchai Phoomak, **Atit Silsirivanit**, Chaisiri Wongkham, Sopit Wongkham; O-GlcNAcylation significantly related to progressiveness of cholangiocarcinoma cells; *The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference, Bangkok, Thailand: Apr 2-4, 2014 (Poster presentation)*

ภาคผนวก

RESEARCH ARTICLE

Overexpression of O-GlcNAc-Transferase Associates with Aggressiveness of Mass-Forming Cholangiocarcinoma

Chatchai Phoomak[1,3], Atit Silsirivanit[1,3]*, Chaisiri Wongkham[1,3], Banchob Sripa[2,3], Anucha Puapairoj[2,3], Sopit Wongkham[1,3]*

Abstract

O-GlcNAcylation, an important O-linked glycosylation of cellular glycoproteins with a single molecule of N-acetylglucosamine (GlcNAc), is involved in regulation of many cellular processes. Alteration of O-GlcNAcylation is associated with the development and progression of many cancers. Here, we demonstrated aberrant O-GlcNAcylation in the cholangiocarcinoma (CCA) using immunohistochemistry of O-GlcNAc modified proteins (OGP), O-GlcNAc transferase (OGT) and N-acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase or OGA). OGP expression was low in normal bile ducts corresponding with the low OGT and high OGA expression. In contrast, OGP was strongly expressed in CCA tissues together with the up-regulation of OGT and down-regulation of OGA. Moreover, elevation of O-GlcNAcylation was associated with non-papillary type CCA and poor survival outcome of CCA patients. Our study showed for the first time that O-GlcNAcylation is increased in CCA tissues and is associated with a poor patient outcome. The OGT expression level could be a useful prognostic indicator and inhibition of O-GlcNAcylation might be a therapeutic target for CCA.

Keywords: O-GlcNAcylation - O-linked β-N-acetylglucosaminyl transferase - N-acetylglucosaminidase - glycosylation

Asian Pacific J Cancer Prev, **13**, 101-105

Introduction

O-GlcNAcylation is a reversible post-translational modification of the proteins with a single molecule of N-acetylglucosamine (GlcNAc) on serine (Ser) or threonine (Thr) (Comer and Hart, 2000; Hart et al., 2007). The modification is regulated by O-linked β-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) and N-acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase or OGA). OGT transfers GlcNAc from uridine diphospho-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) to Ser or Thr, while OGA is responsible for the GlcNAc removal (Comer and Hart, 2000; Hart et al., 2007; Butkinaree et al., 2010). O-GlcNAcylation appears to be important in many cellular processes such as transcription, translation, cell proliferation, apoptosis, signal transduction, etc. (Slawson et al., 2006; Zachara and Hart, 2006; Butkinaree et al., 2010; Hart et al., 2011). Alteration of O-GlcNAcylation was implicated in a number of human diseases such as Type II diabetes mellitus, neurodegenerative diseases, and cancers (Zachara and Hart, 2006; Butkinaree et al., 2010; Hart et al., 2011). Aberrant OGT, OGA expression and the level of UDP-GlcNAc were associated with alteration of O-GlcNAcylation and were reported to be involved in the development and progression of many cancers (Caldwell et al., 2010; Gu et al., 2010; Krzeslak et al., 2010; Krzeslak et al., 2011; Liu et al., 2011; Mi et al., 2011; Slawson and Hart, 2011; Zhu et al., 2011; Krzeslak et al., 2012a; Krzeslak et al., 2012b; Lynch et al., 2012).

Cholangiocarcinoma (CCA) is the malignancy of biliary epithelium which has high prevalence in the Northeast Thailand (Patel, 2006; Sripa and Pairojkul, 2008). CCA is a heterogeneous, slowly growing cancer with high metastatic potential (Morise et al., 2010; Nakanuma et al., 2010). According to the gross appearance, CCA can be classified into mass-forming (MF), periductal infiltrating (PI), and intraductal growth (IG) type (Nakanuma et al., 2010). Based on histopathological features, CCA is classified into papillary and non-papillary type (Nakanuma et al., 2010). CCA is difficult to diagnose at an early stage, and most of CCA patients were detected at the late stage which tumors have metastasized to other organs, resulting in the poor survival after diagnosis (Blechacz and Gores, 2008).

Several glycans and glycoproteins are aberrantly expressed in CCA and are possibly used as biomarkers for diagnosis and prognostic prediction. Some of such examples are, carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9), biliary alkaline phosphatase, mucin-1 (MUC1), mucin-5AC (MUC5AC),

*[1]Department of Biochemistry, [2]Department of Pathology, [3]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand *For correspondence: atitsil@kku.ac.th, sopit@kku.ac.th*

p53, retinoblastoma protein (pRb), epidermal growth factor receptor (EGF-R) (Higashi et al., 1999; Khan et al., 2005; Blechacz and Gores, 2008; Briggs et al., 2009; Park et al., 2009; Sawanyawisuth et al., 2011; Silsirivanit et al., 2011). Some of those proteins such as p53, pRb, EGF-R can be modified by O-linked β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) and their functions and stability are potentially controlled by the modification (Zachara and Hart, 2006).

This study is aimed to explore the status of O-GlcNAcylation in CCA and determine the association of O-GlcNAcylation with the development and progression of CCA. The information obtained may full-fill the understanding of CCA development/progression and probably the improvement of therapy.

Materials and Methods

Formalin-fixed paraffin-embedded tissues

All formalin-fixed paraffin-embedded CCA tissues were obtained from the specimen bank of the Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand. Informed consent was obtained from each subject and the study protocol was approved by the Ethics Committee for Human Research, Khon Kaen University (HE521209). All cancer tissues were from histologically proven intrahepatic CCA patients. Tumor staging was classified according to the 6th edition of American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification and staging (Greene et al., 2002). CCA tissues microarray (TMA52-1) was constructed by the Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University as previously described (Yonglitthipagon et al., 2012).

Immunohistochemistry of OGT, OGA, and OGP

Expression of OGT, OGA, and OGP were determined by a standard protocol of immunohistochemistry (IHC) staining. Briefly, after deparaffinization the antigen retrieval was performed in 0.1 M citrate buffer pH 6.0 followed by endogenous peroxidase neutralization by incubating with 0.3% H2O2 in methanol for 30 min at room temperature (RT). After blocking of non-specific binding by 5% fetal bovine serum (FBS) for 20 min, the sections were incubated with 20 μg/ml anti-O-GlcNAc (RL2, Santa Cruz, CA) or 20 μg/ml mouse anti-OGT (F12; Santa Cruz) or 2 μg/ml goat anti-OGA (L14, Santa Cruz) overnight at RT. After washing with PBS, the sections were incubated with EnVision-system-HRP (Dako, Glostrup, Denmark) or Histofine® Simple Stain MAX PO(G) (Nichirei, Tokyo, Japan) for 1 hour at RT. The sections were developed with diaminobenzidine and counter stained with Mayer's hematoxylin (Bio-optica, Milano, Italy). Tissues incubated with PBS instead of primary antibody were used as negative controls. Fromowitz standard was used to semi-quantitatively assess the staining of OGT, OGA, and OGP, and expressed as the following positive range score (frequency): 0=0-5%; 1+= 6-25%; 2+=26-50%; 3+=51-75%; 4=>75%; positive extent score (intensity): 0=no staining; 1=light yellow; 2=brown; 3=dark brown; and IHC index as frequency score plus intensity score (Fromowitz et al., 1987; Qin et al., 2003). For statistic analysis, the patients were divided into two groups according to the immunohistochemistry score, negative (IHC index=0) and positive (>1).

Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS 16.0 software (SPSS, Chicago, IL). Association of OGT, OGA, and OGP immunoreactivities with age, sex, histological type, lymph node and gall balder metastasis were analyzed by χ^2 or Fisher's exact test. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier plot and Log-Rank test. Cox regression was used to evaluate the association of several prognostic factors with the overall survival. $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results

O-GlcNAcylation is elevated in CCA tissues

To investigate the role of O-GlcNAcylation in CCA, we firstly analyzed the level of O-GlcNAc modified proteins (OGP) in 20 CCA tissues and 10 adjacent normal liver tissues using immnohistichemistry. The weak immuno-reactivity of OGP was observed in all bile duct epithelia of normal liver tissues but was strongly detected in the nucleus of 75% (15 of 20) of CCA bile ducts (P=0.036, Figure 1.).

The elevation of O-GlcNAcylation in CCA in association with high OGT expression

To reveal the possible mechanisms underlying the elevation of O-GlcNAcylation in CCA, we further examined the expression of OGT, OGA and OGP in normal liver and CCA tissues by immunohistochemistry. Bile duct epithelia of normal liver tissues exhibited strongly positive OGA, but low OGT and OGP, immunostaining (Figure 2A). In CCA, OGT was seen as diffused cytoplasmic patterns, whereas OGP was mostly found in the nucleus. Tissue microarray consisting of 88 mass-forming CCA tissues revealed high expression of OGT (80.7%, 71/88) but low expression of OGA (85.2%, 75/88), resulting in high immunostaining of OGP in 54

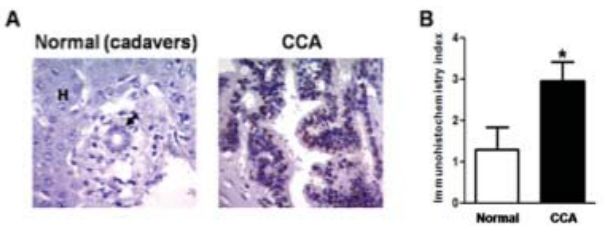


Figure 1. Elevation of O-GlcNAcylation in CCA Tissues. Levels of O-GlcNAcylation were Determined in 20 CCA and 10 Normal Liver Tissues using Immunohistochemistry Staining of OGP. (A) The bile duct epithelia of all normal liver tissues showed weak immunoreactivity of OGP whereas those of CCA tissues had high OGP-immunostaining with nuclear localization, H, indicates hepatocyte and the arrows indicate normal bile duct, Original magnification × 400. (B) The immunoreactivity of OGP observed in CCA was significantly higher than that observed in normal bile ducts. The data are mean±SEM (*P =0.036, Student's t-test)

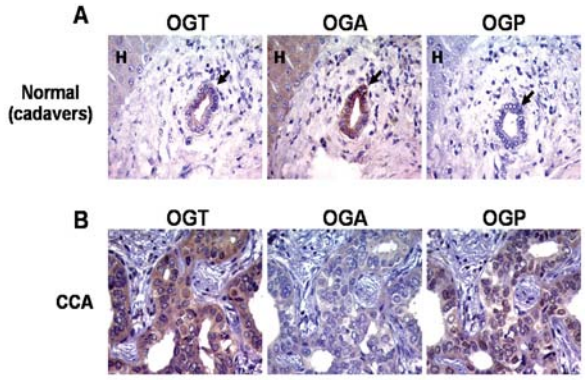


Figure 2. Enhancement of OGP is Associated with Increased OGT expression. The expression of OGT, OGA and OGP were determined using immunohistochemistry. (A) In normal liver tissues, low-OGT, high-OGA and low-OGP immonoreactivities were observed in the normal bile duct epithelia (N) and hepatocyte (H) (n = 10), (B) Mass-forming CCA tissues exhibited high-OGT, low-OGA, and high-OGP immunoreactivities (n = 88). Original magnification×400

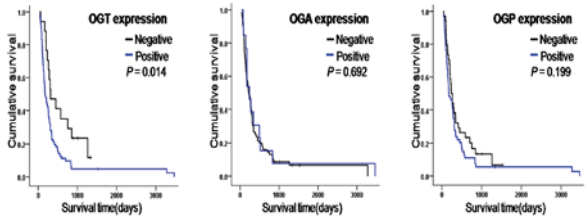


Figure 3. High Expression of OGT Associated with Poor Survival of CCA Patients. Associations of OGT and OGA expressions and O-GlcNAcylation level (OGP) in CCA tissues and the survival of CCA patients were analyzed using Kaplan-Meier plot and Log-Rank test. (A) CCA patients with positive OGT expression (71/88) exhibited the shorter survival (median survival = 401 days, 95%CI = 233-569 days), than those with OGT negative (17/88) (median survival = 580 days, 95%CI = 368-792 days) (P = 0.014). (B and C) The survival of CCA patients had no association with OGA and OGP expression

tumors (61.4%, Figure 2B.).

The high reactivity of OGP in CCA tissues was positively correlated with high-OGT expression (P=0.014; Table 1), but not OGA expression.

High level of O-GlcNAcylation associates with aggressiveness of CCA

To elucidate the significance of O-GlcNAcylation in CCA, the associations of immuno-reactivity of OGT, OGA, and OGP in CCA tissues with clinicopathological data of CCA patients were analyzed. The expressions of OGT, OGA and OGP were not correlated with age, sex, lymph node and gall bladder metastasis (data not shown). However, the immunoreactivity of OGP was significantly higher in non-papillary type CCA than in papillary type CCA (P = 0.035; Table 1). Kaplan-Meier plot and Log Rank analysis were used to determine the ability of OGT, OGA, and OGP for the estimation of survival time of mass-forming CCA patients (Figure 3). Patients with low OGT expression in CCA tissues showed longer survival time than those with high OGT expression (P = 0.014). However, the Cox regression analysis revealed that the ability of OGT in prognostic determination was not an independent factor (data not shown).

Table 1. Clinical correlation of OGP expression in patients with mass-forming CCA

Variation	OGP expression		P-value
	Negative	Positive	
OGT expression (n=88)			
Negative (n=17)	11	6	0.014
Positive (n=71)	23	48	
OGA expression (n=88)			
Negative (n=75)	32	43	0.055
Positive (n=13)	2	11	
Age (n=88)			
≤ 56 (n=38)	14	24	0.763
> 56 (n=50)	20	30	
Sex (n=88)			
Male (n=57)	18	39	0.065
Female (n=31)	16	15	
Histological type (n=88)			
Papillary (n=25)	14	11	0.035
Non-papillary (n=63)	20	43	
Lymph node metastasis (n=59)			
Metastasis (n=27)	9	18	0.291
Non-metastasis (n=32)	15	17	
Gall bladder metastasis (n=75)			
Metastasis (n=60)	22	38	0.477
Non-metastasis (n=15)	7	8	

Negative, IHC index = 0; Positive, IHC > 1

Discussion

O-GlcNAcylation is involved in several cellular processes including functions, stability, and expression (Zachara and Hart, 2006; Hart et al., 2011). Alteration of O-GlcNAcylation is related to the development and progression of many human diseases (Zachara and Hart, 2006; Butkinaree et al., 2010; Hart et al., 2011). Here, we first reported the elevation of global O-GlcNAcylation of cellular proteins in CCA.

In the present study, regardless to the age, gender, histological type, and metastatic stage, all mass forming type CCA over-expressed OGP in comparison to the normal bile ducts. The over-expression of OGP has also been reported for breast, endometrial carcinomas, colon, lung, prostate, and hepatocellular carcinomas (Caldwell et al., 2010; Krzeslak et al., 2012; Mi et al., 2011; Zhu et al., 2011; Lynch et al., 2012).

It is well accepted that the alteration of O-GlcNAcylation is modulated by aberrant expression of either OGT or OGA (Mi et al., 2011; Zhu et al., 2011; Lynch et al., 2012) and the donor substrate, UDP-GlcNAc (Butkinaree et al., 2010). Most of CCA tissues showed high immunoreactivity of OGT and low immunoreactivity of OGA and vice versa for those observed in normal bile duct epithelia. In addition, high immnunoreactivity of OGP in CCA tissues was statistically correlated with high-OGT expression, suggesting that the alteration of O-GlcNAcylation in CCA may be due to the high-OGT expression rather than low expression of OGA. Similar finding was also reported for colon, lung and breast cancers (Mi et al., 2011; Krzeslak et al., 2012a). Since low OGA expression rather than high OGT expression was observed in some CCA tissues, the involvement of aberrant OGA expression in alteration of O-GlcNAcylation in CCA should not be excluded.

The enhancement of O-GlcNAcylation in CCA is associated with poor outcome of patients. High level of O-GlcNAcylation was observed more frequently in non-papillary type CCA than in papillary type CCA. Moreover, CCA patients who had high expression of OGT had a significantly shorter survival time than those who had low OGT expression. This result suggests the possible role of O-GlcNAcylation in the aggressiveness of CCA. As shown in many cancers, O-GlcNAcylation is involved in many steps of cancer progression including tumor growth (Caldwell et al., 2010; Mi et al., 2011), metastasis (Gu et al., 2010; Lynch et al., 2012), chemosensitivity (Pan et al., 2011), etc. High expression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-3 (InsP3R-3, an intracellular calcium channel) associated with O-GlcNAcylation in CCA cell line was reported (Bimboese et al., 2011). The modification by O-GlcNAcylation affected the channel open probability of InsP3R-3, resulted in the changes of intracellular calcium releasing following by the activation of downstream calcium dependent signaling cascades.

Many cellular proteins such as transcription factors, oncoproteins and tumor suppressors are modified by O-GlcNAc, and consequently their functions, interaction, and stability are affected (Ozcan et al., 2010). Several oncoproteins and tumor suppressors, are aberrantly expressed and involved in carcinogenesis, progression, and metastasis of CCA (Li et al., 2011; O'Dell et al., 2012). The elevation of O-GlcNAcylation in CCA reported here may modify these and other proteins, and, consequently alter their functions. To understand the molecular mechanisms underlying O-GlcNAcylation and CCA progression, the proteins which are aberrantly modified by O-GlcNAcylation should be identified and characterized.

In conclusion, our findings demonstrate that CCA exhibited the enhancement of O-GlcNAcylation via increasing of OGT expressions. The elevation of O-GlcNAcylation was associated with non-papillary type CCA and shorter survival of CCA patients. Our data suggested that O-GlcNAcylation may be an important mechanism involved in CCA development and progression.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Khon Kaen University and the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, through the Center of Excellence in Specific Health Problems in Greater Mekong Sub-region cluster of Khon kaen University (SHeP-GMS). C. Phoomak is grateful to Khon Kaen University for the M.Sc scholar support via SHeP-GMS (H-2553-M-05). A. Silsirivanit was supported by the New Scholar Grant (MRG-5580031), which co-funded by the Office of the Higher Education Commission, Thailand Research Fund, and Khon Kaen University. We wish to acknowledge the Khon Kaen University Publication Clinic, Research and Technology Transfer Affairs, Khon Kaen University, for English-language presentation of the manuscript.

References

Bimboese P, Gibson CJ, Schmidt S, Xiang W, Ehrlich BE (2011). Isoform-specific regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by O-linked glycosylation. *J Biol Chem*, **286**, 15688-97.

Blechacz B, Gores GJ (2008). Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology*, **48**, 308-21.

Briggs CD, Neal CP, Mann CD, Steward WP, Manson MM, et al (2009). Prognostic molecular markers in cholangiocarcinoma: a systematic review. *Eur J Cancer*, **45**, 33-47.

Butkinaree C, Park K, Hart GW (2010). O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta*, **1800**, 96-106.

Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, et al (2010). Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene*, **29**, 2831-42.

Comer FI, Hart GW (2000). O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *J Biol Chem*, **275**, 29179-82.

Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, Oravez S, Mishriki Y, et al (1987). ras p21 expression in the progression of breast cancer. *Hum Pathol*, **18**, 1268-75.

Greene FL, Page DL, Flaming ID, et al (2002). Manual for Staging of Cancer. Springer-Verlag, NewYork.

Gu Y, Mi W, Ge Y, et al (2010). GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res*, **70**, 6344-51.

Hart GW, Housley MP, Slawson C (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*, **446**, 1017-22.

Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O (2011). Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem*, **80**, 825-58.

Higashi M, Yonezawa S, Ho JJ, et al (1999). Expression of MUC1 and MUC2 mucin antigens in intrahepatic bile duct tumors: its relationship with a new morphological classification of cholangiocarcinoma. *Hepatology,* **30**, 1347-55.

Khan SA, Thomas HC, Toledano MB, Cox IJ, Taylor-Robinson SD (2005). p53 Mutations in human cholangiocarcinoma: a review. *Liver Int*, **25**, 704-16.

Krzeslak A, Forma E, Bernaciak M, Romanowicz H, Brys M (2012). Gene expression of O-GlcNAc cycling enzymes in human breast cancers. *Clin Exp Med*, **12**, 61-5.

Krzeslak A, Jozwiak P, Lipinska A (2011). Down-regulation of beta-N-acetyl-D-glucosaminidase increases Akt1 activity in thyroid anaplastic cancer cells. *Oncol Rep*, **26**, 743-9.

Krzeslak A, Pomorski L, Lipinska A (2010). Elevation of nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase) activity in thyroid cancers. *Int J Mol Med*, **25**, 643-8.

Krzeslak A, Wojcik-Krowiranda K, Forma E, Bienkiewicz A, Brys M (2012). Expression of genes encoding for enzymes associated with O-GlcNAcylation in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations. *Ginekol Pol*, **83**, 22-6.

Li ZR, Wu YF, Ma CY, et al (2011). Down-regulation of c-Myc expression inhibits the invasion of bile duct carcinoma cells. *Cell Biol Int*, **35**, 799-802.

Liu BQ, Meng X, Li C, et al (2011). Glucosamine induces cell death via proteasome inhibition in human ALVA41 prostate cancer cell. *Exp Mol Med*, **43,** 487-93.

Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, et al (2012). Critical role of O-GlcNAc transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis and metastasis. *J Biol Chem*.

Mi W, Gu Y, Han C, et al (2011). O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta*, **1812**, 514-9.

Morise Z, Sugioka A, Tokoro T, et al (2010). Surgery and chemotherapy for intrahepatic cholangiocarcinoma. *World J Hepatol*, **2**, 58-64.

Nakanuma Y, Sato Y, Harada K, et al (2010). Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept. *World J Hepatol*, **2**, 419-27.

O'Dell MR, Huang JL, Whitney-Miller CL, et al (2012). Kras(G12D) and p53 mutation cause primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Res*, **72**, 1557-67.

Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JE (2010). Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta*, **1799**, 353-64.

Pan X, Wilson M, Mirbahai L, et al (2011). In vitro metabonomic study detects increases in UDP-GlcNAc and UDP-GalNAc, as early phase markers of cisplatin treatment response in brain tumor cells. *J Proteome Res*, **10**, 3493-500.

Park SY, Roh SJ, Kim YN, et al (2009). Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 in cholangiocarcinoma: prognostic impact. *Oncol Rep*, **22**, 649-57.

Patel T (2006). Cholangiocarcinoma. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, **3**, 33-42.

Qin JM, Fu XY, Li SJ, et al (2003). Gene and protein expressions of p28GANK in rat with liver regeneration. *World J Gastroenterol*, **9**, 2523-7.

Sawanyawisuth K, Silsirivanit A, Kunlabut K, et al (2011). A novel carbohydrate antigen expression during development of Opisthorchis viverrini- associated cholangiocarcinoma in golden hamster: a potential marker for early diagnosis. *Parasitol Int*, **61**, 151-4.

Silsirivanit A, Araki N, Wongkham C, et al (2011). A novel serum carbohydrate marker on mucin 5AC: values for diagnostic and prognostic indicators for cholangiocarcinoma. *Cancer*, **117**, 3393-403.

Slawson C, Hart GW (2011). O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. *Nat Rev Cancer*, **11**, 678-84.

Slawson C, Housley MP, Hart GW (2006). O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks. *J Cell Biochem*, **97**, 71-83.

Sripa B, Pairojkul C (2008). Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand. *Curr Opin Gastroenterol*, **24**, 349-56.

Yonglitthipagon P, Pairojkul C, Chamgramol Y, Loukas A, Mulvenna J, et al (2012). Prognostic significance of peroxiredoxin 1 and ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 in cholangiocarcinoma. *Hum Pathol*.

Zachara NE, Hart GW (2006). Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 599-617.

Zhu Q, Zhou L, Yang Z, et al (2011). O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med Oncol*.

Abstracts and Proceedings

The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference

Rama Gardens Hotel & Resort, Bangkok, Thailand

April 2-3, 2014

Bridging ASEAN Biochemical Research Communities

Organized by

Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, Thailand
Biochemistry and Molecular Biology Section of the Science Society of Thailand
under the Patronage of His Majesty the King

AP-18

O-GlcNAcylation Significantly Related to Progressiveness of Cholangiocarcinoma Cells

Chatchai Phoomak, Atit Silsirivanit*, Chaisiri Wongkham and Sopit Wongkham**

Department of Biochemistry and Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

* Corresponding Author: *atitsil@kku.ac.th*

** Corresponding Author: *sopit@kku.ac.th*

O-GlcNAcylation, a post-translational modification of proteins with a single *N* -acetylglucosamine (GlcNAc) attached to serine or threonine residues via β-glycosidic linkage. The process is regulated by O-linked β-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) and β-N-acetylglucosaminidase (OGA). OGT transfers GlcNAc to serine or threonine residues of proteins while OGA catalyzes the reversed reaction. O-GlcNAcylated proteins involve in many cellular processes; such as transcription, signal transduction, and proteolysis by proteasome, *etc*. Alteration of O-GlcNAcylation is associated with the development and progression of many human diseases including cancer. Immunohistochemistry of cholangiocarcinoma (CCA), a malignancy of biliary epithelium, revealed an increase of O-GlcNAcylation of nucleocytoplasmic proteins compared with the normal bile ducts. Roles of O-GlcNAcylation were demonstrated in CCA cell lines using si-OGT. Suppression of OGT significantly reduced migration, invasion and clonogenic survival of CCA cell lines; KKU-M139 and KKU-M213 comparing with the scramble-siRNA treatment. In contrast, enhancing the O-GlcNAcylation by suppression of OGA expression significantly increased the ability of cell migration and invasion. Real-time RT-PCR of siOGT treated cells revealed the significant decreasing of the matrix metalloproteinase (MMP)-3, MMP-7, tissues inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1, and TIMP-2. This information emphasizes the role of O-GlcNAcylation in progressiveness of CCA. Further comprehensive analysis is needed to elucidate the molecular mechanism underlining the involvement of O-GlcNAcylation in metastasis of CCA.

Keywords: cholangiocarcinoma, metastasis, O-GlcNAcylation, OGT

KKU Research Journal
Vol.18 (supplement) October, 2013
Abstracts and Proceedings

ACGG 2013 Conference

5th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology

October 14-18, 2013

Faculty of Medicine, Khon Kaen University
Khon Kaen Thailand

P-19

O-GlcNAcylation involved in metastasis of cholangiocarcinoma

Chatchai Phoomak[1,2], Atit Silsirivanit[1,2], Chaisiri Wongkham[1,2], Sopit Wongkham[1,2]**

[1] *Department of Biochemistry;*
[2] *Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, KhonKaen, 40002, Thailand; E-mail: atitsil@kku.ac.th, sopit@kku.ac.th, Tel/Fax: 66-43-348-386*

O-GlcNAcylation is a post-translational modification process by which a single *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) is attached to the hydroxyl (-OH) of serine or threonine via β-glycosidic linkage. Unlike N-linked or O-linked glycosylation, O-GlcNAc modified proteins are generally either cytoplasmic or nuclear proteins that are not further processed into a complex oligosaccharide. The O-GlcNAc modification is a dynamic process modulated by two enzymes; O-linked β-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA). The association of O-GlcNAcylation with development and progression of cancer is evident. Increasing of O-GlcNAcylation in cholangiocarcinoma (CCA) comparing with the normal bile duct counterpart was reported. Elevation of O-GlcNAcylation in CCA was shown to be the result of increased level of OGT and decreased level of OGA expressions. Here, we analyzed the roles of O-GlcNAcylation in CCA using *in vitro* functional assays. Expression of OGT in CCA cell lines (KKU-M139 and KKU-M213) was suppressed by OGT-specific siRNA, resulting in the marked decrease of O-GlcNAcylated proteins (OGP). Migration, invasion and clonogenic survival of siOGT-treated cells were significantly decreased comparing with scramble-siRNA treated cells. In contrast, reduced OGA expression by siOGA increased OGP level and enhanced cell migration and invasion. This information emphasizes the role of O-GlcNAcylation in metastasis of CCA. Further study is needed to elucidate the molecular mechanism underlining the involvement of O-GlcNAcylation in metastasis of CCA.

Keywords: O-GlcNAcylation, cholangiocarcinoma, metastasis

Acknowledgement: We would like to thank the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, SHeP-GMS cluster of Khon Kaen University for the financial support. AS was supported by the New Researchers Grant (MRG-550031), which co-funded by the OHEC and Thailand Research Fund.

The Second Symposium of

Specific Health Problem in Greater Mekong Sub-region (SHeP-GMS)

Health Cluster, The National Research University Project

29 March 2013

Auditorium 1, Faculty of Medicine,
Khon Kaen University

มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Khon Kaen University

POSTER WALK

P9

UP-REGULATED O-GLCNACYLATION PROMOTES CHOLANGIOCARCINOMA METASTASIS

Phoomak C[1,3], Silsirivanit A[1,3], Puapairoj A[2,3], Wongkham C[1,3] and Wongkham S[1,3]

[1] *Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kean University, Khon Kean 40002, Thailand*

[2] *Department of Pathology, Faculty of Medicine, Khon Kean University, Khon Kean 40002, Thailand*

[3] *Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kean University, Khon Kean 40002, Thailand*

Introduction: O-GlcNAcylation is a reversible post-translational modification, which regulated by O-linked β-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) and β-N-acetylglucosaminidase (OGA). OGT transfers *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) to hydroxyl (-OH) group of serine or threonine, while OGA catalyzes the reverse reaction. This modification involves in many cellular processes such as gene expression, signal transduction, and cell proliferation, *etc.*, therefore aberrant O-GlcNAcylation contributes in the development and progression of many human diseases. The alteration of O-GlcNAcylation was reported to be involved in the proliferation, migration, and invasion of many cancer cells. Our study is aimed to determine the alteration of O-GlcNAcylation in cholangiocarcinoma (CCA) and its association with the disease progression.

Methods: The O-GlcNacylation level in CCA was determined by the immunohistochemistry staining of O-GlcNAcylated protein (OGP), OGT, and OGA in 88 mass forming-CCA and 10 normal liver tissues. Roles of O-GlcNAcylation in cell proliferation, apoptosis, migration, and invasion, were assessed after suppression of OGT in CCA cell lines using siRNA.

Results: Elevation of O-GlcNAcylation was observed in CCA via increased expression of OGP and OGT, comparing with normal bile ducts. High level of O-GlcNAcylation was associated with poor clinical outcomes of CCA patients. Suppression of OGT expression by siRNA resulted in decreasing O-GlcNAcylation level and significantly suppressed the migration and invasion without altering the proliferation of CCA cell lines.

Conclusions: Our study demonstrates the elevation of O-GlcNAcylation in CCA via increasing OGT expression. High level of O-GlcNAcylation in CCA tissues is possibly used as a poor prognostic indicator of CCA. Moreover, O-GlcNAcylation involved in the migration and invasion of CCA cell lines, suggesting the possible roles of O-GlcNAcylation in CCA metastasis.

http://glycoscience.or.kr/ACGG4

ACGG 2012 Conference

4th Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology

ICC JEJU, Jeju Island, Korea

Stone Harubang, Jeju Island, Korea

Mountain Hala, Jeju Island, Korea

October 28-31, 2012
ICC JEJU, Jeju Island
Korea

Hosted by the Korean Society for Glycoscience (KSG) 한국당과학회

Supported by Kyung Ahm Education & Culture Foundation 경암교육문화재단

OR-6

Atit Silsirivanit อาทิตย์ศิลป์ศิริวานิชย์ (Thailand)
Lecturer, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand
E-mail: atitsil@kku.ac.th
Homepage: http://biochem.md.kku.ac.th/

Role of O-GlcNAcylation in cholangiocarcinoma

Atit Silsirivanit[1,3]*, Chatchai Phoomak[1,3], Somchai Pinlaor[2,3], Chaisiri Wongkham[1,3], Sopit Wongkham[1,3]*
[1]*Department of Biochemistry;* [2]*Department of Parasitology;* [3]*Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research center, Faculty of Medicine, Khon Kaen, 40002, Thailand*
E-mail: atitsil@kku.ac.th, sopit@kku.ac.th Tel/Fax: 66-43-348-386

Cholangiocarcnoma (CCA), a malignancy of biliary epithelium, has the highest incidence in Khon Kaen, Thailand. Alteration of glycosylation was reported in CCA and has been emphasized in be involved in the tumor development and progression. We have demonstrated the elevation of O-GlcNAcylation in human CCA tissues which associates with the increasing O-GlcNAc transferase (OGT) and decreasing O-GlcANcase (OGA). Here we explored the alteration of O-GlcNAcylation during cholangiocarcinogenesis in the *Opithorchis viverrini*-NDMA induced CCA hamster model. The hamster were divided into four groups; non-treated, *Opithorchis viverrini* (OV)-infected, *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) treated and OV-NDMA induced CCA groups. The animals from each group were euthanized at 1, 3, and 6 months after treatment, the O-GlcNAcylated proteins (OGP) were determined in the liver sections using immunohistochemistry. All non-treated, OV-infected, and NDMA-treated hamsters were not developed to be CCA and the bile ducts obtained from these non-CCA hamsters showed low staining reactivity for OGP in every time-point. Interestingly, all OV-NDMA treated hamsters were developed to be CCA within 3 months. OGP were highly detected in the nucleus of biliary cells of the OV-NDMA induced CCA hamsters at 3 months and 6 months. Hepatocytes and inflammatory cells showed weakly positive staining, while the stromal showed negative staining of O-GlcNAcylated proteins. This information suggested the role of O-GlcNAcylation in cholangiocarcinogenesis. The precise mechanism by which O-GlcNAcylation involved in CCA development is needed to be further examined.

Acknowledgement: This work was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, SHeP-GMS cluster of Khon Kaen University and Research Grant for the New Scholar (MRG-5580031) for AS, co-funding of the Office of Higher Education Commission and Thailand Research Fund.

O-E-04 ABERRANT O-GLCNACYLATION ASSOCIATES WITH DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF CHOLANGIOCARCINOMA

Silsirivanit A[1,3], Phoomak C[1,3], Puapairoj A[1,3], Wongkham C[1,3], Wongkham S[1,3]

[1]Department of Biochemistry; [2]Department of Pathology; [3]Liver Fluke and Cholangiocarcinoma Research Center, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

Email address: atitsil@kku.ac.th

O-GlcNAcylation, the O-linked glycosylation with a single molecule of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), is an important process for controlling functions, stability, and expression of many cellular proteins. Several O-GlcNAc modified proteins (OGP) were reported to be involved in the development and progression of many cancers. Addition and removal of O-GlcNAc is regulated by *N*-acetylglucosaminyltransferase (OGT) and *N*-acetylglucosaminidase (OGA), respectively. Here, we demonstrate the alteration of O-GlcNAcylation and its role in cholangicoarcinoma (CCA). The immunohistochemistry of OGP, OGT, and OGA were used to explore the alteration of O-GlcNAcylation in mass-forming intrahepatic CCA tissues, comparing with normal liver tissues. OGP and OGT were weakly stained, while OGA showed the strongly positive staining in biliary epithelium observed in all normal livers. In contrast, the high reactivity of OGP ($P = 0.036$) and OGT ($P = 0.205$) immunostaining was observed in CCA, while the OGA reactivity was decreased ($P = 0.114$). Elevation of O-GlcNAcylation in CCA was associated with poor clinical outcome of the patients. Moreover, the O-GlcNAcylation was markedly suppressed in CCA cell lines (KKU-M213, KKU-M214) after knockdown of OGT by siRNA, resulting in the significantly decreased invasiveness of CCA cell lines ($P < 0.05$). These data suggested the possible role of O-GlcNAcylation in the development and progression of CCA.

Keywords: O-GlcNAc, metastasis, OGT, OGA