

## **Abstract**

This study has explored molecular biology of nasopharyngeal carcinoma (NPC) and head & neck squamous cell carcinoma (HNSCC) developments. We succeeded in studying three major topics, genetic alterations in Epstein-Barr viral (EBV) associated NPC, EBV DNA in serum of patients with NPC, and telomerase activity in oral leukoplakia and HNSCC.

## **Genetic Alterations in EBV Associated NPC**

Nasopharyngeal carcinoma is a subset of HNSCC with unique endemic distribution and aetiological co-factors. EBV has been revealed to be an important aetiological factor for most nasopharyngeal carcinomas. Nevertheless, additional genetic alterations may be involved in their development and progression. The aim of this study was to determine the likely chromosomal locations of tumour-suppressor genes related to EBV associated NPC. Fifty-six microsatellite polymorphic markers located on every autosomal arm were used to estimate the incidence of loss of heterozygosity (LOH) in 27 EBV associated NPC. High frequencies of allelic loss were observed on chromosome 3p (75.0%) and 9p (87.0%). Chromosome 9q, 11q, 13q and 14q displayed loss in over 50%, while chromosome 3q, 6p, 16q, 19q and 22q exhibited loss in 35-50%. Furthermore, several other chromosomal arms demonstrated allelic loss in 20-35%. Additionally, 1 of the 27 cases showed microsatellite instability at multiple loci. These findings provide evidence of multiple genetic alterations during cancer development and clues for further studies of tumor-suppressor genes in EBV associated NPC.

Since the incidence of LOH in NPC amounts to a frequency of loss on chromosome 3, 9, 11q, 13q and 14q exceeding 50%, there must be crucial tumor suppressor genes for NPC development located on these chromosomes. Detail mapping on these chromosomes would reveal these valuable informations. Previous studies and our data reveal three, one and three tumor suppressor gene loci on chromosome 3, 9, and 11q respectively. Additional LOH mapping study was performed on chromosome 14q to define its minimal deletion regions. Forty tumors were selected for PCR-based deletion mapping using 16 microsatellite polymorphic markers spanning the long arm of this chromosome. LOH for at least one marker was observed in 29 (72.5%) tumors. Twenty two of these tumors displayed partial loss and provided an informative basis for detailed deletion mapping. Three minimal regions of loss were delineated. The first region was defined by markers D14S278 and D14S288 and the second was between D14S51 and telomere. These data confirmed two potential tumor suppressor gene loci at 14q12-13 and 14q32, respectively. Interestingly, the third region of loss was located on the T-cell receptor delta chain locus. This may reflect another tumor suppressor gene locus or may be a consequence of a specific genomic rearrangement of this region. In addition, these allelic losses occurred with high frequency in all tumor grades and stages and in all histological subtypes. These findings suggested that the genetic alteration of chromosome 14 is common and crucial during NPC development.

## **EBV DNA in Serum of Patients with NPC**

This study evaluated EBV DNA in sera of 46 patients with NPC and 84 healthy individuals who previously been infected with EBV. Thirteen out of 46 NPC samples were positive for EBV DNA in their sera while all 84 normal controls were negative. In addition, EBV typing between primary tumors and sera showed identical results suggesting that serum EBV DNA represented tumor DNA. To evaluate the importance of the serum NPC DNA, clinical data and tumor phenotypes including age, sex, WHO type, EBV type, stage, tumor invasion, metastasis and apoptosis were correlated with serum EBV DNA and only apoptosis was found statistically significant. In conclusion, EBV DNA was detectable in the serum of some patients with NPC and represented tumor DNA. In addition, this finding was associated with tumor cell death and might have clinical implications in the future.

### **Telomerase Activity in Oral Leukoplakia and HNSCC.**

The expression of telomerase, a ribonucleoprotein complex, is necessary to overcome cellular senescence, and it is associated with immortal cells and cancer. However, its role in precancerous lesions such as oral leukoplakias is less known. The purpose of this study is to investigate the presence of telomerase activity in oral leukoplakia and the relationship between the enzyme and multistep tumorigenesis. Telomerase activity was detectable in 14 of 16 HNSCCs and 10 of 26 oral leukoplakia tissues. We also showed that the expression of telomerase in the premalignant lesions was associated with phenotypic progression, the degree of dysplasia. These results indicate that telomerase is activated frequently during the late stage oral premalignancy and may play a crucial role in head and neck squamous cell carcinogenesis.

#### **Note:**

Genetic alterations in Epstein-Barr viral associated NPC is described in chapter 1 and 2.

EBV DNA in serum of patients with NPC is described in chapter 3.

Telomerase activity in oral leukoplakia and HNSCC is described in chapter 4.

## บทคัดย่อ

การศึกษานี้ ศึกษาอนุชีววิทยาการพัฒนาระยะหลังโพรงจมูก และมะเร็งศีรษะและคอแบบสความัส เราสามารถสำเร็จการศึกษาใน 3 หัวข้อคือ การเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมในมะเร็งหลังโพรงจมูกที่ติดเชื้อเอปส์ไตน์บาร์ไวรัส ดีเอ็นเอของเอปส์ไตน์บาร์ไวรัสในเซลล์ของผู้ป่วยมะเร็งหลังโพรงจมูก และการทำงานของเอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรสในเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งของช่องปากและมะเร็งศีรษะและคอแบบสความัส

### การเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมในมะเร็งหลังโพรงจมูกที่ติดเชื้อเอปส์ไตน์บาร์ไวรัส

มะเร็งหลังโพรงจมูกถูกจัดอยู่ในมะเร็งศีรษะและคอแบบสความัสที่มีลักษณะจำเพาะของการกระจายตัวและสาเหตุเอปส์ไตน์บาร์ไวรัสถูกพบว่าเป็นสาเหตุที่สำคัญของมะเร็งหลังโพรงจมูกโดยส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ของเนื้อเยื่อน่าจะมีส่วนในการพัฒนาของมะเร็ง วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อที่จะวินิจฉัยตำแหน่งของโครโมโซมที่มียีนต้านมะเร็งที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งหลังโพรงจมูกที่ติดเชื้อเอปส์ไตน์บาร์ไวรัส ไมโครแซตเทลโลท 56 อัน ที่พบกระจายอยู่ทุกแขนงของออโตโซมถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาความถี่ของการเกิดภาวะสูญเสียเฮเทอโรไซโกท ในมะเร็งหลังโพรงจมูกที่ติดเชื้อเอปส์ไตน์บาร์ไวรัส 27 ราย ความถี่ที่สูงของภาวะนี้ถูกพบในโครโมโซมที่ 3p (75.0%) และ 9p (87.0%) โครโมโซม 9q 11q 13q และ 14q พบภาวะสูญเสียมากกว่า 50% ในขณะที่โครโมโซม 3q 6p 16q 19q และ 22q แสดงภาวะสูญเสีย 35-50% นอกจากนี้แขนโครโมโซมอื่น ๆ บางโครโมโซม พบภาวะสูญเสียได้ 20-35% นอกจากนี้ 1 ราย ใน 27 ราย พบภาวะไม่เสถียรของไมโครแซตเทลโลทในหลายตำแหน่ง การศึกษานี้แสดงถึงการกลายพันธุ์ในหลายตำแหน่งในระหว่างการพัฒนาของมะเร็งและเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาลำดับยีนต้านมะเร็งในมะเร็งหลังโพรงจมูกที่ติดเชื้อเอปส์ไตน์บาร์ไวรัส

เนื่องจากภาวะสูญเสียเฮเทอโรไซโกทในมะเร็งหลังโพรงจมูกพบความถี่สูงที่โครโมโซม 3 9 11q 13q และ 14q มากกว่า 50% จึงน่าจะมียีนต้านมะเร็งที่สำคัญสำหรับการเจริญของมะเร็งหลังโพรงจมูกอยู่บนโครโมโซมต่าง ๆ เหล่านี้ การศึกษาแผนที่โครโมโซมอย่างละเอียดจะสามารถให้ข้อมูลเหล่านี้ได้ การศึกษาที่ผ่านมาพบมียีนต้านมะเร็งอยู่ 3 1 และ 3 ตำแหน่งบนโครโมโซม 3 9 และ 11q ตามลำดับ เราได้ทำการศึกษาการทำแผนที่ภาวะเฮเทอโรไซโกทบนโครโมโซม 14q เพื่อค้นหาตำแหน่งการขาดหายที่สั้นที่สุด มะเร็ง 40 ราย ถูกเลือกมาศึกษาแผนที่การขาดหายด้วยพีซีอาร์โดยใช้ไมโครแซตเทลโลท 16 อัน บนแขนยาวของโครโมโซมนี้ ภาวะสูญเสียอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง ถูกสังเกตในมะเร็ง 29 ราย (72.5%) มะเร็ง 22 ราย แสดงการสูญเสียของบางตำแหน่งและมีประโยชน์สำหรับให้ข้อมูลอย่างละเอียดของแผนที่การขาดหาย การขาดหายพบว่ามีความสำคัญ 3 ตำแหน่ง ตำแหน่งแรกพบอยู่ระหว่าง D14S278 และ D14S288 และตำแหน่งที่สอง พบอยู่ระหว่าง D14S51 และ ทีโลเมียร์ ข้อมูลนี้ยืนยันว่ามียีนต้านมะเร็งที่ 14q12-13 และ 14q32 ตามลำดับ ที่น่าสนใจคือ การสูญเสียในตำแหน่งที่ 3 ถูกพบอยู่ในตำแหน่งของ T-cell receptor delta chain (TCRD) ซึ่งอาจจะหมายถึงตำแหน่งของยีนต้านมะเร็งหรืออาจจะเป็นผลของการเปลี่ยนแปลงของจีโนมในตำแหน่งนี้ นอกจากนี้ภาวะสูญเสียพบใน

ความถี่สูงในมะเร็งทุกระยะทุกชนิด การศึกษานี้ยืนยันว่าการกลายพันธุ์ของโครโมโซมที่ 14 พบบ่อยและมีความสำคัญต่อการพัฒนาของมะเร็งหลังโพรงจมูก

### ดีเอ็นเอของเอปสไตน์บาร์ไวรัสในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งหลังโพรงจมูก

การศึกษานี้ศึกษาดีเอ็นเอของเอปสไตน์บาร์ไวรัสในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งหลังโพรงจมูก 46 ราย และคนปกติที่ถูกพบว่าเคยติดเชื้อเอปสไตน์บาร์ไวรัส 84 ราย ผู้ป่วย 13 รายจาก 46 รายพบมีดีเอ็นเอของเอปสไตน์บาร์ไวรัสในซีรัมขณะที่ซีรัมของคนปกติ 84 ราย ให้ผลลบ นอกจากนี้การจำแนกเชื้อเอปสไตน์บาร์ไวรัสจากก้อนเนื้อและซีรัมให้ผลเหมือนกันแสดงว่าดีเอ็นเอของเชื้อเอปสไตน์บาร์ไวรัสในซีรัมเป็นดีเอ็นเอจากก้อนเนื้อมะเร็ง เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของดีเอ็นเอของมะเร็งหลังโพรงจมูกในซีรัม ข้อมูลทางคลินิก ลักษณะของมะเร็ง อายุ เพศ ชนิด WHO ชนิดเชื้อเอปสไตน์บาร์ไวรัส ระยะ การเบียดแทรกจากก้อนเนื้อ การกระจายตัว และ โปรแกรมการตายถูกนำมาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของเอปสไตน์บาร์ไวรัสในซีรัมและพบเฉพาะโปรแกรมการตายมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสรุปดีเอ็นเอของเอปสไตน์บาร์ไวรัสสามารถตรวจพบในซีรัมของผู้ป่วยโรคมะเร็งหลังโพรงจมูกและแสดงถึงดีเอ็นเอของเนื้อมะเร็ง นอกจากนี้การค้นพบนี้ยังมีความสัมพันธ์กับการตายของเนื้องอกและอาจมีความสัมพันธ์ต่อการนำมาใช้ทางคลินิกในอนาคต

### การทำงานของเอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรสในเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งของช่องปากและมะเร็งศีรษะและคอแบบสควamous

การแสดงออกของเอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรสซึ่งเป็นโรโบนิวคลีโอโปรตีนมีความสำคัญต่อการเอาชนะการแก่ของเซลล์และมีความสัมพันธ์ต่อภาวะไม่ตายของเซลล์และมะเร็ง อย่างไรก็ตามบทบาทของเอ็นไซม์นี้ในเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งเช่นเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งของช่องปากยังเป็นที่รู้กันน้อย วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อจะสำรวจการทำงานของเอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรสในเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งในช่องปากและความสัมพันธ์ระหว่างเอ็นไซม์นี้กับการเกิดมะเร็งแบบหลายขั้นตอน การทำงานของเอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรสถูกพบในมะเร็งของศีรษะและคอแบบสควamous ใน 14 ราย จาก 16 ราย และพบในเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งในช่องปาก 10 ราย จาก 26 ราย เรายังพบอีกว่าการแสดงออกของเอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรสมีความสัมพันธ์กับลักษณะการพัฒนาทางรูปร่างของเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็ง เช่น ระดับของการเสียรูปร่างในระดับกล้องจุลทรรศน์ ผลการตรวจพบนี้แสดงว่าการทำงานของเอ็นไซม์ทีโลเมอร์เรสถูกกระตุ้นอย่างบ่อยในระยะท้ายของเนื้อเยื่อก่อนเกิดมะเร็งในช่องปากและน่าจะมีความสำคัญต่อการเกิดมะเร็งของศีรษะและคอแบบสควamous