

การกดการสร้าง E7 RNA ในมะเร็งปากมดลูกด้วยโปรตีน Argonaute1



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE SUPPRESSION OF E7 TRANSCRIPTION IN CERVICAL CANCER WITH SITE SPECIFIC BINDING OF ARGONAUTE1 PROTEIN

Miss Kanruthai Siriphap



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

กัณฑ์ทัย ศิริภาพ : การกดการสร้าง E7 RNA ในมะเร็งปากมดลูกด้วยโปรตีน Argonaute1 (THE SUPPRESSION OF E7 TRANSCRIPTION IN CERVICAL CANCER WITH SITE SPECIFIC BINDING OF ARGONAUTE1 PROTEIN) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. นพ.อภิวัฒน์ มุทิรากร, 52 หน้า.

ในปัจจุบันมีเทคโนโลยีที่สามารถควบคุมการทำงานของยีน โดยการกดการทำงานของการทำงานของ RNA ได้ โปรตีนที่สำคัญที่น่าจะนำมาใช้ได้คือโปรตีน Argonaute1 เพราะสามารถสร้างโครมาตินให้จับตัวกันอย่างหนาแน่นในบริเวณที่โปรตีน Argonaute1 ไปจับ ซึ่งการศึกษานี้ทดสอบการใช้โปรตีน Argonaute1 เพื่อยับยั้งยีนมะเร็ง เพื่อหวังผลพัฒนาวิธีการรักษาในอนาคต ยีน E7 เป็นยีนมะเร็งที่สำคัญ ที่สร้างจาก E7 HPV ในมะเร็งปากมดลูก และการยับยั้งไม่ให้ E7 สามารถสร้าง RNA ซึ่งเป็น oncogene ที่ทำให้เซลล์มะเร็งแบ่งตัวจากระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S phase ได้นั้น น่าจะทำให้เซลล์มะเร็งมีการหยุดการแบ่งตัวในวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle) ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาในยีน E7 ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก ที่มีคุณสมบัติเป็น oncogene และ encode ได้ oncoprotein ออกมา วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อพิสูจน์ว่า CPPs-AGO1+E7sgRNA complex สามารถส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน ทำให้ยีนเป้าหมายเกิดการลดการแสดงออกของยีนได้ (down-regulated gene) และสามารถลดความเป็นมะเร็งลงได้ โดยการออกแบบ Construction โปรตีน Argonaute1 จับกับ E7 single guide strand RNA (E7sgRNA) ได้เป็น complex และนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก (cell line) ได้แก่ HeLa และ C-33 A จากนั้นนำมาสกัด RNA และทำการสังเคราะห์ cDNA เพื่อนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีน E7 และนำไปวัดตรวจวัดค่า metabolic activity ด้วยเทคนิค MTT assay พบว่า CPPs-AGO1+E7sgRNA สามารถยับยั้งการทำงานของยีน E7 ได้ การแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์มะเร็ง HeLa แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์ C-33 A และเมื่อนำมาตรวจสอบการเจริญของเซลล์ (Cell proliferation) โดยการวัดค่า metabolic activity ด้วยเทคนิค MTT assay พบว่า CPPs-AGO1+E7sgRNA นั้นมีความสามารถทำให้การเจริญของเซลล์มะเร็งลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ HeLa แต่ไม่พบการเจริญของเซลล์ลดลงในเซลล์ C-33 A จากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าโปรตีน Argonaute1 มีสามารถในการยับยั้งการทำงานของยีนส่งผลให้การแสดงออกของยีนลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของ E7sgRNA ที่นำพาโปรตีน AGO1 ไปยังลำดับเบสเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีผลทำให้ยีนเกิดการยับยั้งการทำงานด้วยกระบวนการ Histone modification ซึ่งทำให้โครมาตินจับตัวกันอย่างหนาแน่น และยังส่งผลต่อการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell line) ทำให้การเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกลดลงอย่างมีนัยสำคัญได้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CPPs-AGO1+E7sgRNA กับกลุ่ม CPPs-AGO1+Scramble

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5874047930 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: CERVICAL CANCER ; ARGONAUTE1 PROTEIN ; E7 GENE

KANRUTHAI SIRIPHAP: THE SUPPRESSION OF E7 TRANSCRIPTION IN CERVICAL CANCER WITH SITE SPECIFIC BINDING OF ARGONAUTE1 PROTEIN. ADVISOR: PROF.APIWAT MUTIRANGURA, M.D.,Ph.D., 52 pp.

At the present there are technologies can control the genes by suppression RNA synthesis. The most important protein is Argonaute1 protein. This protein can make heterochromatin in target gene at binding site of Argonaute1 protein. In This study, we prove Argonaute1 protein has ability to inhibit cancer gene for the development of future treatments. *E7* gene is the major cancer gene made from *E7* HPV in cervical cancer. The suppression of *E7* gene for RNA synthesis, which is oncogene that causes cancer cells to divide from the G1 phase into the S phase in cell cycle. This is why cancer cell break down in cell cycle. We study in *E7* gene which associated with cervical cancer and characteristics is oncogene and encode oncoprotein. The purpose of this study is to investigate construction of CPPs-AGO1+*E7*sgRNA complex can reduce carcinogenesis and can repress gene expression of *E7* gene in cervical cancer cell line (down-regulated gene). We designed construction of Argonaute1 protein conjugated with *E7* single guide strand RNA (*E7*sgRNA) to complex form and transfect into HeLa and C-33 A cell line. After that, we extracted RNA and synthesize cDNA for observe gene expression by Real-time PCR technique, we found that Argonaute1 protein can inhibit gene expression of *E7* gene in HeLa cell line and decrease gene expression significantly, but not in C-33 A cell line. We observe metabolic activity value by MTT assay, found that cell proliferation in HeLa cell line decrease cell growth significantly, but not in C-33 A cell line. In summary, Argonaute1 protein has the ability to inhibit gene expression, resulting in decreased expression of gene. Due to the *E7*sgRNA that transports AGO1 protein to target sequences in gene efficiently. Gene expression is inhibited as a result of Histone modification process. Consequently, the CPPs-AGO1+*E7*sgRNA can repress gene expression and inhibit the growth of cervical cancer (HeLa cell line) when compared between CPPs-AGO1+*E7*sgRNA and CPPs-AGO1+Scramble.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature

Academic Year: 2017

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

เนื่องด้วยในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่คอยให้คำปรึกษา อธิบาย ชี้แนะวิธีการและหลักการต่างๆ ตลอดจนการตรวจสอบและแก้ไขปัญหาต่างๆที่เป็นอุปสรรคต่องานวิจัย งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย รศ.ดร. วิไล อินมะศิริ (ประธานคณะกรรมการ) ผศ.ดร.ชาลิสสา หลุยเจริญ ชีพสุนทร อ.ดร.นริศร คงรัตน์ โชค (คณะกรรมการภายใน) และ อ.ดร.ศิวนนท์ จิรวัดโนทัย (คณะกรรมการภายนอก) ที่ร่วมให้ความคิดเห็น และตรวจสอบพิจารณาข้อผิดพลาดในวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มอบความรู้ ความเข้าใจ และหลักวิชาการที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆและเพื่อนๆทุกคนในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์ มะเร็งและโรคของมนุษย์ ที่คอยให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ ทั้งในส่วนที่ไม่เข้าใจและข้อสงสัย พร้อมช่วยเหลือแก้ไขปัญหา ให้คำปรึกษา และข้อมูลวิชาการองค์ความรู้ต่างๆ ซึ่งทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ตลอดจนคนในครอบครัวทุกคน ที่เป็นกำลังใจสำคัญในกับผู้วิจัย และคอยสนับสนุนในด้านการศึกษาตลอดมาตั้งแต่ต้นจนจบ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and rational).....	1
คำถามงานวิจัย.....	2
สมมติฐานงานวิจัย (hypothesis).....	2
วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objective).....	2
กรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual framework).....	3
1. การศึกษา Construction CPP-AGO1+E7sgRNA สามารถลดการแสดงออกของยีน E7 ได้ ในมะเร็งปากมดลูกได้.....	4
2. การศึกษา Construction CPP-AGO1+E7sgRNA สามารถลดความเป็นมะเร็งได้.....	5
บทที่ 2.....	6
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	6
มะเร็ง (Cancer).....	6
มะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer).....	7
พันธุศาสตร์ด้านกระบวนการควบคุมเหนือพันธุกรรม (Epigenetics).....	9
การดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน (Histone modification).....	10
โปรตีน Argonaute1 (Argonaute1 protein).....	11
Single guide RNA (sgRNA).....	13
Cell-penetrating peptide (CPPs).....	13

ยีน E7 ในมะเร็งปากมดลูก	14
บทที่ 3	16
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	16
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	16
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย	17
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	19
2. สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์.....	20
3. ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย.....	20
4. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย.....	20
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	21
1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้งานวิจัย.....	21
2. การนำ recombinant DNA (rDNA) เข้าสู่ competent cells (Plasmid transformation)	21
2.1 Transformation ใน E.coli สายพันธุ์ DH5 α และ BL21 (DE3) pLySs.....	22
3. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้เกิดกระบวนการการผลิตโปรตีน (Bacterial culture for protein production).....	22
4. การแยกและทำโปรตีน AGO1 ให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ HIS Trap ขนาด ปริมาตร 1 mL.....	23
5. การตรวจสอบโปรตีน AGO1 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และ เทคนิค Western blot	24
5.1 เทคนิค Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	24
5.2 เทคนิค Western blot	24

6. Conjugation ของโปรตีน CPP-AGO1 กับ E7 Single guide strand complex (E7sgRNA).....	25
7. Transfection assay (การ Transfect CPPs-AGO1+E7sgRNA เข้าสู่ Cell line)...	26
8. การสกัด RNA จาก HeLa Cells line และ C-33 A Cells line.....	26
9. การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)	27
10. การวิเคราะห์การแสดงออกของ E7 RNA ด้วยเทคนิค Real-time PCR.....	28
11. เทคนิคในการวิเคราะห์ Cell proliferation ในการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Assay.....	29
การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)	30
ข้อจำกัด (Limitation).....	30
ประโยชน์ที่ได้ และการประยุกต์ใช้ (Expected benefit and application).....	30
อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problem).....	31
บทที่ 4	32
ผลการทดลอง.....	32
1. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน Argonaute1 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค Western blot	32
2. ผลจากการศึกษาการกีดการทำงาน E7 RNA ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก 2 ชนิด ได้แก่ HeLa cell line และ C-33 A cell line ด้วยเทคนิค Real-time PCR (qPCR).....	32
2.1. การศึกษาการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) ด้วยเทคนิค Real-time PCR	33
2.1.1 ผลการ Transfection AGO1+E7sgRNA ใน HeLa cell line ในวันที่ 1 และวันที่ 2 ของการทดลอง	33

2.1.2 ผลการ Transfection AGO1+E7sgRNA ใน HeLa cell line ในวันที่ 3 และวันที่ 4 ของการทดลอง	35
3. การศึกษา Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line และ C-33 A cell line (HPV negative) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay	37
3.1. การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (Cell proliferation) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa cell line (HPV18) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity โดยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay .	38
3.1.1 ผลการ Transfection AGO1+E7sgRNA ใน HeLa cell line ในวันที่ 1 และวันที่ 2 ของการทดลอง	38
3.1.2 ผลการ Transfection AGO1+E7sgRNA ใน HeLa cell line ในวันที่ 3 และวันที่ 4 ของการทดลอง	39
3.2. การศึกษา Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33 A cell line (HPV negative) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay .	41
3.2.1 ผลการ Transfection AGO1+E7sgRNA ใน C-33 A cell line ในวันที่ 1 วันที่ 2 วันที่ 3 และวันที่ 4 ของการทดลอง	41
บทที่ 5	44
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	44
รายการอ้างอิง	48
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	52

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 : แผนผังกรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual framework).....	3
รูปที่ 2 : แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทดลองที่ 1.....	4
รูปที่ 3 : แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทดลองที่ 2.....	5
รูปที่ 4 : Hallmark of cancer	7
รูปที่ 5 : ลำดับการติดเชื้อไวรัส HPV เข้าสู่ปากมดลูก.....	8
รูปที่ 6 : ระยะเวลาต่างๆของการเกิดมะเร็งปากมดลูก ระยะ 0-4	9
รูปที่ 7 : โครงสร้างของโครมาติน (Chromatin) ที่ประกอบไปด้วยโปรตีนฮิสโตน 4 คู่.....	10
รูปที่ 8 : Histone modification ที่บริเวณ histone tail ของนิวคลีโอโซม ตรงกรดอะมิโนไลซีน (K) และเซอรีน (S) โดยกระบวนการอะเซทิลเลชัน (A), เมทิลเลชัน (M), ฟอสโฟรีเลชัน (P).....	11
รูปที่ 9 : โครงสร้างของโปรตีน Argonaute1	12
รูปที่ 10 : โครงสร้างของการรวมตัวกันระหว่างโปรตีน และ single guide	13
รูปที่ 11 : Plasmid Map Ago1_Human (Invitrogen).....	14
รูปที่ 12 : กลไกการทำงานของโปรตีน E7 ของเชื้อไวรัส HPV	15
รูปที่ 13 : การเตรียมตัวอย่างของเทคนิค Western blot	25
รูปที่ 14 : (A) ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน Argonaute1 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....	32
รูปที่ 15 : การศึกษาการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) ด้วยเทคนิค Real-time PCR (A) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 1	34
รูปที่ 16 : การศึกษาการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) ด้วยเทคนิค Real-time PCR (C) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 3	35
รูปที่ 17 : การศึกษาการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA และกลุ่ม CPPs-Ago1+Scramble ด้วยเทคนิค Real-time PCR ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน	36
รูปที่ 18 : การศึกษา Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค MTT assay (A) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 1 (B) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 2.....	38
รูปที่ 19 : การศึกษา Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค MTT assay (C) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 3 (D) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 4.....	39

รูปที่ 20 : การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (Cell proliferation) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA และกลุ่ม CPPs-Ago1+Scramble ด้วยเทคนิค MTT assay ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน.....	40
รูปที่ 21 : การศึกษา Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33 A cell line.....	42
รูปที่ 22 : การศึกษาวิเคราะห์ Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33 A cell line (HPV negative) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA และกลุ่ม CPPs-Ago1+Scramble ด้วยการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค MTT assay ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน.....	43



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 : ตารางแสดงปริมาณส่วนผสมในขั้นตอน Real-time PCR ของ <i>E7</i> Gene.....	28
ตารางที่ 2 : ตารางแสดงปริมาณส่วนผสมในขั้นตอน Real-time PCR ของ <i>GAPDH</i> Gene.....	28
ตารางที่ 3 : แสดง Condition ของ Real-time PCR.....	29



บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and rational)

โรคมะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer) เป็นปัญหาสุขภาพอันดับต้นๆ ในเพศหญิงทั่วโลก ซึ่งในแต่ละปีนั้นจะพบผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มขึ้นทั่วโลกประมาณ 6,000 ราย และมีแนวโน้มที่จะพบผู้ป่วยรายใหม่เพิ่มขึ้นในทุกๆ ปี ในแง่ของปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคนั้น มีทั้งปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน ไม่ว่าจะเป็นสภาพแวดล้อม การบริโภคอาหาร หรือแม้แต่การกระตุ้นต่างๆ การเจริญผิดปกติของเซลล์ (Abnormal growth) หรือการแบ่งตัวของเซลล์เร็วกว่าปกติ (Rapid cells division) หรือจากการเปลี่ยนแปลงในระดับเหนือพันธุกรรม (Epigenetics) และปัจจัยสำคัญที่สุดที่พบจากการศึกษาต่างๆ ได้พบว่ามะเร็งปากมดลูก มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ Human papillomavirus (HPV infection) สายพันธุ์ที่พบได้บ่อยได้แก่ HPV type 16 และ HPV type 18 ซึ่งจากข้อมูลเหล่านี้ทำให้ทราบถึงสาเหตุและปัจจัยพื้นฐานที่สามารถชักนำให้เกิดโรคมะเร็งได้ (Carcinogenesis)

จากการศึกษาการเปรียบเทียบ Whole-genome ระหว่างข้อมูล promoter-methylation (GSE20598) กับ AGO binding site (CLIPZ database) ด้วยวิธีการทาง Bioinformatics (Aporntewan, Unpublish) เพื่อหาความสัมพันธ์กันระหว่างระดับ promoter-methylation กับ กลุ่มโปรตีน Argonaute1-4 พบว่าโปรตีน AGO4 มีความสัมพันธ์กับระดับ promoter-methylation มากที่สุด ซึ่งจำนวนของ AGO4 binding site มากขึ้น เมื่อ promoter มีระดับการเกิด methylation มากขึ้น จากผลการศึกษาที่น่าสนใจนี้ จึงได้มีการนำมาศึกษาต่อมาเพื่อพิสูจน์ว่า AGO4 เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการเติมหมู่เมทิลบริเวณ promoter โดยการออกแบบ engineered CPP-AGO4+single guide RNA (sgRNA) (Chalertpet, Unpublish) จากนั้นนำเข้าสู่เซลล์ เพื่อให้ CPP-AGO4 ไปจับยังบริเวณยีนเป้าหมายคือยีน *LINE1* และ *Alu* ซึ่งเป็น repetitive sequence และยีน *EML2* และยีน *CCNA1* ซึ่งเป็น single gene โดยอาศัยการจับยีนเป้าหมายด้วย sgRNA พบว่าระดับของ methylation เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จึงสรุปได้ว่าโปรตีน AGO4 นั้นสามารถชักนำให้เกิดการเติมหมู่เมทิลที่บริเวณ promoter ได้ (DNA methylation) ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีน

จากการศึกษานี้ทำให้สนใจโปรตีน Argonaute ตัวอื่นๆ ซึ่งคาดว่าจะอาจจะมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของยีนได้เช่นกัน แต่อาจจะมีกระบวนการหรือกลไกแตกต่างกัน และจึงเลือกศึกษาโปรตีน Argonaute1 ในกลุ่ม Argonaute family ที่พบว่ามีบทบาทหน้าที่ที่สามารถยับยั้งการ

transcription ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสามารถทำให้เกิดกระบวนการ histone modification ใน Yeast ได้ (1) จึงสนใจนำมาศึกษาต่อ เนื่องจากมีความสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ เช่นเดียวกับโปรตีน Argonaute4 แต่มีกระบวนการที่นำไปสู่การยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน และในการศึกษานี้จะศึกษาในยีน *E7* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งปากมดลูก และมีคุณสมบัติเป็น oncogene และ encode ได้ oncoprotein ออกมา ยังเกี่ยวข้องกับวัฏจักรการแบ่งตัวของเซลล์ (cell cycle) วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ ทำเพื่อพิสูจน์ว่า CPP-AGO1+E7sgRNA complex สามารถทำให้เซลล์มะเร็งมีการเจริญช้าลง เพื่อลดการก่อตัวของเซลล์มะเร็งได้ โดยการออกแบบ Construction Argonaute1 protein จับกับ single guide strand RNA (sgRNA) ได้เป็น complex และนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูก ได้แก่ HeLa cell line และ C-33 A cell line และเพื่อพิสูจน์ว่า CPP-AGO1+E7sgRNA complex สามารถส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของยีน ทำยีนเป้าหมายเกิดการลดการแสดงออกของยีน (down-regulated gene)

คำถามงานวิจัย

1. Construction CPP-AGO1+E7sgRNA สามารถลดการแสดงออกของยีน *E7* ในมะเร็งปากมดลูกได้หรือไม่
2. Construction CPP-AGO1+E7sgRNA สามารถลดความเป็นมะเร็งได้หรือไม่

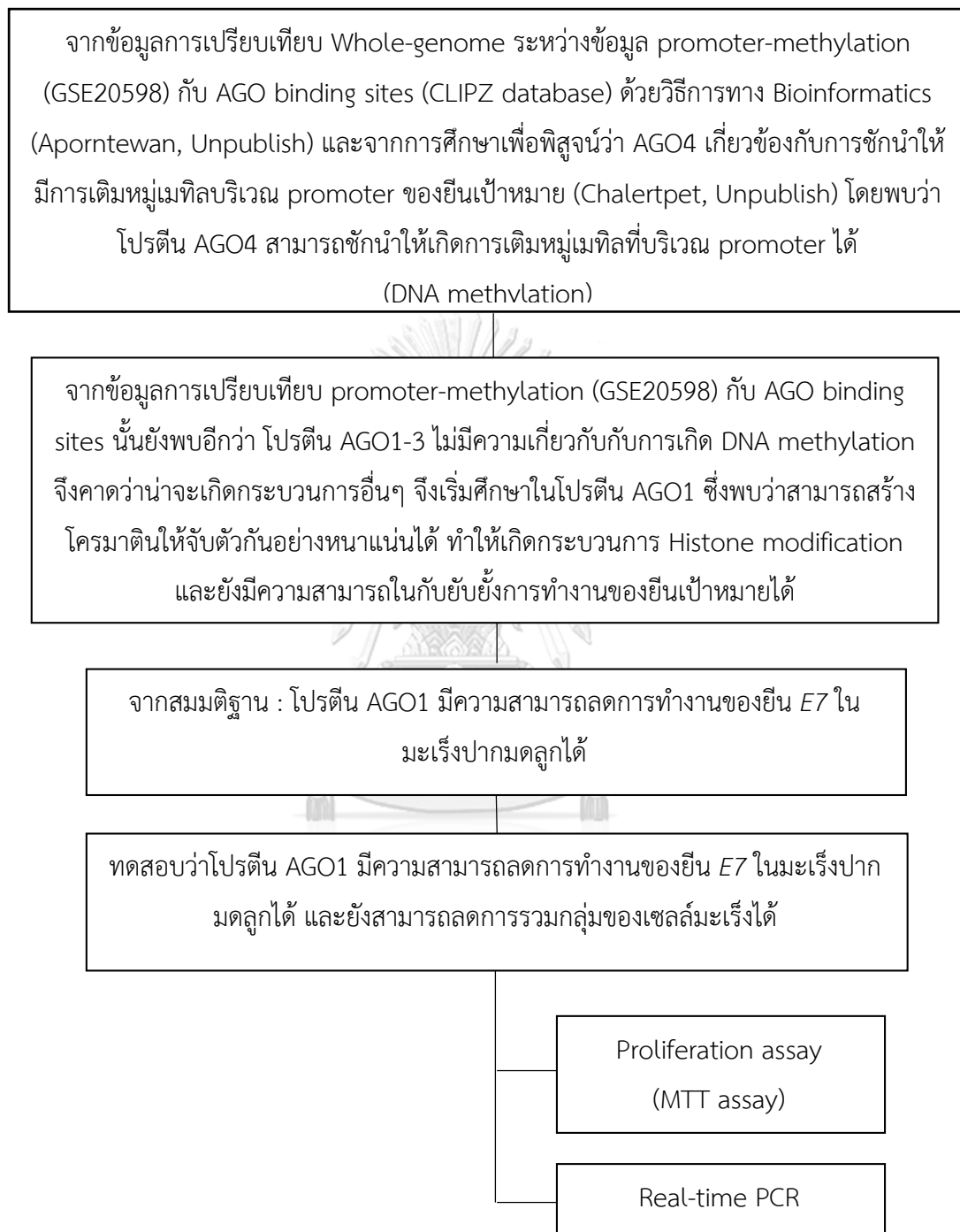
สมมติฐานงานวิจัย (hypothesis)

1. Construction CPP-AGO1+E7sgRNA สามารถลดการแสดงออกของยีน *E7* ในมะเร็งปากมดลูกได้
2. Construction CPP-AGO1+E7sgRNA สามารถลดความเป็นมะเร็งได้

วัตถุประสงค์การวิจัย (Research objective)

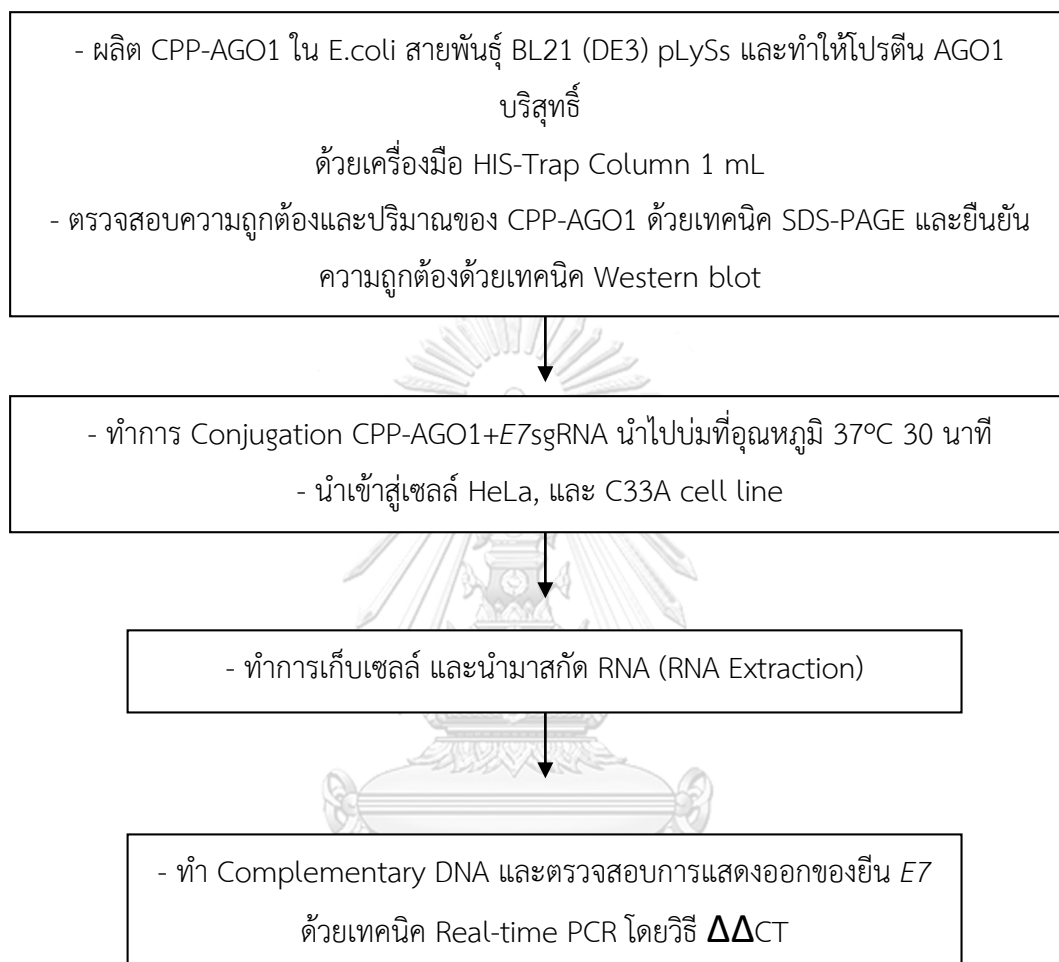
1. ทำการสังเคราะห์ Construction CPP-AGO1+E7sgRNA complex
2. เพื่อพิสูจน์ว่า Construction CPP-AGO1+E7sgRNA สามารถลดการแสดงออกของยีน *E7* ได้
3. เพื่อพิสูจน์ว่า Construction CPP-AGO1+E7sgRNA สามารถลดความเป็นมะเร็งได้

กรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual framework)



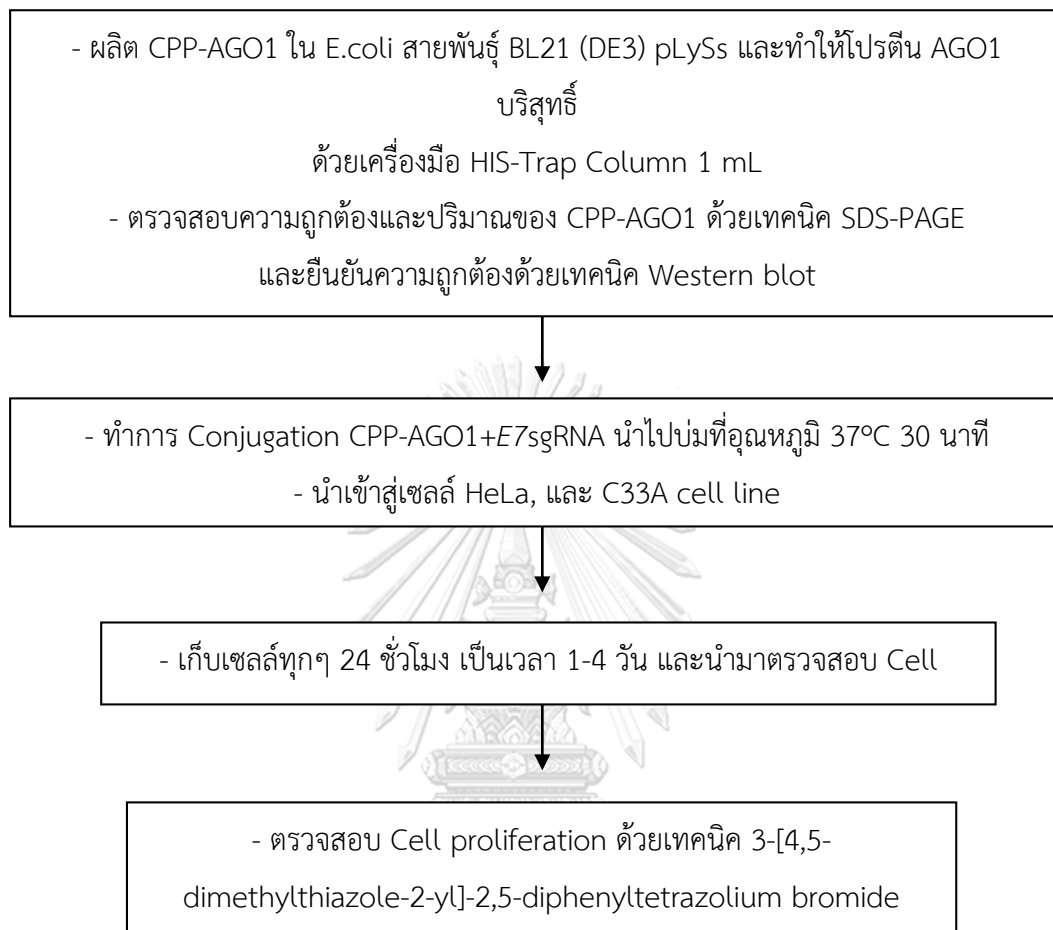
รูปที่ 1 : แผนผังกรอบความคิดงานวิจัย (Conceptual framework)

1. การศึกษา Construction CPP-AGO1+E7sgRNA สามารถลดการแสดงออกของยีน E7 ได้ใน มะเร็งปากมดลูกได้



รูปที่ 2 : แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทดลองที่ 1

2. การศึกษา Construction CPP-AGO1+E7sgRNA สามารถลดความเป็นมะเร็งได้



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 3 : แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทดลองที่ 2

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

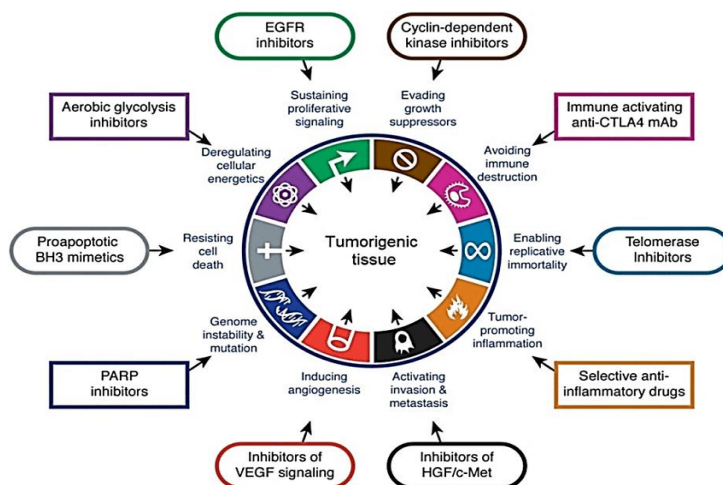
มะเร็ง (Cancer)

โรคมะเร็งนั้นเกิดจากการเจริญที่ผิดปกติไปของเซลล์ ซึ่งสาเหตุของการเกิดมะเร็งนั้นมีทั้งปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน ส่วนใหญ่นั้นจะเกิดจากปัจจัยภายใน คือในระดับพันธุกรรม ร่างกายไม่สามารถควบคุมความเจริญผิดปกตินี้ได้ และยังมีจำนวนมากกว่าปกติ อีกทั้งยังสามารถแพร่กระจายไปยังเซลล์ข้างเคียงและอวัยวะใกล้เคียงภายในร่างกายได้ และเซลล์มะเร็งพวกนี้ จะมีการเจริญที่ไม่เป็นระเบียบ มีการเจริญทับซ้อนกัน จะจับกลุ่มกันเป็นก้อน ไม่มีขอบเขตของเซลล์ที่แน่นอน จึงทำให้เกิดก้อนมะเร็งขึ้น ทำให้ส่งผลให้อวัยวะบางอย่างไม่สามารถทำงานได้อย่างเป็นปกติ ทำให้เกิดภาวะความผิดปกติและสามารถนำไปสู่อันตรายทางด้านร่างกาย ทำให้เสียชีวิตลงได้ มะเร็งทุกชนิดจะมีคุณสมบัติของการเป็นเซลล์มะเร็ง หรือที่เรียกกันว่า Hallmark of cancer ซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญ 10 ข้อ (2) ดังต่อไปนี้

1. มีความสามารถหลบหนีระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Avoiding immune destruction)
2. มีความสามารถหลบหนีระบบการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (Evading growth suppressor)
3. มีความสามารถแบ่งเซลล์ได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด (Enabling)
4. มีความสามารถกระตุ้นให้เกิดการอักเสบได้โดยเนื้องอก (Tumor-promoting inflammation)
5. มีความสามารถแพร่กระจายเซลล์ไปยังบริเวณอื่นๆ และเซลล์ข้างเคียง (Activating invasion and metastasis)
6. มีความสามารถสร้างเส้นเลือดใหม่เพื่อนำไปหล่อเลี้ยงก้อนมะเร็ง (Inducing angiogenesis)
7. มีความสามารถทำให้จีโนมไม่มีความเสถียรและทำให้เกิดการกลายไป (Genome instability and mutation)
8. มีความสามารถต่อต้านโปรแกรมการตายของเซลล์ (Resisting cell death)

9. มีความสามารถทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมผิดปกติไป (Deregulating cellular energetics)

10. มีความสามารถในการรักษาการควบคุมการเจริญของเซลล์อย่างไม่สิ้นสุด (Sustain proliferative signaling)



รูปที่ 4 : Hallmark of cancer

(Hallmark of cancer: The Next Generation, Hanahan and Weinberg, 2011)

มะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer)

โรคมะเร็งปากมดลูกเป็นโรคมะเร็งที่พบได้มากที่สุดและผู้หญิงไทยและผู้หญิงทั่วโลก และเป็นโรคที่พบเป็นลำดับที่สองในมะเร็งที่พบในเพศหญิง ซึ่งในปัจจุบันนั้นถือว่าเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญที่สุดในโลก มักพบในเพศหญิงระหว่างอายุ 30-70 ปี (พบได้สูงในช่วงอายุ 45-55 ปี) แต่ก็ยังสามารถพบได้ในเพศหญิงที่อายุประมาณ 20 ปี และในผู้สูงอายุตั้งแต่ 70 ปีขึ้นไป สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งปากมดลูก พบว่ามีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อไวรัส Human Papilloma Virus หรือที่เรียกกันว่า HPV ในปัจจุบันพบสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส HPV มากถึง 150 ชนิด แต่ชนิดของเชื้อไวรัส HPV ที่พบได้บ่อยๆ นั้น คือ HPV16 และ HPV18 (3) และยังคงมีสาเหตุอื่นๆ ได้อีกด้วย สาเหตุอื่นได้แก่ การมีเพศสัมพันธ์ มีพฤติกรรมทางเพศที่ไม่เหมาะสม มีประวัติการเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ หรือแม้กระทั่งการกินยาคุมกำเนิดเป็นระยะเวลาอันยาวนาน เป็นต้น โรคมะเร็งปากมดลูกยังสามารถแบ่งระยะการเปลี่ยนแปลงหลักๆ ได้เป็น 4 ระยะ (4) ซึ่งมีระยะดังต่อไปนี้

“ระยะที่ 0” (ระยะก่อนเป็นมะเร็ง) เป็นระยะที่เซลล์ปากมดลูกเริ่มเปลี่ยนแปลง แต่ยังไม่พบความผิดปกติอื่นๆ แต่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค Pap smear

“ระยะที่ 1” เซลล์มะเร็งยังคงอยู่เฉพาะที่ปากมดลูก ยังไม่ลุกลามไปยังบริเวณอื่นๆ

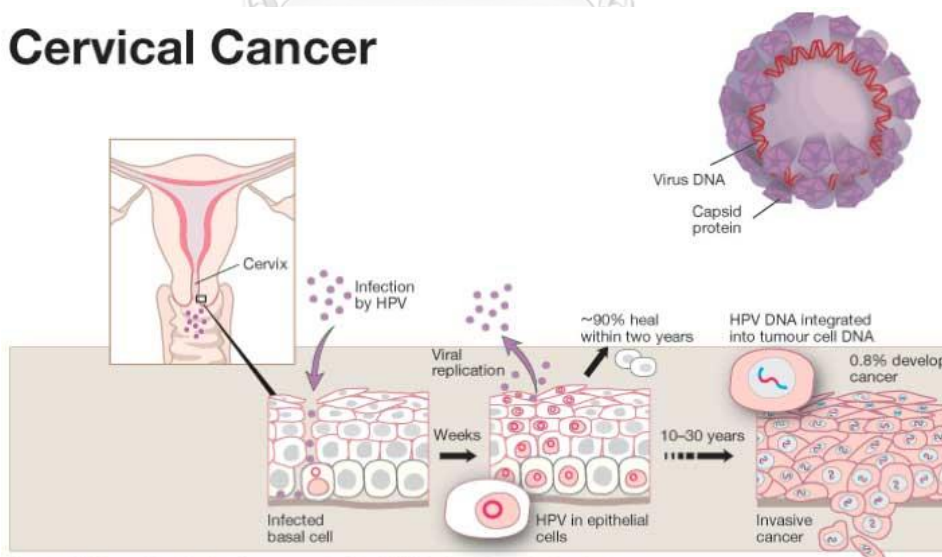
“ระยะที่ 2” เซลล์มะเร็งสามารถลุกลามไปยังบริเวณช่องคลอดส่วนบนหรือบริเวณอุ้งเชิงกราน แต่ยังไม่ขยายบริเวณไปยังผนังอุ้งเชิงกราน

“ระยะที่ 3” เซลล์มะเร็งสามารถลุกลามเข้าไปจนถึงผนังอุ้งเชิงกรานได้ และพบก้อนมะเร็งมีการกดทับท่อไต ทำให้การทำงานของไตเสื่อมลงจนไม่สามารถทำงานได้อย่างปกติ ซึ่งในบางกรณีอาจพบการกดทับไตทั้งสองข้าง ทำให้สามารถเกิดอาการไตวายได้

“ระยะที่ 4” จะเป็นระยะที่มะเร็งสามารถลุกลามไปยังบริเวณอื่นๆได้ เช่น กระเพาะปัสสาวะ ลำไส้ใหญ่ ทวารหนัก ตับ ปอด กระดูก สมอง และต่อมน้ำเหลือง เป็นต้น

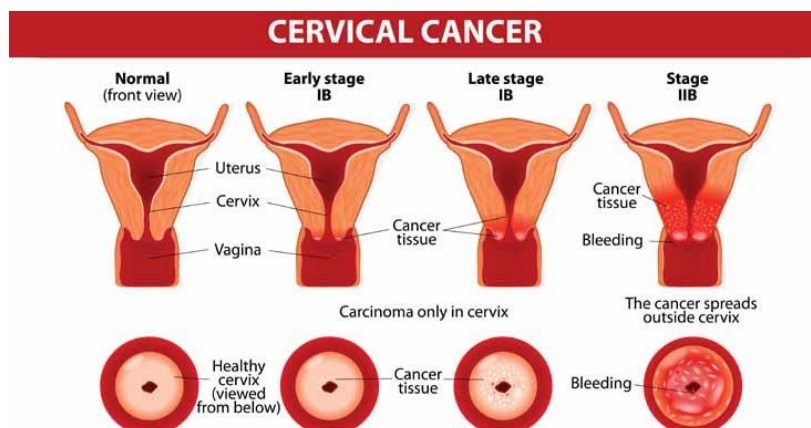
เมื่อเริ่มเป็นโรคมะเร็งปากมดลูกแล้วนั้น อาการในเบื้องต้นอาจไม่มีการแสดงออกอย่างเห็นได้ชัด จนกระทั่งเซลล์มะเร็งเริ่มมีการลุกลามไปยังบริเวณอื่นๆดังที่กล่าวมาในข้างต้น ซึ่งอาการที่บ่งชี้ว่าเป็นโรคมะเร็งปากมดลูกนั้น จะพบว่าเริ่มมีตกขาวมากเกินไปจนผิดปกติ มีกลิ่น หรือสีที่เปลี่ยนแปลงไป บางรายอาจมีเลือดออกจากช่องคลอดอย่างผิดปกติ โดยที่ไม่ใช่ประจำเดือนในรอบนั้น หรือในผู้สูงอายุมีเลือดออกจากช่องคลอด ทั้งๆที่เป็นวัยหมดประจำเดือนแล้ว ผู้ป่วยจะเริ่มมีอาการอ่อนเพลีย รู้สึกไม่อยากอาหารร่วมด้วย หรือแม้กระทั่งน้ำหนักลดลงอย่างรวดเร็ว

Cervical Cancer



รูปที่ 5 : ลำดับการติดเชื้อไวรัส HPV เข้าสู่ปากมดลูก

(The Nobel Committee for Physiology or Medicine 2008, Illustration: Annika Rohl)



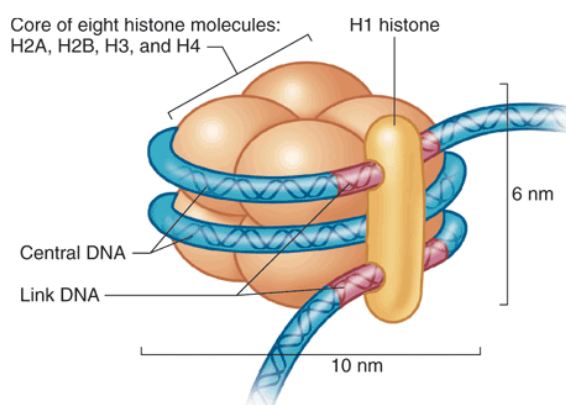
รูปที่ 6 : ระยะเวลาต่างๆของการเกิดมะเร็งปากมดลูก ระยะ 0-4

(<https://www.consumerhealthdigest.com/health-conditions/cervical-cancer.html>)

พันธุศาสตร์ด้านกระบวนการควบคุมเหนือพันธุกรรม (Epigenetics)

การศึกษาในระดับพันธุกรรมนั้น ที่มีการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไป โดยที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงของระดับพันธุกรรม ก็คือการเปลี่ยนแปลงโดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส ของดีเอ็นเอ แต่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงระดับของโครงสร้างโครมาติน และมีความสามารถถ่ายทอด ส่งต่อสู่เซลล์รุ่นลูกรุ่นหลานได้เช่นกันกับกระบวนการทางพันธุกรรมอื่นๆ (5) สารที่ถ่ายทอดทาง พันธุกรรมในที่นี้คือ โครมาติน (Chromatin) โดยหน่วยย่อยของโครมาตินนั้นเรียกว่า นิวคลีโอโซม (Nucleosome) ซึ่งประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอ (DNA) และโปรตีนฮิสโตน (Histone protein) เมื่อ รวมตัวกันแล้วจะเรียกว่า Histone complex ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีนฮิสโตนจำนวน 8 โมเลกุล รวมทั้งหมด 4 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1 คือ H2A และคู่ที่ 2 คือ H2B มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวกับโครงสร้างของ โปรตีน คู่ที่ 3 คือ H3 และคู่ที่ 4 คือ H4 ซึ่งมีบทบาทหน้าที่สำคัญคือ ทำการควบคุมการถอดรหัส พันธุกรรม (Transcription) ของยีน โปรตีนทั้ง 4 คู่นี้จะถูกล้อมรอบด้วยสายดีเอ็นเอทั้งหมด 2 รอบ และในแต่ละนิวคลีโอโซม จะมีดีเอ็นเออยู่ทั้งหมด 147 คู่เบส เมื่อมาขดตัวเข้าด้วยกันจึงเรียกว่า โคร มาติน (Chromatin) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ 1. ยูโครมาติน (Euchromatin) เป็นโครมาตินที่มี การคลายตัวในช่วง Interphase เป็นโครมาตินที่ทำงานได้ดีอยู่ เนื่องจากโครมาตินไม่ได้ขดตัวกัน อย่างหนาแน่น ยีนที่อยู่ในบริเวณนี้จึงสามารถเกิดการถอดรหัสพันธุกรรมได้ (Transcription) 2. เฮเทอโรโครมาติน (Heterochromatin) เป็นโครมาตินที่มีการขดตัวกันอย่างหนาแน่นตลอดช่วงของ Cell cycle ทำให้ Transcription factor เข้ามาจับยังบริเวณยีนไม่ได้ ทำให้ยีนในบริเวณนี้ไม่สามารถ ทำการถอดรหัสพันธุกรรมได้ (Transcription)

กระบวนการควบคุมเหนือพันธุกรรม (Epigenetics) มีกลไกการควบคุมซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กระบวนการ ได้แก่ 1. ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) 2. การดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน (Histone modification) 3. ไมโครอาร์เอ็นเอ (miRNA regulation) การเกิดโรคมะเร็งพบว่าการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันและการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน เป็นส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่ทำให้ยีนเกิดการหยุดการแสดงออก (Gene silencing) (6)

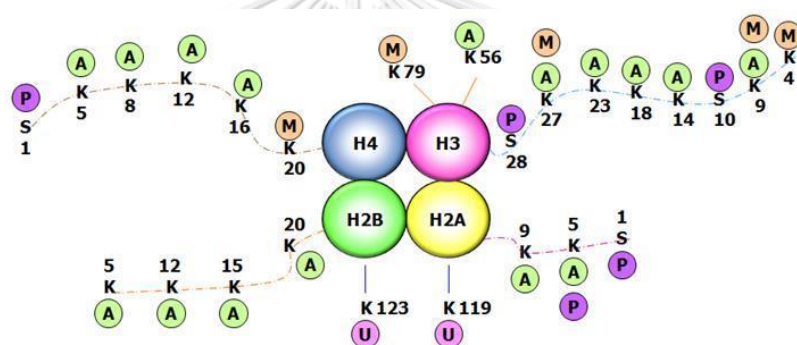


รูปที่ 7 : โครงสร้างของโครมาติน (Chromatin) ที่ประกอบไปด้วยโปรตีนฮิสโตน 4 คู่ (Janson LW, Tischer ME, The Big Picture, Medical Biochemistry journal)

การดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน (Histone modification)

ภายในนิวเคลียสจะมีโครมาตินขดตัวกันอยู่ ซึ่งจะประกอบไปด้วย นิวคลีโอโซม (Nucleosome) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยที่เกิดจากโปรตีนฮิสโตน 8 โมเลกุล รวมทั้งหมด 4 คู่ ได้แก่ H2A, H2B, H3 และ H4 เมื่อทั้งหมดรวมตัวกันและถูกสายดีเอ็นเอพันรอบๆโมเลกุลเอาไว้ จึงถูกเรียกว่า Histone complex ซึ่งโปรตีน H1 นั้นจะมีหน้าที่ที่สำคัญในการเป็นตัวเชื่อมกันระหว่างนิวคลีโอโซมของแต่ละหน่วย เพื่อช่วยให้โครมาตินขดตัวกันได้ดียิ่งขึ้น ภายใน Histone complex แต่ละหน่วยนั้นก็จะมี Structure domain และ Unstructure N-terminal tail และในส่วนของ Histone tail ที่ยื่นออกมาก็คือ โปรตีน H3 และ H4 ซึ่งจะถูกดัดแปลงภายหลังการสังเคราะห์ ซึ่งจะมีกลุ่ม Amino acid จำเพาะที่จะมาจับและเกิดกระบวนการการเติมหมู่ทางเคมีที่แตกต่างกันออกไป อาทิเช่น Methylation, Acetylation, Phosphorylation, Ubiquitination และ Sumoylation กระบวนการต่างๆต่อไปนี้มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน และกระบวนการ Histone modification ที่เด่นชัดที่สุดคือ กระบวนการ Chromatin remodeling และมีการศึกษามากที่สุด คือ Methylation

และ Acetylation ของ Lysine residue ที่จำเพาะ ในส่วนของกระบวนการ Histone modification นั้นจะมีความแตกต่างจากการเกิด DNA methylation เนื่องจากการเกิดกระบวนการนี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครมาติน ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 รูปแบบ คือ 1. ทำให้เกิดการขดตัวของโครมาตินกันอย่างหนาแน่น หรือที่เรียกกันว่า เฮเทอโรโครมาติน (Heterochromatin) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการถอดรหัสทางพันธุกรรม (Transcription repression) ของยีนนั้นๆ 2. ทำให้เกิดการคลายตัวของโครมาติน หรือที่เรียกกันว่า ยูโครมาติน (Euchromatin) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการถอดรหัสทางพันธุกรรม (Transcription activation) ของยีนนั้นๆได้ แต่ทั้งสองรูปแบบนั้นก็ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนและตำแหน่งที่ถูกตัดแปลงไป รวมทั้งประเภทของการตัดแปลงด้วยเช่นกัน ซึ่งในกระบวนการการเกิด Histone modification พบได้อยู่ 3 รูปแบบ คือ 1. Histone acetylation 2. Histone deacetylation 3. Histone methylation (7)



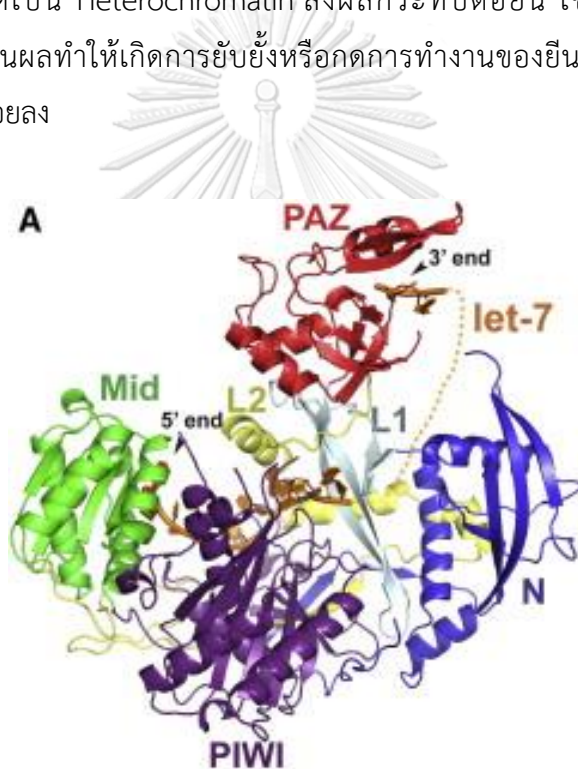
รูปที่ 8 : Histone modification ที่บริเวณ histone tail ของนิวคลีโอโซม ตรงกรดอะมิโนไลซีน (K) และเซอรีน (S) โดยกระบวนการอะเซทิลเลชัน (A), เมทิลเลชัน (M), ฟอสฟอริเลชัน (P) และยูบิควิตินเนชัน (U)

(Sriraksa R. and Limpaboon T, Epigenetics in Cholangiocarcinoma, Srinagarind Medical Journal)

โปรตีน Argonaute1 (Argonaute1 protein)

โปรตีน Argonaute (Ago) นั้นเป็นองค์ประกอบที่สำคัญใน RNA-induced silencing complex หรือที่เรียกว่า RISC complex ที่มีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีน และทำให้เกิดการแยกกันของ RNA สายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยว และยังเป็นส่วนสำคัญในการนำ miRNA และ siRNA เข้าสู่กระบวนการ RNA interference (RNAi) จากการศึกษาในแมลงหวี่ (*Drosophila spp.*) พบว่าโปรตีน Argonaute มีทั้งหมด 5 ชนิด และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian) พบทั้งหมด 4 ชนิด

(Argonaute1-4) ซึ่งเกี่ยวข้องกับ miRNA pathway (8) ซึ่งแต่ละชนิดก็จะมีหน้าที่ในกระบวนการแตกต่างกันไป ซึ่งในการศึกษานี้ ได้เลือกโปรตีน Argonaute1 มาศึกษา ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญอย่างมาก ซึ่งมีบทบาทและหน้าที่ในการแยกสาย miRNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว และโครงสร้างของโปรตีน Argonaute1 นั้นยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 โดเมน คือ N-terminal, PAZ, Mid และ PIWI domains และจากการศึกษาอื่น ๆ ยังพบอีกด้วยว่า โปรตีน Argonaute1 ในกลุ่มโปรตีน Argonaute family มีบทบาทหน้าที่ที่สามารถยับยั้งการ Transcription ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสามารถทำให้เกิดกระบวนการ Histone modification ใน Yeast ได้อีกด้วย (1) ซึ่งเมื่อโปรตีน Argonaute1 ไปจับยังบริเวณลำดับเบสที่จำเพาะนั้นๆ จะสามารถทำให้โครมาตินในบริเวณนั้นเกิดการจับกันอย่างหนาแน่น ทำให้เกิดเป็น Heterochromatin ส่งผลกระทบต่อยีน เช่น ทำให้ยีนไม่สามารถ transcription ได้ เป็นผลทำให้เกิดการยับยั้งหรือกุดการทำงานของยีนนั้นๆ มีผลทำให้ยีนมีการแสดงออกของยีนที่น้อยลง

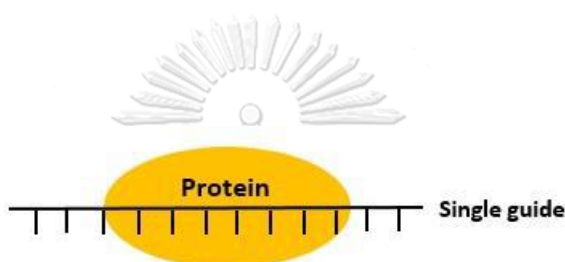


รูปที่ 9 : โครงสร้างของโปรตีน Argonaute1

(Christopher R. Faehnle, The Making of a Slicer: Activation of Human Argonaute-1., 2013)

Single guide RNA (sgRNA)

เป็นลำดับเบสสายสั้นๆ ประมาณ 15-21 เบส ซึ่งเป็นลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงกับยีนเป้าหมาย ออกแบบมาเพื่อนำพาโมเลกุล อาทิเช่น โปรตีน เข้าจับยังบริเวณลำดับเบสในยีนเป้าหมายที่ต้องการ โดยการออกแบบ single guide นี้มีความจำเป็นต้องทราบลำดับเบสของยีนเป้าหมายให้แน่นอน และประสิทธิภาพการนำพาไปยังยีนเป้าหมาย ก็ยังขึ้นอยู่กับจำนวนเบสของ single guide ดังนั้น single guide จึงมีความสำคัญที่สามารถใช้เพื่อการศึกษาในกระบวนการต่างๆ ยกตัวอย่างเช่น การนำพาโปรตีนไปยังบริเวณลำดับเบสของยีนเป้าหมาย เพื่อต้องการยับยั้งการทำงานของยีน และรวมถึงการศึกษา Genome editing



รูปที่ 10 : โครงสร้างของการรวมตัวกันระหว่างโปรตีน และ single guide
(Protein conjugated with single guide RNA)

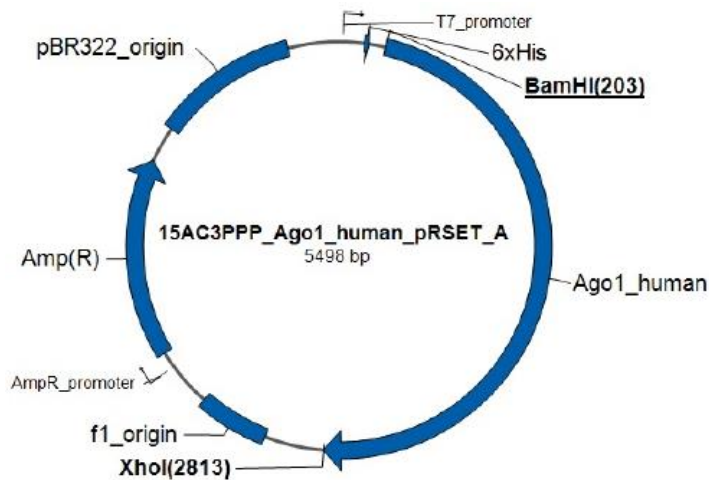
Cell-penetrating peptide (CPPs)

Cell-penetrating peptide หรือ CPPs เป็นเปปไทด์ขนาดสายสั้นๆ ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนประมาณ 5-30 ตัว มีความสามารถเข้าไปภายในเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ได้ ลักษณะของ CPPs ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบคือ

1. Cationic คือ โมเลกุลที่มีลักษณะเป็นประจุบวก
2. Amphipathic คือ โมเลกุลที่มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) อยู่ในโมเลกุลเดียวกัน
3. Hydrophobic คือ โมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ

อีกทั้งยังมีบทบาทและหน้าที่ในการขนส่งโมเลกุลทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์ อาทิเช่น Plasmid, siRNA, DNA, protein, virus หรือ polypeptide, oligonucleotide และ nanoparticle โดยผ่านทาง cellular membrane ซึ่งในปัจจุบันนี้ CPPs ได้รับความสนใจและนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากประสิทธิภาพในการขนส่งโมเลกุลสูง และยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และ

อีกทั้ง CPPs เหล่านี้ยังมีศักยภาพสูง และมีความสำคัญสำหรับในงานด้านการวินิจฉัยและการรักษาโรค ได้แก่ การขนส่งเปปไทด์หรือโปรตีนไปยังอินเป้าหมาย เพื่อประยุกต์การรักษาแบบ Targeted therapy (9)

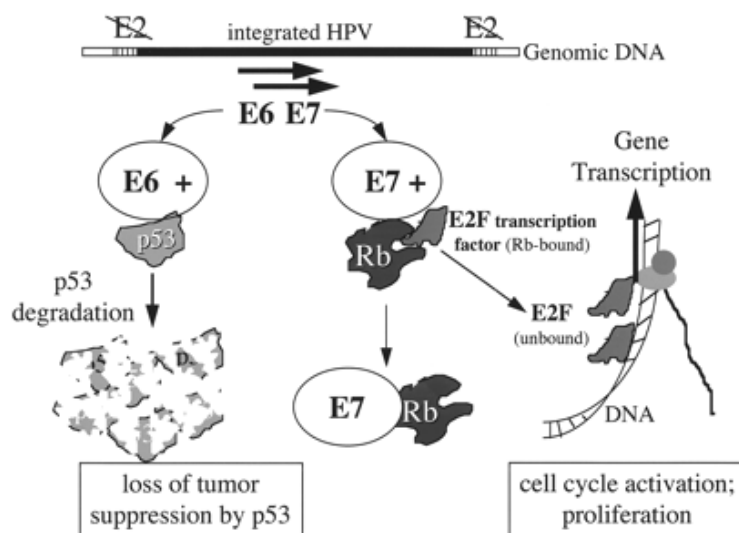


รูปที่ 11 : Plasmid Map Ago1_Human (Invitrogen)

ยีน E7 ในมะเร็งปากมดลูก

ในมะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer) ยีนที่มีความสำคัญที่เป็นสาเหตุที่ทำให้ก่อมะเร็งขึ้น ได้แก่ ยีน E6 และ E7 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น oncogene และ encode ให้ได้ oncoprotein ออกมา ซึ่งเกี่ยวข้องกับวัฏจักรการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell cycle) ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวได้อย่างไม่มีที่สิ้นสุด และยังสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งในปากมดลูกอีกด้วย (10) ในการศึกษาครั้งนี้ได้สนใจศึกษาในยีน E7 และยีน E7 นี้ยังสัมพันธ์กับสถานะการติดเชื้อไวรัส Human papilloma virus หรือ HPV ยีน E7 จะมีการสร้างโปรตีนออกมา และแม้ว่าจะมีขนาดเล็กแค่ไหนก็ตาม ก็ยังสามารถจับและรบกวนโปรตีนของเซลล์อื่นๆได้หลายชนิด และโปรตีนที่มีหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ เรียกว่า pRb ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น tumor suppressor และเมื่อโปรตีน pRb ถูกทำลายและสูญเสียหน้าที่ไป จะทำให้อncogene ทำงานได้อย่างเต็มที่ และส่งผลให้ก่อเกิดมะเร็ง ในสภาวะปกตินั้น โปรตีน pRb จะทำการจับกับ E2F ซึ่งมีบทบาทหน้าที่เป็น Transcription factor (TF) ทำให้ไม่สามารถทำงานได้ และเซลล์ก็จะหยุดการเจริญในวัฏจักรเซลล์ (Cell cycle) จากระยะ G1 phase สู่ระยะ S phase ได้ แต่เมื่อเกิดความผิดปกติไป โปรตีน E7 จะทำหน้าที่จับกับโปรตีน pRb ทำให้โปรตีน pRb ไม่สามารถจับ

และยับยั้งการทำงานของ E2F ได้ จึงทำให้ E2F เกิด Activate gene transcription ทำให้เซลล์สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ S phase และส่งผลให้เซลล์เกิดการเจริญที่ผิดปกติไป



รูปที่ 12 : กลไกการทำงานของโปรตีน E7 ของเชื้อไวรัส HPV

(Inactivation of the human papillomavirus E6 or E7 gene in cervical carcinoma cells using a bacterial CRISPR/Cas, *Medicine and Life Sciences Scientific Journal.*, 2014)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ตู้เย็น (Misubishi, Japan)
2. ตู้เย็นแช่แข็ง -20°C (Revco, Japan)
3. ตู้เย็นแช่แข็ง -80°C (Revco, Japan)
4. ตู้อบ incubator (Mettler, Germany)
5. ตู้ปลอดเชื้อ Class II (Laminar flow cabinet) (Gelman science, Singapore)
6. ตู้ดูดควัน (S.K.Powerrable) (Bockel, UK)
7. ตู้เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี 5% CO₂ (Shel lab, USA)
8. อ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, Germany)
9. เครื่องให้ความร้อน (Bockel, UK)
10. ชั้นวางปิเปตต์ (Mondotech, Thailand)
11. ปิเปตต์บอย (Tecnomara, Switzerland)
12. ไมโครปิเปตต์ขนาด P10, P20, P100, P200 และ P1000 (Eppendorf, Germany)
13. ไมโครปิเปตต์แบบหลายช่องดูด (Eppendorf, Germany)
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Boeco, Germany)
15. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูง แบบควบคุมอุณหภูมิ (Beckman coulter, USA)
16. เครื่องเขย่าสารแบบขึ้นลง (Scientific industries, USA)
17. เครื่องเขย่าสาร (Scientific industries, USA)
18. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Labtech, South Korea)
19. เครื่องชั่งดิจิตอล (Precisa, Switzerland)
20. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, Japan)
21. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo Scientific, USA)
22. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Eppendorf, Germany)
23. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Applied Biosystems, USA)
24. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Denver instrument, USA)

25. เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Ultrapure water type I) (Milipore, France)
26. เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (Ultrapure water type II) (Milipore, France)
27. เครื่องนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Hirayama, Japan)
28. เครื่องไมโครเวฟ (Sanyo, Japan)
29. เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ (Bio-RAD, USA)
30. เครื่องทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonic & Material, USA)
31. เครื่องถ่ายและบันทึกภาพเจล (Bio-RAD, USA)
32. HIS Trap™ HP histidine-tagged protein purification columns 1 mL (GE Healthcare, USA)

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. ทิปไมโครปิเปตต์ 10 µL, 200 µL และ 1,000 µL (Eppendorf, Germany)
2. หลอดใส่สารขนาด 0.2 mL, 0.5 mL, 1 mL และ 2.0 mL (Bio-RAD Elkay, USA)
3. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T25 (Corning, USA)
4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 mL, 500 mL และ 1,000 mL (Pyrex, USA)
5. ขวดดูแรนขนาด 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL และ 1,000 mL (Duran, Germany)
6. กระบอกตวงขนาด 100 mL และ 1,000 mL (Boeco, Germany)
7. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometre) (Boeco, Germany)
8. กระจกปิดสไลด์นับเซลล์ (Chance, UK)
9. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม และ 96 หลุม (Costar, USA)
10. Cryotube tube (Corning, USA)
11. Cryotube box (Corning, USA)
12. Cryotube rack (Corning, USA)
13. ซ้อนตักสาร
14. กระจาดชวย (Aro, China)
15. แผ่นพาราฟิน (Heathrow Scientific, UK)
16. กล่องลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งเซลล์ (Nalgene labware, USA)
17. ถาดเตรียมเจลพร้อมหัว (Bioer, China)

18. หลอด Polypropylene conical tube ขนาด 15 mL และ 50 mL (Elkay, USA)
19. ถังมือยางพารา (Handpro, Thailand)
20. ฟอ์เซฟ (Forcep)
21. แท่งแม่เหล็ก (Agimatic-e, China)
22. แท่นวางหลอดทดลอง (Autopack, USA)
23. พลาสติกสำหรับห่อ (Diamond, USA)
24. เทอร์โมมิเตอร์ (Precision, Germany)
25. แท่นวางหลอดทดลองแบบเย็น (Eppendorf, Germany)



สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารเคมีที่ใช้ทั่วไป

1. Diethylpyrocaronate (DEPC) (Sigma, USA)
2. EDTA (USB, Germany)
3. Absolute ethanol (Merck, Germany)
4. Ethidium bromide (Gibco BRL, Scotland)
5. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA)
6. 10% APS ()
7. TEMED (Omnipur, Germany)
8. Bromophenol blue (USB, Germany)
9. Trizol reagent (Invitrogen, USA)
10. Chloroform (Merck, Germany)
11. Agarose (Cambrex, USA)
12. 40% Acrylamide/Bis solution (Bio-RAD, USA)
13. Sodium chloride (Invitrogen, USA)
14. Sodium hydroxide (Merck, Germany)
15. 80% Ethanol
16. Nuclease Free water (Fermentas, Canada)
17. YBR green I Nucleic acid gel stain (Lonza, USA)
18. Tris (Hydroxymethyl) aminomethane (Omnipur, Germany)
19. Trypan blue (Sigma, USA)
20. Isopropanol (VWR, France)
21. DNA Ladder 25 bp (Promega, USA)
22. SYBR green Master Mix (Applied Biosystem, USA)
23. IPTG (Thermo Fisher scientific, USA)
24. ECL western blotting substrate (Thermo Fisher scientific, USA)
25. Imidazole ที่ความเข้มข้น 20, 50, 100, 200 และ 250
26. DH5 α TM Competent Cells *E. coli* (Thermo Fisher scientific, USA)
27. BL21 (DE3) pLysS Competent cell *E. coli* (Promega, USA)

28. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT reagent)
(SIGMA-ALDRICH, St. Louis USA.)

2. สารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, USA)
2. Anti-anti (100X) antibiotic-antimycotic (Gibco, USA)
3. Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA)
4. Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco, USA)
5. Trypsin EDTA (Gibco, USA)

3. ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

1. GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher scientific, USA)
2. RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher scientific, USA)

4. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

1. เซลล์มะเร็งปากมดลูก (Cervical cancer cell line) ได้แก่ HeLa cell line และ C-33 A

วิธีดำเนินงานวิจัย

เพื่อศึกษาว่า CPPs-AGO1+E7sgRNA สามารถลดการแสดงออกของยีนได้ และสามารถลดความเป็นมะเร็งลงได้ จึงมีแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

1. การศึกษาการแสดงออกของ E7 RNA ว่ามีการแสดงออกที่ลดลง (gene down-regulated) ด้วยเทคนิค Real-time PCR (qPCR) ซึ่งจะทำให้การ Transfect CPPs-AGO1+E7sgRNA เข้าใน Cell line ทั้ง 2 เซลล์ ได้แก่ HeLa cell line และ C-33 A cell line ในช่วงระยะเวลา 4 วัน

2. การศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation) ด้วย MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) หลังจากการ Transfect CPPs-AGO1+E7sgRNA เข้าใน Cell line ทั้ง 2 เซลล์ ได้แก่ HeLa cell line และ C-33 A cell line ในช่วงระยะเวลา 4 วัน

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้งานวิจัย

ในการศึกษานี้ได้ทำการทดลองในเซลล์มะเร็งปากมดลูกจำนวน 2 ชนิด คือ HeLa cell line และ C-33 A cell line ซึ่งจะต้องเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium หรือที่เรียกว่า DMEM ซึ่งในอาหารเลี้ยงเซลล์นั้น จะต้องทำการใส่ Anti-anti (100X) antibiotic-antimycotic และ Fetal Bovine Serum (FBS) ก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง โดยทำการเลี้ยงใน Flask ขนาด T25 และนำบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C และมีความชื้นชื้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% หลังจากการเพาะเลี้ยงแล้ว ต้องคอยสังเกตการณ์การเจริญของเซลล์ เพื่อทำการ subculture หรือเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อคงสภาพความสมบูรณ์ของเซลล์

2. การนำ recombinant DNA (rDNA) เข้าสู่ competent cells (Plasmid transformation)

ขั้นตอนแรก Competent cells (*E.coli*) ที่นำมาใช้มีสองสายพันธุ์ คือ DH5 α และ BL21 (DE3) pLySs แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งสองสายพันธุ์มีวัตถุประสงค์ที่นำมาใช้ศึกษาแตกต่างกันคือ สายพันธุ์ DH5 α ทำเพื่อเพิ่มปริมาณของพลาสมิด และสายพันธุ์ BL21 (DE3) pLySs ทำเพื่อให้เกิดการสร้างโปรตีนได้ ซึ่งขั้นตอนการ transformation เข้าสู่ Competent cells (*E.coli*) ทั้งสองสายพันธุ์ จะใช้วิธีการและขั้นตอนเดียวกัน

2.1 Transformation ใน E.coli สายพันธุ์ DH5 α และ BL21 (DE3) pLySs

2.1.1 ทำการผสม Competent cell (*E.coli*) ปริมาตร 50 μ L และพลาสมิด ปริมาตร 5 μ L (ความเข้มข้นของพลาสมิดไม่ควรเกิน 200 ng) โดยต้องอยู่ในสถานะเย็น จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 45 นาที ถึง 1 ชั่วโมง และทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที (ในขณะที่รอให้ทำการเตรียม S.O.C. Medium โดยเตรียมดังนี้ SOB (Super optimised broth) ปริมาตร 980 μ L, 2M MgCl₂ ปริมาตร 10 μ L และ 2M glucose ปริมาตร 10 μ L)

2.1.2 จากนั้นผสม Competent cells ที่มีพลาสมิดแล้ว นำมารวมกับ SOC ปริมาตร 980 μ L ในหลอดขนาด 1.5 mL และนำไปปั่นในเครื่องเขย่าสารที่อัตราเขย่า 250 rpm อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 90 นาที

2.1.3 จากนั้นนำมา spread บน LB plate ที่มีส่วนผสมของ antibiotic (Ampicillin 100 μ g/mL และ Chloramphenicol 35 μ g/mL) โดยแบ่งเป็น 2 plates ประกอบไปด้วย Low concentration โดยใช้ปริมาตร 70 μ L และ High concentration โดยทำการ centrifuge transformed bacteria ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทิ้ง supernatant และใส่ SOC ใหม่ ปริมาตร 250 μ L จากนั้นนำมา 70 μ L เพื่อ spread plate แล้วจึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

2.1.4 เก็บ Single colony และนำไปเลี้ยงใน LB broth ที่มีส่วนผสมของ antibiotic (Ampicillin 100 μ g/mL และ Chloramphenicol 35 μ g/mL) ที่ปริมาตร 5 mL และนำไปปั่นในเครื่องเขย่าสารที่อัตรา 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น mix grow colony ใน LB broth ปริมาตร 100 μ L และใส่ 50% glycerol ปริมาตร 100 μ L เพื่อเก็บเป็น plasmid stock (เก็บที่อุณหภูมิ -80°C)

2.1.5 สกัด Plasmid (ปฏิบัติตาม protocol ของ plasmid extraction) จากนั้นนำไปตรวจสอบ Insert size ของ Plasmid ด้วยเทคนิค PCR และ Run Agarose gel

3. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้เกิดกระบวนการการผลิตโปรตีน (Bacterial culture for protein production)

โดยจุดประสงค์ของเทคนิคนี้ ทำเพื่อที่จะชักนำให้เซลล์เกิดการสร้างโปรตีนขึ้นมา โดยการจำลองกระบวนการตามธรรมชาติ ซึ่งมีขั้นตอนต่อไปนี้

3.1. เก็บ single colony จาก LB plate และนำไปเลี้ยง ใน 2YT broth ที่มีส่วนผสมของ antibiotic (Ampicillin 100 µg/mL และ Chloramphenicol 35 µg/mL) ปริมาตร 25 µL จากนั้นนำไปปั่นในเครื่องเขย่าสาร ที่อัตรา 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ซึ่งขั้นตอนนี้เรียกว่า “Pre-culture”

3.2 Inoculate 1% ของ pre-culture ใส่ใน 200 mL ของ 2YT broth ที่มีส่วนผสมของ antibiotic (Ampicillin 100 µg/mL และ Chloramphenicol 35 µg/mL) จากนั้นนำไปปั่นในเครื่องเขย่าสาร ที่อัตรา 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C และนำมาวัดค่า cell density ที่ OD600 ทุกๆ ชั่วโมง จนกระทั่งได้ค่า OD600 ประมาณ 0.8

3.3 จากนั้นเติม “IPTG” (working 1 mM) เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างโปรตีน และนำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าสารที่อัตรา 250 rpm ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง และเก็บเซลล์ แล้ว Centrifuge ที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นทิ้ง supernatant แล้วเก็บ cell paste

3.4 ทำการ Lyse cell ด้วยการใส่ Lysis buffer จากนั้นนำไป sonicate ที่ 40% amplitude เป็นเวลา 30 วินาที และพัก 5 นาที (4-5 ครั้ง) แล้วนำไป Centrifuge ที่อุณหภูมิ 4°C ที่อัตรา 250 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บ supernatant และนำไปที่ 4°C

4. การแยกและทำโปรตีน AGO1 ให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านคอลัมน์ HIS Trap ขนาดปริมาตร 1 mL

เทคนิคนี้ทำเพื่อให้โปรตีนที่ได้มามีความบริสุทธิ์ ให้ได้แต่ชนิดของโปรตีนที่เราต้องการ ซึ่งในที่นี้คือ โปรตีน Argonaute1 และเพื่อที่จะทราบได้ว่าโปรตีนที่ได้มานั้น ต้องใช้ความเข้มข้นของ Imidazole ที่ความเข้มข้นเท่าไร จึงจะได้ชนิดของโปรตีนที่เราต้องการออกมา ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ล้าง Column HIS Trap TM HP ขนาด Column 1 mL ด้วย dH₂O ปริมาตร 5 mL
2. Equilibrate column ด้วย 20 mM Imidazole containing buffer ปริมาตร 5 mL
3. ใส่ Crude protein ปริมาตร 4 mL ลงใน Column HIS Trap TM HP และกดอย่างช้าๆ แบบหยดต่อหยด และทำการเก็บ flow through (FT) ในหลอดปริมาตร 2 mL จำนวนทั้งหมด 2 หลอด
4. ล้าง Column ด้วย 20, 50, 100, 200, 250 mM Imidazole containing buffer ปริมาตร 4 mL ตามลำดับ และเก็บ FT ในหลอดปริมาตร 2 mL จำนวนทั้งหมด 2 หลอด
5. ล้าง Column ด้วย dH₂O ปริมาตร 5 mL

6. ล้าง Column ด้วย 20% Ethanol ปริมาตร 5 mL จากนั้นนำโปรตีนทั้งหมดเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

5. การตรวจสอบโปรตีน AGO1 ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และ เทคนิค Western blot

5.1 เทคนิค Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การใช้เทคนิค SDS-PAGE เพื่อที่จะตรวจสอบว่าโปรตีนที่เราได้มานั้น เป็นโปรตีนที่เราต้องการใช่หรือไม่ โดยสังเกตจากแถบ Band ที่ปรากฏในแผ่นเจล ซึ่งจำเป็นต้องทราบขนาดของโปรตีนนั้นๆด้วย จากนั้นนำมาเทียบกับโปรตีน BSA (โปรตีนมาตรฐาน) ว่ามีความเข้มข้นของโปรตีนนั้นๆเท่าไร ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

5.1.1 เตรียม 10% SDS-PAGE ใน Denaturing condition และเตรียมโปรตีนตัวอย่าง ปริมาตร 27.5 μ L และ Loading dye ปริมาตร 12.5 μ L ต่อ 1 sample (รวมถึงโปรตีน BSA ด้วย) จากนั้นนำไปต้ม ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5-10 นาที

5.1.2 Run sample โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 150 Volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วยสี Coomassie blue ประมาณ 1 ชั่วโมง และ Destained solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5.2 เทคนิค Western blot

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบชนิดของโปรตีนที่เราสนใจ เพื่อเป็นการยืนยันจากเทคนิค SDS-PAGE อีกครั้ง โดยเทคนิคนี้ชนิดของโปรตีนที่เราสนใจ จะถูก transfer ไปยัง Nitrocellulose membrane หลังจากนั้นนำ แผ่นเมมเบรนบ่มด้วย Primary antibody และ Secondary antibody ที่จำเพาะต่อชนิดโปรตีนที่ต้องการ โดยขั้นตอนมีดังนี้

5.2.1 เตรียม 10% SDS-PAGE ใน Denaturing condition และเตรียมโปรตีนตัวอย่าง ปริมาตร 27.5 μ L และ loading dye ปริมาตร 12.5 μ L ต่อ 1 sample (รวมถึง BSA ด้วย) จากนั้นนำไปต้ม ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5-10 นาที

5.2.2 Run sample โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 150 Volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้ายโปรตีนจากแผ่นเจล SDS-PAGE ไปยังแผ่น Nitrocellulose membrane โดยเตรียมดังนี้



รูปที่ 13 : การเตรียมตัวอย่างของเทคนิค Western blot (general-western-blot-protocol, abcam company)

5.2.3 ปรับกระแสไฟฟ้าที่ 100 Volt เป็นเวลา 50 นาที (ในสภาวะเย็น)

5.2.4 ทำการ Block แผ่น Membrane ด้วย Blocking buffer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนไปบ่มด้วย Primary antibody ใน Blocking buffer เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรน ด้วย TBST 3 ครั้งๆละ 5 นาที

5.2.5 นำแผ่นเมมเบรนไปบ่มต่อด้วย Secondary antibody ใน Blocking buffer ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วย TBST 3 ครั้งๆละ 5 นาที

5.2.6 จากนั้นนำสาร ECL Western blotting substrate หยดลงบนแผ่นเมมเบรน และนำแผ่นเมมเบรนไปตรวจสอบโปรตีน Agonate1 ด้วยเครื่องถ่ายภาพและวัดระดับโปรตีนจาก western blot (C-digit blot scanner)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. Conjugation ของโปรตีน CPP-AGO1 กับ E7 Single guide strand complex (E7sgRNA)

ในเทคนิคนี้จะมีการแบ่งการทดลองเป็นทั้งหมด 4 set ดังนี้

1. โปรตีน CPP-AGO1 กับ E7sgRNA
2. โปรตีน CPP-AGO1 กับ Scramble
3. Conjugation buffer
4. Untreated (Cells line เพียงอย่างเดียว)

โดยทั้งหมดจะมีสารละลายอยู่ที่ปริมาตร 300 μL ซึ่งทำทั้งหมด 6 replicate โดยเริ่มจากการนำโปรตีน CPPs-AGO1 ปริมาตร 20 μL และ E7sgRNA ปริมาตร 2 μL นำมาใส่ในหลอดเดียวกัน และใส่ Conjugation buffer ปริมาตร 100 μL ลงไปเพื่อให้โปรตีนและ sgRNA จับตัวกันเป็น complex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที (ในส่วนของ Scramble นั้นให้ใช้

ปริมาตร 0.05 μ L และ Conjugation buffer ปริมาตร 100 μ L และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที)

7. Transfection assay (การ Transfect CPPs-AGO1+E7sgRNA เข้าสู่ Cell line)

เมื่อได้ CPPs-AGO1 กับ E7sgRNA complex และ CPPs-AGO1 กับ Scramble complex เรียบร้อยแล้วจึงนำเข้าสู่ Cells line ที่ได้เพาะเลี้ยงไว้ทั้งหมด 2 ชนิด คือ HeLa และ C-33 A

7.1 ทำการ Seed cells ให้ได้จำนวนเซลล์ที่ต้องการ โดยใช้ Cells line เริ่มต้นที่ 7.5×10^4 cells/well หรือก็คือ ประมาณ 75,000 cells ใน 24 well-plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 700 μ L

7.2 เติมโปรตีน CPPs-AGO1 กับ sgRNA complex ปริมาตร 100 μ L ในทั้ง 3 wells ของแต่ละ Set

7.3 เติมโปรตีน CPPs-AGO1 กับ Scramble และ Conjugation buffer ปริมาตร 100 μ L ในของแต่ละ wells ของแต่ละ set

4. จากนั้นนำไปบ่มตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเก็บเซลล์เมื่อครบเวลาที่กำหนด

8. การสกัด RNA จาก HeLa Cells line และ C-33 A Cells line

ทำการเก็บเซลล์ HeLa cell line และ C-33 A cell line หลังจากการนำเข้าสู่เซลล์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาสกัด RNA โดยขั้นตอนของการสกัด RNA มีดังนี้

8.1 ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทั้งหมดออก และเติม PBS เพื่อล้างเซลล์

8.2 เติมสาร Trizol (invitrogen) ปริมาตร 300 μ L ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสาร Chloroform ปริมาตร 60 μ L ผสมกันด้วยแรงมือเป็นเวลา 15 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที

8.3 Centrifuge ที่ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นเก็บ supernatant ใส่หลอดขนาด 1.5 mL และเติมสาร Isopropanol ปริมาตร 150 μ L จากนั้นผสมเบาๆให้เข้ากัน และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

8.4 Centrifuge ที่ 12,000 x g เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C และทิ้ง supernatant จากนั้นล้าง RNA pellet ด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 300 μ L จากนั้นนำมา Centrifuge ที่ 7,500 x g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C และเท supernatant ทิ้ง ทำทั้งหมด 2 ครั้ง

8.5 Dry RNA pellet เป็นเวลาประมาณ 15-20 นาที ละลายตะกอน RNA ใน RNase free water ปริมาตร 20 μL และนำไปปั่นในน้ำที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นวัดปริมาณความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่องมือ Nanodrop ที่ค่าดูดกลืนแสง 260 nm and 280 nm และนำเก็บที่อุณหภูมิ -80°C

9. การสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA)

นำ RNA ที่สกัดมาได้มาในขั้นต้น มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ให้ได้ดีเอ็นเอคู่สม โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Reverse transcriptase และ DNA polymerase โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียมหลอด PCR หลอดที่ 1 โดยเติมสารดังนี้

- RNA sample ปริมาณ 700 ng
- Oligo dT18 primer ปริมาตร 1 μL
- DEPC water เติมจนครบปริมาตร 12 μL

(ปริมาตรทั้งหมด 12 μL)

นำส่วนผสมทั้งหมดรวมเข้าด้วยกัน และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาวางบนน้ำแข็งทันที

2. เตรียมหลอด PCR หลอดที่ 2 โดยเติมสารดังนี้

- 5X Reaction Buffer ปริมาตร 4 μL
- RiboLock RNase Inhibitor (20U/ μL) ปริมาตร 1 μL
- 10 mM dNTP Mix ปริมาตร 2 μL
- RevertAid M-MuLV RT (200U/ μL) ปริมาตร 1 μL

(ปริมาตรทั้งหมด 8 μL)

นำส่วนผสมทั้งสองหลอดรวมเข้าด้วยกัน (ปริมาตรสุทธิ 20 μL) และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

10. การวิเคราะห์การแสดงออกของ *E7* RNA ด้วยเทคนิค Real-time PCR

เมื่อสังเคราะห์ได้ cDNA แล้ว หลังจากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของ *E7* RNA ด้วยเทคนิค Real-time PCR (qPCR)

Target genes : *E7* genes

Reference gene : *GAPDH* gene

Cell line : HeLa และ C-33 A

Transfection by : CPPs-AGO1 กับ *E7*sgRNA complex

Biological replication : 6 replicate

Reaction	1X	Final concentration
2X PCR SYBR green	10 μ L	-
<i>E7</i> Forward primer	0.15 μ L	20 μ M
<i>E7</i> Reverse primer	0.15 μ L	20 μ M
cDNA	2 μ L	-
dH ₂ O	7.7 μ L	-
Total volume	20 μ L	

ตารางที่ 1 : ตารางแสดงปริมาณส่วนผสมในขั้นตอน Real-time PCR ของ *E7* gene

Reaction	1X	Final concentration
2X PCR SYBR green	10 μ L	-
<i>GAPDH</i> Forward primer	0.10 μ L	20 μ M
<i>GAPDH</i> Reverse primer	0.10 μ L	20 μ M
cDNA	2 μ L	-
dH ₂ O	7.8 μ L	-
Total volume	20 μ L	

ตารางที่ 2 : ตารางแสดงปริมาณส่วนผสมในขั้นตอน Real-time PCR ของ *GAPDH* gene

*PCR Cycle	อุณหภูมิ (°C)	เวลา
Denaturing	95	15 วินาที
Annealing	62	30 วินาที
Extension	72	45 วินาที
Holding	72	7 นาที

ตารางที่ 3 : แสดง Condition ของ Real-time PCR

11. เทคนิคในการวิเคราะห์ Cell proliferation ในการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Assay

11.1 เตรียม MTT solution :

- 5 mg/mL MTT ใน PBS
- ต้องทำการกรองสารโดยใช้แผ่นกรอง 0.22 μm หลังจากการเติม MTT
- เก็บ MTT solution ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (เก็บในระยะยาว)

11.2 MTT solvent :

- ชนิดที่ 1 = 400 μL HCl 1 M, 10 mL Triton 100%, 90 mL Isopropanol
- ชนิดที่ 2 = DMSO 100%

11.3 MTT working :

- 0.5 mg/mL MTT ใน serum free medium

ขั้นตอนการทำ MTT :

1. Plate cells ประมาณ 2,000 เซลล์ ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ ชนิด 96 well-plate โดยแต่ละหลุม จะมีปริมาตร 100 μL
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 – 24 ชั่วโมง
3. นำอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก และเติม working MTT ปริมาตร 100 μL
4. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 – 4 ชั่วโมง จนเกิดตะกอนสีม่วงขึ้น จากนั้นดูดสาร MTT ทิ้งและละลายตะกอนด้วยสาร DMSO ปริมาตร 100 μL

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm ด้วยเครื่อง Microplate reader และใช้โปรแกรม Galapagos เพื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

1. Real-time PCR : วัดค่าการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก ได้แก่ HeLa cell line และ C-33 A cell line ที่ได้รับการ transfect ด้วยโปรตีน CPPs-AGO1+E7sgRNA

2. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Assay : คือการวัดค่า Metabolic activity ภายในเซลล์นั้นๆ ซึ่งจะบ่งบอกได้ว่าเซลล์นั้นยังมีชีวิตอยู่ ที่ค่าการดูดกลืนแสง 570 nm

3. สถิติที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ การวิเคราะห์ผลด้วย Paired T-test เพื่อใช้คำนวณความแตกต่างหรือเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง และกลุ่มควบคุมใช้สำหรับการทดสอบข้อมูลที่มีการแจกแจงแบบปกติ (Normal distribution)

ข้อจำกัด (Limitation)

มีผู้ทำการศึกษาโปรตีน Argonaute1 ในสัตว์และคนยังไม่มาก เนื่องจากส่วนใหญ่ศึกษาในพืชเป็นส่วนมาก จึงต้องใช้เวลาหาข้อมูลค่อนข้างมาก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ประโยชน์ที่ได้ และการประยุกต์ใช้ (Expected benefit and application)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเพื่อพิสูจน์ว่า โปรตีน Argonaute1 สามารถจับกับบริเวณ promoter ของยีนเป้าหมาย และชักนำให้เกิด histone modification ได้ เป็นผลทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ซึ่งในอนาคตเมื่อนำไปวิจัยและพัฒนาต่อไป อาจจะสามารถคิดค้นไปสู่การผลิตยา หรือหนทางสู่การรักษาแบบ gene therapy ได้ต่อไปในอนาคต เพื่อเป็นแนวทางใหม่ในการช่วยรักษาผู้ที่เป็นโรคมะเร็งปากมดลูกและมะเร็งชนิดอื่นๆได้

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการการแก้ไข (Obstacles and strategies to solve the problem)

ในขั้นตอนของการทำโปรตีน Argonaute1 ให้บริสุทธิ์นั้น ต้องทำการค่อยๆกด Syringe แบบหยดต่อหยด (drop by drop) ถ้าไม่กดแบบนี้จะทำให้โปรตีนที่ได้มาไม่มีความบริสุทธิ์ ซึ่งอาจมีโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่เราไม่ต้องการ ปนเปื้อนเข้ามาในหลอดที่เราทำการเก็บโปรตีน Argonaute1 ด้วย จึงต้องค่อยๆทำอย่างระมัดระวัง และใช้เวลานาน

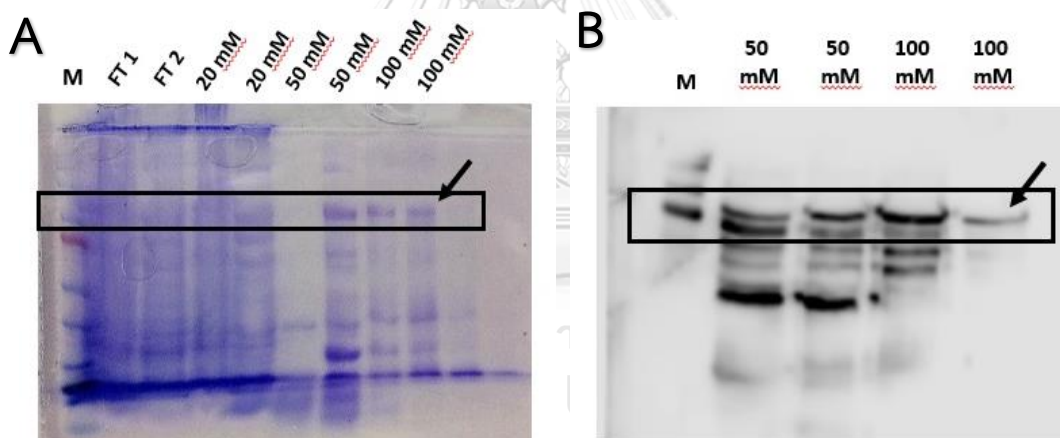


บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน Argonaute1 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค Western blot

ผลจากการศึกษาการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน Argonaute1 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และเทคนิค Western blot จากการแยกชนิดของโปรตีน โดยใช้ความเข้มข้นของ Imidazole ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 20, 50, 100, 200 และ 250 mM พบความบริสุทธิ์ของโปรตีน Argonaute1 ที่ความเข้มข้นของ Imidazole ที่ 100 mM เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ protein marker หรือ BSA ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 98.77 kDa



รูปที่ 14 : (A) ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน Argonaute1 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE
(B) : ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน Argonaute1 ด้วยเทคนิค Western blot

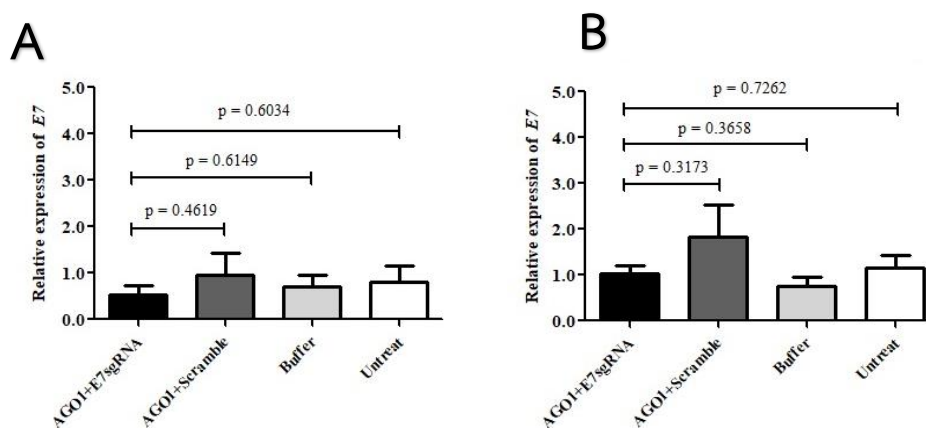
2. ผลจากการศึกษาการกดการทำงานของ E7 RNA ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก 2 ชนิด ได้แก่ HeLa cell line และ C-33 A cell line ด้วยเทคนิค Real-time PCR (qPCR)

จากการทดลองนี้เพื่อศึกษาการทำงานของยีน E7 เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน E7 (Gene expression) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้ง 2 ชนิด อันได้แก่ HeLa cell line และ C-33 A cell line หลังจากทำการสร้าง Construction CPPs-AGO1+E7sgRNA ขึ้นมา และนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งปาก

มดลูกด้วยกระบวนการ Transfection โดยทำการแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็นทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 CPPs-AGO1+E7sgRNA กลุ่มที่ 2 CPPs-AGO1+Scramble กลุ่มที่ 3 Buffer และกลุ่มที่ 4 Untreat (Cell line only) โดยนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นจะเก็บเซลล์ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นนำมาสกัด RNA (RNA extraction) และทำการสังเคราะห์ cDNA และนำไปตรวจสอบการทำงานที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน E7 ด้วยเทคนิค Real-time PCR (qPCR) ซึ่งจากการทดลองดังกล่าว ได้แสดงผลออกมาให้เห็นว่า CPPs-AGO1+E7sgRNA มีความสามารถในการกดการทำงานของยีน ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน E7 ได้ จากการตรวจสอบในเซลล์มะเร็งปากมดลูก คือ HeLa cell line ซึ่งพบความแตกต่างในวันที่ 3 และวันที่ 4 คือ ยีนมีการลดการแสดงออกของยีนได้อย่างชัดเจน หรือลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 แต่เมื่อสังเกตผลการทดลองในเซลล์มะเร็งอีกเซลล์หนึ่ง ไม่พบผลการเปลี่ยนแปลงในเซลล์มะเร็งปากมดลูก ชนิด C-33 A cell line เพราะเนื่องจากในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line เป็นเซลล์มะเร็งที่มีเชื้อไวรัส HPV18 ซึ่งเป็น HPV positive จึงมียีน E7 อยู่ในขณะที่เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33A cell line นั้นเป็นเซลล์มะเร็งที่ไม่มีเชื้อไวรัส HPV (HPV negative) ซึ่งไม่มียีน E7 อยู่ ทำให้ในการทดลองด้วยเทคนิค Real-time PCR (qPCR) นี้ไม่สามารถตรวจสอบและวิเคราะห์ผลออกมาได้ เพราะว่า Construction CPPs-AGO1+E7sgRNA ที่สร้างขึ้นมานั้น จะจำเพาะต่อยีน E7 ที่พบในเชื้อไวรัส HPV18 เท่านั้น

2.1. การศึกษาการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) ด้วยเทคนิค Real-time PCR

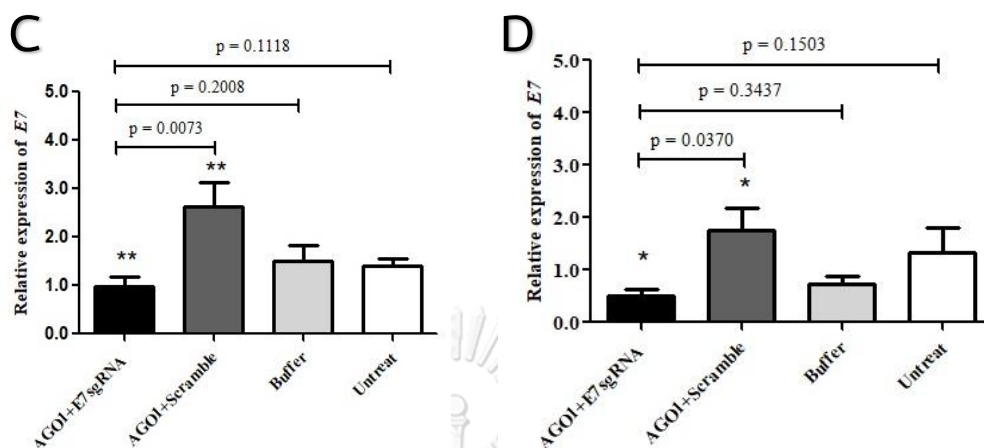
2.1.1 ผลการ Transfection AGO1+E7sgRNA ใน HeLa cell line ในวันที่ 1 และวันที่ 2 ของการทดลอง



รูปที่ 15 : การศึกษาการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์มะเร็งเรื้องปากลมดลูก HeLa cell line (HPV18) ด้วยเทคนิค Real-time PCR (A) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 1
(B) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 2

การศึกษารกตการทำงานของยีนที่ส่งผลให้การแสดงออกของยีน E7 ลดลง จากผลการทดลองนี้ได้ทำการ Transfection โดยใช้ CPPs-Ago1+E7sgRNA complex นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งเรื้องปากลมดลูกชนิด HeLa cell line โดยการทดลองนี้ได้แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็นทั้งหมด 4 กลุ่ม จากผลการทดลองในวันที่ 1 (รูปที่ 15A) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มแรกคือ กลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble พบค่า p-value = 0.4619 กลุ่มที่สอง คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer พบค่า p-value = 0.6149 กลุ่มที่สาม คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบค่า p-value = 0.6034 จากการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Real-time PCR นี้ จะสังเกตเห็นได้ว่าในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble นั้นไม่พบการแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 และในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer และกลุ่มที่สาม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat นั้น ก็พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 เช่นเดียวกับในวันที่ 2 (รูปที่ 15B) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble พบค่า p-value = 0.3173 กลุ่มที่สอง CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer พบค่า p-value = 0.3658 และกลุ่มที่สาม คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบค่า p-value = 0.7262 จากผลการทดลองจะสังเกตเห็นได้ว่าในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble นั้นไม่พบการแสดงออกของยีนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 รวมทั้งในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer และกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat

2.1.2 ผลการ Transfection AGO1+E7sgRNA ใน HeLa cell line ในวันที่ 3 และวันที่ 4 ของการทดลอง

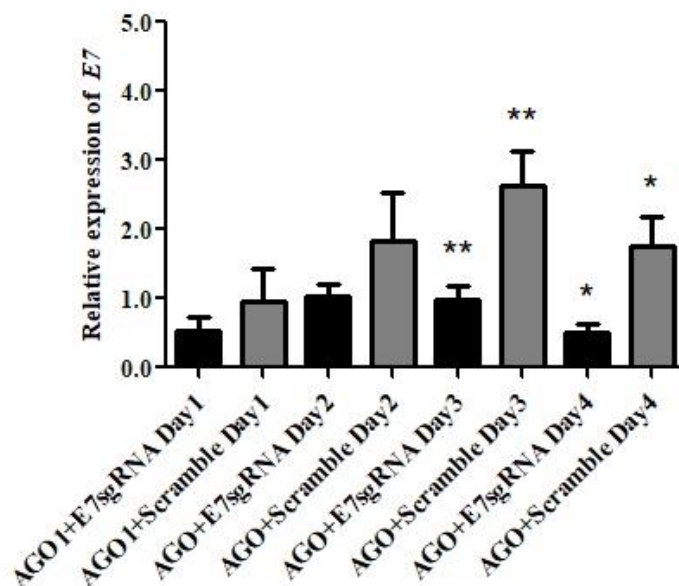


รูปที่ 16 : การศึกษาการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) ด้วยเทคนิค Real-time PCR (C) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 3 (D) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 4

ผลจากการศึกษาการลดการทำงานของยีนในวันที่ 3 (รูปที่ 16C) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble พบค่า p-value = 0.0073 (<0.01) และกลุ่มที่สอง CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer พบค่า p-value = 0.2008 และกลุ่มที่สาม คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบค่า p-value = 0.1118 ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Real-time PCR นี้ แสดงให้เห็นว่าในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble นั้นมีค่าที่แตกต่างออกไปจากการทดลองของวันที่ 1 และวันที่ 2 ซึ่งจะพบได้ว่าในวันที่ 3 มีการทำงานของยีนลดลง ทำให้ค่าการแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.01 แต่ในอีก 2 กลุ่มที่เหลือ คือ CPPs-AGO1+E7sgRNA กับ Buffer และกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 เช่นเดียวกันกับในวันที่ 1 และ 2 ของการทดลอง และในผลของวันที่ 4 (รูปที่ 16D) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสามกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble พบว่าค่า p-value = 0.0370 (<0.05) กลุ่มที่สอง คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer พบค่า p-value = 0.3437 กลุ่มที่สาม คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบค่า p-value = 0.1503 จะสังเกตเห็นได้ว่าในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble นั้นมีค่าที่แตกต่างออกไปจากการทดลองของวันที่ 1 และวันที่ 2 ซึ่งมีค่าการแสดงออกของยีนลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.01 แต่ใน

อีก 2 กลุ่มที่เหลือ คือกลุ่ม CPPs-AGO1+E7sgRNA กับ Buffer และกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat ไม่พบว่าค่าการแสดงออกของยีน *E7* ลดลง

Transfection Ago1+E7sgRNA in HeLa cell line 1-4 days



รูปที่ 17 : การศึกษาการแสดงออกของยีน *E7* ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA และกลุ่ม CPPs-Ago1+Scramble ด้วยเทคนิค Real-time PCR ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน

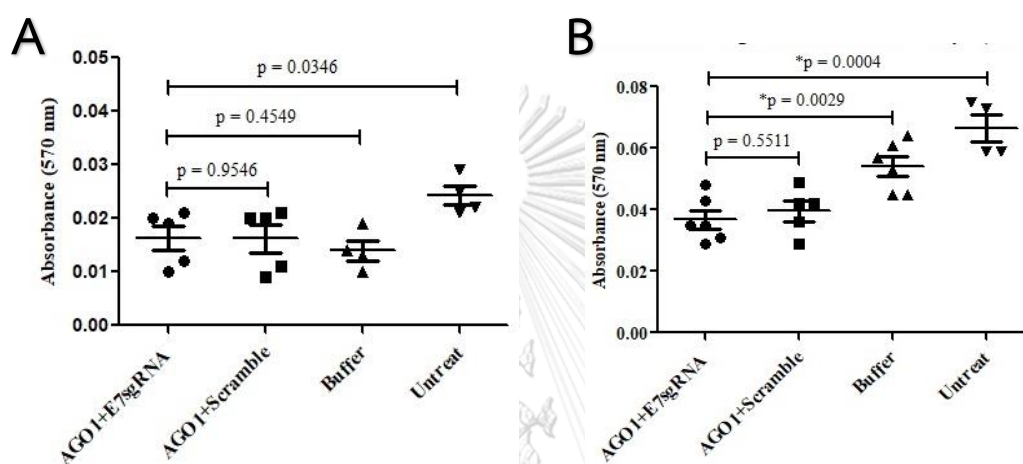
เมื่อตรวจสอบการทำงานของ *E7sgRNA* เทียบกับ Scramble พบว่า CPPs-Ago1+E7sgRNA นั้นมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของยีน *E7* ได้ ทำให้ยีน *E7* มีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 3 และวันที่ 4 จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ว่า เมื่อ protein complex ถูกขนส่งเข้าไปยังเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cell line) โปรตีน CPPs-Ago1 สามารถเข้าไปยังบริเวณลำดับเบสอย่างจำเพาะ เนื่องจากการทำงานของ *E7sgRNA* ทำให้โปรตีนเกิดกลไกการกีดการทำงานของยีน จึงมีผลทำให้การแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CPPs-Ago1+Scramble

3. การศึกษา Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line และ C-33 A cell line (HPV negative) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

จากการทดลองนี้เพื่อศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (Cell proliferation) ด้วยการวัดค่า metabolic activity ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้ง 2 ชนิด อันได้แก่ HeLa cell line และ C-33 A cell line หลังจากทำการสร้าง Construction CPPs-AGO1+E7sgRNA ขึ้นมา และนำเข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกด้วยกระบวนการ Transfection โดยทำการแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็นทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 CPPs-AGO1+E7sgRNA กลุ่มที่ 2 CPPs-AGO1+Scramble กลุ่มที่ 3 Buffer และกลุ่มที่ 4 Untreat (Cell line only) โดยนำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นจะเก็บเซลล์ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน หลังจากการเก็บเซลล์ นำสาร MTT ใส่ลงไปเพื่อให้ตกผลึกสีม่วง และใส่สาร DMSO เพื่อละลายผลึกสีม่วง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm นั้น ได้แสดงผลออกมาให้เห็นว่า CPPs-AGO1+E7sgRNA มีความสามารถในการกีดการทำงานของยีน ส่งผลให้เกิดการลดการเจริญของเซลล์มะเร็งลง จากการตรวจสอบในเซลล์มะเร็งปากมดลูก คือ HeLa cell line ซึ่งพบความแตกต่างในวันที่ 3 และวันที่ 4 คือ มีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 แต่เมื่อสังเกตผลการทดลองในเซลล์มะเร็งอีกเซลล์หนึ่ง ไม่พบผลการเปลี่ยนแปลงในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33 A cell line เพราะเนื่องจากในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line เป็นเซลล์มะเร็งที่มีเชื้อไวรัส HPV18 ซึ่งเป็น HPV positive จึงมียีน E7 อยู่ในขณะที่เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33A cell line นั้นเป็นเซลล์มะเร็งที่ไม่มีเชื้อไวรัส HPV (HPV negative) จึงไม่มียีน E7 อยู่ ทำให้ CPPs-AGO1+E7sgRNA ไม่สามารถเข้าจับยังบริเวณลำดับเบสเป้าหมายได้ ทำให้ค่าการเจริญของเซลล์ไม่ลดลงหรือไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง CPPs-AGO1+E7sgRNA กับกลุ่ม CPPs-AGO1+Scramble เนื่องจาก Construction CPPs-AGO1+E7sgRNA ที่ถูกสร้างขึ้นมานั้น จะจำเพาะต่อบริเวณลำดับเบสเป้าหมายภายในยีน E7 ที่พบในเชื้อไวรัส HPV18 เท่านั้น

3.1. การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (Cell proliferation) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa cell line (HPV18) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity โดยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

3.1.1 ผลการ Transfection AGO1+E7sgRNA ใน HeLa cell line ในวันที่ 1 และวันที่ 2 ของการทดลอง

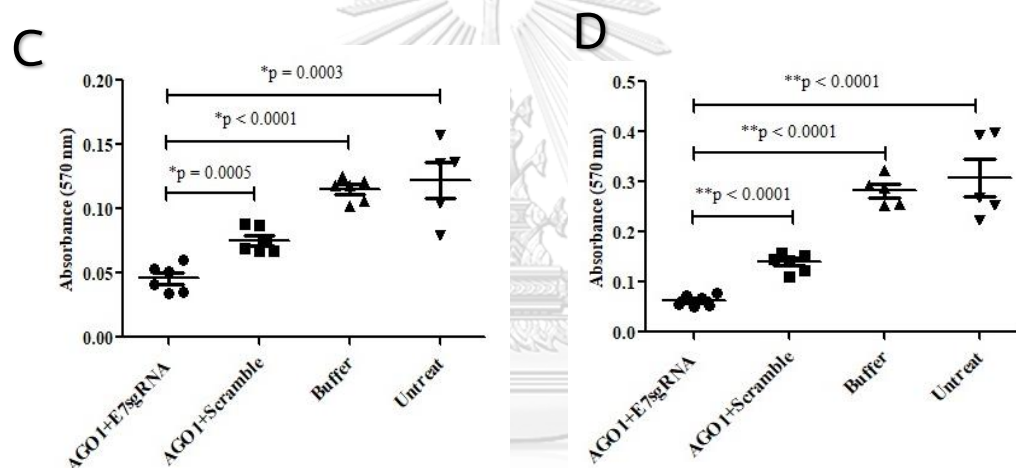


รูปที่ 18 : การศึกษา Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค MTT assay (A) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 1 (B) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 2

การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (Cell proliferation) โดยการตรวจวัดค่า metabolic activity ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก คือ HeLa cell line ด้วยกระบวนการทางเทคนิค MTT assay ได้ทำการ Transfection โดยใช้ CPPs-Ago1+E7sgRNA complex นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa cell line ในวันที่ 1 (รูปที่ 18A) โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็นทั้งหมด 4 กลุ่มเช่นกัน ผลของการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble พบค่า p-value = 0.9546 กลุ่มที่สอง คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer พบค่า p-value = 0.4549 กลุ่มที่สาม คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบค่า p-value = 0.0346 (<0.05) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble นั้นไม่พบการเจริญของเซลล์ลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 และในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer แต่พบว่าในกลุ่มที่ของ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat นั้น ซึ่งพบว่ามีค่าการเจริญของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 และผลจากวันที่ 2 (รูปที่ 18B) เมื่อสังเกต

ผลการทดลองในกลุ่มทั้งสามกลุ่ม กลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble พบค่า p-value = 0.5511 กลุ่มที่สอง CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer พบค่า p-value = 0.0029 (<0.01) กลุ่มที่สาม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบค่า p-value = 0.0004 (<0.01) จากการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค MTT assay นี้ จะสังเกตเห็นได้ว่าในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble นั้นไม่พบค่าการเจริญของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบว่าในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับ Buffer และกลุ่มที่สาม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับ Untreat นั้น มีค่าการเจริญของเซลล์ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05

3.1.2 ผลการ Transfection AGO1+E7sgRNA ใน HeLa cell line ในวันที่ 3 และวันที่ 4 ของการทดลอง



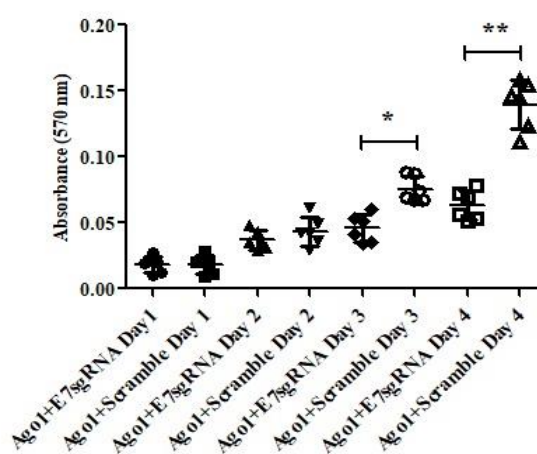
รูปที่ 19 : การศึกษา Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค MTT assay (C) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 3 (D) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 4

จากการผลการวิเคราะห์ด้วยการตรวจวัดค่า metabolic activity เพื่อศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (Cell proliferation) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก คือ HeLa cell line โดยการทดลองนี้ได้แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็นทั้งหมด 4 กลุ่มเช่นกัน และผลของในวันที่ 3 (รูปที่ 19C) ผลของกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับ AGO1+Scramble พบค่า p-value = 0.0005 (<0.01) กลุ่มที่สอง CPPs-Ago1+E7sgRNA กับ Buffer พบค่า p-value < 0.0001 (<0.01) กลุ่มที่สาม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับ Untreat พบค่า p-value = 0.0003 (<0.01) จะเห็นได้ว่าในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble นั้นพบการเจริญของเซลล์ลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 และยังพบอีกด้วยว่าในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer และ

กลุ่มที่สาม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat นั้น มีค่าการเจริญของเซลล์ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 เช่นกัน และผลของในวันที่ 4 (รูปที่ 19D) เมื่อนำทั้งสามกลุ่มมาเปรียบเทียบกับกันจึงได้ผลว่า กลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble พบว่าค่า p-value < 0.0001 (<0.01) กลุ่มที่สอง คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer พบค่า p-value < 0.0001 (<0.01) กลุ่มที่สาม คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบค่า p-value < 0.0001 (<0.01) และจากการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค MTT assay นี้ แสดงออกมาให้เห็นว่าในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble และกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer และกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat นั้น พบค่าการเจริญของเซลล์ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าโครงสร้าง CPPs-Ago1+E7sgRNA มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เซลล์หยุดการแบ่งตัวในวัฏจักรเซลล์



MTT Assay in Hela cell line for 1 to 4 days



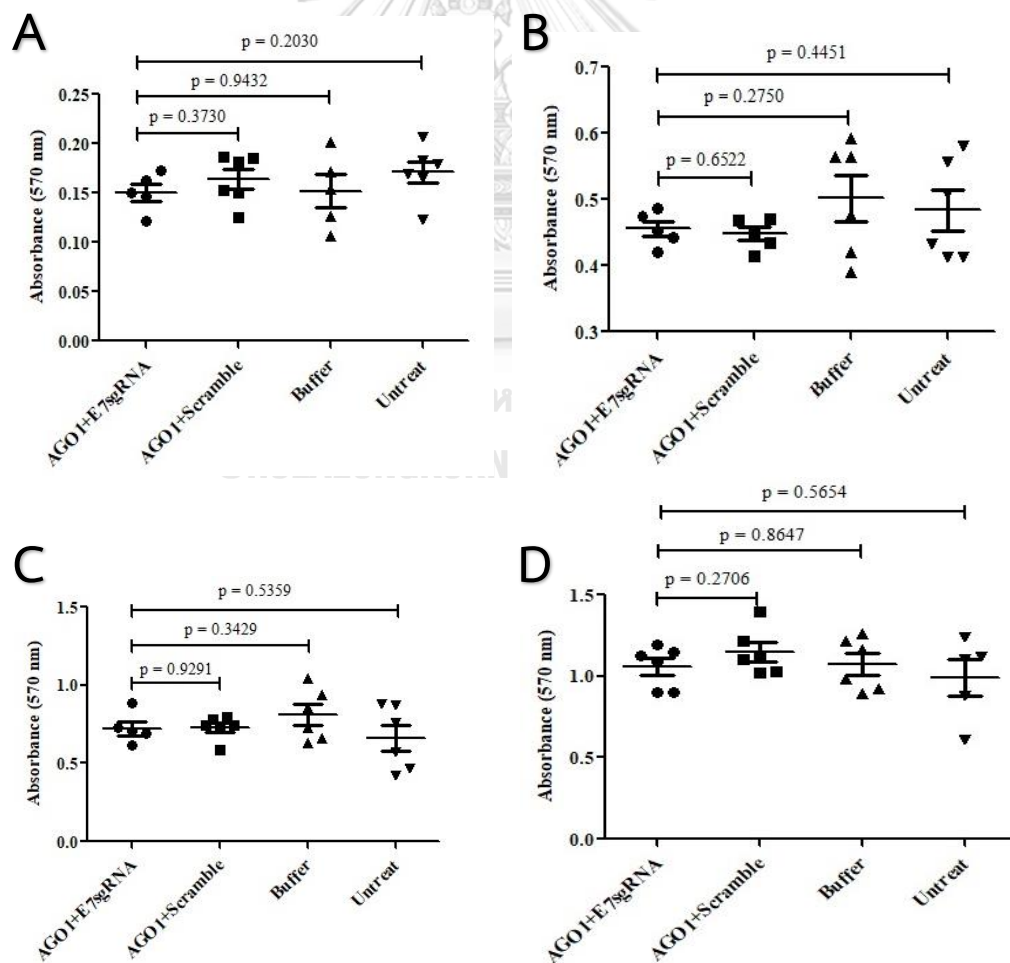
รูปที่ 20 : การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (Cell proliferation) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA และกลุ่ม CPPs-Ago1+Scramble ด้วยเทคนิค MTT assay ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน

เมื่อมาตรวจสอบการทำงานของ E7sgRNA นั้น จะเห็นได้ว่าการทดลองในเซลล์ปากมดลูก C-33 A cell line ไม่พบค่าการเจริญของเซลล์ลดลงอย่างแตกต่างกันทั้ง 4 วัน เนื่องจาก C-33 A cell line เป็นเซลล์มะเร็งที่ไม่มีเชื้อไวรัส HPV (HPV negative) ดังนั้นจึงไม่มี E7 อยู่ภายใน ทำให้โปรตีน Argonaute1 ไม่สามารถไปจับยับยั้งบริเวณเป้าหมายได้ เนื่องจาก E7sgRNA ที่เป็นตัวขนส่ง

และนำพาโปรตีนไปยังบริเวณลำดับเบสที่ต้องการ ไม่สามารถหาหรือพบลำดับเบสที่จำเพาะได้ จึงทำให้ protein complex ไม่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33 A จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า จากการทดลองในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33 A cell line นั้น ไม่พบค่าการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกลดลง

3.2. การศึกษา Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33 A cell line (HPV negative) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

3.2.1 ผลการ Transfection AGO1+E7sgRNA ใน C-33 A cell line ในวันที่ 1 วันที่ 2 วันที่ 3 และวันที่ 4 ของการทดลอง

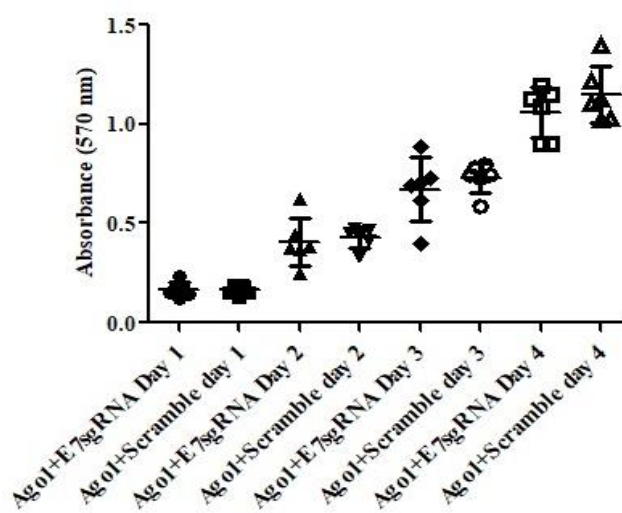


รูปที่ 21 : การศึกษา Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33 A cell line (HPV negative) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity MTT assay (A) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 1 (B) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 2 (C) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 3 (D) การ Transfection CPPs-Ago1+E7sgRNA ในวันที่ 4

จากการศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (Cell proliferation) โดยการตรวจวัดค่า metabolic activity ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก คือ C-33 A cell line ด้วยกระบวนการทางเทคนิค MTT assay ได้ทำการ Transfection โดยใช้ CPPs-Ago1+E7sgRNA complex นำเข้าสู่เซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33 A cell line โดยการทดลองนี้ได้แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็นทั้งหมด 4 กลุ่ม โดยจากผลการทดลองในวันที่ 1 (รูปที่ 20A) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มแรกคือ กลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble พบว่าค่า p-value = 0.3730 กลุ่มที่สอง คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer พบค่า p-value = 0.9432 กลุ่มที่สาม คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบค่า p-value = 0.2030 และผลการทดลองในวันที่ 2 (รูปที่ 20B) พบว่ากลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble มีค่า p-value = 0.6522 กลุ่มที่สอง CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer พบค่า p-value = 0.2750 กลุ่มที่สาม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบค่า p-value = 0.4451 ผลการทดลองในวันที่ 3 (รูปที่ 20C) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มแรกคือ กลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble พบว่าค่า p-value = 0.9291 กลุ่มที่สอง คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer พบค่า p-value = 0.3429 กลุ่มที่สาม คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบค่า p-value = 0.5359 และในผลการทดลองของวันสุดท้ายคือวันที่ 4 (รูปที่ 20D) ได้พบว่า กลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble พบว่าค่า p-value = 0.2706 กลุ่มที่สอง คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer พบค่า p-value = 0.8647 กลุ่มที่สาม คือ CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat พบค่า p-value = 0.5654 และจากผลการทดลองทั้งหมดทั้ง 4 วันของทุกกลุ่มการทดลองของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33 A cell line พบว่าจากการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค MTT assay นี้ แสดงให้เห็นว่าในกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม AGO1+Scramble และกลุ่ม Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Buffer และกลุ่มที่สาม CPPs-Ago1+E7sgRNA กับกลุ่ม Untreat ไม่พบการค่าการเจริญของเซลล์ลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าน้อยกว่า 0.05 อันเนื่องเป็นผลมาจากการที่เซลล์มะเร็ง C-33 A cell line นั้นเป็นเซลล์มะเร็งที่ไม่มีเชื้อไวรัสเอชพีวี (HPV negative) หมายความว่าเซลล์นี้ไม่มียีน E7 อยู่ภายในเซลล์ ทำให้โปรตีน AGO1 ไม่สามารถไปจับยังบริเวณเป้าหมายได้ เมื่อสังเกตการทำงานของ single guide พบว่าไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจาก single guide ที่ออกแบบมานั้น จะจำเพาะต่อ

บริเวณลำดับเบสที่ออกแบบไว้ จึงทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งและนำพาโปรตีนไปยังบริเวณลำดับเบสที่ต้องการไม่ได้ เพราะไม่สามารถตรวจพบลำดับเบสที่จำเพาะ จึงทำให้ CPPs-AGO1+E7sgRNA ไม่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของยีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33 A

MTT Assay in C33A cell line for 1 to 4 days



รูปที่ 22 : การศึกษาวิเคราะห์ Cell proliferation ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33 A cell line (HPV negative) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CPPs-Ago1+E7sgRNA และกลุ่ม CPPs-Ago1+Scramble ด้วยการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค MTT assay ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 วัน

เมื่อมาตรวจสอบการทำงานของ E7sgRNA นั้น จะเห็นได้จากการทดลองในเซลล์ปากมดลูก C-33 A cell line เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CPPs-AGO1+E7sgRNA กับกลุ่ม CPPs-AGO1+Scramble ไม่พบค่าการเจริญของเซลล์ลดลงอย่างแตกต่างกันทั้ง 4 วัน เนื่องจาก C-33 A cell line เป็นเซลล์มะเร็งที่ไม่มีเชื้อไวรัสเอชพีวี (HPV negative) ดังนั้นจึงไม่มียีน E7 อยู่ภายใน ทำให้โปรตีน Argonaute1 ไม่สามารถไปจับยังบริเวณเป้าหมายได้ เนื่องจาก E7sgRNA ที่เป็นตัวขนส่งและนำพาโปรตีนไปยังบริเวณลำดับเบสที่ต้องการ ไม่สามารถหาหรือพบลำดับเบสที่จำเพาะได้ จึงทำให้ protein complex ไม่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของยีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33 A จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า จากการทดลองในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33 A cell line นั้น ไม่พบค่าการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกลดลง

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการทดลองของการศึกษาการแสดงออกของยีน E7 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิด ได้แก่ HeLa cell line (HPV18) และ C-33 A cell line (HPV negative) ด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่าการทดลองในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) ในระยะเวลา 4 วัน ยีน E7 ถูกยับยั้งการทำงาน มีผลทำให้การแสดงออกของยีนลดลง โดยการทำงานของโปรตีน CPPs-AGO1 ที่ทำงานร่วมกับ E7sgRNA ที่นำพาโปรตีนไปยังบริเวณลำดับเบสอย่างจำเพาะ ซึ่งพบว่าในวันที่ 1 และ 2 นั้น ไม่มีค่าการแสดงออกของยีนที่ลดลงทั้งในสามกลุ่มการทดลองอันได้แก่ CPPs-AGO1+E7sgRNA กับ CPPs-AGO1+Scramble, CPPs-AGO1+E7sgRNA กับ Buffer และ CPPs-AGO1+E7sgRNA กับ Untreat แต่พบว่าในวันที่ 3 และ 4 มีค่าการแสดงออกของยีนลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p\text{-value} = 0.0073 (<0.01)$ และ $0.0370 (<0.05)$ ตามลำดับ และเพื่อตรวจสอบการทำงานของ E7sgRNA นั้น ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม CPPs-AGO1+E7sgRNA กับกลุ่ม CPPs-AGO1+Scramble พบว่า E7sgRNA สามารถนำพาโปรตีนไปยังลำดับเบสเป้าหมายในยีนได้อย่างแม่นยำ และเมื่อนำกลุ่ม CPPs-AGO1+E7sgRNA มาเปรียบเทียบกับกลุ่ม Buffer และกลุ่ม Untreat พบว่าไม่มีค่าการแสดงออกของยีน E7 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อศึกษาต่อในมะเร็งปากมดลูกชนิด C-33 A cell line (HPV negative) กลับพบว่าไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีน E7 ได้ เป็นผลมาจาก E7sgRNA ที่ออกแบบมานั้น จะจำเพาะต่อบริเวณลำดับเบสในยีน E7 ซึ่งจะพบได้แต่ในเฉพาะ HeLa cell line (HPV18) ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งที่มีเชื้อไวรัสเอชพีวี ดังนั้นจึงทำให้ E7sgRNA ไม่สามารถจับและพาโปรตีนไปทำงานได้ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33 A cell line (HPV negative)

การศึกษามีชีวิตอยู่ของเซลล์หรือการเจริญเติบโตของเซลล์ (Cell proliferation) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกทั้งสองชนิด ได้แก่ HeLa cell line และ C-33 A cell line พบว่าการทดลองในเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa cell line (HPV18) ด้วยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay เป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่าในวันที่ 1 และวันที่ 2 ไม่พบค่าการเจริญของเซลล์ลดลงในกลุ่ม CPPs-AGO1+E7sgRNA กับ CPPs-AGO1+Scramble แต่พบว่ามีค่าการเจริญของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 3 และวันที่ 4 ที่ค่า $p\text{-value} = 0.0005$ และ <0.0001 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามสมมติฐานที่ว่า CPPs-AGO1+E7sgRNA มีความสามารถกีดการทำงานของยีน E7 ได้ และเมื่อสังเกตว่าในกลุ่ม CPPs-AGO1+E7sgRNA กับกลุ่ม

Buffer และ Untreat พบว่าในวันที่ 1 ไม่มีค่าการเจริญของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่วันที่ 2 นั้นพบการเจริญของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p\text{-value} = 0.0029, 0.0004$ ตามลำดับ และในวันที่ 3 ค่า $p\text{-value} < 0.0001, 0.0003$ ตามลำดับ และในวันที่ 4 ค่า $p\text{-value} < 0.0001, < 0.0001$ ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองนี้อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน AGO1 สามารถทำงานหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ โดยสามารถจับกับบริเวณลำดับเบสได้ โดยที่ไม่ต้องอาศัยการทำงานร่วมกับ sgRNA ที่ออกแบบมาอย่างจำเพาะก็เป็นได้

ส่วนในการทดลองในเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด C-33 A cell line (HPV negative) ด้วยการวัดค่า Metabolic activity ด้วยเทคนิค 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ในระยะเวลา 4 วัน พบว่าทั้งในสามกลุ่มการทดลองอันได้แก่ CPPs-AGO1+E7sgRNA กับ CPPs-AGO1+Scramble และกลุ่ม CPPs-AGO1+E7sgRNA กับ Buffer และกลุ่ม CPPs-AGO1+E7sgRNA กับ Untreat พบว่าไม่มีค่าการเจริญของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อันเนื่องมาจากเซลล์มะเร็งปากมดลูก C-33 A cell line นั้นเป็นเซลล์มะเร็งที่ไม่มีเชื้อไวรัสเอชพีวีอยู่ ทำให้ E7sgRNA ไม่สามารถนำพาโปรตีนไปยังบริเวณที่ออกแบบอย่างจำเพาะได้

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Argonaute1 ที่ถูกสร้างขึ้นเป็นโครงสร้าง CPPs-AGO1+E7sgRNA นั้นมีความสามารถในการกดการทำงานของยีน E7 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ผลการทดลองในข้างต้นนี้เป็นไปตามสมมติฐานคือ CPPs-AGO1+E7sgRNA สามารถลดการแสดงออกของยีน E7 ในมะเร็งปากมดลูกได้จริง และสามารถลดความเป็นมะเร็งลงได้จริงในยีนเป้าหมาย ได้แก่ ยีน E7 และโปรตีน Argonaute1 มีบทบาทหน้าที่ที่สำคัญที่สามารถกดการทำงานของยีนทำให้ยีนมีการแสดงออกที่ลดลงและสามารถลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกชนิด HeLa cell line ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นผลมาจากที่โปรตีน Argonaute1 (AGO1) สามารถทำให้โครมาตินจับกันอย่างหนาแน่นผ่าน โดยผ่านกระบวนการ Histone modification ซึ่งส่งผลต่อวัฏจักรการเจริญเติบโตของเซลล์หรือการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell cycle) ซึ่งเป็นผลมาจากการที่โปรตีน Argonaute1 สามารถเข้าจับยังบริเวณลำดับเบสอย่างจำเพาะ จากการทำงานร่วมกับ E7sgRNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งโปรตีน Argonaute1 มีความสามารถในการทำให้โครงสร้างของโครมาตินจับตัวกันอย่างหนาแน่น (Heterochromatin) ทำให้ยีนไม่สามารถเกิดการ transcription ได้ ทำให้ยีน E7 นั้นไม่สามารถ encode โปรตีนออกมา จึงทำให้ pRb มีเวลาในการผลิตขึ้นมาใหม่ และสามารถจับกับ E2F ซึ่งเป็น transcription factor (TF) ได้ จึงทำให้การแบ่งตัวของเซลล์หยุดชะงัก ในระยะ G_1 เข้าสู่ระยะ S phase ซึ่งทำให้เซลล์มีการลดการเจริญลง และลดความเป็นมะเร็งลงได้ ซึ่งในสภาวะที่ยีน E7 เกิดการทำงานและแสดงออกแบบ overexpress นั้น ยีน E7 จะสามารถ encode โปรตีน E7 ออกมา และทำหน้าที่ในการ degradation ของ pRb จึงทำให้ pRb

เกิดการสูญเสียหน้าที่ที่สำคัญ เนื่องจากไม่สามารถทำงานเพื่อจับกับ E2F ได้ ดังนั้นเซลล์จึงมีการเจริญอย่างต่อเนื่องทำให้การแบ่งตัวของเซลล์นั้นสามารถเข้าสู่ระยะ S phase ได้เมื่อผ่านระยะ G₁

จากผลการทดลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่า protein complex นี้ มีผลกับเฉพาะเซลล์มะเร็งชนิด HeLa cell line เท่านั้น เนื่องจากว่า C-33 A cell line เป็นเซลล์ในกลุ่ม control ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มีไวรัสเอชพีวี Human papillomavirus (HPV negative) จึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงใดๆ เหมือนกัน HeLa cell line ที่เป็นเซลล์มะเร็งที่มีไวรัสเอชพีวี ไทป์18 (HPV18) ซึ่งมียีน E7 อยู่ภายใน จึงทำให้ CPPs-AGO1+E7sgRNA สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและส่งผลกระทบต่อเซลล์ และที่สำคัญของการทดลองนี้คือ CPPs-AGO1+E7sgRNA นี้ไม่ได้ส่งผลต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกให้ตายทั้งหมด แต่เป็นเพียงการยับยั้งการทำงานเพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนลดน้อยลง และลดจำนวนเซลล์มะเร็งลง เพื่อลดความเป็นมะเร็งลงได้

การทดลองทั้งหมดนี้ยังสามารถนำไปศึกษาต่อในเรื่องของการสร้าง pRb (pocket protein) ขึ้นมาใหม่ เมื่อยีน E7 ถูกกีดการทำงาน ทำให้มีการสร้าง E7 RNA ลดน้อยลง ที่มีผลทำให้การแสดงของยีนลดน้อยลง และ pRb สามารถสร้างขึ้นมาใหม่ และกลับมาทำงานได้เหมือนเดิม เพื่อมาจับกับ E2F transcription factor ซึ่งสามารถที่จะตรวจสอบได้ว่า pRb กลับมาสร้างใหม่ได้อีกจริงหรือไม่ โดยอาจจะใช้เทคนิค Western blot ในการตรวจสอบดูโปรตีนที่เกิดขึ้น และอาจศึกษาต่อว่า เมื่อ pRb สามารถสร้างขึ้นมาได้ใหม่แล้วนั้น ทำให้สามารถจับกับ E2F transcription factor ได้หรือไม่ จุดประสงค์คือเพื่อต้องการจะทราบการทำงานระหว่าง pRb/E2F system โดยใช้เทคนิค Immunoprecipitation และอาจจะใช้เทคนิคของ Flow cytometry ในการศึกษาต่อไปอีกว่า เมื่อ pRb สามารถจับกับ E2F ได้แล้วนั้น จะส่งผลต่อวัฏจักรของเซลล์ (Cell cycle) เพื่อทดสอบว่าสามารถทำให้เซลล์มะเร็งมีการหยุดการแบ่งตัวของเซลล์จากระยะ G₁ เข้าสู่ระยะ S phase

จากการศึกษาทั้งหมดนี้ สามารถนำไปโปรตีน Argonaute1 (AGO1) ไปศึกษาพัฒนาต่อยอดหรือทดสอบในอีกหลายๆขั้นตอน หรือหลายๆกระบวนการ เพื่อทำความเข้าใจถึงรายละเอียดกลไกการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ให้มากยิ่งขึ้น ซึ่งในอนาคตอาจจะเป็นอีกเทคโนโลยีหนึ่งที่สามารถควบคุมการทำงานของยีน และเป็นการพัฒนาวิธีการรักษาในอนาคต เพื่อในอนาคตอาจนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคมะเร็งปากมดลูก (anti - HPV) หรือนำข้อมูลไปศึกษาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคิดค้นวิธีการรักษาและคิดค้นยาเพื่อรักษาโรค ซึ่งจะต้องทำการศึกษารายละเอียดต่อไป เพราะเนื่องจากโปรตีน Argonaute1 เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ ดังนั้นจึงต้องทำให้ค้นคว้าหาวิธีในการทำให้โมเลกุลเล็กลง แต่ยังสามารถคงบทบาทและหน้าที่เพื่อประสิทธิภาพในการทำงานของโปรตีน



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

1. Allo M, Agirre E, Bessonov S, Bertucci P, Gomez Acuna L, Buggiano V, et al. Argonaute-1 binds transcriptional enhancers and controls constitutive and alternative splicing in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(44):15622-9.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
3. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet (London, England)*. 2013;382(9895):889-99.
4. American Cancer Society. *Cervical Cancer Early Detection, Diagnosis, and Staging*. American Cancer Society,.
5. Danielle Simmons. *Epigenetic Influences and Disease*. Nature Education. 2008.
6. Ruethairat Sriraksa, Temduand Limpai boon. *Epigenetics in Cholangiocarcinoma*2012.
7. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*. 2011;21(3):381-95.
8. Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature reviews Genetics*. 2011;12(1):19-31.
9. Costantini DL, Hu M, Reilly RM. Peptide motifs for insertion of radiolabeled biomolecules into cells and routing to the nucleus for cancer imaging or radiotherapeutic applications. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2008;23(1):3-24.
10. Eun-Kyoung Yim, Jong-Sup Park. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Research and Treatment*. 2005;37(6):319-24.
11. Mallory A, Vaucheret H. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *The Plant cell*. 2010;22(12):3879-89.
12. Claus-D. Khun, Joshua-Tor L. Eukaryotic Argonautes come into focus. *Trends in Biochemical Science*. 2013;38(5):263-71.

13. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular oncology*. 2007;1(1):19-25.
14. Grewal SI, Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science (New York, NY)*. 2003;301(5634):798-802.
15. Wang D, Zhang Z, O'Loughlin E, Lee T, Houel S, O'Carroll D, et al. Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development. *Genes & development*. 2012;26(7):693-704.
16. Schmitter D, Filkowski J, Sewer A, Pillai RS, Oakeley EJ, Zavolan M, et al. Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic acids research*. 2006;34(17):4801-15.
17. Janowski BA, Huffman KE, Schwartz JC, Ram R, Nordsell R, Shames DS, et al. Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(9):787-92.
18. Songock WK, Kim SM, Bodily JM. The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. *Virus Res*. 2017;231:56-75.
19. Jurkowski TP, Ravichandran M, Stepper P. Synthetic epigenetics-towards intelligent control of epigenetic states and cell identity. *Clinical epigenetics*. 2015;7:18.
20. Semple SC, Akinc A, Chen J, Sandhu AP, Mui BL, Cho CK, et al. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery. *Nature biotechnology*. 2010;28(2):172-6.
21. Zheng ZM, Baker Carl C, Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation, 2006;11:2286-2302.

ภาคผนวก



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Sequence primer

ลำดับเบสของไพรเมอร์ในการทำ Real-time qPCR : เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ ยีน E7

1. E7_Primer Forward

: 5' GAG CCG AAC CAC AAC GTC A 3' ความยาว 19 bp, Tm = 60.59

2. E7_Primer Reverse

: 5' GGA ATG CTC GAA GGT CGT CT 3' ความยาว 20 bp, Tm = 59.83

Product size : 102 bp



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาวกัณฑ์ฤทัย ศิริภาพ

วันเดือนปีเกิด 30 เมษายน พ.ศ.2535

ประวัติการศึกษา

สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษา สายวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์ โรงเรียนสตรีวิทยา 2 และสำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต จากคณะวิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท คณะแพทยศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ แขนงวิชาเซลล์ชีววิทยาและอณูพันธุศาสตร์ของมนุษย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2558

ประวัติเผยแพร่ผลงาน

นำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ Recent Advances in Genomics and Genetics Conference 2018 (RAGG2018): Innovative Genomics and Genetics หัวข้อเรื่อง การกวดการสร้าง E7 RNA ในมะเร็งปากมดลูกด้วยโปรตีน Argonaute1