

การระบุนที่สามารถจับกับโปรตีนอี 7 เอชพีวไทย์ 16 ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโพรโมเตอร์เมทิลเลชัน  
ในเซลล์ไลน์ C33A



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2561  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION OF GENE BINDING WITH HPV TYPE 16 E7 PROTEIN RELATED TO  
PROMOTER METHYLATION IN C33A CELL LINE



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

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2018

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

โดย

น.ส.จุฑามาศ สุขพัฒน์ธี

สาขาวิชา

พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรา ยีทอง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รัชนิกร ธรรมโชติ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.โชติกา สมรรคจันทร์)

จุฬามาศ สุขพัฒน์ธี : การระบุยีนที่สามารถจับกับโปรตีนอี 7 เอชพีวีไทป์ 16 ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันในเซลล์ไลน์ C33A. (

IDENTIFICATION OF GENE BINDING WITH HPV TYPE 16 E7 PROTEIN RELATED TO PROMOTER METHYLATION IN C33A CELL LINE) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.ปฐมวดี ญาณทัศน์ยิจิต

โปรตีนอี 7 ที่สร้างจากไวรัสเอชพีวี ไทป์ 16 เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูก จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าโปรตีนอี 7 สามารถจับกับโปรตีน DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) แล้วจับที่โปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* และชักนำให้เกิดเมทิลเลชันและลดการแสดงออกของยีน การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นเพื่อหาอื่น ๆ และกลไกของโปรตีนอี 7 ที่สามารถจับที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนแล้วชักนำให้เกิดเมทิลเลชันได้ โดยมีสมมติฐานว่า เมื่อโปรตีน E7 จับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์แล้ว จะสามารถจับกับโปรโมเตอร์ของยีนแล้วเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันได้ โดยในการศึกษานี้ได้ทำการค้นหายีนที่สามารถจับกับโปรตีน อี 7 ของ HPV ไทป์ 16 ด้วย 2 วิธีการ คือ การทำ Chromatin immunoprecipitation Sequencing ด้วยการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่บรรจุยีน *E7* เข้าในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A จากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอที่สามารถจับกับโปรตีน E7 แล้วนำมาหาลำดับเบส เพื่อสืบหาพันธะของ E7 ซึ่งค้นพบทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ *FAM189A1*, *ASAH2B*, และ *RAPGEF4* และวิธีการทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) โดยการใช้ลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่เป็น *cis-element* ของ AP2 ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่สามารถจับกับโปรตีน E7 ไปค้นหาในฐานข้อมูลจีโนมมนุษย์เพื่อค้นหาโปรโมเตอร์ของยีนอื่น ๆ ที่มี *cis-element* ตรงกัน จากนั้นคัดเลือกยีนที่มีลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ตรงกับลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่ AP2 สามารถจับได้ แล้วนำมาคัดเลือกเฉพาะยีนที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 ซึ่งมีรายงานว่าสามารถจับกับโปรตีน E7 ได้เช่นกัน พบทั้งหมด 9 ยีน ได้แก่ *NOP56*, *MAG*, *FUS*, *EIF2S2*, *RPL7*, *RPL10*, *NINJ1*, *LGALS1* และ *CLDN5* แล้วจึงทำการคัดเลือกยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* เพื่อทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ในเซลล์ C33A และ HEK293 ที่มีและไม่มี *E7* พบว่ายีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* ในเซลล์ที่มี *E7* มีการแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่มี *E7* และเมื่อทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค Methylation-specific PCR พบว่าในเซลล์ HEK293 ที่มี *E7* เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* มากขึ้น หลังจากนั้นจึงทำการทดสอบยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีน E7, AP2 และ YY1 กับโปรโมเตอร์ของยีน ด้วยวิธี Chromatin immunoprecipitation (ChIP) พบว่า โปรตีน E7, AP2 และ YY1 สามารถจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* ได้ จากผลการศึกษาทั้งหมดจึงเป็นการยืนยันว่าโปรตีน E7, AP และ YY1 คอมเพล็กซ์ สามารถชักนำให้เกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* ได้ โดยผ่านกลไกการจับที่โปรโมเตอร์ของยีนแล้วยับยั้งการแสดงออกของยีน ทำให้การแสดงออกของยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* ลดลง

สาขาวิชา พันธุศาสตร์

ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

# # 5871924723 : MAJOR GENETICS

KEYWORD:

Juthamard Sukbhattee :  
 IDENTIFICATION OF GENE BINDING WITH HPV TYPE 16 E7 PROTEIN RELATED TO PROMOTER METHYLATION IN C33A CELL LINE. Advisor: Assoc. Prof. Pattamawadee Yanatatsaneejit, Ph.D.

E7 protein generated by Human papillomavirus (HPV) type 16 is the main cause of cervical cancer. The previous report showed that E7 protein interacted with DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) and bound with *CCNA1* promoter inducing *CCNA1* methylation and decreasing expression of gene. The purposes of this research are to identify genes that E7 can drive the promoter methylation and to prove the mechanism by which E7 induce promoter methylation. According to assume that when E7 protein interacts with transcription factor, it can bind to the gene promoter and induce methylation. To identify genes which were induced promoter methylation by HPV type 16, two techniques were used. First, Chromatin immunoprecipitation with DNA sequencing (ChIP-Seq) analysis was done by transfecting E7 recombinant plasmid into C33A cervical cancer cell line. After that, DNA fragments which can interact with E7 protein were precipitated and performed sequencing. Here, 3 genes consisting of *FAM189A1*, *ASAH2B*, and *RAPGEF4* were explored. Another technique was bioinformatics used for selecting genes in human genome database contain the same cis element as *CCNA1* that is the binding site of transcription factor AP2 and YY1. The result showed 9 genes that could interact with AP2 and YY1 which were *NOP56*, *MAG*, *FUS*, *EIF2S2*, *RPL7*, *RPL10*, *NINJ1*, *LGALS1* and *CLDN5* gene. Here, *FAM189A1* and *NOP56* gene were selected for validation. Reverse transcription polymerase chain reaction was done in E7 and empty vector in transfected C33A and HEK293 cell line. The result show that the expression of *FAM189A1* and *NOP56* gene was decreased in E7 transfected cell line. Moreover, methylation specific PCR were tested in HEK293 cell line to prove methylation of genes and the result showed that the methylation of *FAM189A1* and *NOP56* gene was increased in E7 transfected cell line. ChIP-PCR was done for proving the binding of E7, AP2 and YY1 at the promoter of candidate genes. Both *FAM189A1* and *NOP56* gene were interacted with E7, AP2 and YY1. Taken together, it was confirmed that the complex of E7, AP2 and YY1 could induce *FAM189A1* and *NOP56* promoter methylation via interacted with gene promoters and suppressed genes expression leading to decrease the expression of *FAM189A1* and *NOP56* gene.

Field of Study: Genetics

Student's Signature .....

Academic Year: 2018

Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปฐมวดี ญาณทัศนีย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตรวจสอบ และแก้ไขร่างวิทยานิพนธ์นี้มาโดยตลอด รวมไปถึงการให้คำปรึกษาและให้กำลังใจระหว่างการดำเนินงานวิจัย จนทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธาน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนิกร ธรรมโชติ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภัทรา ยี่ทอง และ ดร. โชติกา สมรรถจันทร์ ที่กรุณาให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรากร ที่ให้โอกาสเข้ามาทำวิจัยในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ รวมทั้งอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่จำเป็นต่างๆ ในการวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้มาใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้จนเสร็จสิ้นได้

ขอขอบคุณ นางสาวกัญวลัญญ์ ชเลิศเพ็ชร นายนันท์นภัส วงศ์มณี นางสาวศุภาพิชญ์ ห่อประทุม รวมไปถึง พี่ๆ น้อง ๆ ที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอนุพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และสอนเทคนิคต่าง ๆ ในระหว่างดำเนินงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่พอสสมยศ สุขพัฒน์ธี และคุณแม่อุไรวรรณ สุขพัฒน์ธี ที่ให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษา ตลอดจนคอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมาจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้

คุณความดีและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้เขียนขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาข้างต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จุฑามาศ สุขพัฒน์ธี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....ค	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง	ง
กิตติกรรมประกาศ.....จ	จ
สารบัญ.....ฉ	ฉ
สารบัญรูป.....ฉ	ฉ
สารบัญตาราง.....ฐ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ..... 1	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1	1
วัตถุประสงค์งานวิจัย..... 3	3
ขอบเขตงานวิจัย..... 3	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 4	4
วิธีดำเนินการวิจัย..... 4	4
1. การคัดเลือกยีน..... 4	4
2. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน..... 5	5
3. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน..... 6	6
4. การตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรโมเตอร์ของยีนที่คัดเลือกกับโปรตีน E7, AP2 และ YY1..... 6	6
ลำดับขั้นตอนในการวิจัย..... 7	7
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 10	10
มะเร็ง..... 10	10
มะเร็งปากมดลูก..... 11	11

Human papillomavirus.....	13
โครงสร้างสารพันธุกรรมของไวรัสเอชพีวี.....	14
บทบาทของยีนในเอชพีวี กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก.....	16
ยีนต้านมะเร็ง.....	18
กระบวนการเหนือระดับพันธุกรรม (epigenetics).....	18
ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation).....	18
เอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส.....	19
การดัดแปลงฮิสโตน (histone modification).....	20
ความเกี่ยวข้องระหว่างการผลิตดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และการเกิดมะเร็ง.....	22
Chromatin immunoprecipitation (ChIP).....	22
1. Cross-linked ChIP (XChIP).....	23
2. Native ChIP (NChIP).....	23
Chromatin immunoprecipitation with DNA sequencing (ChIP-Seq).....	24
Next-Generation Sequencing (NGS).....	25
ปฏิกิริยาโซเดียมไบซัลไฟต์ (sodium bisulfite treatment).....	29
Methylation specific-PCR (MSP).....	30
Real - time PCR.....	30
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	32
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	33
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	33
วิธีดำเนินการวิจัย.....	36
1. การคัดเลือกยีน.....	36



1.1 การทำ <i>Chromatin immunoprecipitation with DNA Sequencing</i> (ChIP-Seq).....	36
1.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) .....	36
1.1.2 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมของยีน <i>E7</i> ของเอชพีวี ไทป์ 16 เข้าสู่ competent cells (transformation).....	38
1.1.3 การสกัดพลาสมิด .....	39
1.1.4 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม <i>E7</i> ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ C33A .....	39
1.1.5 Chromatin immunoprecipitation .....	40
1.1.6 การทำ Polymerase chain reaction (PCR).....	42
1.1.7 อิเล็กโทรโฟรีซิส.....	43
1.1.8 การเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอ .....	43
1.2 การค้นหาฮีนด้วยการใช้ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ.....	45
2. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน .....	46
2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	46
2.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่ผสม (cDNA) .....	46
2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>E7</i> ของเอชพีวี ไทป์ 16 ในเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอน พลาสมิด .....	47
2.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>NOP56</i> และ <i>FAM189A1</i> .....	48
2.4.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>NOP56</i> .....	48
2.4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>FAM189A1</i> .....	50
2.4.3 การคำนวณการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี $\Delta\Delta CT$ .....	51
2.4.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธีการทางสถิติ .....	52
3. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>NOP56</i> และยีน <i>FAM189A1</i> .....	52

3.1 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FAM189A1</i> และยีน <i>NOP56</i> ในเซลล์ C33A และ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีน <i>E7</i> .....	52
3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....	52
3.1.2 การทำ sodium bisulfite treatment.....	53
3.1.3 การทำ methylation specific PCR (MSP).....	53
4. การตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรตีน E7, AP2 และ YY1 กับโปรโมเตอร์ของยีนที่คัดเลือก.....	55
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	58
การคัดเลือกยีนด้วยวิธี Chromatin immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq).....	58
1. คุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการตกตะกอนด้วยวิธี ChIP.....	58
2. ปริมาณของดีเอ็นเอจากการทำ ChIP.....	59
3. ปริมาณของดีเอ็นเอจากการเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วย Seq plex Enhanced DNA amplification kit.....	59
4. ผลความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากบริษัททำ ChIP seq analysis.....	60
5. ผลจาก ChIP-Seq analysis.....	60
6. ผลการวิเคราะห์หายีนจากผล ChIP-Seq analysis.....	61
การค้นหายีนด้วยการใช้ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ.....	62
1. การค้นหาลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>CCNA1</i> ที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2.....	62
2. การค้นหายีนที่มีลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ตรงกับลำดับเบสของยีน <i>CCNA1</i> บริเวณที่ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 สามารถจับได้.....	63
3. ผลการคัดเลือกยีนที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 และ YY1.....	63
ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>E7</i> ของ เอชพีวี 16 ในเซลล์ที่ได้รับ	
การถ่ายโอนพลาสมิด.....	65
ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน <i>NOP56</i> และ <i>FAM189A1</i> .....	65

ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน <i>NOP56</i> .....	65
ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน <i>FAM189A1</i> .....	67
ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>NOP56</i> และยีน <i>FAM189A1</i> .....	67
ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>NOP56</i> .	67
ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FAM189A1</i> .....	69
ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรตีน E7, AP2 และ YY1 กับโปรโมเตอร์ของยีน <i>NOP56</i> <i>FAM189A1</i> .....	70
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	73
อภิปรายผลการวิจัย .....	73
สรุปผลการวิจัย .....	79
บรรณานุกรม .....	80
ประวัติผู้เขียน .....	92

## สารบัญรูป

รูปที่ 1	แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนของการคัดเลือกยีนด้วยวิธี ChIP-seq.....	7
รูปที่ 2	แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนของการคัดเลือกยีนด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ.....	8
รูปที่ 3	แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนของการตรวจสอบยีน.....	9
รูปที่ 4	สัญลักษณ์ของโรคมะเร็ง.....	10
รูปที่ 5	Hallmarks of cancer.....	11
รูปที่ 6	ตำแหน่งของเซลล์มะเร็งบริเวณปากมดลูก.....	12
รูปที่ 7	ความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุมดลูกในระยะก่อนมะเร็ง.....	13
รูปที่ 8	Human papillomavirus type 16.....	14
รูปที่ 9	โครงสร้างสารพันธุกรรมของ HPV.....	16
รูปที่ 10	รูปแบบการติดเชื้อของเอชพีวีในรูปแบบ episomal form และ Integrate form.....	17
รูปที่ 11	ปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิลบนเบสไซโตซีน.....	19
รูปที่ 12	โครงสร้างของนิวคลีโอโซมและโครมาติน.....	21
รูปที่ 13	การทำ Chromatin immunoprecipitation แบบ Cross-linked ChIP.....	23
รูปที่ 14	การทำ Chromatin immunoprecipitation แบบ Native ChIP.....	24
รูปที่ 15	หลักการของการทำ sequencing ด้วยเครื่อง Illumina.....	26
รูปที่ 16	หลักการของการทำ sequencing ด้วยเครื่อง 454/Roche genome sequencer.....	27
รูปที่ 17	การ sequencing ด้วยเครื่อง SOLiD/Life Technology (ABI) โดยวิธี ligation ด้วยการใช้ di-base labeled probes.....	28
รูปที่ 18	ปฏิกิริยาโซเดียมไบซัลไฟต์.....	29
รูปที่ 19	หลักการในการทำ Methylation specific-PCR.....	30
รูปที่ 20	โครงสร้างของพลาสมิดลูกผสมของยีน E7 ของเอชพีวี ไทป์ 16.....	38
รูปที่ 21	ผลการทำ CHIP - PCR ของยีน CCNA1 ในเซลล์ C33A.....	58
รูปที่ 22	ผลการค้นยีน FAM189A1 จากการใช้ตำแหน่งบนโครโมโซมค้นหาบนฐานข้อมูล UCSC...61	

รูปที่ 23	ผลการค้นหา ยีน <i>ASAH2B</i> จากการใช้ตำแหน่งบนโครโมโซมค้นหาบนฐานข้อมูล UCSC ...	61
รูปที่ 24	ผลการค้นหา ยีน <i>ASAH2B</i> จากการใช้ตำแหน่งบนโครโมโซมค้นหาบนฐานข้อมูล UCSC ...	62
รูปที่ 25	ผลการทำนายลำดับเบสของยีน <i>CCNA1</i> ที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 ..	63
รูปที่ 26	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>E7</i> ในเซลล์ C33A และ HEK293 .....	65
รูปที่ 27	ผลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน <i>NOP56</i> ในเซลล์ C33A และ เซลล์ HEK293 .....	66
รูปที่ 28	กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน <i>NOP56</i> ในเซลล์ HEK293 .....	66
รูปที่ 29	กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน <i>FAM189A1</i> ในเซลล์ HEK293 .....	67
รูปที่ 30	ผลการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>NOP56</i> ในเซลล์ C33A .....	68
รูปที่ 31	ผลการตรวจสอบ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>NOP56</i> ในเซลล์ HEK293 .....	68
รูปที่ 32	ผลการตรวจสอบ unmethylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>NOP56</i> ในเซลล์ HEK293 .....	69
รูปที่ 33	ผลการตรวจสอบ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FAM189A1</i> ในเซลล์ HEK293 ..	70
รูปที่ 34	ผลการตรวจสอบ unmethylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน <i>FAM189A1</i> ในเซลล์ HEK293 .....	70
รูปที่ 35	ผลการทำ CHIP - PCR ของยีน <i>NOP56</i> .....	71
รูปที่ 36	ผลการทำ CHIP - PCR ของยีน <i>FAM189A1</i> .....	71

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ CHIP - PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> .....	42
ตารางที่ 2 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ CHIP- PCR เพื่อตรวจสอบยีน <i>CCNA1</i> .....	43
ตารางที่ 3 สภาวะที่ใช้ในการทำ CHIP - PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>CCNA1</i> .....	43
ตารางที่ 4 สภาวะในการทำ real-time PCR ในขั้นตอน Amplification ของ Seq plex Enhanced DNA amplification kit .....	44
ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ใช้ใน PCR เพื่อตรวจสอบยีน <i>E7</i> ของเอชพีวี ไทป์ 16.....	47
ตารางที่ 6 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบยีน <i>E7</i> ของเอชพีวี ไทป์ 16 .....	47
ตารางที่ 7 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบยีน <i>E7</i> ของเอชพีวี ไทป์ 16.....	48
ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ใน PCR และ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>NOP56</i> .....	49
ตารางที่ 9 สภาวะในการทำ PCR และ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบยีน <i>NOP56</i> .....	49
ตารางที่ 10 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบยีน <i>NOP56</i> .....	49
ตารางที่ 11 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>NOP56</i> .....	50
ตารางที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>FAM189A1</i> .....	50
ตารางที่ 13 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>FAM189A1</i> .....	51
ตารางที่ 14 สภาวะในการทำ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน <i>FAM189A1</i> .....	51
ตารางที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ใน MSP เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันในยีน <i>FAM189A1</i> และยีน <i>NOP56</i> .....	54
ตารางที่ 16 สภาวะในการทำ MSP เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันในยีน <i>FAM189A1</i> .....	54

ตารางที่ 17	สภาวะในการทำ MSP เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันในยีน <i>NOP56</i>	55
ตารางที่ 18	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ CHIP - PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>FAM189A1</i> และยีน <i>NOP56</i>	56
ตารางที่ 19	ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ CHIP- PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>FAM189A1</i> และยีน <i>NOP56</i>	56
ตารางที่ 20	สภาวะที่ใช้ในการทำ CHIP - PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>FAM189A1</i>	57
ตารางที่ 21	สภาวะที่ใช้ในการทำ CHIP- PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>NOP56</i>	57
ตารางที่ 22	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการตกตะกอนด้วยวิธี CHIP	59
ตารางที่ 23	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วย Seq plex Enhanced DNA amplification kit	60
ตารางที่ 24	ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ CHIP-Seq analysis	60
ตารางที่ 25	ยีนที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 และ YY1 ได้	64

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากสถิติทั่วโลก มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์สตรีที่พบมากเป็นอันดับ 2 รองจากมะเร็งเต้านม และมีผู้เสียชีวิตมากกว่า 270,000 รายต่อปี สำหรับประเทศไทย มะเร็งปากมดลูกพบได้บ่อยที่สุดในสตรี ซึ่งเป็นโรคที่ติดต่อผ่านทางเพศสัมพันธ์ (Munoz *et al.*, 2003) โดยในปัจจุบันการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกที่ได้รับการยอมรับและถือปฏิบัติกันอย่างกว้างขวาง คือวิธีการตรวจด้วยวิธีเซลล์วิทยา (แบบสเมียร์) เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระยะใหญ่ ๆ คือ 1. ระยะก่อนมะเร็ง (Premalignant lesion) ในระยะนี้ จะเกิดการค่อย ๆ พัฒนาความผิดปกติของเซลล์ไปเรื่อย ๆ สามารถแบ่งย่อยออกตามความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุมดลูก (Cervical Intraepithelium Neoplasia : CIN) ได้แก่ CIN I (mild dysplasia) คือ มีความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุมดลูกเฉพาะชั้นล่าง 1 ใน 3 ของเยื่อบุสแควมัส, CIN2 (moderate dysplasia) คือ มีความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุมดลูกเฉพาะชั้นล่าง 2 ใน 3 ของเยื่อบุสแควมัส และ CIN3 คือ มีความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุมดลูกทั่วทั้งบริเวณ หรือสามารถแบ่งตาม squamous intraepithelial lesion (SIL) ได้แก่ low-SIL ซึ่งประกอบด้วย CIN1 และ high-SIL ประกอบด้วย CIN2 และ CIN3 2. ระยะ Malignant invasive cervical cancer คือ ระยะที่เป็นมะเร็งปากมดลูก (Yardley, 2001) อย่างไรก็ตาม ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา มีรายงานจำนวนมากที่ประเมินประสิทธิภาพของการตรวจด้วยวิธีดังกล่าวและพบว่า การตรวจด้วยวิธีนี้มีความไว (sensitivity) ต่ำ และมีผลลบวงค่อนข้างสูง (มีความผิดปกติที่ปากมดลูก แต่การตรวจให้ผลปกติ) (Agency for Health Care Policy and Reserch [AHCP], 1999; มงคล เภยจาภิบาล, 2551) ซึ่งทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากพลาดโอกาสในการรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของโรค และทำให้การรักษามีความยากมากยิ่งขึ้น รวมทั้งมีโอกาสนในการหายเป็นปกติลดลง

สาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งปากมดลูกเกิดจากการติดเชื้อ high risk human papillomavirus (HR-HPV) ได้แก่ ไทป์ 16 และ 18 (Bosch *et al.*, 2002; Walboomers *et al.*, 1999) ซึ่งเป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อชนิดสแควมัส จีโนมของเอชพีวีประกอบด้วย คู่เบสประมาณ 8,000 คู่เบส เป็นสายคู่ที่เรียงตัวเป็นวงกลม (double stranded circular DNA) ประกอบด้วย Early genes (ได้แก่ E1, E2, E3, E4, E5, E6 และ E7) และ Late genes (ได้แก่ L1 และ L2) โดยที่ยีน E1 และ E2 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ replication และ transcription ของไวรัสจีโนม จะมีการแสดงออกก่อนเป็นอันดับแรก (ZurHausen, 2002) ต่อมา E6 และ E7 จะมีการแสดงออก



เพื่อทำหน้าที่จับกับโปรตีนของเซลล์ที่ควบคุมวงจรชีวิตและการตายของเซลล์ เพื่อยืดอายุของเซลล์ให้ มีเวลานานพอในการผลิตไวรัสรุ่นลูกหลานต่อไป (Giarre *et al.*, 2001; Hengstermann *et al.*, 2001) จากนั้น L1 และ L2 จะแสดงออกเพื่อทำหน้าที่ผลิตโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้าง เปลือกหุ้มไวรัส (Tan *et al.*, 1995) และ Long control region (LCR) ทำหน้าที่ควบคุม การแปลรหัส (transcription) (Tjong *et al.*, 2001) โดยรูปแบบของการติดเชื้อเอชพีวี มี 2 รูปแบบ คือ episomal form และ integrated form โดยในรูปแบบ integrated form พบได้มากกว่าและ พบว่าการติดเชื้อในรูปแบบนี้จะทำให้ยีน E2 ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมยีน E6 และ E7 ที่เป็น oncogenic gene ถูกทำลาย ส่งผลให้ยีน E6 และ E7 เกิดการแสดงออกมากกว่าปกติ ซึ่งเป็นสาเหตุ สำคัญในการเกิดมะเร็ง เนื่องจากโปรตีน E6 ซึ่งสร้างจากยีน E6 จะทำลายโปรตีน p53 ซึ่งเป็น โปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) และมีหน้าที่เป็นโปรตีน ต้านมะเร็ง โดยทำงานร่วมกับ โปรตีน E6-associated (E6 AP) (Mantovani and Banks, 2001) ในขณะที่โปรตีน E7 จะสามารถจับกับโปรตีน retinoblastoma (pRb) ซึ่งเป็นโปรตีนต้านมะเร็งที่ ควบคุมการเพิ่มจำนวนและการตายของเซลล์ ทำให้โปรตีน E2F เป็นอิสระ ส่งผลให้ยีน *cyclin E* และ *cyclin A* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ E2F มีการแสดงออกมากขึ้น และกระตุ้นให้เซลล์สังเคราะห์ ดีเอ็นเออย่างต่อเนื่อง (Yim and Park, 2005)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยในหลาย ๆ งานวิจัย พบว่า การติดเชื้อเอชพีวีมีความสัมพันธ์กับ การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมในสถานะเหนือพันธุกรรม (epigenetic) เช่น พบว่า ในเซลล์มะเร็งศีรษะ- และลำคอ เอชพีวีสามารถทำให้เกิดเมทิลเลชันและลดการแสดงออกของยีนบางยีนได้ เช่น ยีน *IRS1*, *GNA11*, *GNA12*, *EREG*, *CCNA1*, *RGS4* และ *PKIG* เป็นต้น โดยพบว่ามียีน 75 ยีน ที่มีอัตราการเกิด เมทิลเลชันสูงขึ้นในเซลล์ที่ติดเชื้อเอชพีวีเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ (Sartor *et al.*, 2011) หรือพบ อัตราการเกิดเมทิลเลชันที่สูงขึ้นของยีน *EPB41L3* (Brentnall *et al.*, 2015; Eijsink *et al.*, 2012), *MT1G*, *NMES1*, *RRAD* และ *TFPI2* (Li *et al.*, 2015; Sova *et al.*, 2006) ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก ที่ติดเชื้อเอชพีวี เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเอชพีวีสามารถเพิ่ม การแสดงออกของ mRNA ของ *Dnmt3a* และ *Dnmt1* ในเซลล์โล้นมะเร็งศีรษะและลำคอที่ ติดเชื้อเอชพีวี รวมไปถึงเซลล์โล้นที่ได้รับการถ่ายโอนยีน E6 และ E7 ของเอชพีวีอีกด้วย (Lechner *et al.*, 2013) และจากการศึกษาการติดเชื้อเอชพีวีในรูปแบบอินทิเกรชัน ยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับ การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* (Yanatatsaneejit, Mutirangura, and Kitkumthorn, 2011) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมดีเอ็นเอสายคู่ (Muller-Tidow *et al.*, 2004) โดยในมะเร็งปากมดลูกพบว่าการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* มากถึง ร้อยละ 93 (Kitkumthorn *et al.*, 2006) และยังพบว่าโปรตีน E7 ซึ่งถูกสร้างจากยีน E7 ของไวรัส เอชพีวี สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ DNA methyltransferase 1 (*Dnmt1*) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำ

หน้าที่ดํารงการเกิดเมทิลเลชันภายในเซลล์ โดยทำหน้าที่เติมหมู่เมทิล (-CH<sub>3</sub>) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน (5-methyl cytosine) และลดระดับโปรตีน E-cadherin (Laurson *et al.*, 2010) และพบว่าโปรตีน E7 มีความสามารถในการจับกับ Dnmt1 (Burgers *et al.*, 2007) แล้วสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนและลดการแสดงออกของยีน *CCNA1* ได้ (Chalertpet *et al.*, 2015) นอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีน E7 สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 และ YY1 ทำให้สามารถลงมาจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FOXC1* และเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชัน รวมถึงลดการแสดงออกของยีน (นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2017) ซึ่งจะนำไปสู่การเกิดมะเร็งปากมดลูกในที่สุด

ดังนั้นจากงานศึกษาวิจัยต่าง ๆ ที่ผ่านมา จึงสามารถสรุปได้ว่า ยีน E7 ของไวรัสเอชพีวี สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันและส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกที่ลดลง การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นในการหายีนอื่นๆ โดยเฉพาะยีนในกลุ่มยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันและลดการแสดงออกโดยโปรตีน E7 ซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจคัดกรองและวินิจฉัยโรคมะเร็งปากมดลูกให้มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น รวมทั้งเป็นจุดเริ่มต้นของการออกแบบวิธีการรักษามะเร็งปากมดลูกในรูปแบบใหม่ ๆ เช่น การทำ gene therapy หรือการคิดค้นยารักษามะเร็งปากมดลูก เป็นต้น อันจะนำไปสู่การพัฒนาทางการแพทย์และการรักษามะเร็งปากมดลูกที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

### วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. ทำการศึกษาค้นหายีนที่สามารถถูกจับและถูกชักนำให้เกิดเมทิลเลชันโดยยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ในมะเร็งปากมดลูก
2. เพื่อศึกษากลไกของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ในการทำให้เกิดเมทิลเลชันและการแสดงออกของยีนต่างๆ ในมะเร็งปากมดลูก

### ขอบเขตงานวิจัย

ทำการค้นหายีนที่สามารถจับกับโปรตีน E7 ของเอชพีวี ไทป์ 16 ด้วย 2 วิธีการ คือ การทำ Chromatin immunoprecipitation Sequencing โดยการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่บรรจุยีน E7 เข้าในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A แล้วทำการตกตะกอนดีเอ็นเอที่สามารถจับกับโปรตีน E7 จากนั้นนำมาหาลำดับเบส เพื่อสืบหายีนที่ต้องการ และวิธีการทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics) โดยการใช้ลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่สามารถจับกับ AP2 ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่สามารถจับกับโปรตีน E7 ไปค้นหาในฐานข้อมูลจีโนมมนุษย์เพื่อค้นหาโปรโมเตอร์ของ

ยีนอื่นๆ ที่มีลำดับเบสตรงกัน จากนั้นคัดเลือกยีนที่มีลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ตรงกับลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่ AP2 สามารถจับได้ แล้วนำมาคัดเลือกเฉพาะยีนที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 จากนั้นคัดเลือกยีนที่ได้จากทั้ง 2 วิธีที่คาดว่าจะอยู่ในกลุ่มของยีนต้านมะเร็งมา 2 ยีน ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ ซึ่งคัดเลือกยีน *FAM189A1* ที่ได้จาก Chromatin immunoprecipitation Sequencing และยีน *NOP56* ที่ได้จากวิธีการทางชีวสารสนเทศ แล้วทำการทดสอบยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีน E7 กับโปรโมเตอร์ของยีนที่คัดเลือกด้วยวิธี Chromatin immunoprecipitation (ChIP) ซึ่งทำการทดลองในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด-ลูกผสมที่บรรจุยีน *E7* และพลาสมิดเปล่า และใช้แอนติบอดี E7, AP2, YY1, H3K4, และ IgG ในการตกตะกอนโปรตีน E7, AP2, YY1 และ H3K4 จากนั้นใช้ไพรเมอร์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่คัดเลือกในการทำ PCR เพื่อยืนยันว่าโปรตีน E7, AP2 และ YY1 สามารถจับกับโปรโมเตอร์ของยีนที่คัดเลือกได้ พร้อมกันนั้นได้ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน ด้วยเทคนิค Real-time PCR และการเปลี่ยนแปลงของระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีนด้วยเทคนิค MSP

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบกลไกของโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ในการจับกับโปรโมเตอร์ของยีนและทำให้เกิดเมทิลเลชัน รวมทั้งยับยั้งการแสดงออกของยีน ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นยีนต้านมะเร็งปากมดลูก
2. สามารถนำข้อมูลการศึกษานี้ไปพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกให้มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น รวมทั้งนำไปพัฒนาการรักษา มะเร็งปากมดลูกรูปแบบใหม่ๆ เช่น การทำ gene therapy และการคิดค้นยารักษา มะเร็งปากมดลูก

### วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถแบ่งออกเป็น 4 ส่วนหลัก คือ

#### 1. การคัดเลือกยีน

##### 1.1 การทำ Chromatin immunoprecipitation with DNA Sequencing (ChIP-Seq)

1.1.1 ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่บรรจุยีน *E7* ของเอชพีวี ไทป์ 16 เข้าสู่ competent cell

1.1.2 สกัดพลาสมิด และตรวจสอบยีน *E7* ของเอชพีวี ไทป์ 16 ใน competent cell ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่บรรจุยีน *E7*

1.1.3 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีการติดเชื้อเอชพีวีไทป์ 16

1.1.4 ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่บรรจุยีน *E7* จากข้อ 1.1.2 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ C33A เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.1.5 ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอที่โปรตีน *E7* สามารถจับได้ด้วยวิธี Chromatin immunoprecipitation (ChIP) โดยใช้แอนติบอดี *E7*, H3K9, HIS และ IgG

1.1.6 ทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวกสำหรับยืนยันว่าการทำ ChIP ประสบความสำเร็จ

1.1.7 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มีปริมาณไม่น้อยกว่า 200 ng เพื่อให้ดีเอ็นเอมีปริมาณเพียงพอต่อการทำ ChIP-seq และส่งบริษัททำ ChIP-seq

1.1.8 วิเคราะห์ข้อมูลตำแหน่งบนโครโมโซมที่ได้จากการทำ ChIP-seq เพื่อค้นหา ยีนที่อยู่ในตำแหน่งดังกล่าว และคัดเลือกยีนที่คาดว่าจะอยู่ในกลุ่มของยีนด้านมะเร็ง จำนวน 1 ยีน เพื่อนำมาตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรโมเตอร์ของยีนกับ *E7*, AP2, YY1 และการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน

## 1.2 การคัดเลือกยีนจากวิธีทางชีวสารสนเทศ

1.2.1 นำลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่สามารถจับกับ AP2 ซึ่งเป็นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่สามารถจับกับโปรตีน *E7* ไปค้นหาในฐานข้อมูลจีโนมมนุษย์เพื่อค้นหาโปรโมเตอร์ของยีนอื่นๆ ที่มีลำดับเบสตรงกัน

1.2.2 คัดเลือกยีนที่มีลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ตรงกับลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่ AP2 สามารถจับได้โดยใช้โปรแกรม *promo* และ *jasper* เพื่อคัดเลือกเฉพาะยีนที่ AP2 จับได้

1.2.3 คัดเลือกเฉพาะยีนที่ทั้ง 2 โปรแกรมมีตรงกัน แล้วนำมาคัดเลือกเฉพาะยีนที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 ด้วยโปรแกรม *epd.vital*

1.2.4 คัดเลือกยีนที่คาดว่าจะอยู่ในกลุ่มของยีนด้านมะเร็ง จำนวน 1 ยีน คือ ยีน *NOP56* เพื่อนำมาตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรโมเตอร์ของยีนกับ *E7*, AP2, YY1 และการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน

## 2. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน

2.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ C33A และ HEK293

2.2 ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่บรรจุยีน *E7* จากข้อ 1.1.2 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ C33A และ HEK293 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.3 สกัดอาร์เอ็นเอจากเซลล์ C33A และ HEK293 ที่ถูกโอนถ่ายพลาสมิด และสังเคราะห์ cDNA

2.4 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนที่คัดเลือกด้วยเทคนิค Real-time PCR

### 3. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน

3.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ C33A และ HEK293 และถ่ายโอนพลาสมิดตามวิธีทำในข้อ 2.2

3.2 สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ C33A และ HEK293 ที่ถูกโอนถ่ายพลาสมิด และทำ sodium bisulfite treatment

3.3 ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีนที่คัดเลือกด้วยเทคนิค MSP

### 4. การตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรโมเตอร์ของยีนที่คัดเลือกกับโปรตีน *E7*, *AP2* และ *YY1*

4.1 เพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์ HEK293

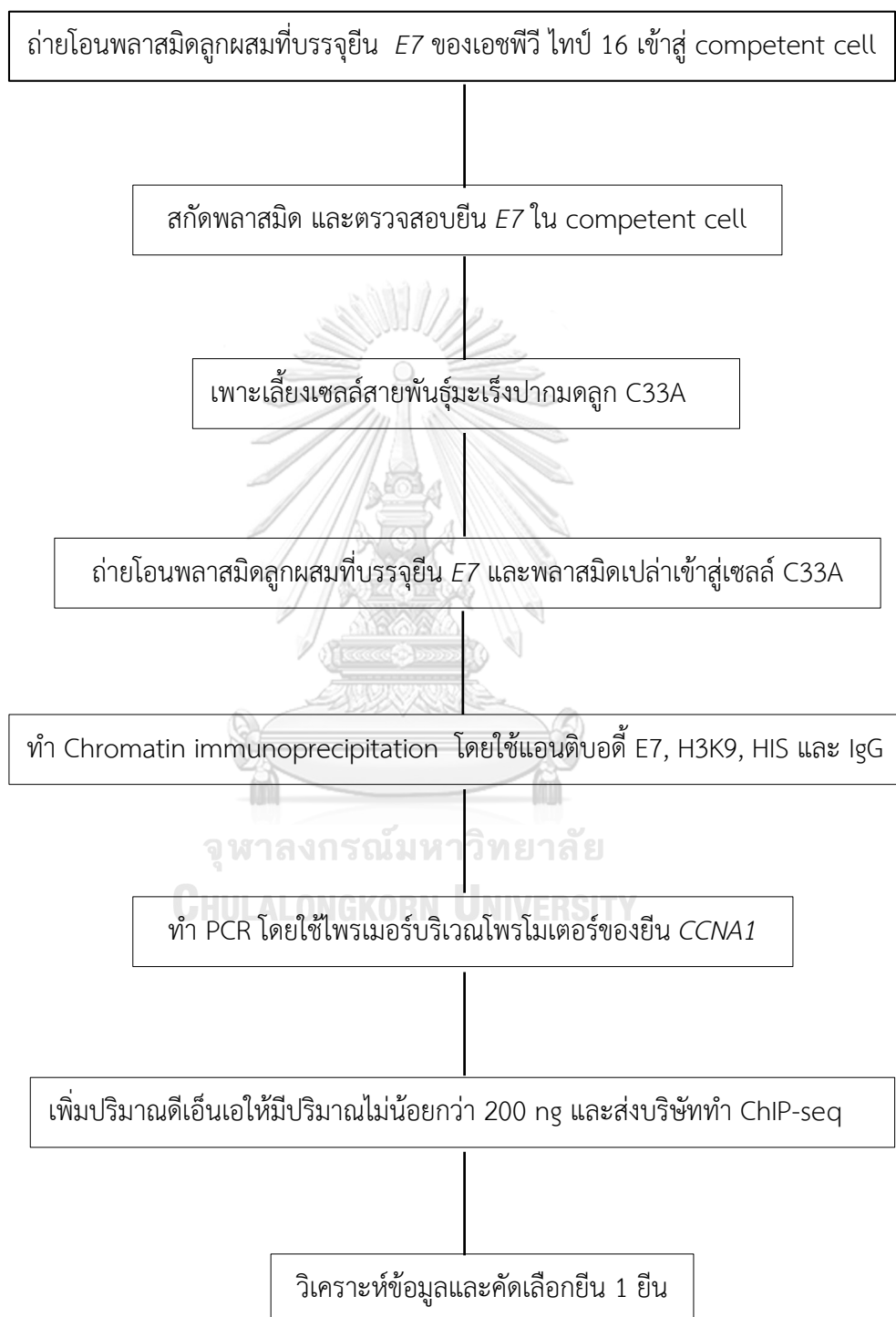
4.2 ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่บรรจุยีน *E7* จากข้อ 1.1.2 และพลาสมิดเปล่าเข้าสู่เซลล์ HEK293 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.3 ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอที่โปรตีน *E7* สามารถจับได้ด้วยวิธี CHIP โดยใช้แอนติบอดี *E7*, *AP2*, *YY1*, *H3K4* และ IgG

4.4 ทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนที่คัดเลือก

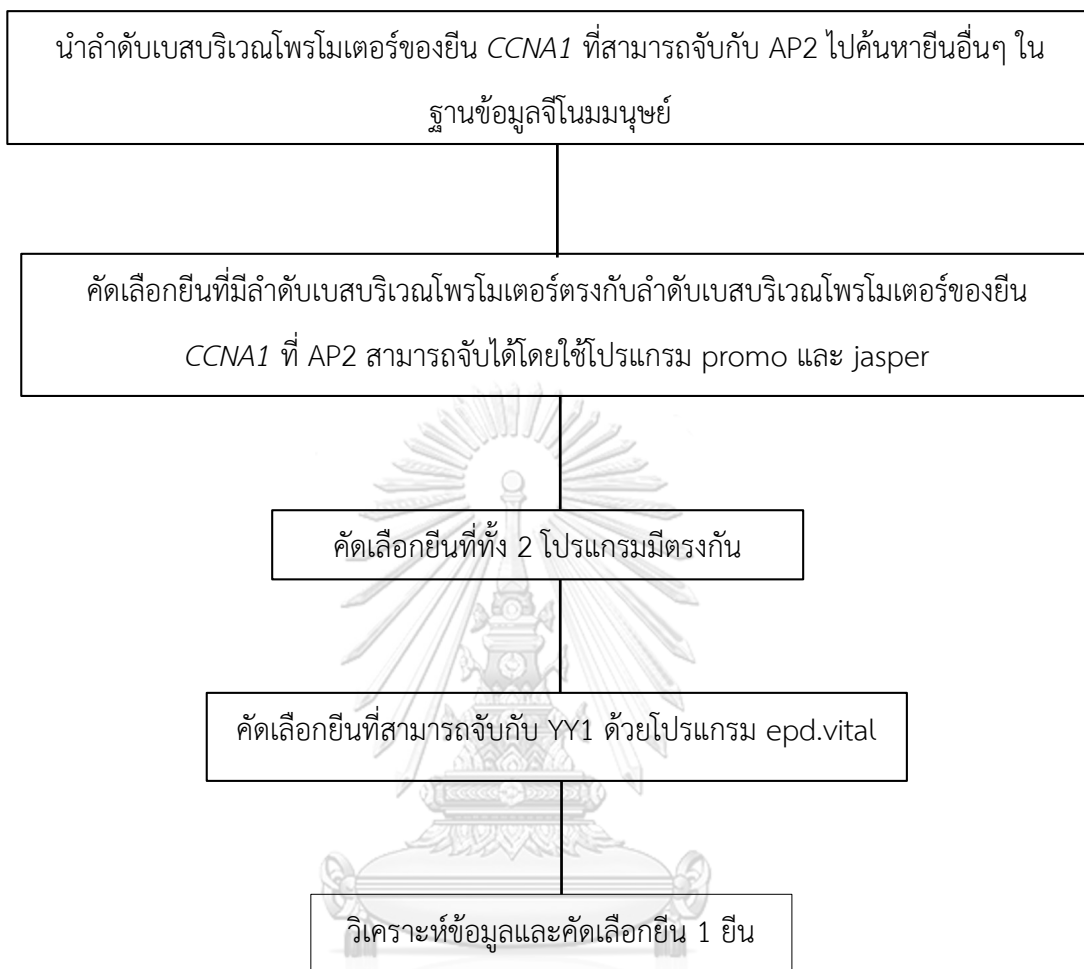
## ลำดับขั้นตอนในการวิจัย

1. การคัดเลือกยีนด้วยการทำ Chromatin immunoprecipitation Sequencing



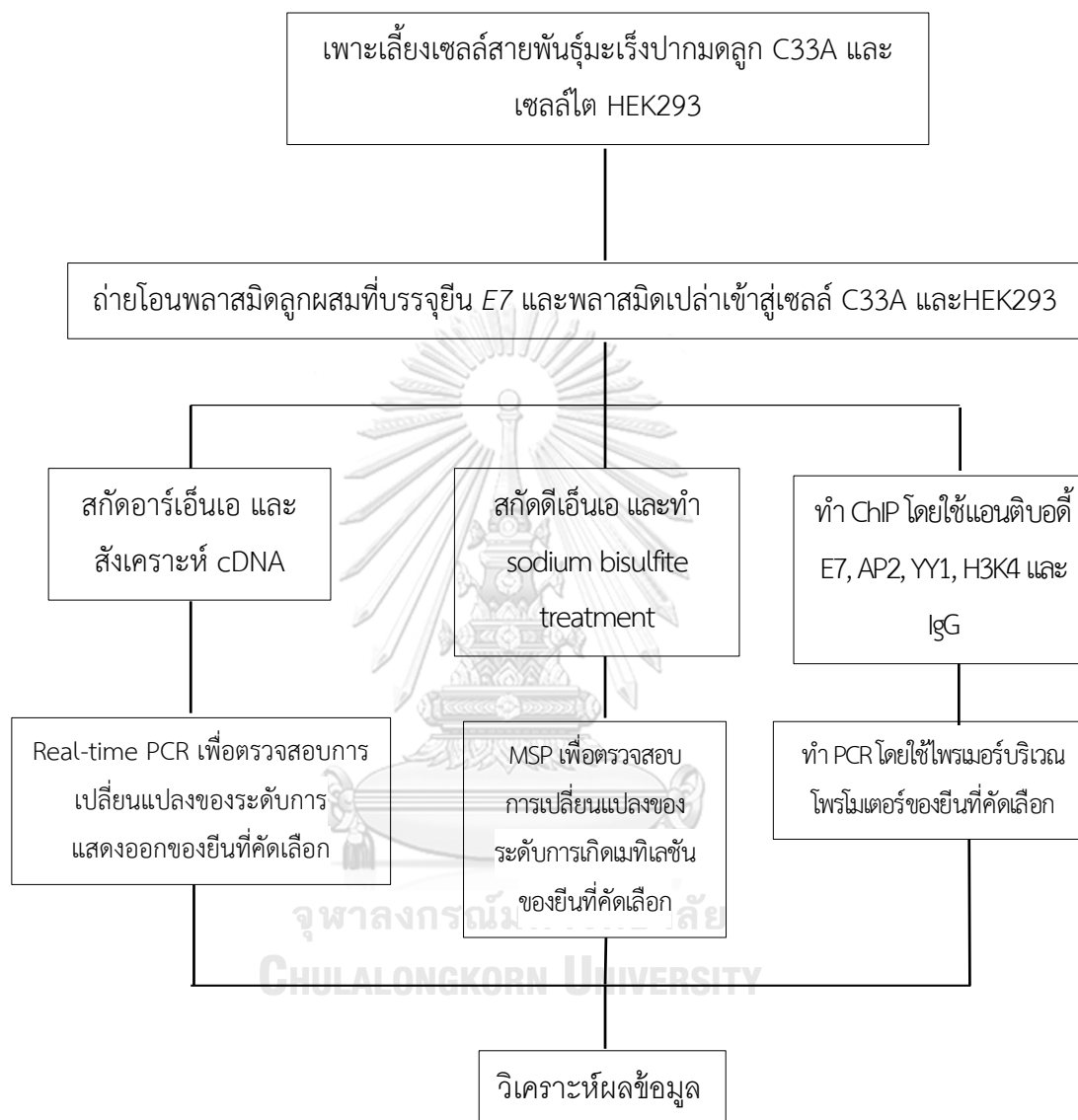
รูปที่ 1 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนของการคัดเลือกยีนด้วยวิธี ChIP-seq

## 2. การคัดเลือกยื่นจากวิธีทางชีวสารสนเทศ



รูปที่ 2 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนของการคัดเลือกยื่นด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศ

3. การตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรโมเตอร์ของยีนที่คัดเลือกกับโปรตีน E7, AP2 และ YY1, การเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกและการเกิดเมทิลเลชันของยีนที่คัดเลือก



รูปที่ 3 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนของการตรวจสอบยีน



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### มะเร็ง

มะเร็ง คือ กลุ่มโรคที่มีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติ และมีความสามารถในการแพร่กระจายไปยังบริเวณต่างๆ ของร่างกายได้ ในภาษาอังกฤษใช้คำว่า cancer ซึ่งมีรากศัพท์มาจากภาษากรีก คือ carcinos แปลว่า ปู (crab) ซึ่งเป็นสัญลักษณ์ของโรคมะเร็ง ดังรูปที่ 4 เนื่องจากก้อนเนื้อมะเร็งมีลักษณะลุกลามออกไปจากตัวก้อนเนื้อเหมือนกับขาปูที่ออกไปจากตัวปู โดยนักปราชญ์ชาวกรีก Hippocrates (460-370 ปีก่อนคริสตกาล) บิดาแห่งการแพทย์สมัยใหม่เป็นผู้ที่บัญญัติศัพท์นี้ขึ้นเป็นคนแรก (American cancer society [ACS], 2018)



รูปที่ 4 สัญลักษณ์ของโรคมะเร็ง  
(<http://cancerfilms.org/blog/how-cancer-got-its-name/>)

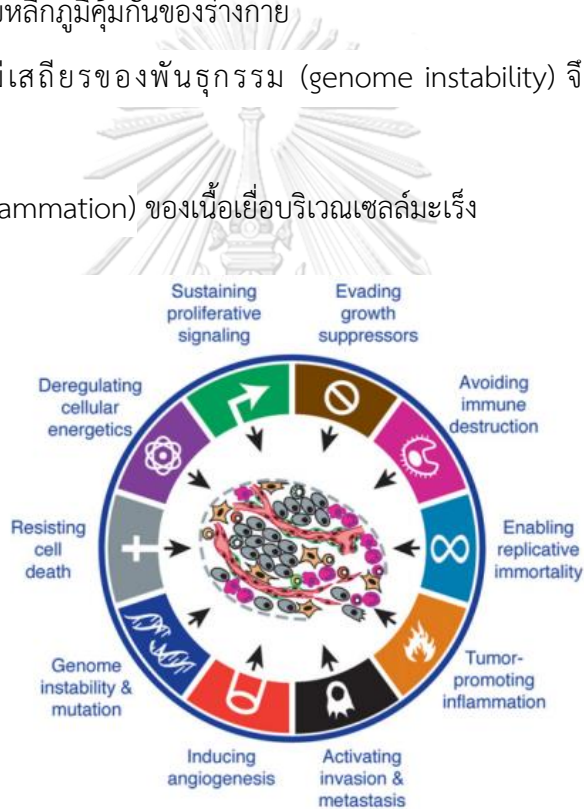
ในปัจจุบันได้มีความพยายามในการศึกษาโรคมะเร็งกันอย่างกว้างขวาง และได้มีการอธิบายลักษณะที่สำคัญของเซลล์มะเร็งที่แตกต่างไปจากเซลล์ปกติ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่จำเป็นต่อการดำเนินโรคของมะเร็งขึ้นในปี 2000 มีทั้งหมด 6 ลักษณะ (Hanahan and Weinberg, 2000) ดังรูปที่ 5 ได้แก่

1. มีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้ด้วยสัญญาณเจริญเติบโตของตัวเอง (self-sufficiency in growth signals) โดยไม่ต้องมีสัญญาณกระตุ้นตามปกติ
2. มีความสามารถในการหลีกเลี่ยงสัญญาณการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ (insensitivity to antigrowth signals) ทำให้สามารถเติบโตและแบ่งเซลล์ได้ตลอดเวลา
3. มีกลไกหลีกเลี่ยงโปรแกรมการตายของเซลล์ (evading apoptosis)

4. มีความสามารถจำลองตัวเองหรือแบ่งเซลล์ได้อย่างไม่จำกัด (limitless replicative potential)
5. มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ (sustained angiogenesis)
6. มีการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) และสามารถแพร่กระจายไปยังบริเวณต่างๆ ของร่างกายได้ (metastasis)

ต่อมาในปี 2011 ได้มีการกำหนดลักษณะที่สำคัญของเซลล์มะเร็งเพิ่มอีก 4 ลักษณะ (Hanahan and Weinberg, 2011) ดังรูปที่ 5 ได้แก่

1. มีกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolic pathways) ที่ผิดปกติ
2. มีกลไกในการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกาย
3. มีภาวะความไม่เสถียรของพันธุกรรม (genome instability) จึงมีความถี่ในการเกิดการกลายพันธุ์สูง
4. มีการอักเสบ (inflammation) ของเนื้อเยื่อบริเวณเซลล์มะเร็ง



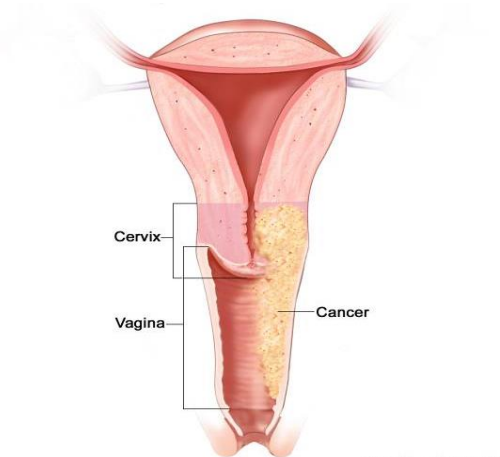
รูปที่ 5 Hallmarks of cancer (Hanahan and Weinberg, 2011)

สำหรับชื่อของมะเร็งแต่ละชนิดนั้น จะแตกต่างกันไปตามอวัยวะซึ่งเป็นจุดกำเนิดของเซลล์ที่เริ่มมีการแบ่งตัวแบบผิดปกติ เช่น มะเร็งปอด มะเร็งเต้านม มะเร็งปากมดลูก เป็นต้น

### มะเร็งปากมดลูก

มะเร็งปากมดลูก คือ มะเร็งที่เกิดจากการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ผิดปกติบริเวณปากมดลูก ซึ่งเป็นมะเร็งชนิดที่พบมากเป็นอันดับ 2 และเป็นมะเร็งที่มีอัตราการเสียชีวิตมากเป็นอันดับ 4 ในสตรี

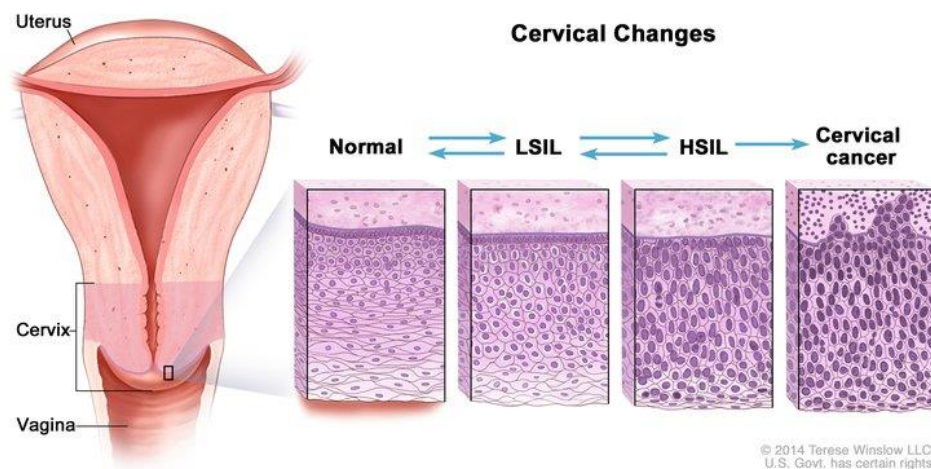
ทั่วโลก (He *et al.*, 2015) โดยในแต่ละปีพบว่ามีผู้ป่วยรายใหม่กว่า 528,00 ราย และเสียชีวิตกว่า 266,000 ราย ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในประเทศด้อยพัฒนาและกำลังพัฒนา คิดเป็นร้อยละ 85 ของผู้ป่วยทั้งหมด และมีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 87 (Finocchario-Kessler *et al.*, 2016)



รูปที่ 6 ตำแหน่งของเซลล์มะเร็งบริเวณปากมดลูก (National Cancer Institute (US), 2002)

การพัฒนาของมะเร็งปากมดลูกจะเริ่มต้นจากมะเร็งชนิดไม่ลุกลาม (Noninvasive) ซึ่งอาจใช้เวลานานถึง 20 ปี แล้วจึงลุกลาม โดยเซลล์จะค่อย ๆ พัฒนาเป็นเซลล์ในระยะก่อนมะเร็ง (Premalignant lesion) และจะค่อย ๆ พัฒนาความผิดปกติจนมีพยาธิสภาพของเซลล์เปลี่ยนไป กล่าวคือ จะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ขึ้น มีรูปร่างผิดปกติ ติดสีมากขึ้น มีนิวเคลียสหลายอัน และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ผิดปกติและไม่สมบูรณ์ (Dysplasia) เป็นต้น (Kjaer *et al.*, 2010) โดยสามารถแบ่งย่อยออกตามความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุมดลูกที่มีพยาธิสภาพเป็น Cervical Intraepithelium Neoplasia (Sartor *et al.*, 2011) ได้ 3 ระยะ (Yardley, 2001) ได้แก่

1. CIN I (mild dysplasia) คือ มีความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุมดลูกเฉพาะชั้นล่าง 1 ใน 3 ของเยื่อบุสแควมัส
2. CIN2 (moderate dysplasia) คือ มีความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุมดลูกเฉพาะชั้นล่าง 2 ใน 3 ของเยื่อบุสแควมัส
3. CIN3 คือ มีความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุมดลูกทั่วทั้งบริเวณ และมีโอกาสพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ (Malignant invasive cervical cancer)



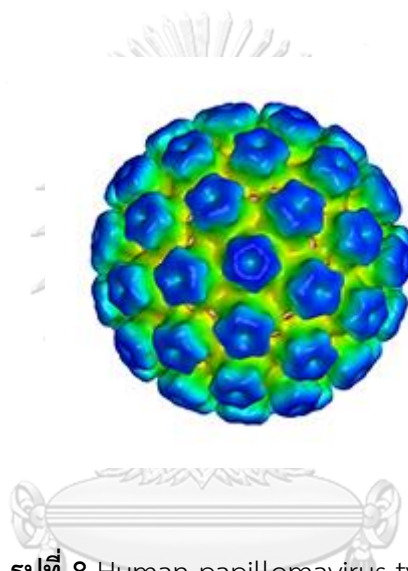
รูปที่ 7 ความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุมดลูกในระยะก่อนมะเร็ง (<http://www.cancer.gov>)

ปัจจุบันการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกที่ได้รับการยอมรับและถือปฏิบัติกันอย่างกว้างขวาง คือวิธีการตรวจด้วยวิธีแปปสเมียร์ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วยวิธีดังกล่าวมีความไว (sensitivity) ต่ำ คือมีเพียงร้อยละ 51 เท่านั้น และมีผลลบลงค่อนข้างสูง กล่าวคือ มีความผิดปกติที่ปากมดลูก แต่การตรวจอาจให้ผลปกติ (Agency for Health Care Policy and Reserch [AHCPR], 1999; มงคล เบญจาทิบาล, 2551) ซึ่งทำให้ผู้ป่วยจำนวนมากพลาดโอกาสในการรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของโรค และทำให้การรักษามีความยากมากยิ่งขึ้นรวมทั้งโอกาสในการหายเป็นปกติก็ลดลง

### Human papillomavirus

Human papillomavirus (HPV) จัดอยู่ในแฟมิลี Papovaviridae มีขนาดของอนุภาคไวรัสประมาณ 45 - 55 นาโนเมตร ที่ประกอบไปด้วยแคปซิด 72 capsomer เรียงตัวเป็นรูปทรงกลมหลายเหลี่ยม (icosahedral symmetry) และไม่มีเปลือกหุ้มชั้นนอก (non-envelope) ปัจจุบันมีการค้นพบ HPV มากกว่า 170 ชนิด (type) และมีมากกว่า 40 ชนิด ซึ่งจัดอยู่ในสกุล Alphapapillomavirus ที่สามารถติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวของระบบสืบพันธุ์และติดต่อผ่านทางเยื่อเมือกได้ (Bzhalava *et al.*, 2013) โดยเชื้อ HPV กลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยตามความเสี่ยงในการก่อโรคมะเร็งหลังติดเชื้อ คือ

1. ชนิดที่มีความเสี่ยงต่ำ (low risk type) ได้แก่ ชนิด 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 73 และ 81 ซึ่งร้อยละ 90 เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดหูดหงอนไก่บริเวณอวัยวะเพศ แต่มักไม่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง
2. ชนิดที่มีความเสี่ยงสูง (high risk type) ได้แก่ ชนิด 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 และ 82 ซึ่งทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุปากมดลูกที่อาจพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกในที่สุด (Munoz, Bosch, de Sanjose *et al.*, 2003) โดย HPV ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกมากที่สุดถึงร้อยละ 70 คือ ชนิด 16 และ 18 โดยเฉพาะชนิด 16 พบว่าเป็นสาเหตุของมะเร็งปากมดลูกมากถึงร้อยละ 55 (Graham, 2010)



รูปที่ 8 Human papillomavirus type 16

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0027101/?figure=1>)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

### โครงสร้างสารพันธุกรรมของไวรัสเอชพีวี

สารพันธุกรรมของเอชพีวี ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 2 สาย เรียงตัวเป็นวงกลม (doubled stranded circular DNA) ขนาดประมาณ 8,000 คู่เบส มีทั้งหมด 8 ยีน อยู่ในบริเวณ early region และ late region ซึ่งโครงสร้างสารพันธุกรรมของ HPV แบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน (Graham, 2010) คือ

1. Long control region (LCR) หรือ untranslated region (UTR) มีขนาดความยาวประมาณ 800 - 1,000 คู่เบส อยู่ระหว่างปลายด้าน 3' ของ late region กับปลายด้าน 5' ของ early region เป็นบริเวณที่ไม่สามารถถอดรหัสโปรตีนได้ แต่จัดว่าเป็นบริเวณที่สำคัญเนื่องจากเป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองดีเอ็นเอและเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเป็นตำแหน่งที่จับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์หลายชนิด (Stunkel and Bernard, 1999)

2. Early region (E) มีขนาดประมาณ 4,000 คู่เบส ประกอบด้วย 6 ORF ได้แก่ *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* และ *E7* ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ DNA replication ของไวรัส และการ transformation ซึ่งยีนในกลุ่มนี้จะมีการแสดงออกในช่วงแรกของวงจรชีวิตของไวรัส

2.1 *E1* โปรตีน *E1* มีขนาด 68 kDa ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในการจำลองจีโนมของไวรัส นอกจากนี้ยังเป็น ATPase-dependent DNA helicase ซึ่งมีความจำเป็นในขั้นตอน initiation และ elongation ของ viral DNA synthesis (Lace *et al.*, 2008)

2.2 *E2* โปรตีน *E2* มีขนาด 42 kDa ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิด Genome replication, transcription, และควบคุมการแสดงออกของยีน *E6* และ *E7*

2.3 *E4* โปรตีน *E4* มีหลายรูปแบบและหลายขนาด ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่ามีหน้าที่อย่างไร ต่อวงจรชีวิตของไวรัส อย่างไรก็ตาม โปรตีน *E4* มีบทบาทสำคัญในการทำลาย cytokeratin matrix network ซึ่งช่วยในการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกจากเซลล์ที่ติดเชื้อ

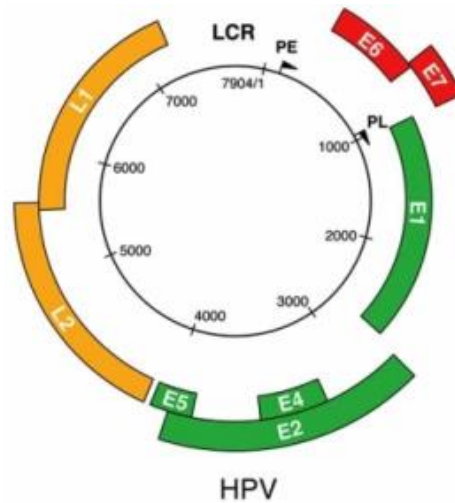
2.4 *E5* โปรตีน *E5* ประกอบด้วย กรดอะมิโนประมาณ 84 ชนิด ทำหน้าที่ในการควบคุมการแบ่งเซลล์และกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ กระตุ้นการสร้าง growth factor (Liao *et al.*, 2013) และยับยั้งกระบวนการตาย (apoptosis) ของเซลล์เจ้าบ้านผ่านกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนต้านมะเร็ง p21 (Tsao *et al.*, 1996)

2.5 *E6* โปรตีน *E6* ประกอบด้วย กรดอะมิโนประมาณ 150 ชนิด เป็น oncoprotein ทำหน้าที่ทำลายโปรตีน p53 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) โดยจะจับกับ p53 ทำให้เกิดการย่อยสลายของ p53 ผ่านกระบวนการ Ubiquitination ทำให้เซลล์เจ้าบ้านไม่ตายตามกำหนด และเป็นการยืดอายุของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้ไวรัสมีเวลานานพอในการผลิต progeny virus และเพิ่มจำนวนไวรัสได้มากขึ้น (Thomas, Pim, and Banks, 1999)

2.6 *E7* โปรตีน *E7* เป็น oncoprotein ประกอบด้วย กรดอะมิโนประมาณ 93 - 197 ชนิด แบ่งเป็น 3 domain ได้แก่ CR1, CR2 และ CR3 โดย CR1 และ CR3 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับความคงอยู่ของเซลล์ (cell immortalization) และทำให้เกิดกระบวนการ Ubiquitination ซึ่งจะยืดอายุของเซลล์เจ้าบ้าน และทำให้ไวรัสเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น ส่วน CR2 ทำหน้าที่จับกับโปรตีน pRb ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวงจรและกระบวนการตายของเซลล์ ทำให้รบกวนการจับระหว่าง pRb กับ E2F ซึ่งจะกระตุ้นให้เซลล์เจ้าบ้านสังเคราะห์ดีเอ็นเออย่างต่อเนื่อง และนำไปสู่การเกิดมะเร็งในที่สุด (McLaughlin-Drubin, Huh, and Munger, 2008)

3. Late regions ประกอบด้วย 2 ORFs ได้แก่ *L1* และ *L2* โดย *L1* ทำหน้าที่สร้าง major capsid protein ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ capsid และ *L2* ทำหน้าที่สร้าง minor capsid protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับการประกอบรูปร่างของ capsid (Graham, 2017)



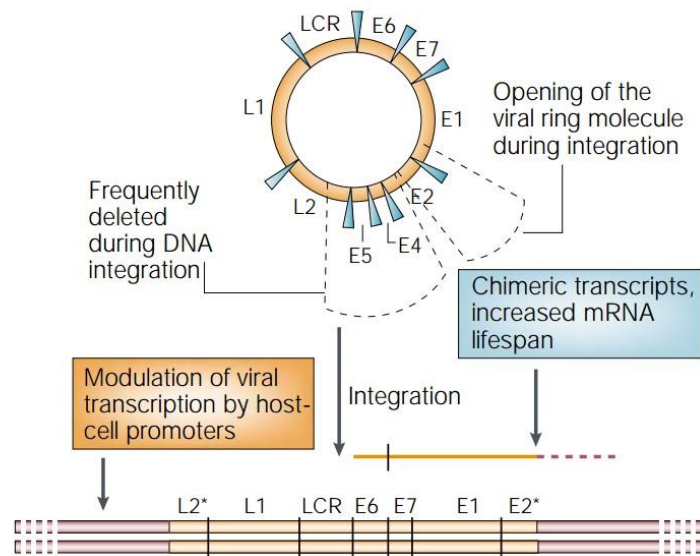


รูปที่ 9 โครงสร้างสารพันธุกรรมของ HPV (Cid-Arregui, 2009)

### บทบาทของยีนในเอชพีวี กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก

เมื่อมีการติดเชื้อเอชพีวี ผ่านรอยถลอกหรือแผลบริเวณปากมดลูก ไวรัสจะกระจายตัวเข้าสู่ basal cell ในชั้นฐานของเยื่อบุผิว โดยมีรูปแบบการติดเชื้อ 2 รูปแบบ (ZurHausen, 2002) คือ

1. รูปแบบ episomal form เป็นรูปแบบของจีโนมไวรัสที่เข้าไปหลบซ่อนอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ จนกระทั่งเซลล์มีการจำลองตัวเอง จีโนมของไวรัสก็จะถูกเพิ่มจำนวนมากขึ้นไปด้วย
2. รูปแบบ integration form เป็นรูปแบบจีโนมของไวรัสที่เมื่อติดเชื้ออยู่ในเซลล์ระยะหนึ่งแล้ว จีโนมจะสอดแทรกเข้าสู่ดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้าน โดยยีน E2 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีน E6 และ E7 จะเกิดการขาดหายไปบริเวณ N-terminal domain ทำให้สูญเสียการแสดงออกของยีน ส่งผลให้การควบคุมการแสดงออกของยีน E6 และ E7 น้อยลง ทำให้ยีน E6 และ E7 มีการแสดงออกที่มากกว่าปกติ (Sanchez-Perez *et al.*, 1997)



รูปที่ 10 รูปแบบการติดเชื้อของเอชพีวีในรูปแบบ episomal form และ Integrate form  
(zur Hausen, 2000)

ซึ่งยีน *E6* และ *E7* นี้เอง ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเกิดมะเร็งปากมดลูก กล่าวคือ โปรตีน *E6* ซึ่งสร้างจากยีน *E6* นั้น มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน p53 ซึ่งเป็นโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ที่ควบคุมวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) มีหน้าที่เป็นโปรตีนต้านมะเร็ง ผ่านกระบวนการ ubiquitin (ubiquitin partway) โดยทำงานร่วมกับ โปรตีน E6-associated (*E6 AP*) ซึ่งจะทำให้ระยะครึ่งชีวิตของโปรตีน p53 สั้นลง และส่งผลทำให้ระดับการทำงานของโปรตีน p53 ลดลงไปด้วย นอกจากนั้นโปรตีน *E6* ยังสามารถลดการแสดงออกของโปรตีน BAK ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอะพอโทซิส (apoptosis) ทำให้เซลล์ไม่เข้าสู่กระบวนการอะพอโทซิส (Mantovani and Banks, 2001) และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ telomerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยยับยั้งการหดสั้นของเทโลเมียร์ (telomere) ในโครโมโซม ขณะที่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ทำให้เซลล์ที่ติดเอชพีวีมีอายุนานขึ้นกว่าเซลล์ปกติ (Werness, Levine, and Howley, 1990)

ส่วนโปรตีน *E7* จากยีน *E7* ซึ่งเป็นยีนก่อมะเร็ง (oncogene) จะสามารถจับกับโปรตีน retinoblastoma (*pRb*) ซึ่งเป็นโปรตีนต้านมะเร็งที่ควบคุมการเพิ่มจำนวนและการตายของเซลล์ โดย *E7* จะไปจับกับ *pRb* ซึ่งปกติแล้ว *pRb* จะจับกับ *E2F* ซึ่งเป็นโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์ของเจ้าบ้าน ทำให้โปรตีน *E2F* เป็นอิสระ ส่งผลให้ยีน *cyclin E* และ *cyclin A* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ *E2F* มีการแสดงออกมากขึ้น และกระตุ้นให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S ทำให้เซลล์มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ





โปรโมเตอร์ของยีน ซึ่งโดยปกติจะมีเบส CG อยู่จำนวนมาก หรือเรียกว่า CpG island การเติมหมู่เมทิลนี้ จะส่งผลต่อ DNA ใน 2 รูปแบบ คือ

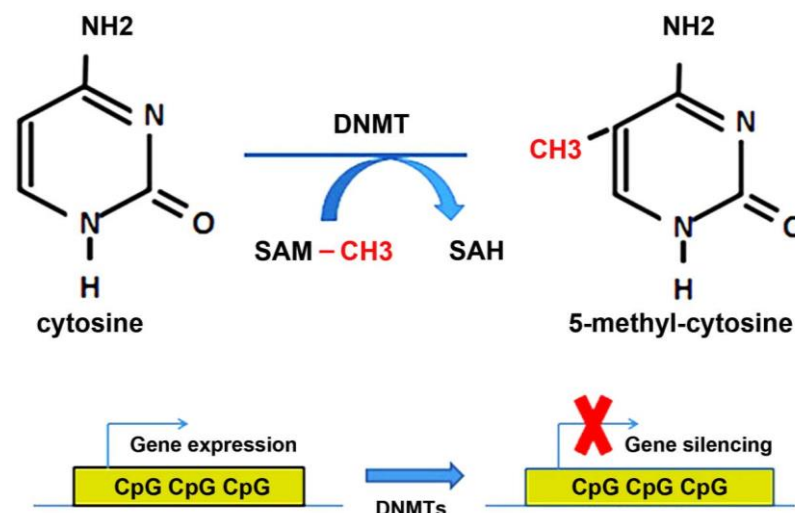
1. ทำให้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัส (transcription factor) เข้ามาเกาะได้น้อยลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสและการแสดงออกของยีน

2. ทำให้โปรตีนที่มีหมู่เมทิลเป็นบริเวณจดจำเข้ามาเกาะกับ DNA ได้ เช่น methyl binding protein (MBD) เป็นต้น ส่งผลให้โครมาตินบริเวณนั้นเกิดการขดตัวและเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป การถอดรหัสและการแสดงออกของยีนจึงเกิดได้น้อยลง (Klose and Bird, 2006)

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่ากระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันยังสามารถเกิดขึ้นบริเวณไซโทซีนที่ไม่อยู่ติดกับเบสกวานีนได้เช่นเดียวกัน ดังที่พบในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น CpHpG และ CpHpH (เมื่อ H = adenosine; A, thymine; T หรือ C) ซึ่งส่วนใหญ่จะพบได้ในเซลล์ต้นกำเนิดของตัวอ่อน (embryonic stem cell) เป็นต้น (Lister *et al.*, 2009)

### เอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA methyltransferase; DNMT)

เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ซึ่งจะทำหน้าที่เคลื่อนย้ายหมู่เมทิลจาก S-adenosyl-methionine (Kim, Samaranyake, and Pradhan) เป็น 5-เมทิลไซโทซีน (5-methyl cytosine) และ S-adenosyl homocysteine (Mills and Ramsahoye) ดังรูปที่ 7



รูปที่ 11 ปฏิกริยาการเติมหมู่เมทิลบนเบสไซโตซีน (Cui *et al.*, 2016)

สำหรับในมนุษย์ สามารถแบ่งตามการทำงานของ DNA methyltransferase ได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. de-novo methyltransferase คือ DNMT ที่ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้แก่เบสไซโตซีนในตำแหน่งใหม่โดยไม่ต้องอาศัยดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิลแล้วเป็นต้นแบบ ได้แก่ DNMT3a และ DNMT3b

2. maintenance methyltransferase คือ DNMT ที่ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้เหมือนกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ เพื่อรักษารูปแบบเมทิลเลชันระหว่าง cell generation ได้แก่ DNMT1

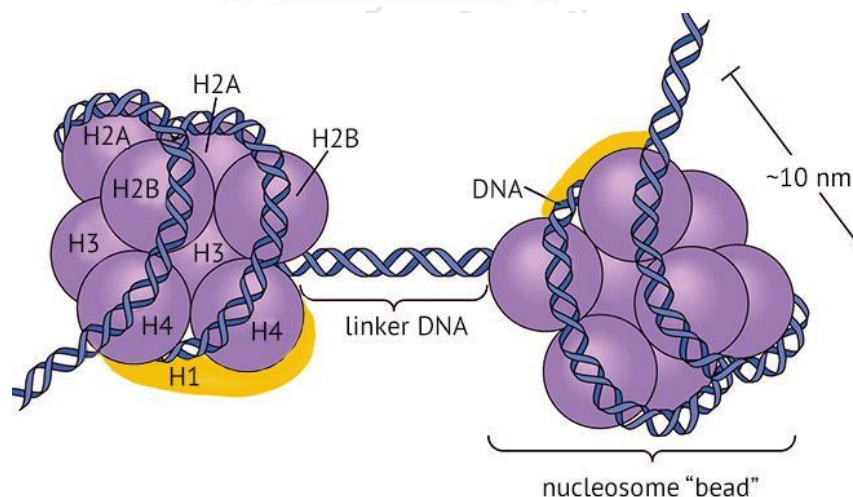
ดังนั้น DNMT1 จะทำหน้าที่รักษารูปแบบของดีเอ็นเอเมทิลเลชันให้เหมือนกับของสายดีเอ็นเอแม่แบบในขั้นตอนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ในขณะที่ DNMT3a และ DNMT3b จะทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้กับสายดีเอ็นเอที่สูญเสียหมู่เมทิลไปในช่วงกระบวนการถ่ายแบบของสายดีเอ็นเอ (Tajima *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตาม มีรายงานพบว่า DNMT1 และ DNMT3 สามารถทำงานร่วมกันและมีคุณสมบัติเป็น de-novo methyltransferase ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า DNMT1 สามารถจับกับโปรตีน E7 ของเอชพีวี ไทป์ 16 และทำให้เกิดเมทิลเลชันแบบ de-novo ได้เช่นกัน (Chalertpet *et al.*, 2015)

โดยปกติ ในเซลล์ทั่วไป CpG island ของยีนจะไม่มีการเกิดเมทิลเลชัน (unmethylation) แต่ไซโทซีนที่อยู่ติดกับเบสกวานีน ในบริเวณอื่นของจีโนมจะถูกเมทิลเลชัน เรียกว่า โกลบอลไฮเปอร์เมทิลเลชัน (global hypermethylation) และในทางตรงกันข้าม เซลล์มะเร็งจะพบดีเอ็นเอเมทิลเลชันสูงบริเวณ CpG-island ที่อยู่บนโปรโมเตอร์ของยีน เรียกว่า โปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมทิลเลชัน (promoter hypermethylation) แต่จะมีการลดหรือสูญเสียสถานะเมทิลเลชันในจีโนมบริเวณอื่นไป เรียกว่า โกลบอลไฮโปเมทิลเลชัน (global hypomethylation) (Sharma, Kelly, and Jones, 2010)

### การดัดแปลงฮิสโตน (histone modification)

โครงสร้างของแท่งโครโมโซมของเซลล์ยูแคริโอตประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลีโอโซม (nucleosome) ซึ่งเกิดจากโปรตีนฮิสโตน ได้แก่ H2A, H2B, H3 และ H4 อย่างละ 2 หน่วยรวมกันเป็นฮิสโตนแกนกลาง (core histone) และถูกพันรอบด้วยสายดีเอ็นเอยาว 146 เบส โดยมีโปรตีนฮิสโตน H1 ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างนิวคลีโอโซมแต่ละหน่วย ทั้งนี้เพื่อช่วยให้การอัดตัวของโครมาตินในนิวเคลียสดียิ่งขึ้น ในฮิสโตนแกนกลางแต่ละหน่วยประกอบด้วย structured domain และ unstructured N-terminal tail ซึ่งส่วนของ histone tail ที่ยื่นออกมาจะถูkdัดแปลงภายหลังการสังเคราะห์ (post-translational modification) ด้วยกระบวนการเติมหมู่ทางเคมีที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่ methylation, acetylation,

phosphorylation, ADP-ribosylation และ ubiquitination โดยกระบวนการดัดแปลงโปรตีน ฮิสโตนที่มีบทบาทสำคัญต่อ chromatin remodeling และมีการศึกษา มากที่สุด คือ acetylation และ methylation ของ lysine residue ที่จำเพาะ ซึ่งบทบาทของการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตนจะแตกต่างจากดีเอ็นเอเมทิลเลชัน เนื่องจากการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตนจะมีผลทั้งสองด้าน คือ 1. ทำให้โครมาตินคลายตัว เรียกว่า ยูโครมาติน (euchromatin) ซึ่งอยู่ในสภาวะกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (transcriptional activation) เนื่องจาก transcription factor ต่างๆ สามารถเข้ามาจับกับดีเอ็นเอได้ และ 2. ทำให้โครมาตินขดตัวแน่น เรียกว่า เฮเทอโรโครมาติน (heterochromatin) ซึ่งจะยับยั้งกระบวนการถอดรหัส (transcriptional repression) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนและตำแหน่งที่ถูกดัดแปลง รวมทั้งประเภทของการดัดแปลงด้วย ซึ่งรหัสการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน จะเรียกว่า histone code มีบทบาทหลักคือทำให้เกิดยูโครมาติน เช่น acetylation ของ lysine residue บน histone tail ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ histone acetylase (Kitkumthorn, Yanatatsanajit, Kiatpongsan *et al.*) และ trimethylation ของ lysine ตำแหน่งที่ 4 บน histone tail ของ H3 (H3K4me3) ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ histone methyltransferase (HMT) ส่วน histone code ที่ทำให้โครมาตินมีสภาพเป็นเฮเทอโรโครมาติน เช่น การกำจัดหมู่อะเซทิลจาก histone tail ของโครโมโซม โดยการทำงานของ histone deacetylase (HDAC) ซึ่งจะส่งผลให้เอนไซม์ HMT สามารถเข้ามาเติมหมู่เมทิลให้แก่ lysine ของ histone tail ของ H3 ได้ ดังที่พบใน H3K9me3 และ H3K27me3 เป็นต้น (Zhang and Reinberg, 2001)



รูปที่ 12 โครงสร้างของนิวคลีโอโซมและโครมาติน (Klug and Cummings, 1993)

## ความเกี่ยวข้องระหว่างการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับยีน *E7* ของเอชพีวีไพบ์ 16 และการเกิดมะเร็ง

จากการศึกษาในหลายงานวิจัย พบว่า ยีน *E7* ของเอชพีวี ไพบ์ 16 มีความสัมพันธ์กับการเกิดเมทิลเลชันของยีนต่างๆ เช่น ยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการซ่อมแซมการฉีกขาดของดีเอ็นเอสายคู่ผ่านกระบวนการ non-homologous end-joining จากการศึกษาการติดเชื้อเอชพีวีในรูปแบบอินทิเกรชัน พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* (Yanatatsaneejit, Mutirangura, and Kitkumthorn, 2011) และเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* มากถึงร้อยละ 93 ในมะเร็งปากมดลูก (Kitkumthorn, *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน *E7* สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) และลดระดับโปรตีน E-cadherin (Laurson, *et al.*, 2010) และโปรตีน *E7* ยังมีความสามารถในการจับกับ Dnmt1 (Burgers, *et al.*, 2007) และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนและลดการแสดงออกของยีน *CCNA1* ได้ (Chalertpet, Pakdeechaidan, Patel *et al.*, 2015)

นอกจากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ยังพบว่าในยีน *FOXO1* ซึ่งเกิดเมทิลเลชันผ่านกระบวนการที่โปรตีน *E7* สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 และ YY1 แล้วสามารถลงมาจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนได้ จึงส่งผลให้เกิดเมทิลเลชันและลดการแสดงออกของยีน (นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2560)

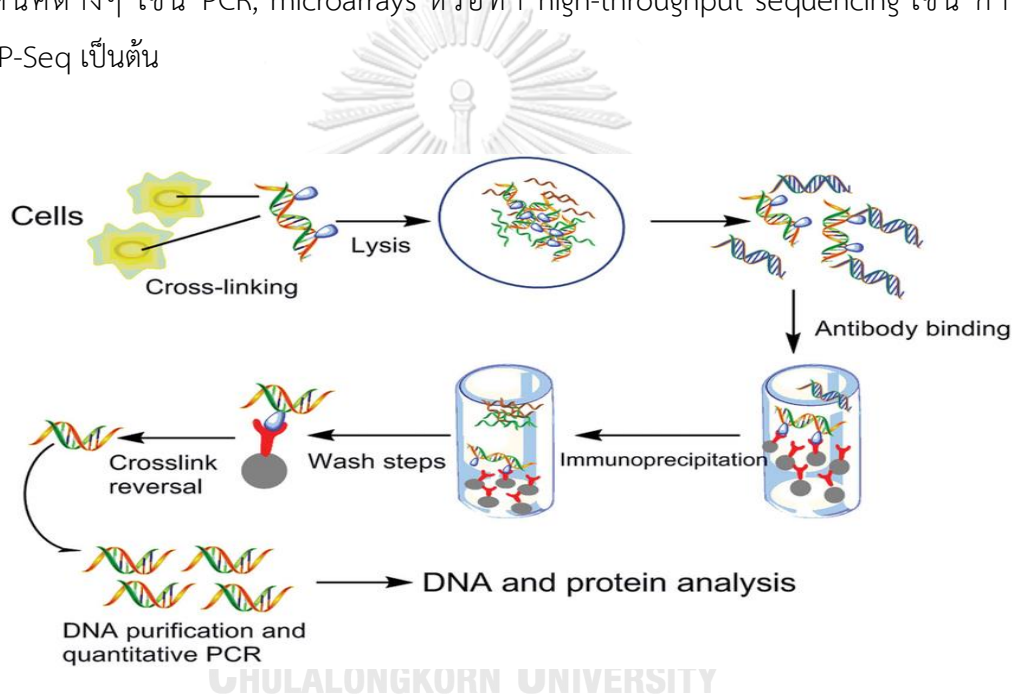
### Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและดีเอ็นเอภายในเซลล์ (Orlando, 2000) เพื่อใช้ระบุตำแหน่งของจีโนมหรือค้นหาเอ็นที่มีอันตรกิริยากับโปรตีนชนิดต่าง ๆ หรือในทางกลับกัน ใช้ระบุโปรตีนชนิดต่างๆ ที่มีอันตรกิริยากับยีนที่สนใจ เช่น การตรวจสอบการมีอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทรานสคริปชันแฟกเตอร์กับโปรโมเตอร์ของยีน หรือใช้วิเคราะห์การมีอันตรกิริยาระหว่าง DNA กับ DNA replication factors หรือ DNA repair proteins เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการทำแผนที่ระบุตำแหน่งของการเกิด histone modifications บนจีโนมได้ หรือใช้ในการวัดปริมาณการเกิด histone modification ทั่วทั้งบริเวณยีนที่ถูกกระตุ้น เป็นต้น (Agalioti *et al.*, 2000)

โดยการทำ ChIP สามารถแบ่งได้ 2 ชนิด ตามวิธีการทำและวัตถุประสงค์ของการตรวจสอบ ได้แก่

### 1. Cross-linked ChIP (XChIP)

เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน-ทรานสคริปชันแฟกเตอร์หรือโปรตีนชนิดอื่นๆ ที่เป็น nonhistone proteins ซึ่งจะทำพันธะที่ค่อนข้างอ่อนกับดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอและโปรตีนจะถูก crosslink ด้วยฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) หรือแสง UV (Gilmour and Lis, 1985) จากนั้นนำไปผ่านการทำ sonication เพื่อให้โครมาติน มีความยาว 200 – 1,000 คู่เบส แล้วทำการตกตะกอนโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่สนใจ ดังรูปที่ 13 หลังจากนั้น decrosslink โปรตีนและดีเอ็นเอด้วยความร้อน แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้นี้สามารถนำมาวิเคราะห์หรือตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น PCR, microarrays หรือทำ high-throughput sequencing เช่น การทำ ChIP-Seq เป็นต้น



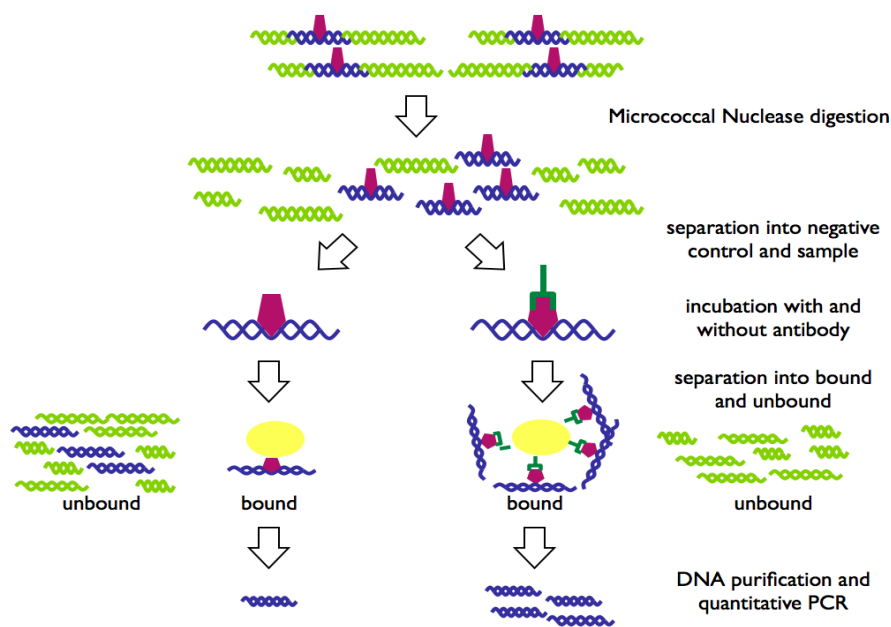
รูปที่ 13 การทำ Chromatin immunoprecipitation แบบ Cross-linked ChIP

(Song, Zhang and Huang, 2015)

### 2. Native ChIP (NChIP)

เป็นเทคนิคที่เหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาด้าน histone modification เช่น การทำแผนที่ระบุตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมายที่โปรตีน histone modifier ต่างๆ จะลงไปจับ ซึ่งเกิดขึ้นเป็นปกติในร่างกายและเป็นพันธะที่ค่อนข้างแข็งแรง โดยโครมาตินจะถูกทำให้มีขนาดสั้นลงด้วยการใช้เอนไซม์ micrococcal nuclease ซึ่งจะตัดบริเวณตำแหน่ง linker DNA ที่เชื่อมแต่ละนิวคลีโอโซม ให้มีขนาดประมาณ 1 – 5 นิวคลีโอโซม (200 คู่เบส ถึง 1,000 คู่เบส) หลังจากนั้นจึงทำการตกตะกอนโดยใช้

แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่สนใจ แล้วตัดอะคริลามิเดอและทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปวิเคราะห์หรือตรวจสอบต่อไป (Collas, 2010)



รูปที่ 14 การทำ Chromatin immunoprecipitation แบบ Native ChIP

([http://methdb.univ-perp.fr/cgrunau/methods/native\\_chip\\_sm.html](http://methdb.univ-perp.fr/cgrunau/methods/native_chip_sm.html))

### Chromatin immunoprecipitation with DNA sequencing (ChIP-Seq)

ChIP-seq เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิค ChIP เพื่อใช้ศึกษาการทำงานร่วมกันหรืออันตรกิริยาระหว่างดีเอ็นเอและโปรตีนในระดับจีโนม โดยจะเป็นการใช้เทคนิค ChIP ร่วมกับ next-generation sequencing (NGS) เพื่อหาลำดับเบสของ binding sites ของโปรตีนที่เราสนใจทั่วทั้งจีโนมแบบ high throughput ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้ในหลายตัวอย่างได้พร้อมกัน (Valouev *et al.*, 2008) โดยในขั้นตอนแรกดีเอ็นเอที่จับกับโปรตีนที่เราสนใจจะผ่านขั้นตอนต่างๆ ของเทคนิค ChIP ซึ่งได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น หลังจากได้ดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์แล้ว ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะถูก sequencing ด้วยเทคนิค next-generation sequencing (NGS) เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ ChIP ซึ่งอาจมีชิ้นส่วนที่แตกต่างกันมากถึงล้านรูปแบบ ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ (Nakato and Shirahige, 2017)

## Next-Generation Sequencing (NGS)

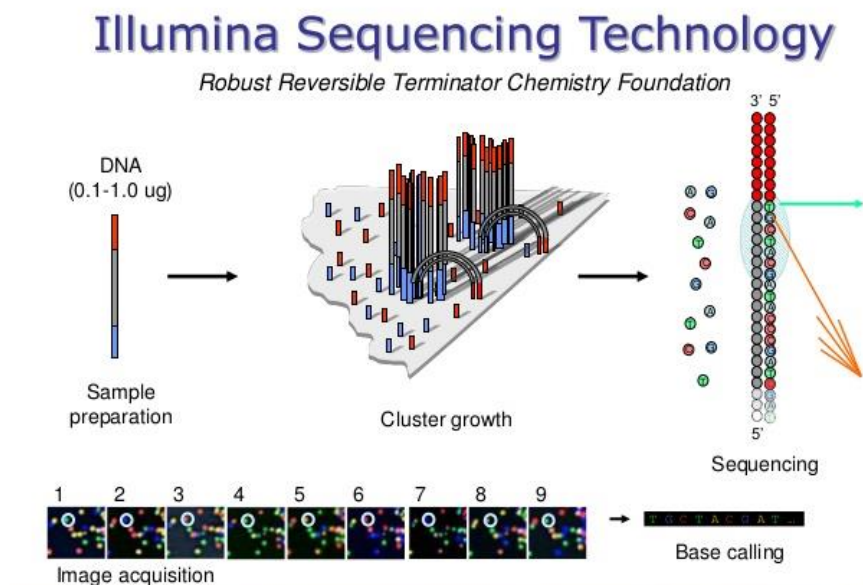
NGS คือ เทคโนโลยีที่ใช้ในการหาลำดับเบสทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการหาลำดับเบสแบบขนาน ทำให้ได้ข้อมูลลำดับเบสจำนวนมากและรวดเร็ว โดยเทคโนโลยีนี้จะอาศัยการอ่านดีเอ็นเอต้นแบบแบบสุ่มทั้งจีโนม และตัดดีเอ็นเอเป็นสายสั้นๆ แล้วเชื่อมต่อกับ adaptor เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งวิธีนี้จะสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้พร้อมๆ กัน (parallel) จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการหาลำดับเบสซึ่งจะได้ลำดับเบสสายสั้น ๆ (reads) เกิดขึ้นจำนวนมาก ความยาว 30 - 500 คู่เบส (Anderson and Schrijver, 2010) ขึ้นอยู่กับเครื่องมือแต่ละแบบ โดยในปัจจุบัน เครื่องมือของเทคโนโลยี NGS มีอยู่ 3 ยี่ห้อหลัก (Wilantho *et al.*, 2012) คือ

### 1. เครื่อง Illumina

เครื่องมือนี้จะใช้หลักการหาลำดับเบสด้วยการติดฉลากสารเรืองแสง (fluorescent reversible terminators) ที่ทั้ง 4 เบส และเพิ่มปริมาณสายดีเอ็นเอโดยเชื่อมต่อเป็นสะพานบนสถานะของแข็ง (solid-phase bridge amplification) ซึ่งจะได้กลุ่มของสายดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยในขั้นแรกตัวอย่างดีเอ็นเอจะถูกตัดด้วย nebulizer จากนั้นส่วนปลายของสายดีเอ็นเอจะถูกซ่อมแซมด้วย T4 DNA polymerase, Klenow enzyme และ T4 poly nucleotide kinase แล้วเติมนิวคลีโอไทด์เบส A ที่ปลาย 3' ของสายดีเอ็นเอ จากนั้นจะถูกเชื่อมด้วย adapter และเติมเบส T ที่ปลายทั้ง 2 ข้าง แล้วตัดแยกสายดีเอ็นเอที่มีความยาวประมาณ 150 - 200 คู่เบสบนเจล และเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ หลังจากนั้นแยกสายดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยวแล้วใส่ลงบนแผ่นกระจกสไลด์ (flow cell channels) แบบสุ่ม ซึ่งจะถูกลบด้วย adapter และ adapter ที่เป็นคู่สมกัน (complementary adapters) โดยจะทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ในช่วงของการเพิ่มดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอสายเดี่ยว 1 โมเลกุลจะจับไพรเมอร์แบบสะพานโค้งแล้วเพิ่มปริมาณ (bridge amplification) และในช่วงการแยกสายดีเอ็นเอ จะได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวซึ่งจะใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้ง เมื่อเสร็จสิ้นจะได้กลุ่มของสายดีเอ็นเอมากกว่า 50 ล้านกลุ่ม ซึ่งจะมีดีเอ็นเอประมาณ 1,000 ชุดในแต่ละช่อง หลังจากนั้นสายดีเอ็นเอจะถูกแยกเป็นสายเดี่ยวอีกครั้งเพื่อทำการ sequencing โดยใช้หลักการ sequencing by synthesis ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสนั้นๆ แล้วเติมเอ็นไซม์ DNA polymerase และนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 เบสที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่มีสีต่างกัน โดยในแต่ละรอบนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้เข้าคู่กับสายดีเอ็นเอตั้งต้นจะถูกล้างออก และเครื่องจะตรวจจับสารเรืองแสงที่นิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กับสายดีเอ็นเอปลดปล่อยออกมา เพื่อบันทึกความเหมือนกันของเบสแรกสำหรับกลุ่มนั้นๆ จากนั้นจะมีการเติมนิวคลีโอไทด์ชุดใหม่เพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ และทำซ้ำต่อไปเรื่อยๆ โดยในแต่ละรอบจะเป็นตัวกำหนดเบสที่อ่านได้ในแต่ละครั้ง โดยเครื่อง Illumina นี้สามารถอ่าน



ความยาว reads ได้ถึง 100 คู่เบส และในการหาลำดับเบส 1 ครั้งจะได้จำนวนเบสมากถึง 600 กิกะเบส และความถูกต้องของเบสที่ได้มากกว่าร้อยละ 99.5 (Wilantho *et al.*, 2012)

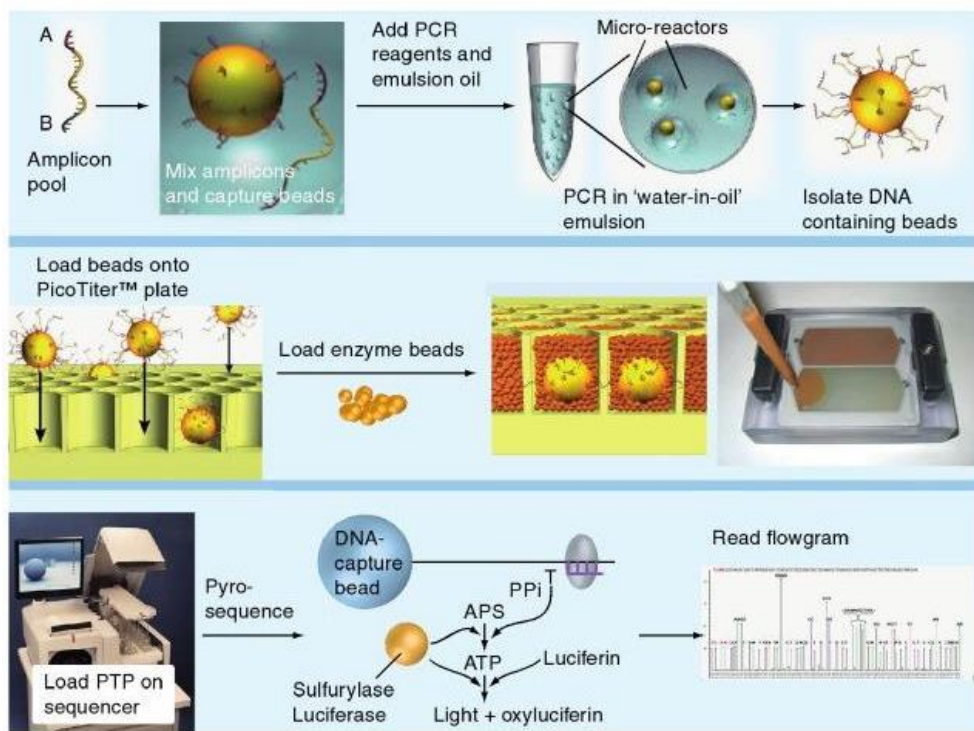


**รูปที่ 15** หลักการของการทำ sequencing ด้วยเครื่อง Illumina (<https://sapac.illumina.com>) โดย (a) สายดีเอ็นเอที่ถูกแยกเป็นสายเดี่ยวและเชื่อมกับ adapter, (b) ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจับกับไพโรเมอร์แบบสะพานโค้งแล้วเพิ่มปริมาณ, (c) การ sequencing by synthesis โดยใช้ไพโรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสนั้นๆ และเติมเอ็นไซม์ DNA polymerase และนิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงที่มีสีต่างกัน (d) เครื่องตรวจจับสารเรืองแสงที่นิวคลีโอไทด์ที่เข้าคู่กับสายดีเอ็นเอปลดปล่อยออกมา และอ่านค่า

## 2. เครื่อง 454/Roche genome sequencer

ใช้หลักการการหาลำดับเบสแบบ pyro sequencing และใช้การอ่านสัญญาณตามจังหวะแสงของเบสคู่สม โดยขั้นตอนที่สำคัญ คือการตรึง (immobilization) ดีเอ็นเอไว้กับเม็ดบีด ในสถานะน้ำมัน (emulsion PCR) แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเริ่มต้นจากการตัดสายดีเอ็นเอให้สั้นประมาณ 400 – 600 คู่เบส แล้วต่อ adapter A และ B ไว้ที่ปลายสาย โดย adapter B จะมีส่วนปลาย 5' เป็น biotin ซึ่งจะจับกับเม็ดบีดที่เคลือบ streptavidin จากนั้นเติมเอ็นไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็น stranddisplacing DNA polymerase เพื่อเข้าซ่อมแซมส่วนที่ขาดไป หลังจากนั้นดีเอ็นเอสายคู่ที่ไม่ถูกตรึงกับเม็ดบีดจะถูกทำให้แยกออก โดยมีสายดีเอ็นเออีกเส้นหนึ่งที่เชื่อมกับ adapter B/B ติดอยู่

กับเม็ดปิด ส่วนสายดีเอ็นเอที่ไม่มี adapter จะถูกล้างออก สุดท้ายจะได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มี adapter A ติดอยู่ที่ปลาย 5' และ adapter B ติดอยู่ที่ปลาย 3' เป็น DNA library หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนเม็ดปิด (emulsion-based clonal amplification) โดยตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวบนเม็ดปิดที่มีไพรเมอร์โอลิโกนิวคลีโอไทด์ติดอยู่ ซึ่งจะสามารถเข้าคู่กับ adapter ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวนั้นๆ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหยดน้ำมันซึ่งมีสารสำหรับทำปฏิกิริยาผสมอยู่ หลังจากนั้นนำไปทำ Sequencing โดยนำเม็ดปิดใส่ลงใน PicoTiterPlate™ (PTP) แล้วจึงใส่เข้าเครื่อง 454/Roche โดยเครื่องจะเติมเบส A, T, C, G เข้าไปที่ละเบส ซึ่งเบสที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบเท่านั้นที่จะจับและทำปฏิกิริยาแล้วเกิดปฏิกิริยาทางเคมีและปลดปล่อยสารไพโรฟอสเฟต ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ sulfurylase adenosine และ 5'-phosphosulfate (APS) ได้พลังงาน ATP ซึ่งเอนไซม์ luciferase จะทำปฏิกิริยากับ luciferin โดยใช้ ATP เป็นสารตั้งต้น และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น oxyluciferin และปลดปล่อยแสงออกมา ซึ่งจะสามารถบ่งชี้สัดส่วนของนิวคลีโอไทด์ได้ โดยในการหาลำดับเบส 1 ครั้ง จะได้จำนวนเบส 400 – 600 เมกะเบส และมีความถูกต้องมากกว่าร้อยละ 99



รูปที่ 16 หลักการของการทำ sequencing ด้วยเครื่อง 454/Roche genome sequencer

([https://www.medscape.com/viewarticle/738786\\_6](https://www.medscape.com/viewarticle/738786_6))

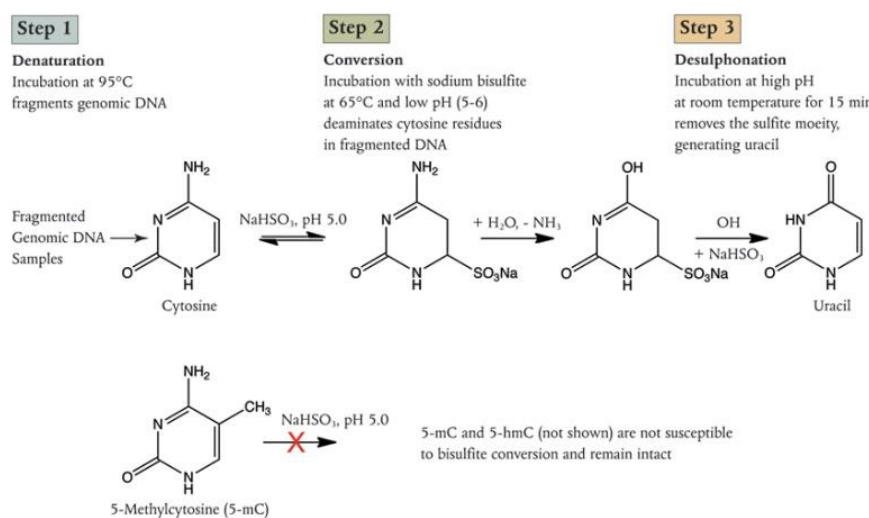


## ปฏิกิริยาโซเดียมไบซัลไฟต์ (sodium bisulfite treatment)

เป็นวิธีการที่ใช้แยกแยะระหว่างเบสไซโตซีน (cytosine) และเบสไซโตซีนที่ถูกเติมหมู่เมทิล (5'-methylcytosine) ออกจากกัน โดยอาศัยหลักการของความไวในการทำปฏิกิริยาที่ต่างกัน โดยเริ่มต้นจากการนำดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์มาผ่านกระบวนการต่างๆ ดังนี้

1. Sulphonation เป็นขั้นตอนที่เปลี่ยนเบส cytosine เป็น cytosine-6-sulphonate
2. Hydrolytic deamination เป็นขั้นตอนที่เปลี่ยน cytosine-6-sulphonate เป็น uracil-6-sulphonate
3. Alkali desulphonation เป็นการกำจัด sulphate ออกจาก uracil-6-sulphonate ทำให้ได้ uracil (Herman *et al.*, 1996)

หลังจากนั้นเทคนิค PCR จะถูกนำมาใช้เพื่อเปลี่ยน uracil เป็น thymine ในขณะที่ 5'-methylcytosine จะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ จึงยังคงเป็น cytosine เช่นเดิม หลังจากนั้นสามารถนำดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น Methylation specific-PCR (MSP) หรือ Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) เป็นต้น (Fraga and Esteller, 2002)

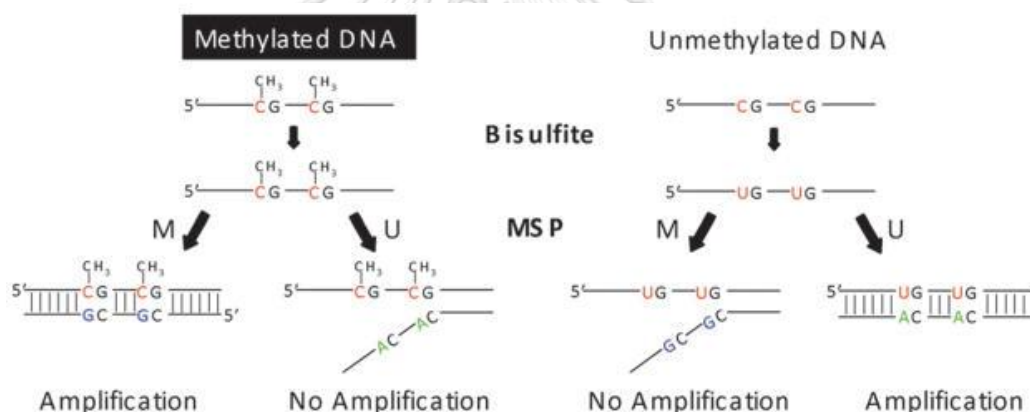


**รูปที่ 18** ปฏิกิริยาโซเดียมไบซัลไฟต์ โดย cytosine จะถูกเปลี่ยนเป็น uracil ในขณะที่ 5'-methylcytosine ยังคงเป็น cytosine

(<https://www.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion>)

### Methylation specific-PCR (MSP)

Methylation specific-PCR (MSP) เป็นวิธีที่นิยมสำหรับใช้ในการศึกษารูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยใช้ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำปฏิกิริยาโซเดียมไบซัลไฟต์มาทำการตรวจสอบ โดยการทำ Allele specific PCR ซึ่งจะจำเพาะต่อเบสไซโตซีนหรือเบสยูราซิล แล้วใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน โดยไพรเมอร์คู่แรกจะมีความจำเพาะสำหรับดีเอ็นเอที่เกิดการเมทิลเลชัน (methylation primer) และคู่ที่ 2 จะมีความจำเพาะสำหรับดีเอ็นเอที่ไม่เกิดการเมทิลเลชัน (unmethylation primer) หากไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสำหรับดีเอ็นเอที่เกิดการเมทิลเลชันสามารถจับกับสายดีเอ็นเอได้ แสดงว่า ดีเอ็นเอบริเวณนั้นมีการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีนในทางกลับกันหากไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอที่ไม่เกิดการเมทิลเลชันจับกับสายดีเอ็นเอได้แสดงว่าดีเอ็นเอบริเวณนั้นไม่มีการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีน (Mills and Ramsahoye, 2002)



**รูปที่ 19** หลักการในการทำ Methylation specific-PCR โดยดีเอ็นเอที่ผ่านปฏิกิริยาโซเดียมไบซัลไฟต์ที่มี 5'-methylcytosine จะถูก amplify โดย methylation primer (M) ในขณะที่ดีเอ็นเอที่ไม่มี 5'-methylcytosine เกาะอยู่ที่ cytosine จะถูก amplify โดย unmethylation primer (U) (Zhang *et al.*, 2009)

### Real - time PCR

Real - time PCR หรือ quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นในขณะที่มีการทำ PCR ในแต่ละรอบ โดยไม่ต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน ซึ่งในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอสามารถใช้ dye ได้หลายชนิด โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้ SYBR green dye ซึ่งเป็นสียฟลูออเรสเซนต์ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่

สามารถดูดกลืนแสงสีฟ้า (488 nm) และปล่อยแสงสีเขียว (522 nm) ซึ่งในช่วง denaturation สายดีเอ็นเอสายคู่จะแยกเป็นสายเดี่ยว และเมื่อมีการเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ SYBR จะเริ่มแทรกตัวไปอยู่ในดีเอ็นเอสายคู่ และเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง UV ซึ่งจะถูกตรวจจับสัญญาณแสงด้วยเครื่องรับสัญญาณแสงที่อยู่ในเครื่อง real time thermocycler (Ponchel *et al.*, 2003)





### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการวิจัย

##### เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus, Japan)
2. เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate stirer) (Labtech, Korea)
3. เครื่องเขย่าสาร (votex) (Scientific Industries, USA)
4. เครื่องเขย่าสารความถี่สูง (sonicator) (Sonics & materials, USA)
5. เครื่องควบคุมการดูดจ่ายอัตโนมัติ (pipett aid) (Tecnomara, Switzerland)
6. เครื่องชั่งดิจิตอล (Precisa, Switzerland)
7. เครื่องถ่ายและบันทึกภาพเจล (Amersham biosciences, UK)
8. เครื่องถ่ายและบันทึกภาพเจล (gel doc) (Biorad, USA)
9. เครื่องนิ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Hirayama, Japan)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดขนาด 1.5 ml (microcentrifuge) (Boeco, Germany)
11. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารสำหรับหลอดชนิด polypropylene conical (Boeco, Germany)
12. เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (ultrapure water type I) (Millipore, France)
13. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler) (Eppendorf, Germany)
14. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาพจริง (real time PCR) (Applied biosystems, UK)
15. เครื่องไมโครเวฟ (Sanyo, Japan)
16. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Denver Instrument, USA)
17. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (nano drop) (Thermo Scientific, USA)
18. เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Qubit<sup>®</sup>) (Thermo Scientific, USA)
19. เครื่องหมุนเขย่าสาร (rotator) (Biosan, Latvia)
20. เครื่องให้ความร้อน (heat block) (Bockel, UK)
21. เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ (Bio-RAD, USA)
22. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20°C และ -80°C (Revco, Japan)
23. ตู้ดูดควัน (fume hood) (S.K.Powerable, Thailand)
24. ตู้ปลอดเชื้อ class II (laminar flow cabinet) (Gelman sciences, Singapore)
25. ตู้เลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มี 5% CO<sub>2</sub> (Shel lab, USA)

26. ตู้เย็น (Misubishi, Japan)
27. ตู้อบ (incubator) (Mettler, Germany)
28. ไมโครปิเปตต์ (Eppendorf, Germany)
29. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Mettler, Germany)

### วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กระจกปิดสไลด์ (Chance, UK)
2. กระจกบอทดวง (Witeg, Germany)
3. ขวดดูแรนขนาด 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1,000 ml (Duran, Germany)
4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml, 500 ml, 1,000 ml และ 2,000 ml (Pyrex, USA)
5. ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T25 และ T75 (Corning, USA)
6. จานเลี้ยงเซลล์แบบ 6 หลุม (6 well plate) (Jet biofill, China)
7. ซ้อนตักสาร
8. ถุงมือยางพารา (Handpro, Thailand)
9. ทิปสำหรับไมโครปิเปตต์ (Jet biofill, China)
10. เทอร์โมมิเตอร์ (Precision, Germany)
11. แท่งแม่เหล็ก (Agimatic-e, China)
12. ปิเปตต์แบบฆ่าเชื้อขนาด 1ml, 5 ml, 10 ml และ 25 ml (Jet biofill, China)
13. พาราฟิล์ม (Parafilm M, USA)
14. สไลด์นับเซลล์ (Haemocytometre) (Boeco, Germany)
15. หลอดขนาด 0.2 ml, 0.5 ml และ 1.5 ml (Bio-rad Elkay, USA)
16. Cell Scraper (Jet biofill, China)
17. Cryovial tube (Corning, USA)
18. Polypropylene conical tube ขนาด 15 ml และ 50 ml (Elkay, USA)
19. 96 well plate (Thermo, USA)

### สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

#### 1. สารเคมีทั่วไป

- 1.1 Absolute ethanol (Merck, Germany)



- 1.2 Acetic acid (Merck, Germany)
- 1.3 Agarose (Cambrex, USA)
- 1.4 Ammonium acetate (Merck, Germany)
- 1.5 Ampicillin (Sigma, USA)
- 1.6 Bromophenol blue (USB, Germany)
- 1.7 Chloroform (Merck, Germany)
- 1.8 Dimethyl sulfoxide (DMSO)(Sigma, USA)
- 1.9 EDTA (USB, Germany)
- 1.10 Formaldehyde (Merck, Germany)
- 1.11 Glycine (Amersham Bioscience, Sweden)
- 1.12 Glycogen (USB, USA)
- 1.13 Hydrochloric acid (Merck, Germany)
- 1.14 Hydroquinone (Merck, Germany)
- 1.15 Isopropanol (VWR, France)
- 1.16 Methanol (SK chemicals, Korea)
- 1.17 Phenol (USB, USA)
- 1.18 Proteinase K (USB, USA)
- 1.19 RNase A (Applichem, Germany)
- 1.20 Sodium chloride (Merck, Germany)
- 1.21 SYBR green I nucleic acid gel stain (Lonza, USA)
- 1.22 Tris (Tris[hydroxymethyl] aminomethane) (Omnipur, Germany)
- 1.23 TritonX 100 (Bio-RAD, USA)
- 1.24 Trizol reagent (Invitrogen, USA)
- 1.25 Trypan blue (Sigma, USA)
- 1.26 Tris base (USB, USA)
- 1.27 Xylene (Merck, Germany)
- 1.28 10 base pair DNA ladder (Promega, USA)
- 1.29 25 base pair DNA ladder (Promega, USA)

## 2. สารเคมีที่ใช้เลี้ยงเซลล์

- 2.1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, USA)

- 2.2 Fetal Bovine Serum (FBS )(Gibco, USA)
- 2.3 Anti-anti (100X) antibiotic-antimycotic (Gibco, USA)
- 2.4 Trypsin EDTA (Gibco, USA)
- 2.5 Phosphate Buffered Saline (PBS) (Abslagen, Thailand)
- 2.6 Tryphan blue (Gibco, USA)

### 3. สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

- 3.1 Opti-MEM reduced serum medium (Gibco, USA)
- 3.2 Turbofect (Thermo, USA)

### 4. สารเคมีสำหรับทำ PCR

- 4.1 10mM Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) (Bioneer, Korea)
- 4.2 10X PCR buffer (Quigen, Germany)
- 4.3 Hot start *Taq* DNA polymerase (Quigen, Germany)
- 4.4 Oligonucleotide primers (Bioneer, Korea)

### 5. สารเคมีที่ใช้ในการทำ real-time PCR

- 5.1 Oligonucleotide primers (Bioneer, Korea)
- 5.2 Power SYBR® Green PCR master mix (Applied biosystems, UK)

### 6. สารเคมีที่ใช้ในการทำ chromatin immunoprecipitation (ChIP)

- 6.1 Anti AP2 alpha (Abcam, UK)
- 6.2 Anti His tag antibody (Abcam, UK)
- 6.3 Anti-histone H3- tri methyl K4 (Abcam, UK)
- 6.4 Anti-histone H3- tri methyl K9 (Abcam, UK)
- 6.5 Anti YY1 (Abcam, UK)
- 6.6 HPV16 E7 antibody (Santa cruz, USA)
- 6.7 Halt protease inhibitor cocktail (100x) (Thermo Scientific, USA)
- 6.8 Normal mouse IgG (Santa cruz, USA)
- 6.9 Protein G plus agarose (Santa cruz, USA)
- 6.10 ChIP buffer

- 6.11 Elution buffer
- 6.12 Lysed buffer
- 6.13 Lysis buffer
- 6.14 PK buffer
- 6.15 Washing buffer

## 7. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

- 7.1 Agar bacterial powder (Conda, Spain)
- 7.2 Tryptone (Bio Basic Inc, Canada)
- 7.3 Yeast extract powder (Bio Basic Inc, Canada)

## 8. ชุดสารเคมีสำเร็จรูปที่ใช้ในงานวิจัย

- 8.1 EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Reserch, USA)
- 8.2 GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA)
- 8.3 Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit (Fermentas, USA)
- 8.4 SeqPlex Enhanced DNA Amplification kit (Sigma-Aldrich, USA)

## วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถแบ่งออกเป็น 4 ส่วนหลัก คือ

1. การคัดเลือกยีน
2. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน
3. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน
4. การตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรตีน E7, AP2 และ YY1 กับโปรโมเตอร์ของยีนที่คัดเลือก

### 1. การคัดเลือกยีน

#### 1.1 การทำ Chromatin immunoprecipitation with DNA Sequencing (ChIP-Seq)

##### 1.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

ในงานวิจัยนี้ใช้เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A และเซลล์ไตสายพันธุ์ HEK293

### 1.1.1.1 การเลี้ยงเซลล์จากเซลล์แช่แข็ง (thaw cell)

เริ่มต้นจากการนำเซลล์ที่เก็บแช่แข็งไว้ในหลอด cryotube มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 - 4 นาที เพื่อให้เซลล์ที่ถูกแช่แข็งละลาย จากนั้นใช้ปิเปตดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจายตัวดี แล้วจึงดูดใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร (T25) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ที่ผสม Fetal Bovine Serum (FBS) 10% และ antibiotic 1% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์เพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°C ความชื้น 95 - 99% เป็นเวลาข้ามคืนเพื่อให้เซลล์เกาะตัวดี จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เพื่อป้องกันพิษจาก DMSO ซึ่งเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับแช่แข็ง

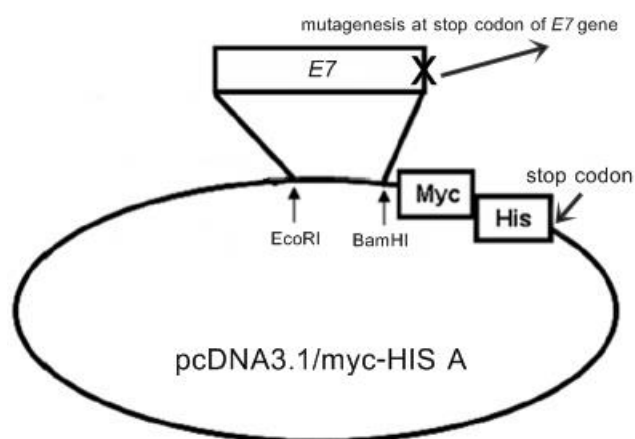
### 1.1.1.2 การเลี้ยงเซลล์

หลังจากที่เซลล์ที่เลี้ยงไว้โตประมาณ 80% (80% confluency) ทำ การเก็บเซลล์และแบ่งเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยลำดับแรก ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ใน ขวดเก่าออกโดยใช้ suction จากนั้นล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วเติม Trypsin EDTA (กระบวนการ trypsinization) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ประมาณ 3 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดจากการยึดเกาะ เมื่อครบเวลาแล้วนำเซลล์มาเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 2 เท่าของปริมาณ Trypsin เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาของ Trypsin แล้วดูดเซลล์ปริมาตร 70 - 100 ไมโครลิตรไปใส่ในขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด T25 ขวดใหม่ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์บรรจุอยู่ 5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดเซลล์จาก T25 ขวดเก่าทิ้งให้เหลือเกาะขวดประมาณ 10 - 20% แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เอียงขวดเลี้ยงเซลล์ไปมาเพื่อให้เซลล์กระจายบนพื้นผิวขวดทั่วๆ แล้วนำขวดเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดเข้าตู้เลี้ยงเซลล์ หลังจากนั้นตรวจดูการโตของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อย่างสม่ำเสมอ หากเซลล์ยังไม่ถึง 80% แต่สีอาหารเลี้ยงเซลล์เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองควรเปลี่ยนอาหาร เซลล์ และเมื่อเซลล์โตมากกว่า 80% ก็สามารถเก็บเซลล์ไปทำการทดลองในขั้นต่อไปหรือเก็บเซลล์แช่แข็งเพื่อการเก็บในระยะยาวได้

### 1.1.1.3 โครงสร้างของพลาสมิดลูกผสมของยีน E7 ของเอชพีวี ไทป์ 16

พลาสมิดลูกผสมของยีน E7 ของเอชพีวี ไทป์ 16 สร้างไว้โดยนายวัชรพงศ์ ภัคดีชายแดน (2555) โดยการตัดยีน E7 ของเอชพีวี ไทป์ 16 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *BamHI* จากพลาสมิด pGEX2T-E7 ที่แสดงออกได้เฉพาะในแบคทีเรีย จากนั้นนำยีน E7 ที่ได้มาทำ mutagenesis โดยตัด stop codon ที่ปลายด้าน 3' แล้วเติมลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นเพื่อให้เกิด

การแสดงออกต่อไปได้ แล้วนำยีน *E7* ที่ได้นี้ มาเชื่อมกับพลาสมิด pcDNA3.1/myc-HIS ที่มียีน *MYC* และ *HIS* อยู่ จะได้พลาสมิดลูกผสมของ *E7* ที่ยีนสามารถแสดงออกได้เมื่อถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสามารถตรวจสอบโปรตีน *E7* ที่ผลิตขึ้นโดยใช้แอนติบอดีของ *MYC* หรือ *HIS* ได้ (วัชรพงศ์ ภักดีชายแดน, 2555) จากนั้นนำพลาสมิดไปทำการหาลำดับเพื่อตรวจสอบยีน *E7*



รูปที่ 20 โครงสร้างของพลาสมิดลูกผสมของยีน *E7* ของเอชพีวี ไทป์ 16

### 1.1.2 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมของยีน *E7* ของเอชพีวี ไทป์ 16 เข้าสู่ competent cells (transformation)

เริ่มจากนำ competent cells *Escherichia coli* XL-1 blue โดยมี ampicillin เป็นตัวคัดเลือก ซึ่งถูกเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส มาละลายโดยวางบนน้ำแข็ง เมื่อ competent cells ละลายหมดแล้ว คูด competent cells ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับพลาสมิดลูกผสมของ *E7* ปริมาตร 8 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้พลาสมิดลูกผสมของ *E7* จับที่ด้านนอกผนังเซลล์ของ competent cells แล้วนำไปให้ความร้อน (heat shock) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยใช้ heat block เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อให้ผนังเซลล์ของ competent cells เป็นรู ซึ่งจะทำให้พลาสมิดลูกผสมของ *E7* เข้าไปใน competent cells จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ผนังเซลล์ของ competent cells กลับสู่สภาพเดิม แล้วนำ competent cells ไปผสมกับ super optimal broth (Muller-Tidow, *et al.*) ปริมาตร 980 ไมโครลิตรที่ผสมด้วย 2M  $MgCl_2$  10 ไมโครลิตร และ 2M glucose 10 ไมโครลิตร นำ competent cells ไปบ่มในเครื่องบ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อ

นาที่ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งจนเหลือของเหลวในหลอดประมาณ 100 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเพื่อให้ตะกอนกระจายออกจากกัน แล้วดูดของเหลวปริมาตร 25 ไมโครลิตร (low concentration competent cells) ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (Luria-Bertani agar หรือ LB agar) ที่มี ampicillin ในอัตราส่วน LB agar : ampicillin = 1000 : 1 นำ competent cells ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมของ E7 ที่เหลือไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนอีกครั้ง จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนทิ้งจนเหลือปริมาตรในหลอดประมาณ 25 ไมโครลิตร แล้วจึงทำให้ตะกอนกระจายออกจากกัน ดูดของเหลวปริมาตร 25 ไมโครลิตร (high concentration competent cells) นำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มี ampicillin เช่นเดียวกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเพาะเชื้อ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เนื่องจากพลาสมิดลูกผสมของ E7 มียีนต้านยา ampicillin ดังนั้น competent cells ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมของ E7 จึงสามารถโตได้บนอาหารที่มี ampicillin จากนั้น นำโคลนที่ขึ้นในจานเพาะเชื้อมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Luria-Bertani broth หรือ LB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่ผสม ampicillin 5 ไมโครลิตร โดยแยก 1 โคลนต่อ 1 หลอดเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่องบ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 - 12 ชั่วโมง

### 1.1.3 การสกัดพลาสมิด

นำแบคทีเรียที่เลี้ยงใน LB เป็นเวลา 10 - 12 ชั่วโมง มาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเก็บตะกอนที่ได้มาสกัดพลาสมิดด้วยชุดคิท GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) แล้วนำพลาสมิดที่ได้ส่งบริษัท sequence เพื่อตรวจสอบยีน E7 ในพลาสมิด หลังจากนั้นสามารถนำพลาสมิดไปใช้ในการทดลองต่อไป หรือเก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

### 1.1.4 การถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ C33A

ทำการถ่ายโอนพลาสมิดในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม โดยเริ่มต้นจากนับเซลล์ให้มีจำนวน  $2 \times 10^5$  เซลล์ใน 1 หลุมของจานเลี้ยงเซลล์ 6 หลุม ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ปริมาตร 2 ml แล้วบ่มเซลล์ในตู้เลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง วันถัดมา ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งและเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็น DMEM ที่ไม่มี antibiotic ปริมาตร 1,800 ไมโครลิตร แล้วถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยนำพลาสมิดลูกผสม E7 และ พลาสมิดเปล่าซึ่งเป็นชุดควบคุม ปริมาณ 2  $\mu$ g โดยใช้พลาสมิดความเข้มข้น 200 ng/ $\mu$ l ปริมาตร 10  $\mu$ l ผสมกับ TurboFect™ transfection reagent (Thermo Scientific, USA) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร และ Opti-MEM ปริมาตร 184 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่

อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นจุดพลาสติกหลอดผสม E7 หรือพลาสติกเปล่าที่บ่มไว้ ใส่ในงานเลี้ยงเซลล์ จำนวน 200 ไมโครลิตร โดยค่อยๆ ปลอຍสารละลายลงด้านข้างของหลุม แล้วเคลื่อนงานเลี้ยงเซลล์ ไปมาเพื่อให้พลาสติกกระจายตัวดี จากนั้นนำไปบ่มต่อในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้ พลาสติกเข้าไปภายในเซลล์ แล้วจึงเก็บเซลล์ไปทำการทดลองในขั้นต่อไป

### 1.1.5 Chromatin immunoprecipitation

นำเซลล์ที่อยู่ในงานเพาะเซลล์มาใส่ 37% formaldehyde ความเข้มข้นสุดท้าย 1% ลงในงานเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์หลุมละ 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้เกิดการ cross-link ระหว่างโปรตีนและดีเอ็นเอ จากนั้นยับยั้งการ cross-link ด้วยการเติม glycine ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.25 M แล้วนำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วล้างเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อหลุม จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นผสม protease inhibitor ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ PBS เย็น ปริมาตร 198 ไมโครลิตร แล้วดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ในแต่ละหลุมปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ scraper ขูด เซลล์และเก็บเซลล์ใส่หลอดขนาด 1.5 ml ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง แล้วเก็บเซลล์ใส่หลอดเต็ม นำเซลล์ไปปั่น เหยียงตกตะกอนที่ความเร็ว 800 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ดูดของเหลวส่วนบน ทิ้ง แล้วใส่ lysis buffer ปริมาตร 198 ไมโครลิตรผสมกับ protease inhibitor ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง นำไปบ่มด้วยการวางบนน้ำแข็ง โดย vortex ทุกๆ 5 นาที จนครบ 20 นาที เพื่อให้ผนังเซลล์แตก จากนั้นนำไปปั่นเหยียงตกตะกอนที่ความเร็ว 800 g อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งของเหลวส่วนบน ใส่ nuclear lysis buffer ปริมาตร 198 ไมโครลิตรผสมกับ protease inhibitor ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง นำไปบ่มด้วยการ วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เชื้อหุ้มนิวเคลียสแตก จากนั้นนำตัวอย่างไปทำให้โครมาติน มีขนาดประมาณ 200 - 1000 bp. ด้วยการใช้คลื่นเสียง (sonication) ความแรง (pulse) 30% เป็น เวลา 10 วินาที และพัก 30 วินาที จำนวน 8 รอบ โดยวางหลอดทดลองในน้ำแข็งขณะที่ทำ sonication เนื่องจากความร้อนที่เกิดจากการ sonicate จะส่งผลให้โปรตีนที่เกาะอยู่กับดีเอ็นเอหลุด ออกจากกันได้ หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปตกตะกอนด้วยการปั่นเหยียงด้วยความเร็ว 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบนซึ่งมี sheared chromatin ไปใส่หลอด ทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ ในขั้นตอนนี้ สามารถนำไปเก็บแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียสได้นาน 3 เดือน

ขั้นตอนนี้ต่อไป คือ ใส่ ChIP buffer และ protease inhibitor ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงใน sheared chromatin (lysate) ที่ได้จากขั้นตอนที่แล้ว จากนั้นใส่ protein G ปริมาตร 80 ไมโครลิตรแล้วบ่มบน rotator ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1

ชั่วโมง เพื่อทำ pre - clear lysate ลด background จาก non-specific antibody หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาตกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2 นาที แล้วดูดส่วนใสที่เป็น lysate ด้านบน มาใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ และเก็บ lysate ประมาณ 50 ไมโครลิตรไว้อีก 1 หลอดเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform ตามวิธีทำในข้อ 4.1.1 สำหรับใช้เป็น input DNA (positive control) จากนั้นตกตะกอนชิ้นส่วนโครมาติน (immunoprecipitation) โดยใช้แอนติบอดี HPV 16 E7 (Santa cruz, USA), HIS (Abcam, USA), H3K9 (Abcam, USA) สำหรับเป็น positive control และ mouse normal IgG (Cell signaling, USA) สำหรับเป็น isotype control antibody ปริมาณอย่างละ 10  $\mu$ g ลงไปใน lysate บ่มบน rotator ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หลังจากนั้น เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ใส่ protein G ปริมาตร 60 ไมโครลิตรลงใน lysate แล้วบ่มต่อบน rotator ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ protein G จับกับ antibody และตกตะกอน complex ของโปรตีนกับ shear chromatin ลงมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 1 นาที ที่มีส่วนใสด้านบนแล้วล้างตะกอนด้วย 150 mM NaCl, 500 mM NaCl, LiCl และ  $T_{10}E_1$  ตามลำดับ อย่างละ 1 มิลลิลิตร โดยหลังจากใส่สารในแต่ละชั้นต้องนำไปเขย่าบน rotator เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 1 นาที แล้วกำจัดส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นใส่ elution buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วเขย่าบน vortex 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 1,100 g เป็นเวลา 30 วินาที แล้วดูดส่วนใสด้านบนไปใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วใส่ elution buffer ในหลอดเดิมแล้วทำซ้ำอีก 1 รอบ ดูดส่วนใสด้านบนที่ได้ไว้ในหลอดเดียวกัน แล้วใส่ 5M NaCl 8 ไมโครลิตร และ RNaseA 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่ 100% EtOH ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เพื่อ decross-link โปรตีนออกจากดีเอ็นเอและตกตะกอนดีเอ็นเอ

เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นใส่  $T_{10}E_1$ , 5X PK buffer และ PK buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร 25 ไมโครลิตร และ 1.5 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดโปรตีนและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้น แล้วทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform โดยใช้ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำตัวอย่างไป vortex เพื่อผสมสารให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดของเหลวส่วนใสชั้นบนสุดไปยังหลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วใส่ 100% EtOH ปริมาตร 750 ไมโครลิตร 5M NaCl ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ



glycogen ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปแช่ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ หลังจากนั้น นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% EtOH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วย dH<sub>2</sub>O ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำดีเอ็นเอไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Qubit (Thermo Scientific, USA) แล้วนำดีเอ็นเอไปทำ PCR และเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอสำหรับทำ CHIP - seq analysis

#### 1.1.6 การทำ Polymerase chain reaction (PCR)

ทำ PCR จากดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ CHIP โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นยีนที่โปรตีน E7 สามารถจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนและเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันได้ (Chalertpet et al., 2015) เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมบวกสำหรับตรวจสอบความสำเร็จในการทำ CHIP

**ตารางที่ 1** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ CHIP-PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
Forward <i>CCNA1</i> primer	CAGGAAGCGTAGGTGTGTGAG
Reverse <i>CCNA1</i> prime	GCTTTGGAAGGGACTGTTTCCG

**ตารางที่ 2** ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ CHIP- PCR เพื่อตรวจสอบยีน *CCNA1*

ชนิดของสาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 20 uM Forward <i>CCNA1</i> primer	0.15	0.3 uM
4. 20 uM Reverse <i>CCNA1</i> primer	0.15	0.3 uM
5. 250 U HotStarTaq polymerase	0.1	0.25 U/reaction
6. Distilled water	5.4	
7. DNA	4	
ปริมาณรวม	10.0	

**ตารางที่ 3** สภาวะที่ใช้ในการทำ CHIP - PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. Initial denaturation	95	15
2. PCR cycle (35 รอบ)		
- Denature	95	1
- Annealing	56	1
- Extension	72	1
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

### 1.1.7 อิเล็กโทรโฟรีซิส

นำ PCR product มาตรวจสอบด้วย 6% non-denaturing acrylamide gel โดยรันเจลที่ความต่างศักย์ 120 โวลต์ 45 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปแช่ใน 1X TBE + 1X SYBR green I nucleic acid gel stain เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายและบันทึกภาพเจล ซึ่งจะมีขนาด PCR product 205 คู่เบส

### 1.1.8 การเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ในขั้นตอนของการทำ CHIP- seq analysis จะต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นอย่างน้อยเท่ากับ 200 นาโนกรัม จึงจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยใช้ Seq plex Enhanced





## 2. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน

### 2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ

ทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ C33A และ HEK293 ตามวิธีทำในข้อ 1.1.4 จนครบ 72 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเซลล์โดยการ trypsinization ตามหัวข้อ 1.1.1.2 หลังจากนั้นดูดเซลล์โดยใช้ปิเปตต์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 500 g เป็นเวลา 4 นาที แล้วทิ้งของเหลวด้านบน จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 500 g เป็นเวลา 4 นาที เท PBS ทิ้ง แล้วล้างตะกอนเซลล์ซ้ำอีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นใส่ trizol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วใช้ปิเปตต์ดูดขึ้นลงเพื่อให้ trizol ผสมกับเซลล์และทำให้เซลล์แตก วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วใส่ chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอดให้สารผสมเข้ากัน 15 วินาที แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ใช้ปิเปตต์ดูดส่วนใสขึ้นบนสุดไปใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วใส่ 100% isopropanol เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร คั่วหางย หลอด 2 - 3 ครั้ง เพื่อผสมสารในหลอดให้เข้ากัน บ่มโดยวางหลอดบนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 12,000 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้ง เพื่อเก็บตะกอนอาร์เอ็นเอที่ก้นหลอด ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% ethanol เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 7,500 g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนอาร์เอ็นเอโดยวางหลอดทดลองบนน้ำแข็งให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย nuclease free water ปริมาตร 20 - 50 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่ปริมาณของตะกอนอาร์เอ็นเอ นำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ แล้วนำอาร์เอ็นเอไปวัดความเข้มข้นเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป หรือเก็บอาร์เอ็นเอที่ได้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

### 2.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่ผสม (cDNA)

หลังจากที่สกัดอาร์เอ็นเอแล้ว ใช้ RevertAid™ first strand cDNA synthesis kit (Fermentas, Canada) ในการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ RNA เริ่มต้น 2.5 ไมโครกรัม ใน nuclease free water โดยต้องมีปริมาตรรวมทั้งหมด 11 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 0.2 ml จากนั้นใส่ oligo primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ซึ่งจะทำหน้าที่จับอย่างจำเพาะบริเวณปลาย 3' ของ poly (A) RNA นำตัวอย่างไปบ่มในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นใส่ 5X reaction buffer 4 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 2 ไมโครลิตร, RNase inhibitor (20u/u) 1 ไมโครลิตร และ M-MuLV reverse transcriptase (200u/u) 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้งที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และอุณหภูมิ

70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอต้นแบบและยับยั้งการสังเคราะห์ cDNA หลังจากนั้น นำ cDNA ที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป หรือเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

### 2.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน E7 ของเอชพีวี 16 ในเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน E7 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน E7 ของเอชพีวี 16 เพื่อยืนยันความสำเร็จในการถ่ายโอนพลาสมิด

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ใช้ใน PCR เพื่อตรวจสอบยีน E7 ของเอชพีวี 16

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
Forward E7 primer	GGGCAATTAAATGACAGCTCAG
Reverse E7 primer	GTGTGCTTTGTACGCACAACC

ตารางที่ 6 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบยีน E7 ของเอชพีวี 16

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 20 uM Forward E7 primer	0.15	0.3 uM
4. 20 uM Reverse E7 primer	0.15	0.3 uM
5. 250 U HotStarTaq polymerase	0.1	0.25 U/reaction
6. Distilled water	8.4	
7. DNA	1	
ปริมาตรรวม	10.0	

ตารางที่ 7 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบยีน E7 ของเอชพีวี ไทป์ 16

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	15 นาที
2. PCR cycle (30 รอบ)		
- Denature	95	1 นาที
- Annealing	56	1 นาที
- Extension	72	1 วินาที
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

หลังจากนั้นนำ PCR product ไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 1.1.7 ซึ่งยีน E7 จะมีขนาด เท่ากับ 142 คู่เบส

## 2.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน NOP56 และ FAM189A1

### 2.4.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน NOP56

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน NOP56 ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน NOP56 โดยตรวจสอบในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด E7 และพลาสมิดเปล่า ด้วยวิธี PCR และ Real-time PCR และตรวจสอบในเซลล์ C33A ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด E7 และพลาสมิดเปล่า ด้วยวิธี PCR โดยใช้ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) เป็น reference gene จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 1.1.7 ซึ่งยีน NOP56 จะมีขนาด เท่ากับ 136 คู่เบส และ *GAPDH* จะมีขนาดเท่ากับ 163 คู่เบส ในส่วน Real - time PCR นั้น ใช้ SYBR (Applied biosystems, USA) ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน และคำนวณการ แสดงออกของยีน NOP56 ด้วยวิธี  $\Delta\Delta$ CT method

**ตารางที่ 8** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ใน PCR และ Real - time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NOP56*

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
Forward <i>NOP56</i> primer	CAGCATCGTTTCGTCTGGTGG
Reverse <i>NOP56</i> primer	AGGCGGAGGTCCTCATGAAC
Forward <i>GAPDH</i> primer	TGGAAGGACTCATGACCACAG
Reverse <i>GAPDH</i> primer	TTCAGCTCAGGGATGACCTT

**ตารางที่ 9** สภาวะในการทำ PCR และ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบยีน *NOP56*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	15 นาที
2. PCR cycle (30 รอบ)		
- Denature	95	45 นาที
- Annealing	64	45 นาที
- Extension	72	45 วินาที
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

**ตารางที่ 10** ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบยีน *NOP56*

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 20 uM Forward <i>NOP56</i> primer	0.15	0.3 uM
4. 20 uM Reverse <i>NOP56</i> primer	0.15	0.3 uM
5. 20 uM Forward <i>GAPDH</i> primer	0.15	0.3 uM
6. 20 uM Forward <i>GAPDH</i> primer	0.15	0.3 uM
7. 250 U HotStarTaq polymerase	0.1	
8. Distilled water	7.1	
9. DNA	1	
ปริมาตรรวม	10.0	0.25 U/reaction



**ตารางที่ 11** ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NOP56*

ชนิดของสาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 2X SYBR (Applied biosystems, USA)	5.0	1X
2. 20 uM Forward <i>NOP56</i> primer	0.05	0.1 uM
20 uM Reverse <i>NOP56</i> primer	0.05	0.1 uM
หรือ		
20 uM Forward <i>GAPDH</i> primer	0.05	0.1 uM
20 uM Reverse <i>GAPDH</i> primer	0.05	0.1 uM
3. Distilled water	4.4	
4. cDNA	1.0	
ปริมาตรรวม	10.0	

#### 2.4.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *FAM189A1*

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *FAM189A1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *FAM189A1* โดยตรวจสอบในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด E7 และพลาสมิดเปล่า ด้วยวิธี Real - time PCR โดยใช้ SYBR (Applied biosystems, USA) ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน และใช้ glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) เป็น reference gene จากนั้นคำนวณการแสดงออกของยีน *NOP56* ด้วยวิธี  $\Delta\Delta$ CT method

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 12** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ Real - time PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *FAM189A1*

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
Forward <i>FAM189A1</i> primer	TGGATTTTCGACGAGTTCATC
Reverse <i>FAM189A1</i> primer	TATTGATGGCCACGTCATAC
Forward <i>GAPDH</i> primer	TGGAAGGACTCATGACCACAG
Reverse <i>GAPDH</i> primer	TTCAGCTCAGGGATGACCTT

ตารางที่ 13 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ Real - me PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *FAM189A1*

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 2X SYBR (Applied biosystems, USA)	5.0	1X
2. 20 uM Forward <i>FAM189A1</i> primer	0.05	0.1 uM
20 uM Reverse <i>FAM189A1</i> primer	0.05	0.1 uM
หรือ		
20 uM Forward <i>GAPDH</i> primer	0.05	0.1 uM
20 uM Reverse <i>GAPDH</i> primer	0.05	0.1 uM
3. Distilled water	4.4	0.1 uM
4. cDNA	1.0	0.1 uM
ปริมาตรรวม	10.0	

ตารางที่ 14 สภาวะในการทำ Real - time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *FAM189A1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. Initial denaturation	95	15
2. PCR cycle (40 รอบ)		
- Denature	95	1
- Annealing	56	1
- Extension	72	1
3. Final extension	72	7
4. Holding	4	

#### 2.4.3 การคำนวณการแสดงออกของยีน ด้วยวิธี $\Delta\Delta CT$

$\Delta\Delta CT$  method เป็นการศึกษาการแสดงออกของยีนแบบ relative quantification โดยอาศัยค่า threshold cycle (Ct) ซึ่งได้จากจุดตัดระหว่าง amplification curve และ threshold line ของทั้ง target gene (*NOP56* หรือ *FAM189A1*) และ reference gene (*GAPDH*) test sample คือ HEK293 ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม E7 และ control sample คือ HEK293 ที่ได้รับ พลาสมิดเปล่า มาใช้ในการคำนวณตามสมการของ Livak and Schmittgen

(2001) ซึ่งการแสดงออกของยีนที่ได้จะเป็นสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงเป็นจำนวนเท่า (fold change) ดังนี้

$$\begin{aligned}\text{Fold change} &= 2^{-\Delta\Delta\text{CT}} \\ &= 2^{-(\Delta\text{Ct}(\text{test}) - \Delta\text{Ct}(\text{reference}))} \\ &= 2^{-[(\text{Ct}(\text{target}, \text{test}) - \text{Ct}(\text{ref}, \text{test})) - (\text{Ct}(\text{target}, \text{control}) - \text{Ct}(\text{ref}, \text{control}))]}\end{aligned}$$

เมื่อ Ct(target, test)	คือ	Ct ของยีน <i>FAM189A1</i> หรือ <i>NOP56</i> จาก HEK293 ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม E7
Ct(ref, test)	คือ	Ct ของยีน <i>GAPDH</i> จาก HEK293 ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม E7
Ct(target, control)	คือ	Ct ของยีน <i>FAM189A1</i> หรือ <i>NOP56</i> จาก HEK293 ที่ได้รับพลาสมิดเปล่า
Ct(ref, control)	คือ	Ct ของยีน <i>GAPDH</i> จาก HEK293 ที่ได้รับพลาสมิดเปล่า

#### 2.4.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธีการทางสถิติ

นำค่า  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  ของ HEK293 ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม E7 และ HEK293 ที่ได้รับพลาสมิดเปล่า ที่ได้จากการทดลองจำนวน 6 ซ้ำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การทดสอบ Independent sample T-Test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 5 (Motulsky, 2007)

### 3. การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* และยีน *FAM189A1*

#### 3.1 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* ในเซลล์ C33A และ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดที่มียีน E7

##### 3.1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

หลังจากนำเซลล์ C33A และ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และ พลาสมิดเปล่า ตามวิธีทำในข้อ 1.1.4 มาทำการเก็บเซลล์โดยการ trypsinization ตามวิธีทำในข้อ 1.1.1.2 แล้ว หลังจากนั้นดูดเซลล์โดยใช้ปิเปตต์ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 500 g เป็นเวลา 4 นาที แล้วทิ้งของเหลว

ด้านบน จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 500 g เป็นเวลา 4 นาที เท PBS ทิ้ง แล้วล้างตะกอนเซลล์ซ้ำอีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นใส่ lysis buffer II (ภาคผนวก) ที่ผสมกับ 10% SDS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และ proteinase K ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วนำหลอดตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในเครื่อง water bath เป็นเวลาข้ามคืนหรือจนตะกอนเซลล์ย่อยจนหมด หลังจากนั้นใส่ phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง เขย่าสารให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบน (upper layer) ใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วเติม 100% ethanol ปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่าง และ 7.5 M ของ  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  ปริมาตร 0.5 เท่าของตัวอย่าง คว่ำหายหลอด 3 - 4 ครั้ง เพื่อผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทของเหลวด้านบน (supernatant) ทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ติดอยู่ด้านล่างหลอด ด้วย 75% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเท supernatant ทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย distilled water ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) ปริมาตร 20 - 30 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณของตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่อง water bath เป็นเวลา 15 - 30 นาที เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้นเพื่อนำไปทำการทดลองในขั้นต่อไป หรือเก็บดีเอ็นเอที่ได้ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

### 3.1.2 การทำ sodium bisulfite treatment

ทำการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไซโตซีนให้กลายเป็นยูราซิล โดยใช้วิธีการ sodium bisulfite treatment ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo research, USA)

### 3.1.3 การทำ methylation specific PCR (MSP)

ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1* ในเซลล์ HEK293 และยีน *NOP56* ในเซลล์ HEK293 และ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม E7 และพลาสมิดเปล่า ด้วยการนำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ sodium bisulfite treatment ซึ่งใช้แยกดีเอ็นเอที่มีเมทิลเลชัน ออกจากดีเอ็นเอที่ไม่มีเมทิลเลชัน ด้วยเทคนิค MSP โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อการทดลองเมทิลเลชันที่จำเพาะต่อยีน *FAM189A1* และ ยีน *NOP56* ในบริเวณที่ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 และ YY1 จับ ซึ่งทำนายจากโปรแกรม epd.vital ประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเมทิลเลชัน (methylation primer) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีเมทิลเลชัน (unmethylation primer) โดยสำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่

ไม่มีเมทิลเลชัน หลังจากทำ sodium bisulfite treatment แล้ว ลำดับเบสไซโตซีนจะเปลี่ยนไปเป็นยูราซิล ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีเมทิลเลชัน  $C^{met}$  จะไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้น ก่อนการออกแบบไพรเมอร์ จึงต้องทำการเปลี่ยนลำดับเบสไซโตซีนทุกตัวให้เป็นเบสไทมีน สำหรับออกแบบ unmethylation primer และเปลี่ยนเฉพาะเบสไซโตซีนที่ไม่ต่อกับเบสกวีนีน สำหรับออกแบบ methylation primer ตามลำดับ (ดังในตารางที่ 15)

**ตารางที่ 15** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ใน MSP เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันในยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56*

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
Forward <i>FAM189A1</i> methylation primer	GAGGTTTTTGTTCGTTATATTTGC
Reverse <i>FAM189A1</i> methylation primer	ACGACAACGAACCAACCG
Forward <i>FAM189A1</i> unmethylation primer	ATTTAAGAGGTTTTTGTGGTTATATTTGT
Reverse <i>FAM189A1</i> unmethylation primer	CAATAACAACAACCAACCA
Forward <i>NOP56</i> methylation primer	TATTTTTTATTATATTTTGAATC
Reverse <i>NOP56</i> methylation primer	ATTAAATTATTTTAACCGTCG
Forward <i>NOP56</i> unmethylation primer	GTATTTTTTATTATATTTTGAATT
Reverse <i>NOP56</i> unmethylation primer	AATATTAAATTATTTTAACCATCA

**ตารางที่ 16** สภาวะในการทำ MSP เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันในยีน *FAM189A1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	15 นาที
2. PCR cycle (30 รอบ)		
- Denature	95	45 วินาที
- Annealing	50	45 วินาที
- Extension	72	45 วินาที
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

**ตารางที่ 17** สภาวะในการทำ MSP เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันในยีน *NOP56*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	15 นาที
2. PCR cycle (30 รอบ)		
- Denature	95	45 วินาที
- Annealing	38	45 วินาที
- Extension	72	45 วินาที
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

หลังจากนั้น นำ PCR product มาตรวจสอบ methylated band และ unmethylated band ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีทำในข้อ 1.1.7 ซึ่ง PCR product ของ methylated band และ unmethylated band ของยีน *FAM189A1* จะมีขนาด 154 และ 143 คู่เบส และยีน *NOP56* จะมีขนาด 64 และ 68 คู่เบสตามลำดับ

#### 4. การตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรตีน E7, AP2 และ YY1 กับโปรโมเตอร์ของยีนที่คัดเลือก

จากการคัดเลือกยีนด้วยวิธี ChIP-seq analysis และวิธีทางชีวสารสนเทศ ได้ทำการคัดเลือกยีน *FAM189A1* และ *NOP56* เพื่อทำการตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรตีน E7, AP2 และ YY1 กับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนดังกล่าว ในเซลล์ HEK293

##### 4.1 การถ่ายโอนพลาสมิดยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เข้าสู่เซลล์ HEK293

ทำการถ่ายโอนพลาสมิดในงานเลี้ยงเซลล์ขนาด 6 หลุม ตามวิธีทำในข้อ 1.1.4

##### 4.2 การทำ Chromatin immunoprecipitation

ทำการศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีน E7, AP2 และ YY1 บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1* และ *NOP56* ด้วยวิธี ChIP ตามวิธีทำในข้อ 1.1.5 โดยในขั้นตอนของการตกตะกอนชิ้นส่วนโครมาติน (immunoprecipitation) จะใช้แอนติบอดีทั้งหมด 5 แอนติบอดี ได้แก่ HPV16 E7 (Santa cruz, USA), AP2 (Santa cruz, USA), YY1 (Santa cruz, USA), H3K4 (Abcam, USA) และ mouse normal IgG (Cell signaling, USA) ปริมาณอย่างละ 10 µg หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายไปทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *FAM189A1* และ *NOP56*

หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 1.1.7 ซึ่งยีน *FAM189A1* และ *NOP56* จะมีขนาด PCR product เท่ากับ 130 คู่เบส และ 174 คู่เบส ตามลำดับ

**ตารางที่ 18** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ ChIP-PCR ของยีน *FAM189A1* และ ยีน *NOP56*

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')
Forward <i>FAM189A1</i> primer	CTCCTGTTCGCCACACCTGC
Reverse <i>FAM189A1</i> primer	GGCCAGCCGAGCCTTCAGA
Forward <i>NOP56</i> primer	CTGGTTTGTAGTGATAAGCA
Reverse <i>NOP56</i> primer	CAAGTTAATCCATACATTAGC

**ตารางที่ 19** ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ ChIP- PCR ของยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56*

ชนิดของสาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1. 10X PCR	1.0	1X
2. 10 mM dNTPs	0.2	0.2 mM
3. 20 uM Forward <i>CCNA1</i> primer	0.15	0.3 uM
4. 20 uM Reverse <i>CCNA1</i> primer	0.15	0.3 uM
5. 250 U HotStarTaq polymerase	0.1	0.25 U/reaction
6. Distilled water	5.4	
7. DNA	4	
ปริมาตรรวม	10.0	

**ตารางที่ 20** สภาวะที่ใช้ในการทำ CHIP- PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *FAM189A1*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	15 นาที
2. PCR cycle (30 รอบ)		
- Denature	95	45 วินาที
- Annealing	67.5	45 วินาที
- Extension	72	45 วินาที
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	

**ตารางที่ 21** สภาวะที่ใช้ในการทำ CHIP- PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NOP56*

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1. Initial denaturation	95	15 นาที
2. PCR cycle (30 รอบ)		
- Denature	95	45 วินาที
- Annealing	44.2	45 วินาที
- Extension	72	45 วินาที
3. Final extension	72	7 นาที
4. Holding	4	



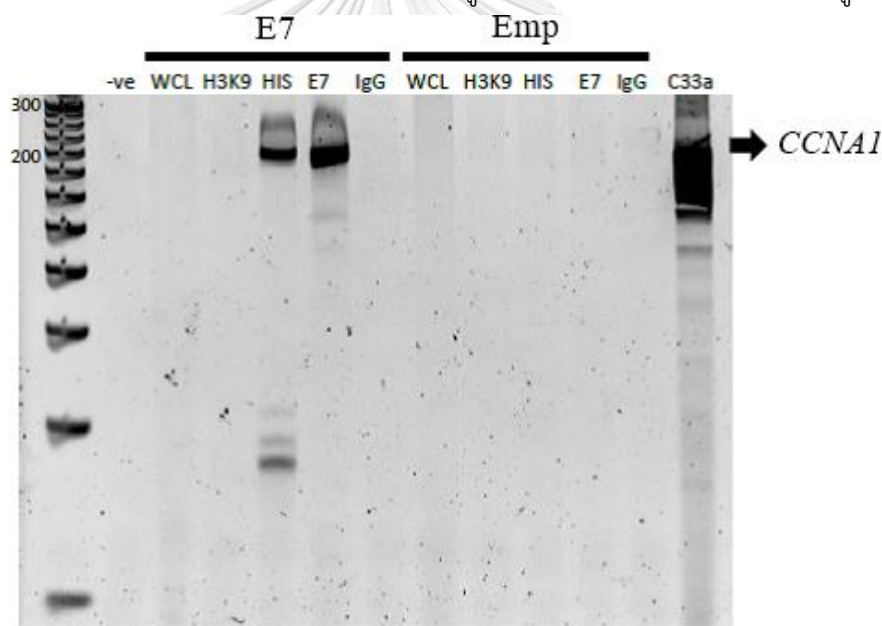
## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

การคัดเลือกยีนด้วยวิธี Chromatin immunoprecipitation Sequencing (ChIP-Seq)

#### 1. คุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการตกตะกอนด้วยวิธี ChIP

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการตกตะกอนด้วยวิธี ChIP โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นยีนที่โปรตีน E7 สามารถจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน และเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันได้ (Chalertpet et al., 2015) โดย PCR product ที่ได้จะมีขนาด 205 คู่เบส และเมื่อตรวจสอบ PCR product ด้วยการใส่ 8% acrylamide gel electrophoresis พบว่า ในเซลล์ที่ถูกถ่ายโอน พลาสมิด *E7* มีโปรตีน E7 และ HIS ซึ่ง HIS tag จะต่ออยู่กับยีน *E7* ในพลาสมิด และไม่พบโปรตีน E7 และ HIS ในเซลล์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า (PC) ดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 ผลการทำ ChIP-PCR ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* (*E7*) และพลาสมิดเปล่า (*Emp*) โดย

- WCL คือ lysate เปล่า
- H3K9 คือ ดีเอ็นเอจาก C33A ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน H3K9
- HIS คือ ดีเอ็นเอจาก C33A ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน HIS
- E7 คือ ดีเอ็นเอจาก C33A ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน E7

- IgG คือ ดีเอ็นเอจาก C33A ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน IgG
- -ve คือ negative control
- C33A คือ ดีเอ็นเอของเซลล์ C33A

## 2. ปริมาณของดีเอ็นเอจากการทำ CHIP

สำหรับการทำ CHIP-Seq analysis จะต้องใช้ปริมาณของดีเอ็นเอ อย่างน้อย 200 ng ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ CHIP ซึ่งจะเป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในการทำ CHIP-Seq โดยทำการวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Qubit® ซึ่งเป็นเครื่องที่มีความแม่นยำสูง พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป็นดังตารางที่ 22 ซึ่งเมื่อคำนวณปริมาณของดีเอ็นเอแล้วไม่เพียงพอต่อการทำ CHIP-Seq

ตารางที่ 22 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการตกตะกอนด้วยวิธี CHIP

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น จาก Qubit® (ng/ul)
C33A E7-E7	0.778
C33A Emp-E7	0.441

โดย

- C33A E7-E7 คือ เซลล์ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม E7 และตกตะกอนด้วย E7 antibody
- C33A Emp-E7 คือ เซลล์ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า และตกตะกอนด้วย E7 antibody

## 3. ปริมาณของดีเอ็นเอจากการเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วย Seq plex Enhanced DNA amplification kit

ผลการเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วย Seq plex Enhanced DNA amplification kit (Sigma Aldrich ,USA) โดยตรวจสอบด้วยการวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Qubit® พบว่าดีเอ็นเอที่ถูกตกตะกอนด้วย E7 antibody จากเซลล์ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด E7 (C33A E7-E7) มีความเข้มข้นเท่ากับ 125 ng/ul และ จากเซลล์ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า (C33A PC-E7) มีความเข้มข้นเท่ากับ 153 ng/ul ซึ่งเมื่อคำนวณปริมาณของดีเอ็นเอจากปริมาตร 15 ไมโครลิตร สำหรับทำ CHIP-Seq เพียงพอต่อการทำ CHIP-Seq analysis ดังในตารางที่ 23

**ตารางที่ 23** ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วย Seq plex Enhanced DNA amplification kit

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (ng/ul)
C33A E7-E7	125
C33A Emp-E7	153

#### 4. ผลความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากบริษัททำ ChIP seq analysis

ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอสำหรับเตรียมทำ ChIP-seq analysis จากบริษัท BGI ซึ่งเป็นบริษัทที่ทำ ChIP seq analysis พบว่า ดีเอ็นเอมีคุณภาพอยู่ในระดับ A หรือดีเยี่ยม โดยความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จาก เซลล์ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด E7 เท่ากับ 25.4 ng/ul เซลล์ C33a ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า เท่ากับ 21.8 ng/ul ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอ 381 ng และ 327 ng ตามลำดับ ซึ่งเพียงพอต่อการทำ ChIP-Seq analysis

#### 5. ผลจาก ChIP-Seq analysis

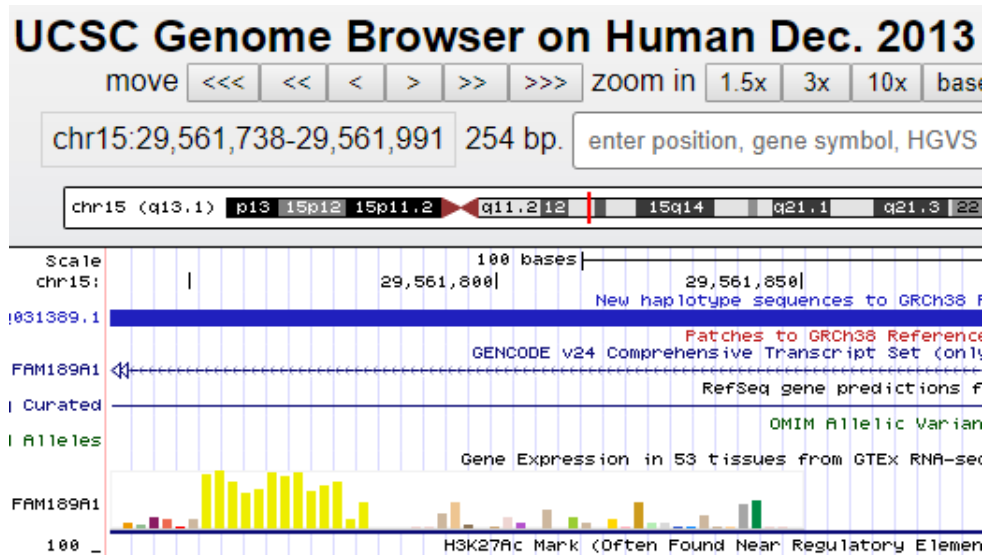
จากการวิเคราะห์ผลจาก ChIP-Seq analysis พบดีเอ็นเอ ทั้งหมด 10 ตำแหน่ง ดังตารางที่ 24

**ตารางที่ 24** ตำแหน่งของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ ChIP-Seq analysis

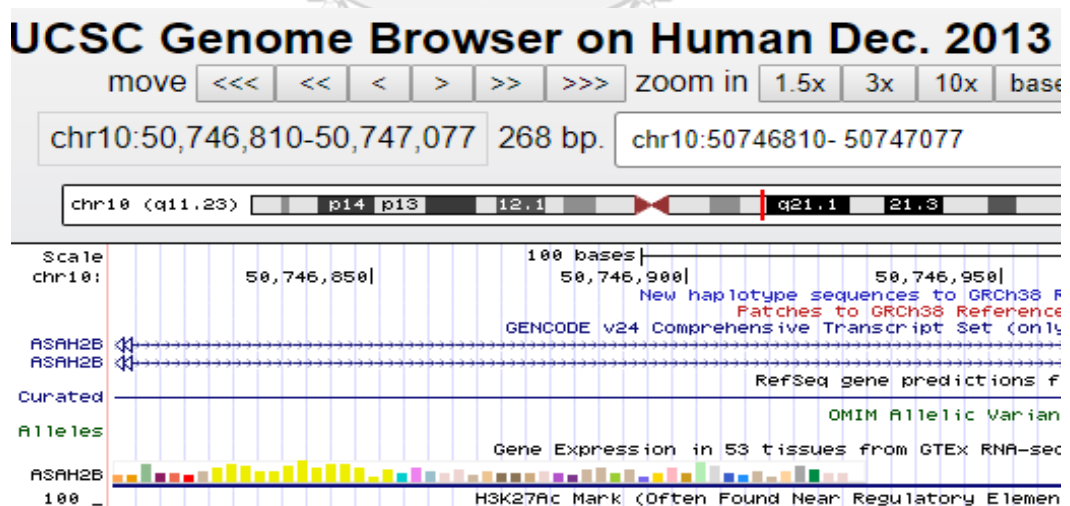
โครโมโซมแท่งที่	ตำแหน่ง start บนโครโมโซม	ตำแหน่ง end บนโครโมโซม	ความยาว (คู่เบส)
10	50746810	50747077	268
10	131330546	131330881	336
14	23815995	23816238	244
15	29561738	29561991	254
2	172750869	172751119	251
2	187963812	187964094	283
20	40321700	40321943	244
22	47654636	47654879	244
7	43098787	43099086	300
8	41187780	41188146	367

## 6. ผลการวิเคราะห์หายีนจากผล CHIP-Seq analysis

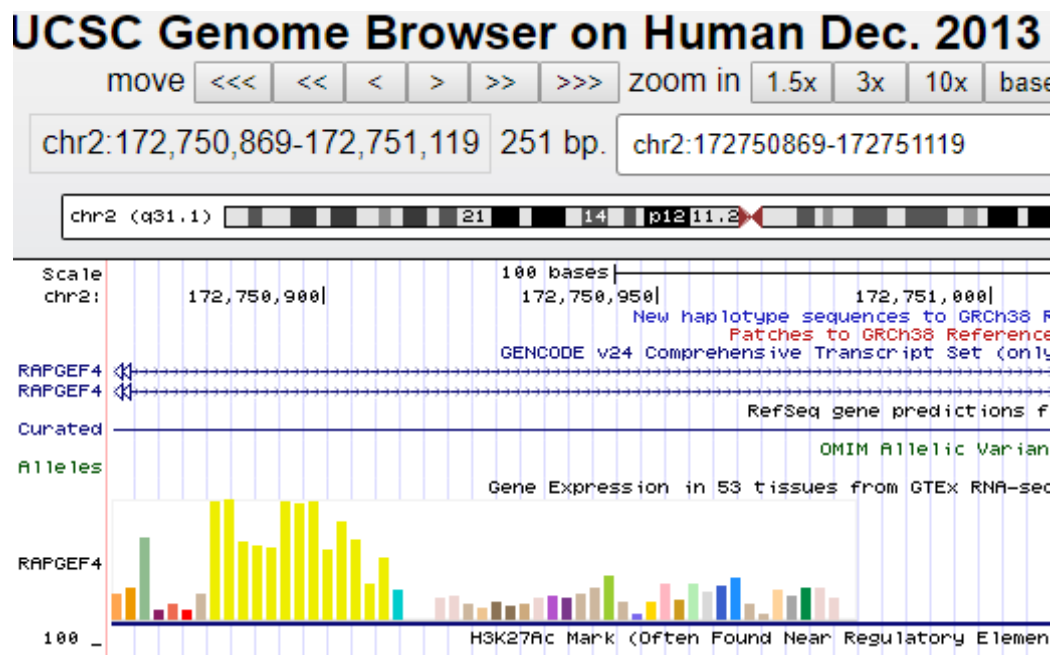
ผลจากการวิเคราะห์หายีนจากตำแหน่งของดีเอ็นเอบนโครโมโซมในตารางที่ 24 บนฐานข้อมูล UCSC พบยีนทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ *FAM189A1*, *ASAH2B*, และ *RAPGEF4* นอกจากนั้นเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่อยู่ในตำแหน่ง coding



รูปที่ 22 ผลการค้นยีน *FAM189A1* จากการใช้ตำแหน่งบนโครโมโซมค้นหาค้นหาบนฐานข้อมูล UCSC



รูปที่ 23 ผลการค้นหายีน *ASAH2B* จากการใช้ตำแหน่งบนโครโมโซมค้นหาค้นหาบนฐานข้อมูล UCSC



รูปที่ 24 ผลการค้นหายีน ASAH2B จากการใช้ตำแหน่งบนโครโมโซมโครโมโซมค้นหาค้นหาข้อมูล UCSC

จากนั้นทำการคัดเลือกยีน จำนวน 1 ยีน คือ *FAM189A1* มาทำการทดลองต่อ เนื่องจากมีรายงานว่า การกลายพันธุ์ของยีน *FAM189A1* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Chen, *et al.*, 2013) และยังมีรายงานพบว่ามี การแสดงออกของยีนที่ลดลงในผู้ป่วยโรคโครห์น (Crohn's Disease) (Hong *et al.*, 2017) ซึ่งเป็นโรคลำไส้อักเสบ-เรื้อรังชนิดหนึ่ง และมีความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งลำไส้ได้

การค้นหายีนด้วยการใช้ข้อมูลทางชีวสารสนเทศ

1. การค้นหาลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2

จากการค้นหาลำดับเบสด้วยโปรแกรม Jaspar (<http://jaspar.genereg.net>) โดยค้นหาทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่สามารถจับบริเวณโปรโมเตอร์ของ *CCNA1* ก่อน จากนั้นจึงดูที่ลำดับเบสที่ทรานสคริปชันแฟคเตอร์จับ โดยกำหนดค่า Relative profile score threshold ที่ร้อยละ 99 พบทรานสคริปชันแฟคเตอร์ 2 ชนิดที่สามารถจับกับ *CCNA1* ได้ โดยหนึ่งในนั้น คือ ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 ซึ่งจับกับลำดับเบส 5'-GCCCGAGGG-3' ของ *CCNA1* ดังรูปที่ 25

3 putative sites were predicted with these settings (99%) in sequence named **CCNA1**

Model ID	Model name	Score	Relative score	Start	End	Strand	predicted site sequence
MA0098.1	ETS1	7.633	0.992426667573013	2	7	-1	CTTCCT
MA0003.1	TFAP2A	10.122	0.991194889124188	42	50	-1	GCCCGAGGG
MA0098.1	ETS1	7.797	0.999991489624619	184	189	-1	TTTCCG

**Comment:** This type of analysis has a high sensitivity but abysmal selectivity. In other words: while true functional will be detected in most cases, most predictions will correspond to sites bound in vitro but with no function in vivo. A number of additional constraints of the analysis can improve the prediction; phylogenetic footprinting is the most common. We recommend using the [ConSite](#) service, which uses the JASPAR datasets.

The review [Nat Rev Genet. 2004 Apr;5\(4\):276-87](#) gives a comprehensive overview of transcription binding site prediction

รูปที่ 25 ผลการทำนายลำดับเบสของยีน *CCNA1* ที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 จากโปรแกรม Jaspasr

## 2. การค้นหายีนที่มีลำดับเบสบริเวณโพรโมเตอร์ตรงกับลำดับเบสของยีน *CCNA1* บริเวณที่ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 สามารถจับได้

จากการนำลำดับเบส 5'-GCCCGAGGG-3' ซึ่งเป็นลำดับเบสของยีน *CCNA1* ที่ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 สามารถจับได้ไปค้นหาในฐานข้อมูลจีโนมมนุษย์ จาก <http://www.ensembl.org> พบว่ามี 687 ยีน ที่มีลำดับเบสบริเวณโพรโมเตอร์ตรงกับ 5'-GCCCGAGGG-3' และเมื่อนำ gene ID ทั้ง 687 ยีน มาค้นหาเพื่อดูหน้าที่ของโปรตีนที่สร้างจากแต่ละยีนจากโปรแกรม pantherdb (<http://pantherdb.org>) แล้วคัดเลือกยีนที่มีหน้าที่คล้ายกับยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) เช่น เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวกับ cell adhesion molecule, biological regulation, immune system process, cell junction protein, transcription factor เป็นต้น สามารถคัดเลือกได้ทั้งหมด 129 ยีน

## 3. ผลการคัดเลือกยีนที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 และ YY1

จากการคัดเลือกยีนที่สามารถจับกับ AP2 โดยใช้ 2 โปรแกรม ได้แก่ promo (<http://algggen.lsi.upc.es>) ซึ่งกำหนดค่า Maximum matrix dissimilarity rate ที่ร้อยละ 1 ได้ผลลัพธ์ทั้งหมด 129 ยีน และ โปรแกรม jasper (<http://jaspar.genereg.net/>) โดยกำหนดค่า Relative profile score threshold ที่ร้อยละ 99 ได้ผลลัพธ์ทั้งหมด 19 ยีน แล้วทำการคัดเลือกยีนที่ทั้ง 2 โปรแกรมทำนายตรงกัน ได้ผลลัพธ์ทั้งหมด 19 ยีน จากนั้นคัดเลือกยีนทั้ง 19 ยีน ที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 ด้วยโปรแกรม epd.vital (<https://epd.vital-it.ch>) ได้ผลลัพธ์ทั้งหมด

9 ยีน ได้แก่ ยีน *NOP56*, *MAG*, *FUS*, *EIF2S2*, *RPL7*, *RPL10*, *NINJ1*, *LGALS1* และ *CLDN5* ดังในตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ยีนที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 และ YY1 ได้

ลำดับ ที่	ยีน	การทำนายการจับของ	การทำนายการจับของ	การทำนายการจับของ
		ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 ด้วยโปรแกรม Promo	ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 ด้วยโปรแกรม Jaspar	ทรานสคริปชัน- แฟคเตอร์ YY1
1	<i>DAF</i>	✓	✓	-
2	<i>LCN7</i>	✓	✓	-
3	<i>KAI1</i>	✓	✓	-
4	<i>MAG</i>	✓	✓	✓
5	<i>DDX5</i>	✓	✓	-
6	<i>NOP 56</i>	✓	✓	✓
7	<i>FBL</i>	✓	✓	-
8	<i>FUS</i>	✓	✓	✓
9	<i>EIF2S2</i>	✓	✓	✓
10	<i>RPL7</i>	✓	✓	✓
11	<i>RPL10</i>	✓	✓	✓
12	<i>RPL36A</i>	✓	✓	-
13	<i>NINJ1</i>	✓	✓	✓
14	<i>LGALS1</i>	✓	✓	✓
15	<i>CLDN5</i>	✓	✓	✓
16	<i>NR4A1</i>	✓	✓	-
17	<i>CRIP2</i>	✓	✓	-
18	<i>TCEA2</i>	✓	✓	-
19	<i>SUPT4H1</i>	✓	✓	-



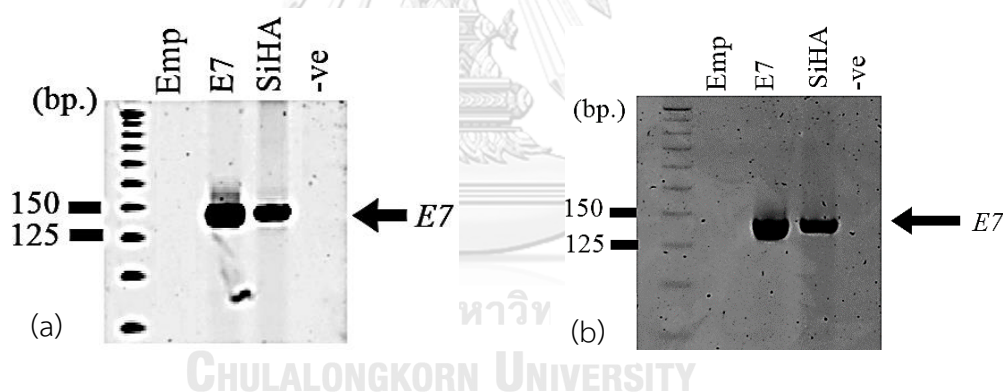
โดย ✓ หมายถึง ทรานสคริปชันแฟคเตอร์สามารถจับที่ยีนได้

- หมายถึง ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ไม่สามารถจับที่ยีนได้

จากนั้นจึงนำทั้ง 9 ยีนที่สามารถจับกับทั้งทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 และ YY1 มาค้นหาหน้าที่ และได้ทำการคัดเลือกยีน *NOP56* ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับ histonemethylation binding, cadherin binding ซึ่งน่าจะเป็นลักษณะของยีนด้านมะเร็งมาทำการทดลองต่อไป

### ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *E7* ของ เอชพีวี ไทป์ 16 ในเซลล์ที่ได้รับ การถ่ายโอนพลาสมิด

ผลจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *E7* ของเอชพีวีไทป์ 16 ในเซลล์ C33A และ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* และพลาสมิดเปล่า โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *E7* พบว่า ในเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* มีการแสดงออกของยีน *E7* และเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเปล่า ไม่มีการแสดงออกของยีน *E7* ซึ่ง PCR product ที่ได้จะมีขนาด 142 คู่เบส ดังรูปที่ 26 แสดงว่าการถ่ายโอนพลาสมิดนั้นประสบความสำเร็จ และสามารถนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปได้



รูปที่ 26 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *E7* ในเซลล์ C33A (a) และ HEK293 (b) ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* (*E7*) และพลาสมิดเปล่า (*Emp*) โดยใช้เซลล์ *SiHA* เป็น positive control และ *-ve* คือ negative control

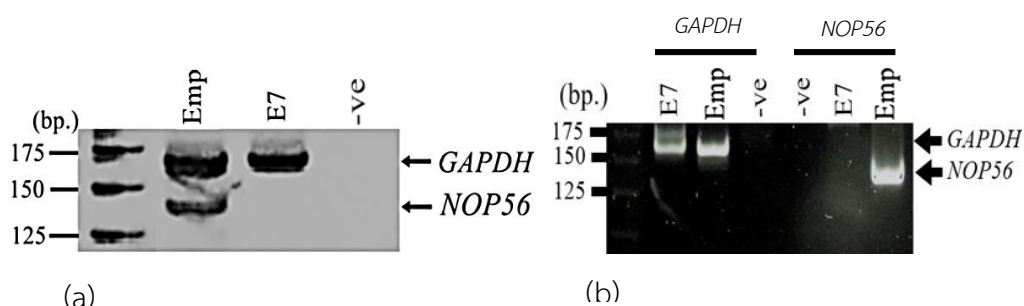
### ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *NOP56* และ *FAM189A1*

#### ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *NOP56*

ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *NOP56* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *NOP56* แล้วนำ PCR product ไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ในเซลล์ C33A และ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* ไม่มีการแสดงออกของยีน

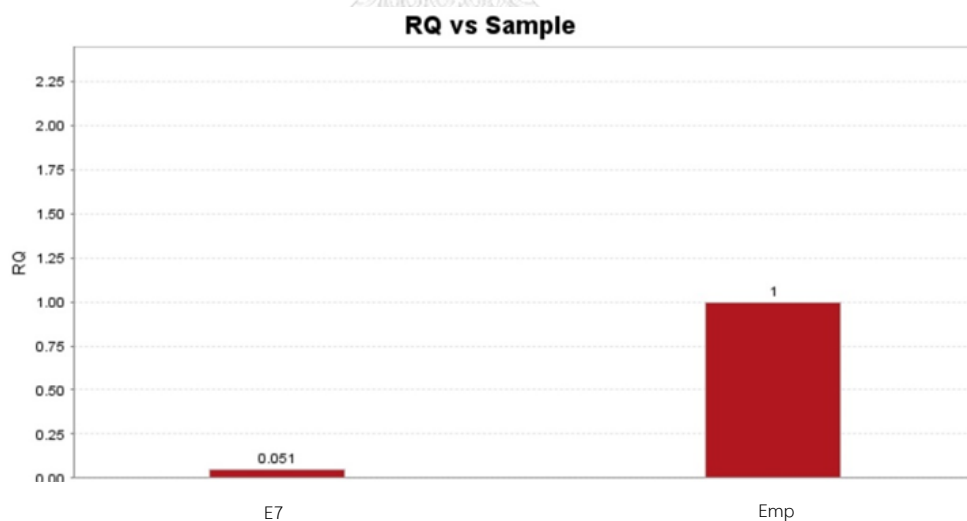


ในขณะที่เซลล์ C33A และ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเปล่ามีการแสดงออกของยีน โดยยีน *NOP56* จะมีขนาด เท่ากับ 136 คู่เบส และยีน *GAPDH* จะมีขนาด เท่ากับ 163 คู่เบส



**รูปที่ 27** ผลการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน *NOP56* ในเซลล์ C33A (a) และ เซลล์ HEK293 (b) ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด *E7* (E7) เทียบกับเซลล์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า (Emp)

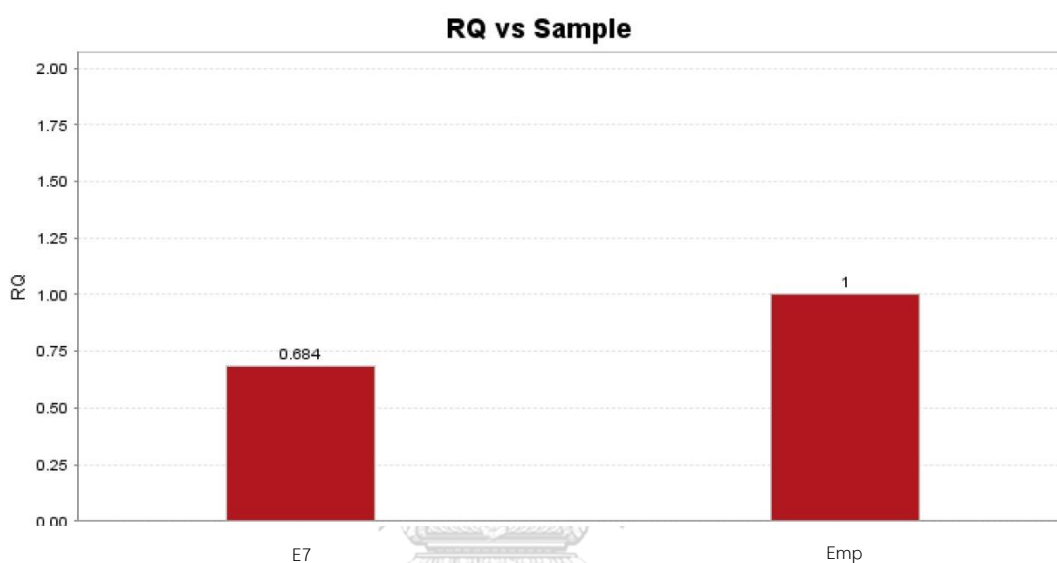
หลังจากนั้น ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NOP56* ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ cDNA ของเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* และพลาสมิดเปล่า ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *NOP56* พบว่า มีการแสดงออกของยีนลดลง ร้อยละ 94.9 ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับพลาสมิด *E7* เมื่อเปรียบเทียบกับ เซลล์ HEK293 ที่ได้รับพลาสมิดเปล่า ดังรูปที่ 28



**รูปที่ 28** กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน *NOP56* ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด *E7* (E7) เทียบกับ HEK293 ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า (Emp)

### ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *FAM189A1*

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *FAM189A1* ด้วยเทคนิค Real - time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *FAM189A1* และ cDNA ของเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด E7 และพลาสมิดเปล่า พบว่ายีน *FAM189A1* ในเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอน พลาสมิด E7 มีการแสดงออกของยีนที่ลดลงร้อยละ 31.6 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า โดยมีการแสดงออกของยีนลดลง ดังรูปที่ 29



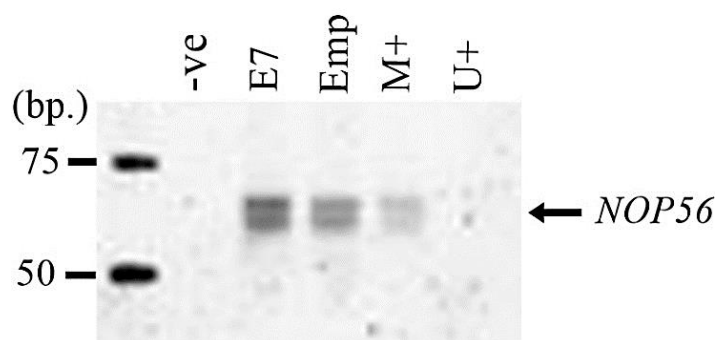
รูปที่ 29 กราฟแสดงระดับการแสดงออกของยีน *FAM189A1* ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด E7 (E7) เทียบกับ HEK293 ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า (Emp)

### จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* และยีน *FAM189A1*

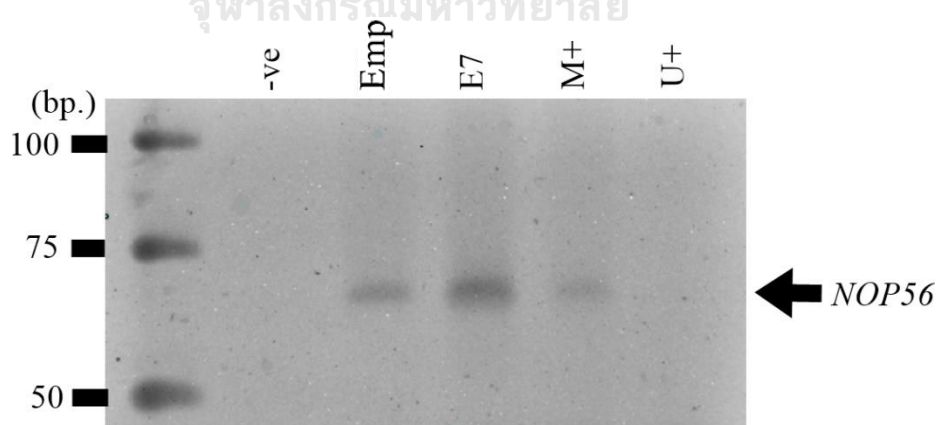
#### ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56*

ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันโดยใช้เทคนิค MSP บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* ซึ่งเป็นยีนที่คัดเลือกมาจากวิธีทางชีวสารสนเทศ ในเซลล์ C33A ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด E7 และ พลาสมิดเปล่า โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *NOP56* ที่ถูก methylated พบว่า ในเซลล์ C33A ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด E7 มีการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนมากกว่าเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า โดยตรวจสอบจากความเข้มของ methylated band ซึ่งมีขนาด PCR product เท่ากับ 64 คู่เบส ดังรูปที่ 30



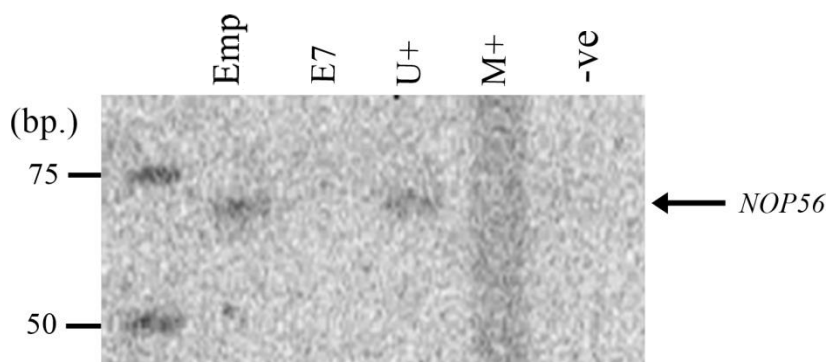
**รูปที่ 30** ผลการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* (E7) และพลาสมิดเปล่า (Emp) โดย M+ คือ methylation control (positive control), U+ คือ unmethylation control และ -ve คือ negative control

จากรูปที่ 30 จะเห็นได้ว่า ความเข้มของ methylated band ระหว่าง เซลล์ C33A ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* และพลาสมิดเปล่า มีความแตกต่างกันไม่ชัดเจน ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่เซลล์ C33A เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก ทำให้มีระดับการเกิดเมทิลเลชันมากกว่าในเซลล์ปกติ ถึงแม้จะไม่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* ก็ตาม ดังนั้น จึงนำ เซลล์ HEK293 ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ มาทำการเปรียบเทียบ methylation ระหว่าง เซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* และพลาสมิดเปล่า อีกครั้งหนึ่ง ซึ่งจากผลการตรวจสอบ พบว่า ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* มีการเกิดเมทิลเลชันมากกว่า เซลล์ HEK293 ที่ได้รับพลาสมิดเปล่า และมีความเข้มของ methylated band มากกว่าอย่างชัดเจน ซึ่ง PCR product มีขนาดเท่ากับ 64 คู่เบส ดังรูปที่ 31 ดังนั้นจึงใช้เซลล์ HEK293 เป็นตัวแทนของเซลล์ปกติสำหรับการศึกษาในการทดลองขั้นต่อไป



**รูปที่ 31** ผลการตรวจสอบ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* (E7) และพลาสมิดเปล่า (Emp) โดย M+ คือ methylation control (positive control), U+ คือ unmethylation control และ -ve คือ negative control

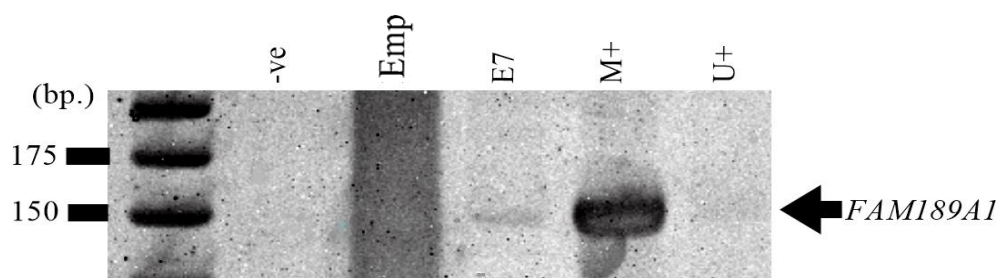
ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับ unmethylation ของยีน *NOP56* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *NOP56* ที่ถูก unmethylated พบว่า ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* และพลาสมิดเปล่า พบว่า มีการเกิด unmethylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีนในเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า และไม่พบในเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* โดยตรวจสอบได้จาก unmethylated band ที่เกิดขึ้น ซึ่งมีขนาด PCR product เท่ากับ 68 คู่เบส ดังรูปที่ 32



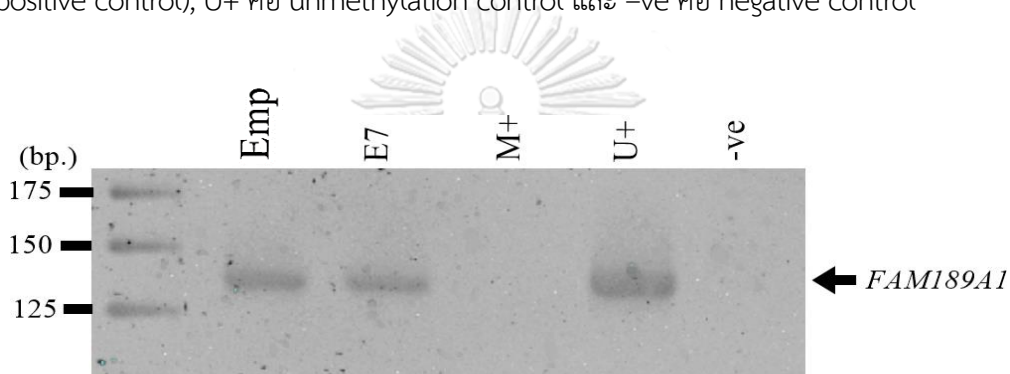
**รูปที่ 32** ผลการตรวจสอบ unmethylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* (*E7*) และพลาสมิดเปล่า (*Emp*) โดย *M+* คือ methylation control (positive control), *U+* คือ unmethylation control และ *-ve* คือ negative control

### ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1*

ผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันด้วยเทคนิค MSP บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1* ซึ่งเป็นยีนที่คัดเลือกมาจากวิธี ChIP-Seq โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *FAM189A1* ที่ถูก methylated และไม่ถูก methylated ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* และพลาสมิดเปล่า พบว่า ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* มีการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน ส่วนเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเปล่าไม่พบการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชัน ซึ่ง PCR product จะมีขนาดของ methylated band และ unmethylated band เท่ากับ 154 และ 143 คู่เบส ดังรูปที่ 33 และ รูปที่ 34



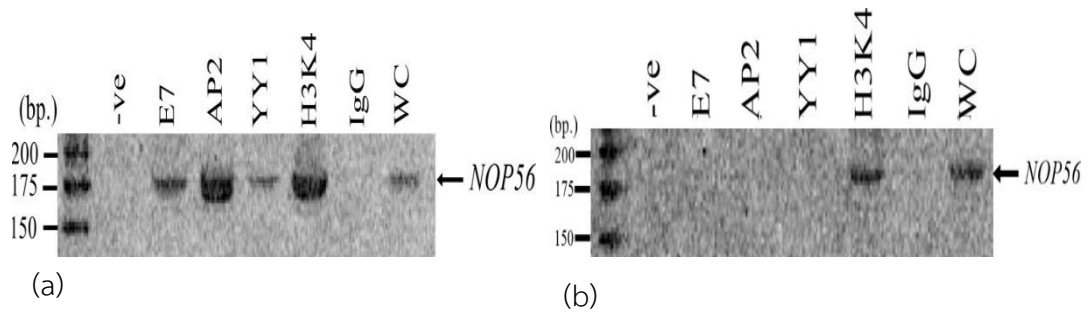
**รูปที่ 33** ผลการตรวจสอบ methylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1* ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* (*E7*) และพลาสมิดเปล่า (*Emp*) โดย *M+* คือ methylation control (positive control), *U+* คือ unmethylation control และ *-ve* คือ negative control



**รูปที่ 34** ผลการตรวจสอบ unmethylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1* ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* (*E7*) และ พลาสมิดเปล่า (*Emp*) โดย *M+* คือ methylation control (positive control), *U+* คือ unmethylation control และ *-ve* คือ negative control

#### ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรตีน *E7*, *AP2* และ *YY1* กับโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* และ *FAM189A1*

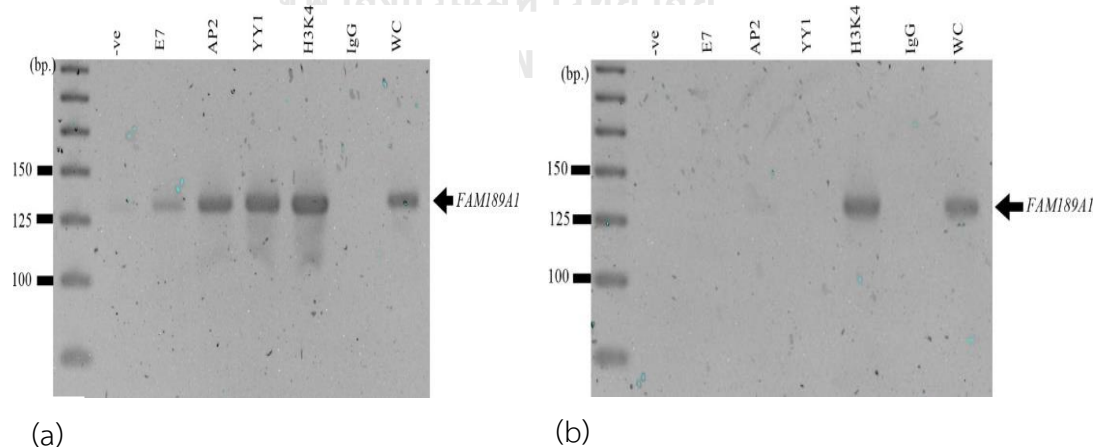
ผลการตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรตีน *E7*, *AP2* และ *YY1* กับโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* และ *FAM189A1* ด้วยการทำให้ทำ ChIP – PCR ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *E7* ของเอชพีวีไทป์ 16 และเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเปล่า เพื่อพิสูจน์ว่า โปรตีน *E7* โปรตีน *AP2* และ โปรตีน *YY1* สามารถจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* ได้ ด้วยการให้ HPV 16 *E7* antibody, *AP2* antibody และ *YY1* antibody ตกตะกอนคอมเพล็กซ์ของ *E7*, *AP2* และ *YY1* ที่จับกับดีเอ็นเอ โดยใช้ H3K4 antibody เป็น positive control และ normal mouse IgG เป็น isotype control antibody ผลการตรวจสอบพบว่าโปรตีน *E7* โปรตีน *AP2* และโปรตีน *YY1* สามารถจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* (ดังรูปที่ 35) และยีน *FAM189A1* (ดังรูปที่ 36)



**รูปที่ 35** ผลการทำ CHIP - PCR ของยีน *NOP56* ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายไอออนพลาสมิด *E7* (a) และพลาสมิดเปล่า (b)

โดย

- *E7* คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน *E7*
- *AP2* คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน *AP2*
- *YY1* คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน *YY1*
- *H3K4* คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน *H3K4*
- *IgG* คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน *IgG*
- *Input* คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293
- *-ve* คือ negative control



**รูปที่ 36** ผลการทำ CHIP - PCR ของยีน *FAM189A1* ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายไอออนพลาสมิด *E7* (a) และ พลาสมิดเปล่า (b)

โดย

- E7 คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน E7
- AP2 คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน AP2
- YY1 คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน YY1
- H3K4 คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน H3K4
- IgG คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293 ที่ถูกตกตะกอนด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน IgG
- Input คือ ดีเอ็นเอจาก HEK293
- -ve คือ negative control



## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### อภิปรายผลการวิจัย

สาเหตุสำคัญของมะเร็งปากมดลูก เกิดจากการติดเชื้อเอชพีวี โดยโปรตีน E7 ของเอชพีวี คือหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการทำให้การเกิดมะเร็งปากมดลูกและพัฒนาเพิ่มขึ้นได้ และมีงานวิจัยจำนวนมากที่รายงานว่า โปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 สามารถทำให้เกิดไฮเปอร์เมทิลเลชันของยีนต้านมะเร็งได้ เช่น สามารถจับกับเอนไซม์ Dnmt1 (Burgers, Blanchon, Pradhan *et al.*, 2007) และเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ Dnmt1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ดําเนินการเกิดเมทิลเลชันภายในเซลล์ (Laurson, Khan, Chung *et al.*, 2010) นอกจากนี้ โปรตีน E7 ที่จับกับเอนไซม์ Dnmt1 ยังสามารถจับกับโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นยีนต้านมะเร็ง แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันและลดการแสดงออกของยีน (Chalertpet, Pakdeechaidan, Patel *et al.*, 2015) และยังมีรายงานพบว่าโปรตีน E7 สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 และ YY1 แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน *FOXC1* ซึ่งอาจจะเป็นยีนต้านมะเร็งในอนาคตได้ (นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2017)

จากงานศึกษาวิจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้วนั้น จึงนำมาสู่การศึกษานี้ เพื่อมุ่งเน้นในการหา ยีนอื่นๆ โดยเฉพาะยีนในกลุ่มยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) ที่สามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันและลดการแสดงออกโดยโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และศึกษากลไกของการเกิดเมทิลเลชันที่เกิดจากโปรตีน E7 ซึ่งจะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล ในการตรวจคัดกรองและวินิจฉัยโรคมะเร็งปากมดลูกให้มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น รวมทั้งเป็นจุดเริ่มต้นของการออกแบบวิธีการรักษามะเร็งปากมดลูกในรูปแบบใหม่ๆ เช่น การทำ gene therapy หรือการคิดค้นยารักษามะเร็งปากมดลูก เป็นต้น โดยการศึกษาเริ่มจากการค้นหายีนที่โปรตีน E7 จากเอชพีวีไทป์ 16 สามารถจับได้ ด้วย 2 วิธีการ ได้แก่ Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) และวิธีการชีวสารสนเทศ ซึ่งจากการค้นหายีนด้วยวิธี ChIP - Seq โดยการใช้เซลล์ C33A ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี มาทำการถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และ พลาสมิดเปล่าเพื่อเป็นชุดควบคุมลบ มาทำการตกตะกอนดีเอ็นเอที่โปรตีน E7 สามารถจับได้ ด้วยวิธี Chromatin immunoprecipitation (ChIP) โดยใช้ antibody ดังต่อไปนี้ 1. E7 HPV16 antibody สำหรับตกตะกอนคอมเพลกซ์ของ DNA - E7 2. H3K9 antibody เป็น positive control เพื่อยืนยันการมีประสิทธิภาพของขั้นตอนการทำ immunoprecipitation 3. HIS antibody สำหรับยืนยัน



การตกตะกอนของโปรตีน E7 เนื่องจากในพลาสมิดลูกผสมที่มียีน E7 นั้น ยีน E7 จะต่ออยู่กับ 6X-HIS motif ดังนั้น จึงควรจะตกตะกอนคอมเพล็กซ์ของ DNA - HIS ได้เช่นกันในเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม E7 และ 4. IgG สำหรับใช้เป็น isotope ของ E7 HPV16 antibody, H3K9 antibody และ HIS antibody เนื่องจาก antibody อาจมีความไม่จำเพาะในการจับกับ antigen เป้าหมาย (non specific - binding) ดังนั้น การใช้ IgG antibody ตกตะกอนด้วยจะสามารถบอกรหัส background ของการจับไม่จำเพาะของ antibody ได้ หลังจากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ CHIP มาตรวจสอบความสำเร็จของการทำ CHIP ด้วยการนำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน CCNA1 เนื่องจาก CCNA1 เป็นยีนที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าโปรตีน E7 ของเอชพีวีไพบี 16 สามารถจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน แล้วเหนี่ยวนำให้ CCNA1 เกิดเมทิลเลชันได้ (Chalertpet, Pakdeechaidan, Patel *et al.*, 2015) ซึ่งผลที่ได้ พบว่าเกิด CCNA1 band ในเซลล์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด E7 ที่ถูกตกตะกอนด้วย E7 HPV16 antibody, HIS antibody และ H3K9 antibody แสดงว่า โปรตีน E7 จับที่ดีเอ็นเอจริง ในขณะที่เซลล์ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่าและถูกตกตะกอนด้วย E7 HPV16 antibody, และ HIS antibody ไม่มี CCNA1 band ขึ้น เนื่องจากไม่มียีน E7 ในระบบ แสดงว่าการทำ CHIP ประสบความสำเร็จและดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปทำ CHIP - Seq ต่อได้ จากนั้นจึงส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Qubit® ซึ่งเป็นเครื่องวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่มีความแม่นยำสูง เนื่องจากใช้หลักการของการตรวจวัดสี (dye) ที่ผสมกับตัวอย่างซึ่งจะมีคุณสมบัติจับอย่างจำเพาะกับโมเลกุลของดีเอ็นเอเท่านั้น ทำให้ได้ค่าที่แม่นยำ และผลที่ได้จากการวัดพบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอของเซลล์ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสม E7 และตกตะกอนด้วย E7 antibody มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.778 ng/ul และ เซลล์ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า มีความเข้มข้น เท่ากับ 0.441 ng/ul ซึ่งไม่เพียงพอต่อการทำ CHIP - Seq เนื่องจากต้องใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นปริมาณอย่างน้อย 200 ng จึงจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอก่อน

การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอใช้ Seq plex Enhanced DNA amplification kit ซึ่งเป็นชุดคิดสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการทำ CHIP - Seq โดยเฉพาะ หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว ได้ทำการตรวจสอบด้วยการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Qubit® พบว่าดีเอ็นเอที่ถูกตกตะกอนด้วย E7 antibody จากเซลล์ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด E7 มีความเข้มข้น เท่ากับ 125 ng/ul และ จากเซลล์ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า มีความเข้มข้นเท่ากับ 153 ng/ul ซึ่งเมื่อคำนวณปริมาณดีเอ็นเอแล้ว เพียงพอต่อการทำ CHIP-Seq analysis

สำหรับการทำ CHIP-Seq ได้ส่งบริษัท BGI ซึ่งเป็นบริษัทที่ทำ CHIP-Seq โดยทางบริษัทได้ทำการตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ส่งไปอีกครั้ง พบว่า ความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากเซลล์ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด E7 เท่ากับ 25.4 ng/ul เซลล์ C33A ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า เท่ากับ 21.8 ng/ul ซึ่งเพียงพอต่อการทำ CHIP-Seq และ ดีเอ็นเอมีคุณภาพอยู่ในระดับ A

หรือดีเยี่ยม ผลจากการทำ ChIP-Seq พบว่า มีชิ้นส่วนโครมาติน 10 ชิ้นส่วนซึ่งตั้งอยู่บนตำแหน่งบนโครโมโซมต่างๆ ที่สามารถจับกับโปรตีน E7 ได้ หลังจากนั้นได้ทำการวิเคราะห์หาชิ้นที่ตั้งอยู่ในตำแหน่งดังกล่าว พบว่า มีชิ้นส่วนโครมาตินเพียง 3 ชิ้นส่วนที่ตั้งอยู่ในตำแหน่ง coding ซึ่งอยู่ในตำแหน่งของยีน *FAM189A1*, *ASAH2B*, และ *RAPGEF4*

สาเหตุของการพบยีนเพียง 3 ยีน และไม่พบยีน *CCNA1* ซึ่งเป็นยีนที่สามารถจับกับโปรตีน E7 ได้ อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ชุดคิท Seq Plex Enhanced DNA Amplification Kit ที่ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ 1. ขั้น Pre - amplification 2. ขั้น amplification และ 3. ขั้น Primer Removal ในขั้นตอนของ Pre - amplification และ amplification นั้น จะใช้ไพรเมอร์ที่เป็น universal 5'-end และ universal end ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งไพรเมอร์ที่เป็น universal นี้ อาจจะสามารถจับกับยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ซึ่งได้ถูกถ่ายโอนเข้าไปในเซลล์ในขั้นตอนของการถ่ายโอนพลาสมิด แล้วสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอหลังจากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่ตรงกับดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการทำ ChIP ซึ่งสอดคล้องกับผลวิเคราะห์จากบริษัท BGI ที่ทำ ChIP - Seq ซึ่งรายงานว่ายีนดีเอ็นเอหลังจากการทำ sequencing พบว่าตรงกับจีโนมมนุษย์เพียงร้อยละ 10 เท่านั้น ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าดีเอ็นเอร้อยละ 90 ที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอของมนุษย์อาจจะเป็นยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ได้

หลังจากนั้นได้ทำการคัดเลือกยีนที่ได้จากการทำ ChIP - Seq มาจำนวน 1 ยีน คือ ยีน *FAM189A1* ซึ่งมีรายงานว่า การกลายพันธุ์ของยีน *FAM189A1* มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว (Chen, Bartenhagen, Gombert *et al.*, 2013) และพบว่ามี การแสดงออกของยีนที่ลดลงในผู้ป่วยโรคโครห์น (Crohn's Disease) (Hong, Joung, Bae *et al.*, 2017) ซึ่งเป็นโรคลำไส้อักเสบเรื้อรังชนิดหนึ่ง และมีความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งลำไส้ได้ มาทำการทดสอบต่อไป

ในส่วนการค้นหายีนด้วยวิธีการทางชีวสารสนเทศ ซึ่งเริ่มจากการค้นหาลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 ด้วยโปรแกรม Jaspar โดยการค้นหาทรานสคริปชันแฟคเตอร์ที่สามารถจับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* จากนั้นจึงดูลำดับเบสที่ทรานสคริปชันแฟคเตอร์จับ โดยกำหนดค่า Relative profile score threshold ที่ร้อยละ 99 พบทรานสคริปชันแฟคเตอร์ 2 ชนิดที่สามารถจับกับ *CCNA1* ได้ โดยหนึ่งในนั้น คือ ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 ซึ่งจับกับลำดับเบส 5 -'GCCCCGAGGG-3' บริเวณโปรโมเตอร์ของ *CCNA1* จากนั้นนำลำดับเบส 5 -'GCCCCGAGGG-3' ไปค้นหาในฐานข้อมูลจีโนมมนุษย์ โดยใช้โปรแกรม Ensembl เพื่อค้นหายีนที่มีลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ตรงกับลำดับเบสของยีน *CCNA1* ที่ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 สามารถจับได้ พบว่ามี 687 ยีน หลังจากนั้นนำ gene ID ทั้ง 687 ยีน มาดูหน้าที่ของโปรตีนที่สร้างจากแต่ละยีนโดยโปรแกรม pantherdb แล้วจึงคัดเลือกยีนที่มีหน้าที่

คล้ายกับยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) เช่น เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวกับ cell adhesion molecule, biological regulation, immune system process, cell junction protein, transcription factor เป็นต้น คัดเลือกได้ทั้งหมด 129 ยีน แล้วจึงคัดเลือกยีนที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 ที่ได้จาก 129 ยีน โดยใช้ 2 โปรแกรม ได้แก่ promo ซึ่งกำหนดค่า Maximum matrix dissimilarity rate ที่ร้อยละ 1 ได้ผลลัพธ์ทั้งหมด 129 ยีน และโปรแกรม jasper โดยกำหนดค่า Relative profile score threshold ที่ร้อยละ 99 ได้ผลลัพธ์ทั้งหมด 19 ยีน จากนั้นคัดเลือกยีนที่ทั้ง 2 โปรแกรมทำนายตรงกัน ได้ผลลัพธ์ทั้งหมด 19 ยีน แล้วจึงคัดเลือกยีนที่สามารถจับกับทรานสคริปชันแฟกเตอร์ YY1 จากทั้ง 19 ยีน ด้วยโปรแกรม epd.vital ได้ผลลัพธ์ทั้งหมด 9 ยีน ได้แก่ *NOP56*, *MAG*, *FUS*, *EIF2S2*, *RPL7*, *RPL10*, *NINJ1*, *LGALS1*, *CLDN5* จึงทำการสุ่มเลือกยีน *NOP56* ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับ histonemethylation binding และ cadherin binding ซึ่งน่าจะเป็นลักษณะของยีนต้านมะเร็งมาทำการทดลองต่อไป

อย่างไรก็ตาม จากผลการค้นหาโดย 2 วิธี คือ ChIP-Seq และวิธีการทางชีวสารสนเทศ ได้ยีนที่เป็นผลลัพธ์ไม่ตรงกัน กล่าวคือ การค้นหาโดยวิธี ChIP-Seq ได้ผลลัพธ์ คือ ยีน *FAM189A1*, *ASAH2B*, และ *RAPGEF4* ส่วนการค้นหาทางชีวสารสนเทศ ได้ผลลัพธ์ คือ ยีน *NOP56*, *MAG*, *FUS*, *EIF2S2*, *RPL7*, *RPL10*, *NINJ1*, *LGALS1*, *CLDN5* สาเหตุที่ผลลัพธ์ไม่ตรงกัน เนื่องจากทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 ซึ่งจะจับกับโปรตีน E7 แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันโดยการลงมาจับที่โปรโมเตอร์ของยีน (นันทน์ภัส วงศ์มณี, 2017) นั้น มีความจำเพาะกับหลายลำดับเบส กล่าวคือ ยีน *FAM189A1* ทรานสคริปชันแฟกเตอร์ AP2 จะจับที่ลำดับเบส 5'-CCAGGA-3' (โปรแกรม promo ค่า Maximum matrix dissimilarity rate ร้อยละ 1) ในขณะที่การค้นหาทางชีวสารสนเทศ ใช้ลำดับเบส 5'-GCCCGAGGG-3' ในการค้นหา จึงทำให้ผลลัพธ์จากทั้ง 2 วิธีไม่ตรงกัน

หลังจากที่ได้ทำการคัดเลือกยีน *FAM189A1* จากวิธี ChIP - Seq และ ยีน *NOP56* จากวิธีทางชีวสารสนเทศแล้ว จึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิลเลชันของยีน และพิสูจน์การจับกันระหว่างโปรตีน E7, AP2 และ YY1 กับโปรโมเตอร์ของยีน โดยเริ่มจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ในเซลล์ C33A และ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด E7 และพลาสมิดเปล่า พบว่า ในเซลล์ C33A และ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด E7 มีการแสดงออกของยีน E7 และเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า ไม่มีการแสดงออกของยีน E7 แสดงว่า การถ่ายโอนพลาสมิดนั้นประสบความสำเร็จ และสามารถนำไปใช้ในการทดลองต่อไปได้ จากนั้นทำการเก็บเซลล์ เพื่อทำการสกัดอาร์เอ็นเอ ดีเอ็นเอ และทำ ChIP โดยผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *NOP56* โดยวิธี PCR และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเซลล์ C33A และ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด E7 และ พลาสมิด-

เปล่า พบว่า ทั้งในเซลล์ C33A และ เซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* ยีน *NOP56* ไม่มีการแสดงออก แต่มีการแสดงออกในเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเปล่า ในขณะที่เดียวกันได้ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันของยีน *NOP56* ในเซลล์ C33A และ HEK293 ด้วยเทคนิค MSP พบว่าเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* มีการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนมากกว่าเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า ซึ่งในเซลล์ HEK293 มีความแตกต่างของความเข้มของ methylated band ในเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* มากกว่าอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า แสดงว่ามีการเกิดเมทิลเลชันมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ C33A ซึ่งความเข้มของ methylated band ระหว่างเซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* และพลาสมิดเปล่า แตกต่างกันน้อย แสดงว่ามีความแตกต่างของระดับการเกิดเมทิลเลชันระหว่างเซลล์ที่มีและไม่มี *E7* ไม่มาก ทั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ C33A ที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี 16 และไม่มียีน *E7* อยู่ภายในเซลล์จะมีการเกิดเมทิลเลชันของยีนในระดับสูงอยู่แล้ว เนื่องจาก C33A เป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูก ซึ่งอาจจะมีเมทิลเลชันสูงกว่าในเซลล์ปกติ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป จึงใช้เซลล์ HEK293 เพียงอย่างเดียวในการทดสอบ เนื่องจากเป็นเซลล์ปกติที่ไม่มีการติดเชื้อเอชพีวี ซึ่งน่าจะเป็นตัวแทนของเซลล์ปกติได้ดีกว่า อันเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ซึ่งมุ่งเน้นในการตรวจสอบความแตกต่างของระดับเมทิลเลชัน การแสดงออกของยีน และกลไกการเกิดเมทิลเลชันระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์ที่กำลังจะพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งหรือเซลล์มะเร็ง เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในระยะก่อนเป็นมะเร็งหรือมะเร็งในระยะต้นให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NOP56* และ *FAM189A1* ด้วยเทคนิค Real - time PCR โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ HEK293 ที่ได้รับพลาสมิด *E7* และพลาสมิดเปล่า พบว่า ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับพลาสมิด *E7* ยีน *NOP56* มีการแสดงออกของยีนลดลงร้อยละ 94.9 และ ยีน *FAM189A1* มีการแสดงออกของยีนลดลงร้อยละ 31.6 จากนั้นจึงทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของระดับเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1* พบว่า ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับพลาสมิด *E7* มีการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีน ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเปล่าไม่เกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชัน ซึ่งจากการตรวจสอบการแสดงออกและการเปลี่ยนแปลงระดับการเกิดเมทิลเลชันของยีน *NOP56* และยีน *FAM189A1* พบว่าการแสดงออกของยีน *NOP56* มีระดับลดลงมากกว่ายีน *FAM189A1* ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับยีน *E7* ในขณะที่ระดับการเปลี่ยนแปลงเมทิลเลชันของทั้ง 2 ยีนไม่แตกต่างกันมากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีหลายสาเหตุที่สามารถทำให้ยีนลดการแสดงออกได้นอกเหนือจากการเกิดเมทิลเลชัน เช่น การดัดแปลงฮิสโตน หรือการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของโครมาติน เป็นต้น จึงทำให้ยีน *NOP56* มีการแสดงออกที่ลดลงมากกว่ายีน *FAM189A1* แม้ระดับเมทิลเลชันจะไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ผลการแสดงออกและ

การเปลี่ยนแปลงระดับการเกิดเมทิลเลชันก็มีความสอดคล้องกัน คือ เซลล์ที่ได้รับยีน *E7* จะมีการเกิดเมทิลเลชันที่เพิ่มขึ้นและมีการแสดงออกของยีนที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับยีน *E7* ดังนั้น ยีน *E7* ของเอชพีวีไทม์ 16 จึงน่าจะมียีนที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดเมทิลเลชันและลดการแสดงออกของยีน *NOP56* และยีน *FAM189A1*

ในขั้นตอนสุดท้ายคือการศึกษากลไกการชักนำให้เกิดเมทิลเลชันของยีน *NOP56* และยีน *FAM189A1* โดยยีน *E7* ของเอชพีวีไทม์ 16 โดยทำการตรวจสอบการจับกันระหว่างโปรตีน *E7*, *AP2* และ *YY1* กับโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* และ *FAM189A1* ด้วยวิธี CHIP – PCR ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *E7* ของเอชพีวีไทม์ 16 และเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดเปล่า เพื่อพิสูจน์ว่า โปรตีน *E7*, โปรตีน *AP2* และ โปรตีน *YY1* สามารถจับกับบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* ได้ ด้วยการใช้ HPV 16 *E7* antibody, *AP2* antibody และ *YY1* antibody ตกตะกอนคอมเพล็กซ์ของ *E7*, *AP2* และ *YY1* ที่จับกับดีเอ็นเอ โดยใช้ H3K4 antibody เป็น positive control และ IgG antibody เป็น isotype control antibody ผลการตรวจสอบพบว่า เกิด *NOP56* band และ *FAM189A1* band ในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด *E7* แล้วถูกตกตะกอนด้วย HPV 16 *E7* antibody, *AP2* antibody และ *YY1* antibody แต่ไม่พบในเซลล์ HEK293 ที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิดเปล่า แสดงว่าคอมเพล็กซ์ของโปรตีน *E7*, *AP2* และ *YY1* สามารถจับที่โปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* และยีน *FAM189A1* ในเซลล์ที่มี *E7* เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบ *NOP56* band และ *FAM189A1* band ในเซลล์ HEK293 ที่ถูกถ่ายโอนพลาสมิด *E7* และพลาสมิดเปล่า แล้วถูกตกตะกอนด้วย H3K4 antibody แสดงว่าการตกตะกอนในขั้นตอน immunoprecipitation มีประสิทธิภาพ ในส่วนของการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย IgG antibody ซึ่งเป็น Isotope control ของ *E7*, *AP2*, *YY1*, และ H3K4 ไม่พบ *NOP56* band และ *FAM189A1* band แสดงว่า antibody ที่ใช้ในการตกตะกอนมีความจำเพาะต่อ antigen นอกจากนี้ยังใช้ input DNA ในการทำ PCR เพื่อเป็น positive control เนื่องจาก input DNA ประกอบด้วยโครมาตินทั้งหมด ดังนั้นจึงควรมียีน *NOP56* และ *FAM189A1* อยู่ด้วย ซึ่งเมื่อตรวจสอบ band แล้วก็พบ band ของทั้ง 2 ยีนนี้เช่นกัน ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า โปรตีน *E7* ของเอชพีวีไทม์ 16 สามารถเหนี่ยวนำให้ยีน *NOP56* และยีน *FAM189A1* เกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันได้ ด้วยการจับกับทรานสคริปชันแฟคเตอร์ *AP2* และ *YY1* จากนั้นคอมเพล็กซ์ของโปรตีน *E7*, *AP2* และ *YY1* จึงลงมาจับที่โปรโมเตอร์ของยีน *NOP56* และยีน *FAM189A1* แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณ โปรโมเตอร์ของยีน ส่งผลให้ยีน *NOP56* และยีน *FAM189A1* มีการแสดงออกของยีนลดลง ซึ่งจากผลการศึกษาจะสามารคนำยีนดังกล่าวไปพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจคัดกรองและวินิจฉัยโรคมะเร็งปากมดลูกที่มีสาเหตุมาจากเอชพีวีให้มีความถูกต้องแม่นยำ รวมทั้งอาจเป็นจุดเริ่มต้นของการทำ gene therapy เพื่อรักษามะเร็งปากมดลูกในอนาคตได้

## สรุปผลการวิจัย

จากการค้นหาฮินที่โปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเมทิลเลชันได้ ด้วย 2 วิธีการ คือ 1. CHIP - seq โดยการใช้ E7 HPV16 antibody ตกตะกอนคอมเพลกซ์ของ DNA ที่สามารถจับกับโปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ได้ ด้วยวิธี CHIP จากนั้นทำการ sequencing พบยีนทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ ยีน *FAM189A1*, *ASAH2B*, และ *RAPGEF4* และ 2. วิธีทางชีวสารสนเทศ โดยการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ที่ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 จับได้ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบไปค้นหาฮินอื่นๆ ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์เหมือนกันในฐานข้อมูลจีโนมมนุษย์ แล้วทำการคัดเลือกฮินที่สามารถจับได้ทั้งทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 และ YY1 พบทั้งหมด 9 ยีน ได้แก่ *NOP56*, *MAG*, *FUS*, *EIF2S2*, *RPL7*, *RPL10*, *NINJ1*, *LGALS1*, *CLDN5* หลังจากนั้นทำการเลือกฮินในแต่ละวิธีมา 1 ยีน คือยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* เพื่อทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน การเกิดเมทิลเลชัน ในเซลล์ที่ได้รับและไม่ได้รับฮิน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 และพิสูจน์การจับกันระหว่างโปรตีน E7 กับยีน

ผลการตรวจสอบยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* พบว่า ในเซลล์ที่ได้รับฮิน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 จะมีการแสดงออกของยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับฮิน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 ซึ่งสอดคล้องกับระดับการเปลี่ยนแปลงเมทิลเลชัน ซึ่งมีระดับที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่ได้รับฮิน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 นอกจากนี้เมื่อทำการพิสูจน์การจับกันระหว่างโปรตีน E7 กับยีนเพื่อศึกษากลไกของโปรตีน E7 ในการชักนำให้เกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีนด้วยวิธี CHIP ก็พบว่าโปรตีน E7 สามารถจับกับโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* ได้ นอกจากนี้ ยังพบว่าทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 และ YY1 สามารถจับกับโปรโมเตอร์ของยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* ได้เฉพาะในเซลล์ที่ได้รับฮิน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 เท่านั้น ดังนั้น จึงเป็นการยืนยันได้ว่า โปรตีน E7 ของเอชพีวีไทป์ 16 สามารถเหนี่ยวนำให้ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ AP2 และ YY1 ลงมาจับที่โปรโมเตอร์ของยีน โดยอาจจับกันเป็นคอมเพลกซ์ของโปรตีน E7, AP2 และ YY1 แล้วจึงลงมาจับที่โปรโมเตอร์ของยีน จากนั้นจึงชักนำให้เกิดเมทิลเลชันและลดการแสดงออกของยีน *FAM189A1* และยีน *NOP56* ในที่สุด

## บรรณานุกรม

- นันทน์ภัส วงศ์มณี. 2560. การระบุโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับเอชพีวีไพบ์ 16 อี 7 และบทบาทในการเกิดมะเร็งปากมดลูก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มงคล เบญจาทิบาล. 2551. แนวทางการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในปัจจุบัน (Cervical Cancer). ใน Optimizing Outcome with Family Medicine, หน้า 112-119.
- วัชรพงศ์ ภักดีชายแดน. 2010. เมทิลเลชันของยีน CCNA1 ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูกที่ถูก ทรานส์เฟกต์ด้วยยีน E7 ของ Human papillomavirus ชนิด 16. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., and Thanos, D. 2000. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. Cell 103(4): 667-678.
- American Cancer Society. Early History of Cancer. [online]. 2018. Available from [https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what\\_is\\_cancer.html](https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer/what_is_cancer.html) [2018, October 12]
- Agency for Health Care Policy and Research. 1999. Evaluation of cervical cytology. Evid Rep Technol Assess 5 : 110.
- Anderson, M. W. and Schrijver, I. 2010. Next generation DNA sequencing and the future of genomic medicine. Genes (Basel) 1(1): 38-69.
- Bosch, F. X., Lorincz, A., Munoz, N., Meijer, C. J., and Shah, K. V. 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J Clin Pathol 55(4): 244-265.
- Brentnall, A. R., Vasiljevic, N., Scibior-Bentkowska, D., Cadman, L., Austin, J., Cuzick, J., et al. 2015. HPV33 DNA methylation measurement improves cervical pre-cancer risk estimation of an HPV16, HPV18, HPV31 and \textit{EPB41L3} methylation classifier. Cancer Biomark 15(5): 669-675.
- Burgers, W. A., Blanchon, L., Pradhan, S., de Launoit, Y., Kouzarides, T., and Fuks, F. 2007. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases. Oncogene 26(11):

1650-1655.

- Bzhalava, D., Guan, P., Franceschi, S., Dillner, J., and Clifford, G. 2013. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology* 445(1-2): 224-231.
- Chalertpet, K., Pakdeechaidan, W., Patel, V., Mutirangura, A., and Yanatatsaneejit, P. 2015. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein mediates CCNA1 promoter methylation. *Cancer Sci* 106(10): 1333-1340.
- Chen, C., Bartenhagen, C., Gombert, M., Okpanyi, V., Binder, V., Rottgers, S., et al. 2013. Next-generation-sequencing-based risk stratification and identification of new genes involved in structural and sequence variations in near haploid lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 52(6): 564-579.
- Collas, P. 2010. The current state of chromatin immunoprecipitation. *Mol Biotechnol* 45(1): 87-100.
- Dupont, C., Armant, D. R., and Brenner, C. A. 2009. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med* 27(5): 351-357.
- Eijsink, J. J., Lendvai, A., Deregowski, V., Klip, H. G., Verpooten, G., Dehaspe, L., et al. 2012. A four-gene methylation marker panel as triage test in high-risk human papillomavirus positive patients. *Int J Cancer* 130(8): 1861-1869.
- Finocchiaro-Kessler, S., Wexler, C., Maloba, M., Mabachi, N., Ndikum-Moffor, F., and Bukusi, E. 2016. Cervical cancer prevention and treatment research in Africa: a systematic review from a public health perspective. *BMC Womens Health* 16: 29.
- Fraga, M. F. and Esteller, M. 2002. DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 33(3): 632, 634, 636-649.
- Giarre, M., Caldeira, S., Malanchi, I., Ciccolini, F., Leao, M. J., and Tommasino, M. 2001. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16 INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J Virol* 75(10): 4705-4712.
- Gilmour, D. S. and Lis, J. T. 1985. In vivo interactions of RNA polymerase II with genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 5(8): 2009-2018.
- Graham, S. V. 2010. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects



- for novel diagnostic methods and antiviral therapies. Future Microbiol 5(10): 1493-1506.
- Graham, S. V. 2017. Keratinocyte Differentiation-Dependent Human Papillomavirus Gene Regulation. Viruses 9(9).
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. Cell 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144(5): 646-674.
- Hasan, U. A., Zannetti, C., Parroche, P., Goutagny, N., Malfroy, M., Roblot, G., et al. 2013. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. J Exp Med 210(7): 1369-1387.
- He, C., Mao, D., Hua, G., Lv, X., Chen, X., Angeletti, P. C., et al. 2015. The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. EMBO Mol Med 7(11): 1426-1449.
- Hengstermann, A., Linares, L. K., Ciechanover, A., Whitaker, N. J., and Scheffner, M. 2001. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 98(3): 1218-1223.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., and Baylin, S. B. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A 93(18): 9821-9826.
- Hong, S. N., Joung, J. G., Bae, J. S., Lee, C. S., Koo, J. S., Park, S. J., et al. 2017. RNA-seq Reveals Transcriptomic Differences in Inflamed and Noninflamed Intestinal Mucosa of Crohn's Disease Patients Compared with Normal Mucosa of Healthy Controls. Inflamm Bowel Dis 23(7): 1098-1108.
- Kim, J. K., Samaranayake, M., and Pradhan, S. 2009. Epigenetic mechanisms in mammals. Cell Mol Life Sci 66(4): 596-612.
- Kitkumthorn, N., Yanatatsanajit, P., Kiatpongsan, S., Phokaew, C., Triratanachat, S., Trivijitsilp, P., et al. 2006. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. BMC Cancer 6: 55.
- Kjaer, S. K., Frederiksen, K., Munk, C., and Iftner, T. 2010. Long-term absolute risk of

- cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. J Natl Cancer Inst 102(19): 1478-1488.
- Klose, R. J. and Bird, A. P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends Biochem Sci 31(2): 89-97.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., and Savage, E. A. 1993. Essentials of Genetics: Macmillan.
- Lace, M. J., Anson, J. R., Turek, L. P., and Haugen, T. H. 2008. Functional mapping of the human papillomavirus type 16 E1 cistron. J Virol 82(21): 10724-10734.
- Laurson, J., Khan, S., Chung, R., Cross, K., and Raj, K. 2010. Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. Carcinogenesis 31(5): 918-926.
- Lechner, M., Fenton, T., West, J., Wilson, G., Feber, A., Henderson, S., et al. 2013. Identification and functional validation of HPV-mediated hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. Genome Med 5(2): 15.
- Li, L., Xu, C., Long, J., Shen, D., Zhou, W., Zhou, Q., et al. 2015. E6 and E7 gene silencing results in decreased methylation of tumor suppressor genes and induces phenotype transformation of human cervical carcinoma cell lines. Oncotarget 6(27): 23930-23943.
- Liao, S., Deng, D., Zhang, W., Hu, X., Wang, W., Wang, H., et al. 2013. Human papillomavirus 16/18 E5 promotes cervical cancer cell proliferation, migration and invasion in vitro and accelerates tumor growth in vivo. Oncol Rep 29(1): 95-102.
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., et al. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature 462(7271): 315-322.
- Mantovani, F. and Banks, L. 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. Oncogene 20(54): 7874-7887.
- McLaughlin-Drubin, M. E., Huh, K. W., and Munger, K. 2008. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. J Virol 82(17): 8695-8705.
- Mills, K. I. and Ramsahoye, B. H. 2002. DNA methylation protocols. Overview. Methods Mol Biol 200: 1-7.
- Motulsky, H. 2007. Graphpadn PRISM version 5.0 Regression Guide. President GraphPad

Software Inc : 1-294.

- Muller-Tidow, C., Ji, P., Diederichs, S., Potratz, J., Baumer, N., Kohler, G., et al. 2004. The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair. Mol Cell Biol 24(20): 8917-8928.
- Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., et al. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 348(6): 518-527.
- Nakato, R. and Shirahige K. 2017. Recent advances in ChIP-seq analysis: from quality management to whole-genome annotation. Brief Bioinform 18(2): 279-290.
- Orlando, V. 2000. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. Trends Biochem Sci 25(3): 99-104.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., et al. 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. BMC Biotechnol 3: 18.
- Sanchez-Perez, A. M., Soriano, S., Clarke, A. R., and Gaston, K. 1997. Disruption of the human papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2F-induced apoptosis. J Gen Virol 78 ( Pt 11): 3009-3018.
- Sartor, M. A., Dolinoy, D. C., Jones, T. R., Colacino, J. A., Prince, M. E., Carey, T. E., et al. 2011. Genome-wide methylation and expression differences in HPV(+) and HPV(-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. Epigenetics 6(6): 777-787.
- Sharma, S., Kelly, T. K., and Jones, P. A. 2010. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis 31(1): 27-36.
- Sherr, C. J. 2004. Principles of tumor suppression. Cell 116(2): 235-246.
- Sova, P., Feng, Q., Geiss, G., Wood, T., Strauss, R., Rudolf, V., et al. 2006. Discovery of novel methylation biomarkers in cervical carcinoma by global demethylation and microarray analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 15(1): 114-123.
- Stunkel, W. and Bernard, H. U. 1999. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. J Virol 73(3): 1918-1930.

- Tajima, S., Suetake, I., Takeshita, K., Nakagawa, A., and Kimura, H. 2016. Domain Structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA Methyltransferases. Adv Exp Med Biol 945: 63-86.
- Tan, W., Felber, B. K., Zolotukhin, A. S., Pavlakis, G. N., and Schwartz, S. 1995. Efficient expression of the human papillomavirus type 16 L1 protein in epithelial cells by using Rev and the Rev-responsive element of human immunodeficiency virus or the cis-acting transactivation element of simian retrovirus type 1. J Virol 69(9): 5607-5620.
- Thomas, M., Pim, D., and Banks, L. 1999. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. Oncogene 18(53): 7690-7700.
- Tjong, M. Y., Out, T. A., Ter Schegget, J., Burger, M. P., and Van Der Vange, N. 2001. Epidemiologic and mucosal immunologic aspects of HPV infection and HPV-related cervical neoplasia in the lower female genital tract: a review. Int J Gynecol Cancer 11(1): 9-17.
- Tsao, Y. P., Li, L. Y., Tsai, T. C., and Chen, S. L. 1996. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21 (Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. J Virol 70(11): 7535-7539.
- Valouev, A., Johnson, D. S., Sundquist, A., Medina, C., Anton, E., Batzoglou, S., et al. 2008. Genome-Wide Analysis of Transcription Factor Binding Sites Based on ChIP-Seq Data. Nat Methods 5(9): 829-834.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., et al. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol 189(1): 12-19.
- Werness, B. A., Levine, A. J., and Howley, P. M. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science 248(4951): 76-79.
- Wilantho, A., Praditsup, O., Charoenchim, W., Kulawonganunчай, S., Assawamakin, A., and Tongsimma, S. 2012. Next generation sequencing (NGS) technologies and their applications in omics-research. Thai J. Genet. 5(2): 104-129
- Yanatatsaneejit, P., Mutirangura, A., and Kitkumthorn, N. 2011. Human papillomavirus's physical state and cyclin A1 promoter methylation in cervical cancer. Int J Gynecol Cancer 21(5): 902-906.

- Yardley, K. 2001. Understanding cervical dysplasia: A holistic treatment protocol. Br J Phytother 5: 4.
- Yim, E. K. and Park, J. S. 2005. The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. Cancer Res Treat 37(6): 319-324.
- Zhang, Y. and Reinberg, D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails *Genes & Development* (Vol. 15, pp. 2343-2360): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ZurHausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer from basic studies to clinical application. Nat Rev Cancer 2: 342-350.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

### การเตรียมสารที่ใช้ในการทดลอง

#### 2.5 M glycine

Reagent	Stock	Working	using
Glycine		2.5 M	9.384 g
ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย NaOH แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วย H <sub>2</sub> O			

#### PIPES pH 8.0

Reagent	Stock	Working	using
PIPES		1M	15.11mg
ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย KOH แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วย H <sub>2</sub> O			

#### Cell lysis buffer

Reagent	Stock	Working	using
PIPES pH 8.0	1M	5 mM	500 ul
KCl		85 mM	0.634 g
NP-40 (Igepal)	100%	0.5%	500 ul
ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ด้วย H <sub>2</sub> O			

#### Nuclear lysis buffer

Reagent	Stock	Working	using
Tris HCl pH 8.0	1M	50 mM	5 ml
EDTA pH 8.0	0.5 M	10 mM	2 ml
SDS	10%	1%	1 ml
ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ด้วย H <sub>2</sub> O			

## ChIP dilution buffer

Reagent	Stock	Working	using
SDS	10%	1%	100 ul
Triton X 100	100%	1.1%	1.1 ml
EDTA pH 8.0	0.5 M	1.2 mM	240 ul
Tris HCl pH 8.0	1 M	16.7 mM	1.67 ml
NaCl	5 M	167 mM	3.34 ml
ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml ด้วย H <sub>2</sub> O			

## 5M NaCl

Reagent	Stock	Working	using
NaCl		5 M	292.2 g
ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 ml ด้วย H <sub>2</sub> O			

## 150mM low salt NaCl

Reagent	Stock	Working	using
SDS	10%	0.1%	2 ml
Triton X 100	100%	1%	2 ml
EDTA pH 8.0	0.5 M	2 mM	800 ul
Tris HCl pH 8.0	1 M	20 mM	4 ml
NaCl	5 M	150 mM	6 ml
ปรับปริมาตรให้ได้ 200 ml ด้วย H <sub>2</sub> O			



## 500mM high salt NaCl

Reagent	Stock	Working	using
SDS	10%	0.1%	2 ml
Triton X 100	100%	1%	2 ml
EDTA pH 8.0	0.5 M	2 mM	800 ul
Tris HCl pH 8.0	1 M	20 mM	4 ml
NaCl	5 M	150 mM	20 ml
ปรับปริมาตรให้ได้ 200 ml ด้วย H <sub>2</sub> O			

## LiCl

Reagent	Stock	Working	using
Tris HCl pH 8.0	1M	100 mM	50 ml
LiCl (M.W. = 42.39)		500 mM	4.24 g
NP 40	100%	1%	2 ml
Sodium deoxycholate		1%	2 g
ปรับปริมาตรให้ได้ 200 ml ด้วย H <sub>2</sub> O			

T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> pH 8.0

Reagent	Stock	Working	using
Tris HCl pH 8.0	1M	5 mM	10 ml
EDTA pH 8.0	0.5 M	10 mM	4 ml
ปรับปริมาตรให้ได้ 200 ml ด้วย H <sub>2</sub> O			

## Elution buffer

Reagent	Stock	Working	using
NaHCO <sub>3</sub>		50 mM	1 ml
SDS	10%	0.1%	5 ml
ปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วย H <sub>2</sub> O			

## RNase A (10mg/ml)

Reagent	Stock	Working	using
RNase A			100 mg
ใส่ H <sub>2</sub> O ปริมาตร 10 ml แล้วนำไป heat ที่ 100°C เป็นเวลา 20 นาที			

## Lysis buffer II + 10% SDS

Reagent	Stock	Working	using
Sodium hydroxide (NaOH) solution		10 N	0.2 ml
sodium dodecyl sulfate (SDS)		10%	1 ml
ใส่ H <sub>2</sub> O ปริมาตร 8 ml ก่อน จึงค่อยเติม reagent ลงไป แล้วเติม H <sub>2</sub> O ให้มีปริมาตรของสารละลายสุดท้าย 10 ml เพื่อป้องกันการเกิดตะกอน			

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวจุฑามาศ สุขพัฒน์ธี
วัน เดือน ปี เกิด	10 มีนาคม 2531
สถานที่เกิด	จังหวัดสุรินทร์
วุฒิการศึกษา	ปริญญาบัณฑิต
ที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 112 หมู่ 5 ตำบลศรีนาวา อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก 26000



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY