กลไกของโปรตีน E7 ของฮิวแมนแพพิลโลมาไวรัสชนิด 16 ในเมทิเลชันและการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก

นางสาวโชติพร ชเลิศเพ็ชร์

2788028807

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5372232823

MECHANISM OF E7 PROTEIN OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 IN METHYLATION AND EXPRESSION OF *CCNA1* GENE IN CERVICAL CANCER

Miss Chotiporn Chalertpet

2788028802

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	กลไกของโปรตีน E7 ของฮิวแมนแพพิลโลมาไวรัสชนิด 16 ในเมทิเลชันและการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก
โดย	นางสาวโชติพร ชเลิศเพ็ชร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต .....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

รัชนีกร ธรรมโชติ .....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ)

โชติกา สมรรคจันทร์ .....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. โชติกา สมรรคจันทร)

2788028802

โชติพร ชเลิศเพ็ชร์ : กลไกของโปรตีน E7 ของฮิวแมนแพพิลโลมาไวรัสชนิด 16 ในเมทิเลชันและการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก. (MECHANISM OF E7 PROTEIN OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 IN METHYLATION AND EXPRESSION OF *CCNA1* GENE IN CERVICAL CANCER) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. นพ. ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร, 105 หน้า.

การติดเชื้อ HPV กลุ่มความเสี่ยงสูง เช่น HPV ชนิด 16 เป็นต้น เป็นสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งปากมดลูก มีงานวิจัยพบว่าการติดเชื้อ HPV แบบอินทีเกรชั่นส่งผลให้ยีน *E7* ของ HPV มีการแสดงออกมากขึ้น และส่งผลให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งโปรตีน E7 ยังจับกับ DNMT1 ได้ ทำให้ DNMT1 มีการทำงานเพิ่มขึ้น การศึกษาในมะเร็งปากมดลูกยังพบว่าบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* มีการเกิดเมทิเลชันถึง 93% จากที่กล่าวมา งานวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษากลไกของโปรตีน E7 ของ HPV ชนิด 16 ในการชักนำเกิดเมทิเลชันและการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก การศึกษาในขั้นตอนแรกเป็นการยืนยันความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิเลชันและการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วยการให้ยา 5'-azacytidine (aza) แก่เซลล์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A ซึ่งมีการติดเชื้อ HPV ชนิด 16 และไม่มีการติดเชื้อ HPV ตามลำดับ ผลการศึกษา พบว่า เซลล์ทั้งสองมีระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับ aza ความเข้มข้นสูงขึ้นตั้งแต่ 0, 3, 5 และ 7 ไมโครโมลาร์ ในทางกลับกันการแสดงออกของยีน *CCNA1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังนี้ การเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์จึงมีความสัมพันธ์กับการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* จริง และเพื่อศึกษาบทบาทของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ต่อการเกิดเมทิเลชันและการแสดงออกของยีน *CCNA1* จึงได้ทำ *E7* siRNA และ *E7* overexpression ในเซลล์ SiHa และ C33A ตามลำดับ ผลการศึกษาที่ได้มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือพบว่า ยีน *E7* ส่งผลต่อการแสดงออกที่ลดลงของยีน *CCNA1* อย่างมีนัยสำคัญ และทำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเพื่อศึกษากลไกของโปรตีน E7 และโปรตีน DNMT1 ที่บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* และชักนำให้เกิดเมทิเลชันของยีน *CCNA1* ในมะเร็งปากมดลูก จึงได้ทำ ChIP ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* (*E7* overexpression) และ empty plasmid ผลการศึกษาที่ได้พบว่า โปรตีน E7 และ DNMT1 สามารถจับกับบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ได้โดยตรง โดยสรุปแล้วจึงยืนยันได้ว่า โปรตีน E7 ของ HPV ชนิด 16 สามารถชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ และการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CCNA1* ซึ่งนำไปสู่การเกิดมะเร็งปากมดลูกในที่สุด

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา พันธุศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

2788028802

5372232823 : MAJOR GENETICS
KEYWORDS: HUMAN PAPILLOMAVIRUS / HPV / E7 / METHYLATION / CCNA1

CHOTIPORN CHALERTPET: MECHANISM OF E7 PROTEIN OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 IN METHYLATION AND EXPRESSION OF *CCNA1* GENE IN CERVICAL CANCER. ADVISOR: ASST. PROF. PATTAMAWADEE YANATATSANEEJIT, Ph.D., CO-ADVISOR: PROF. APIWAT MUTIRANGURA, M.D., Ph.D., 105 pp.

Infection with high risk types of HPV such as HPV type 16 is the main cause of cervical cancer. Previous studies were found that the integrated form of HPV resulted in increasing *E7* expression and significantly higher levels of *CCNA1* promoter methylation. In cervical cancer, *CCNA1* promoter is methylated to 93%: moreover, E7 can bind DNMT1 and augment DNMT1 activity. As mentioned above, the aim of this study is to verify that the E7 protein of HPV type 16 plays a role in inducing methylation at the promoter of *CCNA1* and inhibits its expression in cervical cancer. In the first step, the correlation of promoter methylation and expression of *CCNA1* was confirmed by administering 5'-azacytidine (aza) to SiHa (HPV16 infection) and C33A (no HPV infection). The results were showed that in both cell lines, the level of *CCNA1* promoter methylation was reduced significantly followed 0, 3, 5 and 7 uM aza concentration, but *CCNA1* expression was increased significantly. Accordingly, *CCNA1* promoter methylation was associated with its expression. To study whether *E7* of HPV type 16 can influence methylation and expression of *CCNA1*, *E7* siRNA and *E7* overexpression were performed in SiHa and C33A, respectively. The results were confirmed and revealed that *E7* affected significantly the decrease of *CCNA1* expression, while *CCNA1* promoter methylation was increased significantly. Furthermore, in confirmation of the mechanism of E7 protein and DNMT1 protein at *CCNA1* promoter in inducing methylation in cervical cancer, ChIP was carried out in *E7* and empty plasmid overexpressed C33A. The results were showed that E7 and DNMT1 protein could bind directly to *CCNA1* promoter. In conclusion, the E7 protein of HPV type 16 can induce promoter methylation of *CCNA1* gene and suppress its expression, leading finally to cervical cancer.

Department: Botany
Field of Study: Genetics
Academic Year: 2013

Student's Signature Chotiporn Chalertpet
Advisor's Signature Pattamawadee Yanatatsaneejit
Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปฐมวดี ญาณทัศนีย์จิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์นี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. อภิวัฒน์ มุทิรางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย และเมตตาให้โอกาสเข้ามาทำวิจัยในศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านอณูพันธุศาสตร์มะเร็งและโรคของมนุษย์ รวมทั้งอนุเคราะห์อุปกรณ์และสารเคมีที่จำเป็นต่างๆ ในการวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ประธานกรรมการ, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชนีกร ธรรมโชติ กรรมการ และ ดร. โชติกา สมรรคจันทร กรรมการภายนอกที่ได้ให้ข้อเสนอแนะ และข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.นริศร คงรัตนโชติ, คุณประกาศิต รัตนตันหยง และคุณปิยพัทธ์ ปิ่นอ่อนที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการวิจัยเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้มาใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้จนเสร็จสิ้นได้

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อโชคดี ชเลิศเพ็ชร์ และคุณแม่ปัทมาพร ชเลิศเพ็ชร์ที่ให้การสนับสนุนทางด้านการศึกษา และเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดตลอดมาจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้

สุดท้ายนี้คุณความดี และประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการศึกษา และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

2788028802

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูปภาพ ..... ฑ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญ 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

ขอบเขตการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

วิธีดำเนินงานวิจัย 4

ลำดับขั้นตอนในการวิจัย 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 9

มะเร็ง (cancer) 9

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) 10

Human papillomavirus 11

พันธุกรรมของ HPV 11

บทบาทของ E7 ต่อการเกิดมะเร็ง 14

สภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics) 15

1. การเกิดดีเอ็นเอเมทิเลชัน (DNA methylation) 15

DNA methyltransferase (DNMT) 16

1. DNA methyltransferase1 (DNMT1) 17

2. DNA methyltransferase3 (DNMT3) family 18

2. การดัดแปลงโปรตีนฮีสโตน (histone modification) 19

ความเชื่อมโยงระหว่างการเกิดดีเอ็นเอเมทิเลชัน และการดัดแปลงโปรตีนฮีสโตนต่อการเกิดการยับยั้งการทำงานของยีน (gene silencing) และการเกิดมะเร็ง 20

27880280 2

หน้า

ปัจจัยแวดล้อมต่อการเกิดสภาวะเหนือพันธุกรรม 23
Cyclin A1 (*CCNA1*) 25
เทคนิคที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย 26
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 33
เครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย 33
วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 34
สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 34
วิธีดำเนินการวิจัย 37
1. การตรวจการติดเชื้อ HPV และระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ และระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1* 37
1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สายพันธุ์มะเร็งของมนุษย์ (cell culture) 37
1.2 การสกัดดีเอ็นเอ 37
1.3 การตรวจการติดเชื้อ HPV 38
1.4 เจลอิเล็กโทรโฟริซิส(อะกาโรส) 39
1.5 การทำ sodium bisulfite treatment 39
1.6 การทำ methylation specific (MSP) PCR 40
1.7 การตรวจสอบระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก 41
1.8 เจลอิเล็กโทรโฟริซิส(อะคริลาไมด์) 42
1.9 การสกัดอาร์เอ็นเอ 42
1.10 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) 42
1.11 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* 43
2. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการแสดงออกของยีน *CCNA1* 44
2.1 การเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เติม 5'-azacytidine 44
2.2 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 44

27860280

หน้า

2.2.1 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ 45

2.3 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *CCNA1* 45

2.3.1 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ 45

3. การศึกษากลไกการชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 45

3.1 การยับยั้งการแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 โดยเทคนิค siRNA..... 45

3.1.1 การออกแบบ small interfering RNA (siRNA) 45

3.1.2 การหาปริมาณ *E7* siRNA และระยะเวลาที่เหมาะสมในการทรานสเฟ็ก 46

3.1.3 siRNA transfection 46

3.1.4 Real-time PCR 47

3.1.5 การคำนวณการแสดงออกของยีน *CCNA1* ด้วยวิธี $\triangle\triangle$CT method 48

3.1.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *E7* และ *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ 49

3.1.7 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ 49

3.2 การชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16..... 49

3.2.1 โครงสร้างของพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 49

3.2.2 การถ่าย *E7* recombinant plasmid เข้าสู่ competent cells (transformation)..... 50

3.2.3 การสกัดพลาสมิด 51

3.2.4 การตรวจสอบยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ใน competent cells ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid 51

3.2.5 การทรานสเฟ็ก *E7* recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A 52

3.2.6 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และ *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ 52

2788028802

3.2.7 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ด้วยวิธีการทางสถิติ 53

4. การศึกษาการจับกันระหว่างโปรตีน E7 และ DNMT1 บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 53

บทที่ 4 ผลการทดลอง 57

1. การตรวจการติดเชื้อ HPV และระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ และระดับการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A 57

1.1 การตรวจสอบการติดเชื้อ HPV ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A..... 57

1.2 การตรวจสอบการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 58

1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* 59

2. การศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์และการกดการแสดงออกของยีน *CCNA1* 60

2.1 การศึกษาการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa และ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine 60

2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa และ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine 62

3. การศึกษากลไกการชักนำให้เกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* โดยยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 64

3.1 ปริมาณของ *E7* siRNA และระยะเวลาทรานสเฟ็กที่เหมาะสม 64

3.2 การลดการแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ด้วยเทคนิค siRNA ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa 66

3.2.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *E7* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA 66

3.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA 67

3.2.3 การศึกษาการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA 68

3.3 การชักนำให้มีการแสดงออกของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก C33A 69

3.3.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *E7* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid 69

3.3.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid 70

2788028802

3.3.3 การศึกษาการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid 71
4. การวิเคราะห์การจับกันระหว่างโปรตีน E7 และ DNMT1 บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 72
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 73
อภิปรายผลการวิจัย 73
สรุปผลการวิจัย 77
ข้อเสนอแนะ 78
รายการอ้างอิง 79
ภาคผนวก 91
ภาคผนวก ก 92
ภาคผนวก ข 102
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 105

2788028802

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ *L1* บริเวณ MY09/MY11 เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ HPV 38
ตารางที่ 2 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ HPV 38
ตารางที่ 3 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการติดเชื้อ HPV 39
ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอเมทิเลชันบนโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 41
ตารางที่ 5 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 41
ตารางที่ 6 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 42
ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน *CCNA1* 43
ตารางที่ 8 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* 43
ตารางที่ 9 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* 44
ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ siRNA ที่จำเพาะต่อยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 45
ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ใช้ใน real-time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และยีน *CCNA1* 47
ตารางที่ 12 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ real-time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และยีน *CCNA1* 48
ตารางที่ 13 สภาวะในการทำ real-time PCR เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *E7* และยีน *CCNA1* 48
ตารางที่ 14 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 51
ตารางที่ 15 สภาวะในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 52
ตารางที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CCNA1* ที่ใช้ทำ PCR หลังจากการทำ ChIP 55
ตารางที่ 17 ส่วนผสมที่ใช้ในการทำ PCR ของยีน *CCNA1* หลังจากการทำ ChIP 55
ตารางที่ 18 สภาวะในการทำ PCR ของยีน *CCNA1* หลังจากการทำ ChIP 56
ตารางที่ 19 เปอร์เซนต์ methylation และ unmethylation บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine 92
ตารางที่ 20 เปอร์เซนต์การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ 5'-azacytidine 92
ตารางที่ 21 เปอร์เซนต์การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine 93

หน้า

ตารางที่ 22 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *E7* จากการทำ real time PCR เพื่อหาปริมาณ *E7* siRNA ที่เหมาะสมต่อการทรานสเฟ็ก 94
ตารางที่ 23 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *E7* จากการทำ real time PCR เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทรานเฟ็ก 95
ตารางที่ 24 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *E7* จากการทำ real time PCR ในเซลล์ SiHa ที่... 96
ตารางที่ 25 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *CCNA1* จากการทำ real time PCR ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* และ scrambled siRNA 97
ตารางที่ 26 เปอร์เซนต์ methylation และ unmethylation บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* และ scrambled siRNA 98
ตารางที่ 27 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *E7* จากการทำ real time PCR ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid 99
ตารางที่ 28 แสดงค่า Ct ของยีน *GAPDH* และ *E7* จากการทำ real time PCR ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid 100
ตารางที่ 29 เปอร์เซนต์ methylation และ unmethylation บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* และ empty plasmid 101

2788028802

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยการทดลองที่ 1 5
รูปที่ 2 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยการทดลองที่ 2 6
รูปที่ 3 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยการทดลองที่ 3 7
รูปที่ 4 แผนผังแสดงลำดับขั้นตอนในการทำวิจัยการทดลองที่ 4 8
รูปที่ 5 รูปแบบการติดเชื้อของ HPV 1) episomal form และ 2) integrated form 13
รูปที่ 6 โครงสร้างโปรตีน E7 ของ human papillomavirus 14
รูปที่ 7 การเปลี่ยน cytosine เป็น 5'-methylcytosine โดยการทำงานของ DNMT 16
รูปที่ 8 รูปแบบการทำงานของ DNMT1 DNMT3a และ DNMT3b 17
รูปที่ 9 โครงสร้างของโปรตีน DNMT1 18
รูปที่ 10 การเกิด embryonic lethality ในหนู 19
รูปที่ 11 การทำงานระหว่าง 1) DNMT-cytosine และ 2) DNMT-5'-azacytidine 27
รูปที่ 12 ปฏิกิริยาในการทำ sodium bisulfite treatment 28
รูปที่ 13 การออกแบบ methylated และ unmethylated primer ที่ใช้ในการทำ MSP 29
รูปที่ 14 methylated และ unmethylated PCR product ที่ได้จากการทำ duplex MSP 30
รูปที่ 15 กลไกการทำงานของ siRNA 30
รูปที่ 16 condition ที่ใช้ในการหาปริมาณ siRNA ที่เหมาะสมต่อการทรานสเฟ็ก *E7* siRNA 46
รูปที่ 17 โครงสร้างของ recombinant plasmid ของยีน *E7* ของ HPV ชนิด 16 50
รูปที่ 18 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ HPV ในเซลล์สายพันธุ์ปากมดลูก SiHa และ C33A 57
รูปที่ 19 ผลการตรวจสอบเปอร์เซนต์เมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A 58
รูปที่ 20 ผลการตรวจสอบเปอร์เซนต์การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A 59
รูปที่ 21 รูปผลการตรวจสอบเปอร์เซนต์เมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A เมื่อได้รับ 5'-azacytidine 60
รูปที่ 22 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ one way ANOVA เพื่อศึกษาการเกิดเมทิเลชัน บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine 61
รูปที่ 23 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์สายพันธุ์มะเร็งปากมดลูก SiHa และ C33A เมื่อได้รับ 5'-azacytidine 62

27880288O2

หน้า

รูปที่ 24 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ one way ANOVA เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa และ C33A ที่ได้รับ 5'-azacytidine 63
รูปที่ 25 กราฟแท่งแสดงการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA ที่สภาวะต่างๆ 64
รูปที่ 26 กราฟแท่งแสดงการแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง 65
รูปที่ 27 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ independent sample t-test เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *E7* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA 66
รูปที่ 28 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ independent sample t-test เพื่อวิเคราะห์ การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA ... 67
รูปที่ 29 ผลการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA 68
รูปที่ 30 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ paired sample t-test เพื่อวิเคราะห์การเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ SiHa ที่ได้รับ *E7* siRNA และ scrambled siRNA 68
รูปที่ 31 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ independent sample t-test เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *E7* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid 69
รูปที่ 32 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ independent sample t-test เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid 70
รูปที่ 33 ผลการเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid (PC) 71
รูปที่ 34 ผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธีการ paired sample t-test เพื่อวิเคราะห์การเกิดเมทิเลชันบริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid 71
รูปที่ 35 ผลการทำ chromatin immunoprecipitation ในเซลล์ C33A ที่ได้รับ *E7* recombinant plasmid และ empty plasmid (PC) เพื่อยืนยันการจับกันระหว่างโปรตีน E7 และ DNMT1 บริเวณโพรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* 72

2788028802