

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความเป็นมาและความสำคัญ

มะเร็ง (cancer)

มะเร็ง หมายถึง กลุ่มของโรคที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ส่วนใดส่วนหนึ่งในร่างกายเริ่มแบ่งตัวอย่างควบคุมไม่ได้ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่มีหลายขั้นตอน (multistep process) Hanahan และ Weinberg (2000) ได้กล่าวถึงลักษณะสำคัญ (hallmark) ของเซลล์มะเร็งที่ต่างจากเซลล์ปกติไว้ 6 ข้อ คือ

1. สามารถเจริญเติบโตได้ด้วยสัญญาณการเจริญเติบโตของตัวเอง (self-sufficiency in growth signals)
2. สามารถหลีกเลี่ยงสัญญาณการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ (insensitivity to antigrowth signals)
3. สามารถหลีกเลี่ยงโปรแกรมการตายของเซลล์ได้ (evading apoptosis)
4. สามารถจำลองตัวได้อย่างไม่จำกัด (limitless replicative potential)
5. มีการรุกรานเนื้อเยื่อข้างเคียง (invasion) และกระจายไปยังบริเวณต่างๆ ของร่างกาย (metastasis)
6. มีการสร้างเส้นเลือดใหม่ (sustained angiogenesis)

เนื่องจากมะเร็งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่มีหลายขั้นตอน ดังนั้น จึงมีความเกี่ยวข้องกับยีนหลายกลุ่ม ซึ่งปกติแล้วยีนเหล่านั้นจะคอยดำรงความเป็นปกติของกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ ยีนมะเร็ง (oncogene) และยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) เป็นต้น ซึ่งหากการกลาย (mutation) เกิดขึ้นในกลุ่มยีนเหล่านั้นจะทำให้เซลล์มีความผิดปกติและทำให้เกิดมะเร็งได้

1. ยีนก่อมะเร็ง เป็นยีนที่กระตุ้นการทำงานของกระบวนการต่างๆ ในเซลล์ เช่น การเจริญเติบโต การแบ่งตัว การพัฒนาของเซลล์ เป็นต้น การกลายของยีนมะเร็งทำให้ยีนทำงานมากขึ้นและมีลักษณะการถ่ายทอดเป็นแบบยีนเด่น หากมีความผิดปกติบนโครโมโซมเพียง 1 อัลลีล โดยอีก 1 อัลลีลยังปกติอยู่ก็สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้ เช่น ยีน *Her-2* เป็นต้น

2. ยีนต้านมะเร็ง เป็นยีนที่ทำงานตรงข้ามกับยีนมะเร็ง คือ ควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ไม่ให้มีการเจริญเติบโตมากหรือเร็วเกินควร การกลายของยีนต้านมะเร็งทำให้ยีนทำงานน้อยลงหรือสูญเสียการทำงานไปและมีลักษณะการถ่ายทอดเป็นแบบยีนด้อย คือ ในการก่อมะเร็งต้องมีความผิดปกติของยีนต้านมะเร็งทั้ง 2 อัลลีล ตัวอย่างของยีนต้านมะเร็งนี้ เช่น ยีน *TP53* เป็นต้น

สำหรับชื่อของมะเร็งแต่ละชนิดนั้นโดยปกติแล้วจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอวัยวะซึ่งเป็นจุดกำเนิดของเซลล์ที่เริ่มมีการแบ่งตัวผิดปกติ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งปากมดลูก เป็นต้น



27188028802

มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer)

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่เกิดขึ้นบริเวณส่วนล่างของมดลูก (uterus) ซึ่งเป็นส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างมดลูกและช่องคลอด (birth canal)

โดยปกติแล้วเมื่อเกิดความผิดปกติของเซลล์บริเวณนี้ เซลล์เหล่านี้ไม่ได้กลายเป็นมะเร็งในทันที แต่จะค่อยๆ พัฒนาเป็นเซลล์ในระยะก่อนมะเร็ง (pre-cancer) ก่อน ได้แก่ รอยโรคที่มีพยาธิสภาพเป็น cervical intraepithelial neoplasia (CIN) เรียงจาก CIN1 คือ มีความผิดปกติของเซลล์น้อย (mild dysplasia) CIN2 มีความผิดปกติของเซลล์ปานกลาง (moderate dysplasia) และ CIN3 มีความผิดปกติของเซลล์มาก (severe dysplasia หรือ carcinoma *in situ*) หรือ squamous intraepithelial lesion (SIL) ได้แก่ low-SIL ซึ่งประกอบด้วย CIN1 และ high-SIL ประกอบด้วย CIN2 และ CIN3 ซึ่งใช้เวลาหลายปีแล้วจึงพัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูก (invasive cervical cancer) (Yardley, 2001)

ปัจจุบันมะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นลำดับที่ 3 ในผู้หญิงทั่วโลก ในปี 2008 มีผู้ป่วยใหม่ประมาณ 529,000 ราย ซึ่งมากกว่า 85% ของผู้ป่วยอยู่ในประเทศกำลังพัฒนา และในปีนั้นเองมีผู้ป่วยเสียชีวิตจากโรคนี้อีกโดยประมาณสูงถึง 275,100 ราย (Ferlay *et al.*, 2010) สำหรับประเทศไทย มะเร็งปากมดลูกพบบ่อยเป็นอันดับ 2 รองจากมะเร็งเต้านม ปัจจุบันมีการประมาณว่าในทุกๆ ปี ผู้หญิงไทยประมาณ 10,000 ราย ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคนี้อีก และเสียชีวิตจากโรคนี้อีก 5,216 ราย โดยกลุ่มผู้หญิงที่มีความเสี่ยงสูงมีอายุระหว่าง 15-44 ปี ซึ่งชนิดของมะเร็งปากมดลูกที่พบได้บ่อยที่สุด ได้แก่ squamous cell carcinoma คิดเป็นร้อยละ 69.8-81.8 รองลงมา คือ adenocarcinoma คิดเป็นร้อยละ 9.8-22.8 (Attasara *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตาม อุบัติการณ์ของมะเร็งปากมดลูกในหญิงไทยลดลงทุกปีซึ่งเป็นผลมาจากการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูก (Wilailak, 2009) ปัจจุบันทำได้ 2 วิธี คือ

1. การตรวจทางเซลล์วิทยา ได้แก่ การตรวจ papanicolaou (pap) smear ซึ่งวิธีนี้ไม่เพียงพอต่อการวินิจฉัยว่าเซลล์ที่ผิดปกตินี้จะพัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูกในระยะลุกลามได้หรือไม่ อีกทั้งยังอาจให้ผลผิดพลาดในกรณีที่นรีแพทย์มีประสบการณ์น้อยในการแปลผลตรวจ (Banik *et al.*, 2011)

2. การตรวจโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุล เช่น การทำ HPV DNA test เป็นวิธีการตรวจที่มักใช้เมื่อผู้ป่วยมีผลการตรวจ Pap smear ไม่ชัดเจน วิธีการนี้มีความไวสูงกว่าวิธี pap smear และจำเพาะต่อการดำเนินของโรคมะเร็งจึงมักใช้ทดสอบในการตรวจคัดกรอง high-grade dysplasia (Wright *et al.*, 2000) เป็นต้น

สำหรับปัจจัยที่ทำให้เกิดมะเร็งปากมดลูกนั้นมีอยู่มากมาย ได้แก่ การสูบบุหรี่ (Moutinho, 2011) ความเครียดเป็นระยะเวลานานทำให้ความสามารถในการกำจัด HPV ของร่างกายลดลง (Fang *et al.*, 2008) ภาวะน้ำหนักเกินเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิด adenocarcinoma มากกว่า squamous cell carcinoma (Lacey *et al.*, 2003) แต่ปัจจัยที่สำคัญที่สุดของการเกิดมะเร็งปากมดลูก คือ การติดเชื้อ HPV (Walboomers *et al.*, 1999)



Human papillomavirus

Human papillomavirus (HPV) จัดอยู่ในตระกูล *Papovaviridae* ซึ่ง HPV เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็กประมาณ 55 nm ไม่มีเปลือกชั้นนอกหุ้ม (nonenveloped virus) มี capsid protein เป็นรูปทรงกลมหลายเหลี่ยม (icosahedral capsid) และมีลักษณะคล้ายลูกกอล์ฟเมื่อมองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในปี 1978 ได้เริ่มมีการประชุมเพื่อกำหนดชนิดของ HPV ต่อเมื่อรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HPV มากขึ้นจึงมีการใช้ DNA ที่เป็นองค์ประกอบของยีน *E6*, *E7* และ *L1* ของ HPV เพื่อจำแนกชนิดของ HPV โดยกำหนดว่า หากมีความแตกต่างภายใน open reading frame มากกว่า 10% จะถูกกำหนดเป็น HPV ชนิดใหม่ (Villiers *et al.*, 1989) จนกระทั่งปี 1995 มีการประชุมอีกครั้งหนึ่งที่เมืองควิเบก ได้กำหนดว่า หากมีความแตกต่างของ *L1* open reading frame มากกว่า 10% จาก prototypes จึงจะถูกกำหนดเป็น HPV ชนิดใหม่ ซึ่งปัจจุบันมี HPV มากกว่า 100 ชนิดที่ได้รับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จนเสร็จสมบูรณ์ HPV เหล่านี้สามารถติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่อ หรือเยื่อบุผิวในตำแหน่งที่แตกต่างกัน มีประมาณ 40 ชนิดที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อของเนื้อเยื่อ หรือเยื่อบุผิว บริเวณที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ (ano-genital area) ได้แก่ ปากมดลูก ช่องคลอด ปากช่องคลอด ทวารหนัก ท่อปัสสาวะ และองคชาติ เป็นต้น นอกจากนี้ การติดเชื้อ HPV ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งช่องปากและลำคอ และมะเร็งผิวหนังบางชนิด ปัจจุบันสามารถแบ่งกลุ่มของ HPV ตามความสามารถในการก่อให้เกิดการพัฒนาของมะเร็งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มความเสี่ยงสูง (high risk type, HR-HPV หรือ oncogenic type) เป็นกลุ่มที่มีความเชื่อมโยงกับการเกิดมะเร็งบริเวณ ano-genital ได้แก่ HPV ชนิด 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 และ 82 โดยชนิดที่ก่อให้เกิดมะเร็งปากมดลูกมากที่สุด คือ HPV ชนิด 16 ซึ่งมากกว่า 50% พบใน squamous cell carcinomas และ HPV ชนิด 18 ที่มากกว่า 50% พบใน adenocarcinoma (Milde-Langosch *et al.*, 1993)

2. กลุ่มความเสี่ยงต่ำ (low risk type, LR-HPV) เป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากมดลูกในระดับต่ำ ส่วนใหญ่พบว่าก่อให้เกิดหูดหงอนไก่ (genital warts) บริเวณ ano-genital ได้แก่ HPV ชนิด 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 73 และ 81 ซึ่งชนิดที่พบมากกว่า 90% คือ HPV ชนิด 6 และ 11 ตามลำดับ (Castellsague, 2008)

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มของ HPV ตามเนื้อเยื่อที่ HPV ไปเจริญเติบโตได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่ม HPV ที่สามารถเจริญได้บริเวณผิวหนัง (cutaneous HPV) เป็นสาเหตุของการเกิด skin warts และ warts ได้แก่ HPV ชนิด 1, 2 และ 5 เป็นต้น

2. กลุ่ม HPV ที่สามารถเจริญได้บริเวณเซลล์เยื่อเมือก (mucosal HPV) บริเวณช่องปาก และอวัยวะสืบพันธุ์ ได้แก่ HPV ชนิด 6, 11, 16 และ 18 เป็นต้น (Gomez and Santos, 2007)

พันธุกรรมของ HPV

จีโนมของ HPV เป็น DNA ขนาดประมาณ 8,000 คู่เบส เรียงตัวเป็นวงกลม (doubled stranded circular DNA) ซึ่งมีเพียง coding strand สายเดียวเท่านั้นที่จะเข้าสู่กระบวนการ



ถอดรหัส ดังนั้น กระบวนการถอดรหัสจึงเกิดขึ้นเพียงทิศทางเดียว (Burd, 2003) จีโนมของ HPV สามารถแบ่งเป็น 3 บริเวณ ได้แก่ Early region มีขนาดประมาณ 4,000 คู่เบส, Late region มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส และ non coding long control region (LCR) มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส

1. Long control region (LCR) ยาวประมาณ 850 kb คิดเป็น 10% ของ HPV genome จะไม่แปลรหัสให้โปรตีน แต่มีหน้าที่เป็น origin of replication และ control element ในกระบวนการถอดรหัสของ HPV โดยเป็น binding site ของ transcription factor หลายชนิดซึ่งมีความสำคัญในการควบคุม RNA polymerase II initiated transcription ของ early และ late promoter อีกทั้งยังมีหน้าที่เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ HPV ด้วย

2. Late region (L) ได้แก่ L1 และ L2 open reading frame (ORF) โดยโปรตีน L1 มีขนาดประมาณ 55 kDa ซึ่งมีประมาณ 80% ของ viral protein ทั้งหมด ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบของ capsid หรือเรียก major capsid protein ในการไปเกาะกับ receptor ของเซลล์ และสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง neutralizing antibody ในขณะที่โปรตีน L2 มีขนาด 70 kDa (Crawford and Crawford, 1963) มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการประกอบรูปร่างของ capsid หรือเรียก minor capsid protein และอาจมีหน้าที่ในการบรรจุสารพันธุกรรมของไวรัสให้เข้าไปอยู่ใน capsid ด้วยปกติแล้ว L1 และ L2 จะมีการแสดงออกเฉพาะในเซลล์ที่มีการติดเชื้อมานั้น เนื่องจากการสร้าง capsid เกิดขึ้นในระยะสุดท้ายของการจำลองตัวของไวรัส (Motoyama *et al.*, 2004)

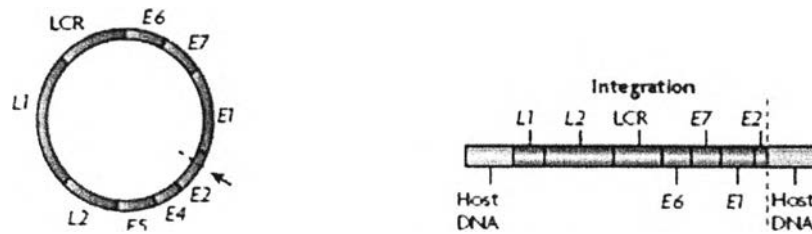
3. Early region (E) ประกอบด้วย E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 ORF ทำหน้าที่เกี่ยวกับ viral DNA replication และ cell transformation

3.1 E1 open reading frame โปรตีน E1 มีขนาด 68 kDa มีความเกี่ยวข้องในการควบคุมการจำลองตัวของไวรัส E1 ORF มีความเหมือนกันในทุกชนิดของ papillomavirus นอกจากนี้ โปรตีน E1 ยังมีคุณสมบัติเป็น dependent ATPase และ DNA helicase ซึ่งมีความจำเป็นในขั้นตอน initiation และ elongation ของ viral DNA synthesis (Clertant and Seif, 1984)

3.2 E2 open reading frames มีหน้าที่สำคัญในการจำลองตัวของไวรัสเช่นกัน โดย E2 เป็น DNA binding transcription factor มีบริเวณจดจำคือ ACCN₆GGT ในบริเวณ LCR (McBride *et al.*, 1991) นอกจากนี้โปรตีน E2 จะทำงานร่วมกับ DNA helicase E1 เป็น complex protein ทำหน้าที่จดจำบริเวณที่เป็นจุดเริ่มต้นของการเริ่มจำลองตัวของจีโนม HPV (ori) การขาดหายไปของบริเวณ N-terminal domain ของ E2 ซึ่งต้องทำงานร่วมกับ E1 ไม่สามารถทำให้การ replication เกิดขึ้นได้ (Chiang *et al.*, 1992) อย่างไรก็ตาม ในการเกิดมะเร็งปากมดลูกที่มีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ HPV นั้น การสูญเสียการแสดงออกของยีน E2 ถือว่าเป็น hallmark อย่างหนึ่ง โดยปกติโปรตีน E2 ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการถอดรหัสของ E6 และ E7 oncogene แต่ในการติดเชื้อของ HPV ซึ่งมี 2 แบบคือ 1) แบบ episome จีโนมของ HPV จะมีลักษณะเป็นวงกลมปิด และ 2) แบบ integration จีโนมของ HPV จะสอดแทรกเข้าไปยังจีโนมของเจ้าบ้าน (host) ดังรูปที่ 5 การติดเชื้อรูปแบบ integration นี้ ทำให้เกิดการถ่ายยีน E2 ส่งผลให้การควบคุมการแสดงออกของยีน E6 และ E7 ลดน้อยลง ดังนั้น E6 และ E7 จึงมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น และยังส่งผลให้เซลล์



เข้าสู่กระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) น้อยลง เซลล์จึงเข้าสู่รูปแบบการเกิดมะเร็งเพิ่มขึ้น (Sanchez-Perez *et al.*, 1997)



รูปที่ 5 รูปแบบการติดเชื้อของ HPV 1) episomal form และ 2) integrated form (<http://www.medscape.com/viewarticle/553264>)

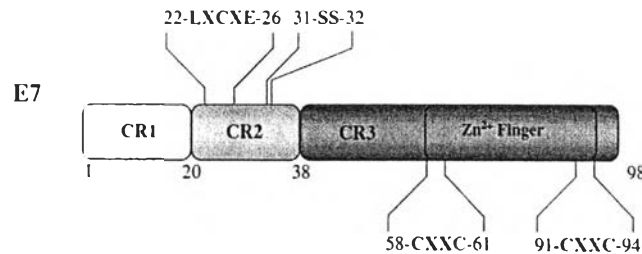
3.3 E4 open reading frame ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าโปรตีน E4 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับ cell transformation หรือไม่ อย่างไรก็ตาม โปรตีน E4 มีบทบาทสำคัญสำหรับกระบวนการเจริญ (maturation) และ replication ของไวรัส (Brown *et al.*, 1994) นอกจากนี้ โปรตีน E4 ยังพบมากใน cytoplasm ของเซลล์ และสามารถทำลาย cyokeratin matrix network ซึ่งช่วยในการปล่อยอนุภาคไวรัสออกจากเซลล์ที่ติดเชื้อ (Doorbar *et al.*, 1991)

3.4 E5 open reading frame มักถูกกำจัดออกในเซลล์ cervical carcinoma จึงคาดว่า E5 มีบทบาทในช่วงแรกของการติดเชื้อ HPV และสามารถก่อให้เกิด transformation ของเซลล์ได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยปกติ E5 มักจะทำงานร่วมกับ transmembrane protein เช่น receptor ของ epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor β และ colony stimulating factor-1 receptor เป็นต้น (Hwang *et al.*, 1995)

3.5 E6 open reading frame โปรตีน E6 มีขนาด 151 amino acid โปรตีน E6 ของ high risk HPV จะทำงานร่วมกับโปรตีน E7 ในการก่อให้เกิด cell immortalization โดยโปรตีน E6 สามารถจับกับโปรตีน p53 ได้ (Werness *et al.*, 1990) ทำให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีน p53 ผ่านกระบวนการ ubiquitin proteolysis system (Scheffner *et al.*, 1990) ซึ่งปกติ p53 ทำหน้าที่เป็น transcription activator โดยการจับกับลำดับเบสของ DNA ที่จำเพาะ และ p53 ยังจำเป็นต่อการเกิด cell cycle arrest ในระยะ G1 (Lechner *et al.*, 1992) ดังนั้นในเซลล์ที่ขาดโปรตีน p53 จึงไม่สามารถหยุดอยู่ในระยะ G1 ได้ แม้ว่าจะมีการเสียหายของ DNA เกิดขึ้น จึงทำให้เกิด genomic instability และนำไปสู่ pre-malignant lesions ได้

3.6 E7 open reading frame โปรตีน E7 มีขนาด 98 amino acid และมีน้ำหนัก 21 kDa จัดเป็น nuclear phosphoprotein ประกอบด้วย 3 domain คือ conserved region (CR)1, CR2 และ CR3 ดังรูปที่ 6 โดย CR1 ประกอบด้วย amino acid ที่ 1-20 มีความจำเป็นต่อการเกิด cellular transformation, CR2 ประกอบด้วย amino acid ที่ 21-39 มีบริเวณ LxCxE motif ทำให้จับกับ pRb family member ได้ (Edmonds and Vousden, 1989) รวมถึง pocket protein p107 และ p130 (Ghittoni *et al.*, 2010) อีกทั้งยังมีความสำคัญต่อการชักนำการเกิด hyperplasia และการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) เมื่อทำการทดลองในหนู (Gulliver *et al.*,

1997) และ CR3 ประกอบด้วย amino acid ที่ 40-98 มีบริเวณที่ทำหน้าที่ร่วมกับ cullin2 E3 ubiquitin ligase ในการทำให้เกิดกระบวนการ ubiquitination เพื่อย่อยสลาย pRb และทำให้เกิดการยับยั้ง cell cycle arrest (Todorovic *et al.*, 2012)



รูปที่ 6 โครงสร้างโปรตีน E7 ของ human papillomavirus

(Ghittoni *et al.*, 2010)

บทบาทของ E7 ต่อการเกิดมะเร็ง

1. การดำรงความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์

ใน high risk HPV โปรตีน E7 มีความสามารถในการจับกับโปรตีน pRb ซึ่งเป็น tumor suppressor gene มากกว่าใน low risk HPV ถึง 10 เท่า ปกติ E7 จับกับ pRb ที่บริเวณ LXCXE ซึ่งอยู่ใน CR2 โดย Rb family จะควบคุมวัฏจักรของเซลล์ระยะ G1-S ผ่าน E2F family ซึ่งเป็น transcription factor ใน E2F family ประกอบด้วย E2F1-E2F8 ซึ่งส่วนหนึ่งทำหน้าที่เป็น transcription activator และอีกส่วนเป็น repressor ในเซลล์ปกติ Rb จะยับยั้งกระบวนการถอดรหัสผ่าน E2F โดยการจับกับ E2F โดยตรง จากนั้นจึงชักนำ chromatin modifier ต่างๆ เช่น histone deacetylases (HDACs) ให้มาเกาะยังบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน แต่ในระยะ late G1 นั้น Rb จะได้รับการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) โดย cyclin-dependent kinase (CDK) complex ทำให้เกิดการแยกกันระหว่าง Rb และ E2F แล้วจึงเกิดกระบวนการถอดรหัสในระยะ S ของยีนที่จำเพาะ (Stevaux and Dyson, 2002) แต่การจับกันระหว่าง E7 ของ high risk HPV และ Rb ทำให้เกิดการทำลาย Rb-E2F complex ได้โดยตรงผ่าน proteasome-mediated pathway (Berezutskaya and Bagchi, 1998) ทำให้ E2F เป็นอิสระและนำไปสู่การแสดงออกอย่างต่อเนื่องของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับ E2F ได้แก่ cyclin E และ cyclin A จึงเกิดการกระตุ้นวัฏจักรของเซลล์ให้เข้าสู่ระยะ S และการสังเคราะห์ดีเอ็นเออย่างต่อเนื่องซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง (Cheng *et al.*, 1995)

นอกจากนี้ E7 ยังทำงานร่วมกับ histone deacetylase complex ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านการดัดแปลงโครงสร้างของโครมาติน โดย E7 สามารถจับกับ histone deacetylase 1 (HDAC1) ที่บริเวณ CR3 zinc-finger domain และ mi2 β ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ NURD histone deacetylase complex ทำให้เซลล์ค้างอยู่ในระยะ S และไปยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของยีน เป็นต้น (Brehm *et al.*, 1999)

2. การทำให้เกิดความไม่เสถียรของจีโนม (genomic instability)

E7 ชักนำให้เกิด centrosome amplification ใน mouse embryonic fibroblasts อาจเนื่องมาจากการจับกันของ E7 และ γ -tubulin ใน mitotic spindle ซึ่งส่งผลให้เกิด centrosome synthesis ที่ผิดปกติ อีกทั้ง E7 ยังสามารถชักนำให้เกิด DNA damage ได้ผ่าน ATM-ATR pathway (ataxia telangiectasia-mutated-ATM and RAD3-related DNA damage repair pathway) โดย E7 ทำให้ checkpoint ระยะ S และ G2-M มีการทำงานผิดปกติไป คือ จะเข้าสู่ระยะ mitotic เพิ่มขึ้น (Nguyen *et al.*, 2007)

นอกจากการศึกษาหน้าที่ของยีนต่างของ HPV ได้แก่ ยีน E6 และ E7 ซึ่งส่งผลต่อการเกิดมะเร็งตามที่ได้กล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง HPV และสภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics) ที่นำไปสู่การเกิดมะเร็งด้วย เช่น การศึกษาความเกี่ยวข้องกันระหว่างการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* และรูปแบบการติดเชื้อของ HPV แบบ integration (Yanatatsaneejit *et al.*, 2011) หรือการศึกษาโปรตีน E7 ของ HPV ในการเพิ่มกิจกรรมของ DNMT1 และลดระดับโปรตีน E-cadherin (Laurson *et al.*, 2010) เป็นต้น

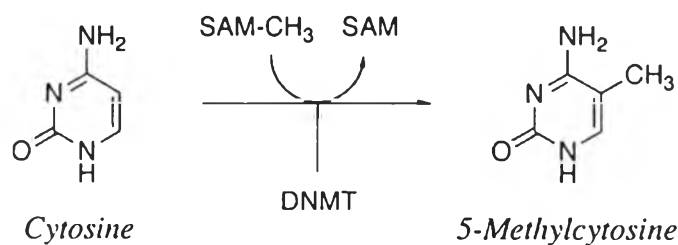
สภาวะเหนือพันธุกรรม (epigenetics)

Epigenetics คือ การแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปโดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอ (โชติกา, 2011) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้อาจเกิดขึ้นได้เอง หรือได้รับการชักนำจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม หรืออาจเป็นผลจากการเกิดการกลาย กลไกทาง epigenetics มีความสำคัญต่อการเจริญ (development) การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ (cell differentiation) และการป้องกันจีโนมมนุษย์จากจีโนมของไวรัส เป็นต้น การขาดการควบคุมทาง epigenetics มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในมนุษย์หลายโรค รวมถึงมะเร็งด้วย กลไกทาง epigenetics ที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางคือ 1. การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) และ 2. การดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน (histone modification)

1. การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation)

DNA methylation เป็นการเติมหมู่เมทิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโตซีน ทำให้เกิด 5-methylcytosine (5-mC) ในยูคาริโอตปฏิกิริยานี้เกิดจากการทำงานของ DNA methyltransferase (DNMT) และมี S-adenosylmethionine (SAM) เป็นตัวให้หมู่เมทิล (CH_3) ดังรูปที่ 7 โดย DNMT มีทิศทางและบริเวณการทำงานที่ 5'-CG-3' หรืออาจเรียก CpG dinucleotide หรือ CpG islands (Signal and Ginder, 1999) ในระหว่างช่วงวิวัฒนาการพบว่า 5-mC สามารถเกิด spontaneous deamination ได้ ทำให้เกิด Thymine residues (T) ดังนั้น CpG จึงมีการกลายเป็น TpG ได้ ซึ่งเป็นเหตุผลว่าทำไมในจีโนมของมนุษย์จึงมีความถี่ของ CpG ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น คือมี CpG เพียง 21% ของความถี่ของ CpG ที่ควรจะมีทั้งหมด (Lander *et al.*, 2001) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าจาก CpG ที่มีทั้งหมดนั้นมี 5-mC ประมาณ 60-90% และมักพบบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ซึ่งเป็นบริเวณเริ่มต้นของกระบวนการถอดรหัส





รูปที่ 7 การเปลี่ยน cytosine เป็น 5'-methylcytosine โดยการทำงานของ DNMT โดยมี S-adenosylmethionine (SAM) เป็นตัวให้หมู่เมทิล (CH₃) (http://www.medchem.ch.cam.ac.uk/lab_rotations/murrell.php)

DNA methylation มีความสำคัญต่อการเจริญ (normal development) และยังเป็นกุญแจสำคัญในกระบวนการต่างๆ ได้แก่ genomic imprinting, X-chromosome inactivation, การยับยั้งการทำงานของ repetitive element รวมถึงกลไกการเกิดมะเร็ง ซึ่งการเกิด DNA methylation ส่งผลต่อ DNA ใน 2 รูปแบบ คือ

1. ทำให้เกิดการยับยั้งการจดจำของโปรตีนที่ต้องมาเกาะกับ DNA เช่น transcription factor ต่างๆ ทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการถอดรหัส
2. ทำให้โปรตีนอื่นๆ ที่มีหมู่เมทิลเป็นบริเวณจดจำมาเกาะได้ เช่น methyl binding protein (MBD) เป็นต้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของโครมาทิน และยับยั้งกระบวนการถอดรหัสในท้ายที่สุดเช่นเดียวกัน (Klose and Bird, 2006)

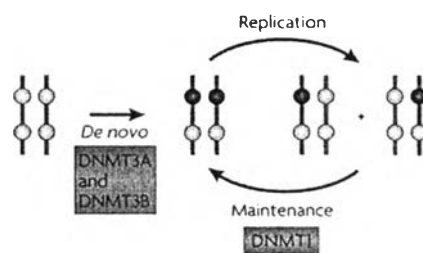
DNA methyltransferase (DNMT)

ดังที่ได้กล่าวข้างต้น การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเป็นผลมาจากการทำงานของ DNMT ซึ่งประกอบด้วย DNMT1, DNMT3a และ DNMT3b สามารถแบ่ง DNMT ตามการทำงานได้เป็น 2 ประเภท คือ

- 1) *de novo* methylation เป็นการเติมหมู่เมทิลให้แก่ดีเอ็นเอบนไซโตซีนในตำแหน่งใหม่ โดยไม่ต้องอาศัยดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมทิลแล้วเป็นต้นแบบ
- 2) maintenance methylation เป็นการดำรงการเกิดเมทิลเลชันระหว่าง cell generation ซึ่งจะเกิดขึ้นหลังจากที่ดีเอ็นเอเกิดการจำลองตัวและมีดีเอ็นเอที่มีหมู่เมทิลอยู่แล้วเป็นต้นแบบในการเติมหมู่เมทิลให้แก่ดีเอ็นเออีกสาย (Bird, 2002)

การสร้างรูปแบบเมทิลเลชันเริ่มแรกนั้นเกิดขึ้นใน embryonic fertilization เกิดจากการทำงานของ DNMT3a และ DNMT3b ซึ่งมีความจำเพาะในการเติมหมู่เมทิลแก่ non-methylated DNA (Okano *et al.*, 1998) ดังนั้น DNMT3a และ DNMT3b จึงจัดเป็น *de novo* methyltransferase ในขณะที่ DNMT1 ซึ่งเป็น DNMT ที่พบมากที่สุดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นั้น มีการแสดงออกสูงสุดในระหว่างระยะ S และทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้แก่ดีเอ็นเอใน somatic cell

หลังจากที่มีการจำลองตัวของดีเอ็นเอในแต่ละรอบ (Detich *et al.*, 2001) อีกทั้ง DNMT1 ยังมีความจำเพาะต่อบริเวณ hemimethylated CpGs มากกว่า unmethylated CpG site ดังนั้น DNMT1 จึงจัดเป็น maintenance methyltransferase (Hermann, 2004) รูปแบบการทำงานของ DNMT1, DNMT3a และ DNMT3b แสดงได้ดังรูปที่ 8 อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันมีข้อสงสัยว่า DNMT1 อาจไม่ได้ทำหน้าที่ maintenance methylation บริเวณ hemimethylated CpG sites เพียงอย่างเดียว แต่ DNMT3a และ DNMT3b อาจมีบทบาทในการจดจำบริเวณ hemi-methylated DNA เช่นเดียวกัน ข้อสันนิษฐานนี้นำไปสู่สมมติฐานว่า DNMT3a และ DNMT3b ทำหน้าที่เติมหมู่เมทิลให้เสร็จสมบูรณ์ จากนั้น DNMT1 จึงทำหน้าที่ตรวจสอบความถูกต้องของการเติมหมู่เมทิลอีกครั้ง เพื่อความสมบูรณ์ของการจำลองรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (Jones and Liang, 2009)



รูปที่ 8 รูปแบบการทำงานของ DNMT1 DNMT3a และ DNMT3b

โดยรูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันเกิดขึ้นใน germ cell และในช่วงการพัฒนา embryo ด้วยการทำงานของ DNMT3a และ DNMT3b หลังจากนั้น เมทิลเลชันที่เกิดขึ้น (วงกลมสีดำ (จะถูกถ่ายทอดต่อไปหลังจากเกิด DNA replication ด้วยการทำงานของ DNMT1

(http://www.nature.com/nrgjournal/v10/n11/fig_tab/nrg2651_F1.html#figure-title)

1. DNA methyltransferase1 (DNMT1)

DNMT1 ในมนุษย์ประกอบด้วย 1616 amino acid โครงสร้างของโปรตีน DNMT1 แสดงได้ดังรูปที่ 9 ทางด้าน N-terminal ของ DNMT1 ทำหน้าที่เป็น regulatory domain ประกอบด้วย

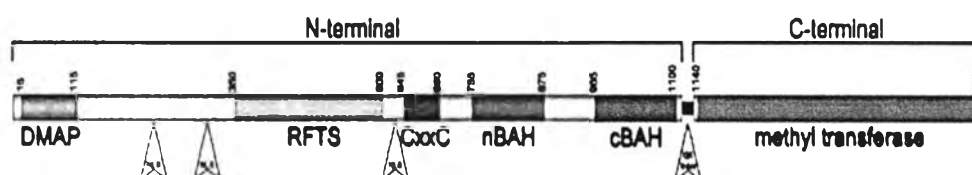
1) DNA methyltransferase-associated protein1 (DMAP1)-binding domain (residues 12-105) เป็นบริเวณที่ DMAP ซึ่งทำหน้าที่เป็น co-repressor ของกระบวนการถอดรหัสมาจับ และจะจับกับ histone deacetylase2 (HDAC2) ด้วย (Rountree *et al.*, 2000)

2) replication foci targeting sequence (RFTS) (residues 350-600) บทบาทของ RFTS ยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างชัดเจน แต่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ DNMT1 ในระยะ S ของ cell cycle (Leonhardt *et al.*, 1992)

3) CxxC zinc binding domain และ bromo adjacent homology (BAH) domain (residues 621-698) เป็นบริเวณควบคุมการทำงานในส่วน catalytic activity ในบริเวณ unmethylated CpG DNA substrate เมื่อทำให้เกิด proteolytic cleavage ที่ zinc binding domain พบว่ามีอัตราการเกิด *de novo* methylation สูงขึ้น จึงเป็นไปได้ว่า N-terminal

sequence นี้อาจทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ endogenous *de novo* methylation ของทางด้าน C-terminal domain (Bestor, 1992)

นอกจากนี้ DNMT1 ยังมี proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding motif ที่บริเวณ residues 162-171 ทำให้ DNMT1 สามารถไปเกาะยังบริเวณ replication foci ในช่วงที่มีกระบวนการ replication ได้ (Chuang *et al.*, 1997) อีกทั้งยังมี nuclear localization signals (NLS) หลายบริเวณ ได้แก่ residues 191-211, 259-378 และ 630-757 ซึ่งมีความสำคัญต่อการเกิด nucleocytoplasmic shuttling คือ การเข้าออกของโปรตีนระหว่าง nucleus และ cytoplasm (Cardoso and Leonhardt, 1999)

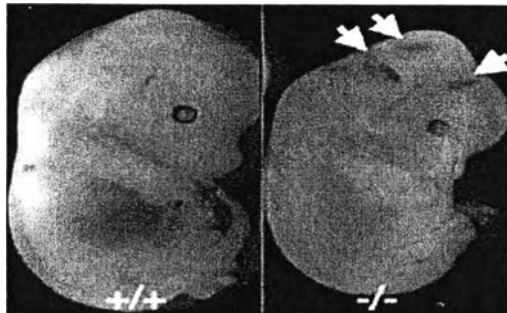


รูปที่ 9 โครงสร้างของโปรตีน DNMT1
(Dhe-Paganon *et al.*, 2011)

ในส่วนของ C-terminal ประกอบด้วย amino acid ที่ 1140-1616 ซึ่ง C-terminal ถูกแยกออกจาก N-terminal ด้วย Gly-Lys residues (G-K repeats) โดย C-terminal ทำหน้าที่เป็น catalytic methyltransferase domain ใน catalytic site นี้เองมี motif FxFxG ซึ่งเป็นบริเวณที่ S-Adenosylmethionine (SAM) ซึ่งเป็นตัวให้หมู่เมทิลมาเกาะ จากนั้น DNMT1 และ SAM ทำให้เกิดการเติมหมู่เมทิลบนไซโตซีนผ่าน Michael addition reaction pathway และในขั้นตอนสุดท้ายจะเกิด β -elimination ทำให้ได้ 5-mC ในที่สุด (Santi *et al.*, 1984)

2. DNA methyltransferase3 (DNMT3) family

DNMT3 family ประกอบด้วย DNMT3a และ DNMT3b ทั้งคู่จัดเป็น *de novo* DNA methyltransferase มีหน้าที่ในการสร้างรูปแบบดีเอ็นเอเมทิลเลชันให้แก่ unmethylated DNA ในช่วงที่มีการเจริญ (Okano *et al.*, 1998) ในหนูที่มี genotype *Dnmt3b*^{-/-} พบว่าเกิด embryonic lethality ในระยะ mouse embryonic Day 9.5 (E9.5) ถึง E13.5 ดังรูปที่ 10 แต่หากไม่มี DNMT3a แล้วพบว่าหนูจะมีชีวิตเพียงช่วงสั้นๆ หลังจากเกิดมา จึงเป็นไปได้ว่า ในช่วงแรกของการพัฒนา embryo นั้น DNMT3b อาจทำหน้าที่ในการสร้างรูปแบบเมทิลเลชัน จนถึงระยะ E9.5 หลังจากนั้น DNMT3a จึงทำหน้าที่ต่อ (Watanabe *et al.*, 2002) นอกจากนี้ การเกิดการกลายใน DNMT3b ยังทำให้เกิดโรค immunodeficiency centromere instability and facial anomalies (ICF) syndrome (Ueda *et al.*, 2006)



รูปที่ 10 การเกิด embryonic lethality ในหนู ซึ่งมี null allele $Dnmt3b^{-/-}$ เปรียบเทียบกับ wild type ($Dnmt3b^{+/+}$) (รูปแรก) พบว่า หนูที่มี $Dnmt3b^{-/-}$ มีเลือดออกในศีรษะในระยะ E13.5 ดังที่ลูกศรชี้ (รูปหลัง) (Ueda *et al.*, 2006)

2. การดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน (histone modification)

โครงสร้างพื้นฐานของโครโมโซมของยูคาริโอตอยู่ในรูป DNA-protein complex หรือเรียกว่า nucleosome ซึ่งประกอบด้วย DNA และคอร์ฮิสโตนโปรตีน (core histone) เป็น octamer ประกอบด้วยฮิสโตนโปรตีนละ 2 copy ได้แก่ H2A, H2B, H3 และ H4 แต่ละ nucleosome จะเชื่อมโยงกันด้วย linker DNA และ histone H1 เพื่อฟอร์มโครมาทิน (Luger *et al.*, 1997) นอกจากนี้ บริเวณ N-terminal ของ histone H3 และ H4 จะมีหาง (tail) ยื่นออกมา ซึ่งมี lysine และ arginine เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ หางที่ยื่นมานี้สามารถจับกับ DNA และโปรตีนอื่นๆ หรือ transcription factor ได้อีกด้วย (Luger and Richmond, 1998) บริเวณหางของ H3 และ H4 นี้เองจึงเป็นบริเวณที่เกิด histone modification ได้แก่ histone acetylation, histone deacetylation และ histone methylation

Histone modification ที่ได้รับการศึกษา และเข้าใจกลไกมากที่สุดขณะนี้ คือ การเกิด histone acetylation ในกระบวนการนี้ histone acetyltransferase (HAT) จะเคลื่อนย้ายหมู่ acetyl จาก acetyl-coenzyme A ไปยังบริเวณ $-NH_3^+$ ของ lysine residue ที่บริเวณหางของ histone ที่ยื่นออกมา ทำให้เกิดการกำจัด positive charge บน histone ส่งผลให้เกิดการลดแรงกระทำระหว่างกัน ระหว่าง N-terminal ของ histone และ negative charge ของ phosphate group บน DNA จึงเกิดเป็นโครงสร้างที่มีการคลายตัวของโครมาทิน เรียกว่า euchromatin ซึ่ง transcription factor ต่างๆ สามารถเข้ามาจับกับดีเอ็นเอได้ จึงเกิดกระบวนการถอดรหัสขึ้น (Kuo and Allis, 1998) การสูญเสียการทำงานของ histone acetylation นำไปสู่การแสดงออกของยีนที่บกพร่อง และส่งผลให้เกิดมะเร็งได้

อย่างไรก็ตาม โครงสร้างที่มีการคลายตัวของโครมาทินที่เกิดจาก histone acetylation นี้สามารถผันกลับได้ด้วยการทำงานของ histone deacetylase (HDAC) ซึ่งจะนำหมู่ acetyl ออกจากบริเวณหางของ histone และนำกลับไปเติมให้แก่ coenzyme A จึงทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ positive charge บนหางของ histone ดังนั้น histone ที่มี positive charge และ DNA ที่มี negative charge จึงมีแรงกระทำระหว่างกันมากขึ้น เกิดเป็นโครงสร้างที่มีการหดตัวกันอย่าง

หนาแน่นของโครมาติน เรียกว่า heterochromatin และทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสในที่สุด (Vaissiere *et al.*, 2008)

สำหรับการเกิด histone methylation นั้น เป็นกระบวนการเคลื่อนย้าย methyl group ไปยัง amino acid ที่เป็นองค์ประกอบของฮิสโตนโปรตีนจากการทำงานของ histone methyltransferase ซึ่งมีความจำเพาะต่อ lysine (K) และ arginine (R) การเกิด histone methylation นี้มีความสัมพันธ์ต่อการยับยั้งและการกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส เช่น การเกิด methylation ที่ histone H3 lysine4 (H3K4), H3K36 และ H3K79 มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส แต่การเกิด methylation ของ H3K9, H3K27 และ H4K20 กลับมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งกระบวนการถอดรหัส เป็นต้น (Kouzarides, 2007)

ความเชื่อมโยงระหว่างการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน และการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตนต่อการเกิดการยับยั้งการทำงานของยีน (gene silencing) และการเกิดมะเร็ง

ดังที่ได้กล่าวข้างต้น การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน และการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน จัดเป็นกลไกทาง epigenetics ซึ่งทั้งคู่ต่างมีความเชื่อมโยงกันในการควบคุมกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ รวมถึงการควบคุมการแสดงออกของยีน การยับยั้งการทำงานของกลไกทาง epigenetics ใดๆ หนึ่งข้างต้น จะส่งผลกระทบต่อกลไกอีกอย่างอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ เช่น การเกิด hypermethylation บริเวณ CpG ในโปรโมเตอร์ของยีนจะชักนำให้เกิด histone deacetylation โดยมี DNA methylation เป็นบริเวณจดจำ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม กลไกทั้งสองนี้ยังไม่ได้รับการศึกษาย่างชัดเจนว่าเหตุการณ์ใดเกิดขึ้นก่อนหรือหลังในการทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของยีนในเซลล์มะเร็ง (Cairns, 2001)

Buschhausen และคณะ (1986) ได้ศึกษาความเชื่อมโยงระหว่างการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน และการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน พบว่า pre-methylated DNA ที่ถูกชักนำให้เข้าสู่เซลล์นั้นก่อให้เกิดการยับยั้งกระบวนการถอดรหัส และพบว่าโครมาตินมีโครงสร้างที่พันตัวกันอย่างหนาแน่น ต่อมามีการศึกษาอีกมากมาย พบว่า การยับยั้งกระบวนการถอดรหัส มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด DNA hypermethylation ที่บริเวณ CpG ในโปรโมเตอร์, histone deacetylation และ histone methylation (Vaissiere *et al.*, 2008)

อย่างไรก็ดี ความเชื่อมโยงกันระหว่างการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน ได้แก่ histone acetylation/deacetylation และการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันอาจเกิดขึ้นได้ในสองทิศทาง คือ

1) การเกิด DNA methylation อาจเป็นเหตุการณ์แรกที่เกิดขึ้น แล้วจึงชักนำให้เกิด histone deacetylation และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครมาติน แล้วทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของยีน

2) การเกิด histone deacetylation อาจเกิดขึ้นเป็นเหตุการณ์แรกที่เกิดขึ้น ซึ่ง hypoacetylated histone นี้ อาจเป็นบริเวณจดจำของ DNMT จากนั้นจึงเกิด DNA methylation ที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน แล้วจึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของยีน

ในปี 1990 มีการศึกษาพบว่า การเกิด CpG methylation นั้นเกิดขึ้นเป็นเหตุการณ์แรกในบริเวณโปรโมเตอร์ แล้วจึงชักนำให้เกิดกระบวนการยับยั้งการถอดรหัส โดยมี methyl-CpG binding protein (MeCP1 และ MeCP2) (Meehan *et al.*, 1992) และ methyl-CpG-binding domain protein (MBD) เข้ามาเกี่ยวข้อง โดย MeCP2 และ MBD จะเป็นบริเวณจดจำของ histone deacetylase ซึ่งถูกชักนำมาบริเวณโปรโมเตอร์ จากนั้นจึงเกิด histone deacetylation (Jones *et al.*, 1998) นอกจากนี้ MeCP2 ยังมีความเกี่ยวข้องกับ histone methyltransferase ซึ่งทำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณฮิสโตน H3K9 (Fuks *et al.*, 2001)

heterochromatin ซึ่ง Strunnikova และคณะ (2005) ได้ทำการทดลองและแสดงให้เห็นว่า การยับยั้งยีน *RASSF1A* มีความเชื่อมโยงกับการเกิด histone H3 deacetylation และ H3K9 methylation ซึ่งเกิดขึ้นก่อน *de novo* DNA methylation การค้นพบนี้ยังมีความสอดคล้องกับการศึกษาใน *Neurospora crassa* ซึ่งพบว่า DNA methylation เกิดขึ้นได้หลังจากการเกิด H3K9 methylation (Tamaru and Selker, 2001) นอกจากนี้ มีงานวิจัยได้ศึกษาการยับยั้งการทำงานของยีนโดยชักนำ transgene เข้าสู่เซลล์ พบว่า histone H3 hypoacetylation นั้นเป็นเหตุการณ์แรกที่เกิดขึ้นในกระบวนการยับยั้งการทำงานของยีน จากนั้นจึงเกิด H3K9 methylation แล้วจึงส่งผลให้เกิด hypermethylation ขึ้นที่บริเวณ CpG ในโปรโมเตอร์ (Mutskov and Felsenfeld, 2004) จากผลการศึกษาที่ได้ เป็นไปได้ว่า การเกิด methylation บริเวณ CpG อาจเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นทีหลังการเกิด histone deacetylation

อีกทั้ง การศึกษาของ Mutskov และคณะ (2002) ได้แสดงให้เห็นว่า การเกิด histone acetylation มีความสำคัญต่อการดำรง unmethylated state ที่บริเวณโปรโมเตอร์ โดย histone acetylation นั้นมีบทบาทหลักในการรักษาการทำงานของยีน ผ่านการยับยั้งการจับกันระหว่าง methyl-binding domain (MBD) protein และ Mi-2 deacetylase complex ที่บริเวณ CpG ของโปรโมเตอร์ ทำให้โครมาทินเป็นโครงสร้างเปิด transcription factor จึงเข้าไปยังบริเวณ histone H3 และ H4 acetylation ได้ ในขณะที่การเกิด DNA methylation มักนำไปสู่การเกิด histone deacetylation นอกจากนี้ มีการศึกษาการใช้ histone deacetylase inhibitor (HDACi) เช่น valporate (VPA) หรือ trichostatin A (TSA) พบว่า VPA และ TSA ทำให้เกิดการกำจัด MeCP2 จาก methylated cytosine จึงทำให้ histone acetyltransferase (HAT) ทำงานได้ และเกิด histone acetylation ขึ้น ซึ่งการเกิด hyperacetylated histone นี้จะเป็นตัวชักนำ DNA demethylases มายังบริเวณโปรโมเตอร์ ดังนั้น DNA methylation จึงไม่สามารถเกิดขึ้นได้ อีกทั้งยังพบว่า เมื่อให้ HDACi แก่เซลล์ ที่บริเวณโปรโมเตอร์มีการเกิด methylation ลดลงด้วย (Dong *et al.*, 2007)

ทั้งนี้ ไม่ว่าจะ DNA methylation หรือ histone acetylation/deacetylation จะเกิดขึ้นก่อนกัน เหตุการณ์ทั้งสองล้วนส่งผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของทั้ง transgene และ endogenous gene ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่า ลำดับและระยะเวลาของการเกิด DNA methylation หรือ histone deacetylation ที่ส่งผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้น อาจขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ ตำแหน่งของยีน หรือเป็นผลมาจากสภาวะแวดล้อมอื่นๆ ก็เป็นไปได้ที่ชักนำให้เหตุการณ์ทาง epigenetics ขึ้น (Vaissiere *et al.*, 2008)



ปัจจุบันมีการศึกษาจำนวนมาก พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีนอันเนื่องมาจากกลไกทาง epigenetics เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็ง เช่น การศึกษาการเกิด DNA methylation ในยีนต้านมะเร็ง พบว่า บริเวณ CpG island ของยีนต้านมะเร็งมีการเกิด hypermethylation ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งหลายชนิด เช่น การเกิด hypermethylation บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *Rb* (retinoblastoma tumor suppression gene), *hMLH1* (a homologue of MUltL), *BRCA1* (breast-cancer susceptibility gene1) และ *VHL* (associated with von Hippel-Lindau disease) เป็นต้น (Esteller, 2008) การเกิด hypermethylation ของยีนต้านมะเร็งนี้มีผลต่อวัฏจักรของเซลล์ การซ่อมแซมดีเอ็นเอ การหลีกเลี่ยงโปรแกรมการตายของเซลล์ การยึดเกาะกันระหว่างเซลล์ ซึ่งล้วนแต่ส่งผลต่อการพัฒนาการเกิดมะเร็งทั้งสิ้น (Herman and Baylin, 2003) เช่นเดียวกัน มีการศึกษาการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตน พบว่าการเกิด histone acetylation และ methylation มีผลโดยตรงต่อกระบวนการต่างๆ ภายในนิวเคลียส เช่น กระบวนการถอดรหัสของยีน การซ่อมแซมดีเอ็นเอ การจำลองตัวของดีเอ็นเอ และการจัดการโครงสร้างของโครโมโซม โดยปกติแล้ว การเกิด histone acetylation มีความเชื่อมโยงกับการกระตุ้นการถอดรหัสของยีน แต่การเกิด histone methylation นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโน และตำแหน่งของ histone tail ที่จะทำให้เกิดกระบวนการกระตุ้น หรือยับยั้งการถอดรหัสของยีน มีการศึกษาพบว่า การเกิด hypermethylation ของ CpG island ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีนต้านมะเร็งยังมีความเชื่อมโยงกับการเกิด histone H3/H4 deacetylation การสูญเสียเมทิลเลชันของ H3K4 trimethylation และการเกิดเมทิลเลชันของ H3K9 และ H3K27 trimethylation (Jones and Baylin, 2007) สำหรับการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตนที่ส่งผลต่อการเกิดมะเร็ง พบว่าการเกิด hypoacetylation และ hypermethylation ของ histone H3 และ H4 ส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของยีนที่มีคุณสมบัติเหมือนยีนต้านมะเร็ง เช่น cell cycle kinase inhibitor *p21^{WAF1}* (Richon *et al.*, 2000) นอกจากนี้ การสูญเสียการเกิดเมทิลเลชันของ histone H4 ไม่ว่าจะเป็น monoacetylation หรือ triacetylation ยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของเซลล์มะเร็ง เช่น การสูญเสีย monoacetylation ที่ Lys16 และ trimethylation ของ Lys20 ของ histone H4 สามารถพบได้ในมะเร็งเต้านม และในมะเร็งต่อมลูกหมากพบว่า การเกิด dimethylation ของ Lys4 และ acetylation ของ Lys18 ของ histone H3 สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ความเสี่ยงของการเป็นมะเร็งต่อมลูกหมากได้ (Seligson *et al.*, 2005) เป็นต้น

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าการเกิด DNA methylation และการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตนมีความสัมพันธ์ต่อการพัฒนาการเกิดมะเร็ง นักวิจัยบางกลุ่มจึงเล็งเห็นความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากการเกิด DNA methylation หรือการดัดแปลงโปรตีนฮิสโตนให้เกิดประโยชน์ในระดับคลินิก จึงมีการพัฒนาการใช้ DNA hypermethylation มาใช้เป็น marker สำหรับเป็นตัวทำนาย วิเคราะห์ และการตอบสนองต่อการเกิดและการรักษาโรคมะเร็ง เช่น Glutathione S-transferase gene (*GSTP1*) มีเมทิลเลชันถึง 80-90% ในผู้ป่วยมะเร็งต่อมลูกหมาก แต่ใน benign hyperplastic tissue ของต่อมลูกหมากพบว่าไม่มีการเกิด hypermethylation (Jeronimo *et al.*, 2001) ดังนั้น การตรวจสอบการเกิดเมทิลเลชันของยีน *GSTP1* จึงอาจใช้แยกมะเร็งต่อมลูกหมากและระยะการพัฒนาของ benign ออกจากกันได้ด้วยวิธีการตรวจปัสสาวะของผู้ป่วย (Cairns *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมี

การวิเคราะห์การเกิด hypermethylation ของยีนต้านมะเร็งและ DNA hypermethylome profile เพื่อใช้ในการทำนายอาการของโรคในผู้ป่วยมะเร็ง ผลการศึกษาพบว่า การเกิด hypermethylation ของ death-associated protein kinase (DAPK), *p16^{INK4a}* และ epithelial membrane protein 3 (EMP3) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งสมองของผู้ป่วย ตามลำดับ (Esteller, 2007) อีกทั้ง การเกิด hypermethylation ของแต่ละยีนยังอาจใช้เป็นตัวทำนายการตอบสนองต่อการรักษาโรคได้ เช่น การเกิดเมทิลเลชันของ DNA-repair enzyme O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) ใน gliomas สามารถใช้เป็นตัวติดตามการตอบสนองต่อการทำ chemotherapy จากการให้ carmustine (BCNU) (Esteller *et al.*, 2000) หรือ temozolomide (Hegi *et al.*, 2005) ได้อีกด้วย เป็นต้น

ปัจจัยแวดล้อมต่อการเกิดสภาวะเหนือพันธุกรรม

มนุษย์ได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมทุกวันจากลักษณะการใช้ชีวิต ตลอดจนลักษณะการทำงาน เป็นต้น ความเป็นพิษจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ nickel, cadmium, arsenic, aflatoxin, ionizing radiation, ควันบุหรี่ และการติดเชื้อต่างๆ เช่น HPV หรือ *Helicobacter pylori* มีความเป็นไปได้ที่จะส่งผลต่อการเกิด DNA methylation และการจัดการโครงสร้างของโครมาติน และฮิสโตน ซึ่งยังส่งผลกระทบต่อรูปแบบการแสดงออกของยีน รวมถึงการเกิด malignant transformation ด้วย (Feinberg and Tycko, 2004)

มีการศึกษาพบว่า ionizing radiation โดยเฉพาะ α -rays มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มความเสียหายของการเกิด lung adenocarcinoma ซึ่งเกิดจากโปรโมเตอร์เมทิลเลชันของยีนต้านมะเร็ง เช่น *p16 (CDKN2A)* (Belinsky *et al.*, 2004) นอกจากนี้ ultraviolet (UV) ยังเป็นสารก่อมะเร็งซึ่งชักนำให้เกิด melanoma และ non-melanoma skin cancer (Miller and Weinstock, 1994) อีกทั้ง การได้รับ UV เป็นระยะเวลานานยังส่งผลต่อการเกิด global DNA hypomethylation ในหนูอีกด้วย (Mittal *et al.*, 2003)

การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการเกิดเมทิลเลชันยังถูกชักนำได้ด้วย arsenic และ cadmium ซึ่ง sodium arsenate ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ genomic hypomethylation ของโปรโมเตอร์ของยีน *Ha-ras* ซึ่งเป็น oncogene การแสดงออกของ *ras* นี้สอดคล้องกับการลดลงของการเกิดเมทิลเลชันของยีนนี้ อีกทั้ง arsenic ยังชักนำให้เกิด tumor formation อีกด้วย (Okoji *et al.*, 2002) สำหรับ cadmium นั้น การสัมผัส cadmium มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งตับ มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งไต และมะเร็งกระเพาะอาหาร เป็นต้น (Waalkes, 2000) cadmium ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ DNA methyltransferase จึงเกิด hypomethylation (Takiguchi *et al.*, 2003) ในขณะที่การเกิด hypomethylation อันเนื่องมาจาก arsenic นั้นเป็นเพราะการขาด S-adenosyl-methionine ซึ่งเป็นสารที่สำคัญต่อการเกิด DNA methylation และ arsenic metabolism (Zhao *et al.*, 1997)

นอกจากสารประกอบต่างๆ แล้ว การติดเชื้อไวรัสเป็นอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลต่อการเกิดมะเร็ง อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการเกิดเมทิลเลชันภายในจีโนมของ host เช่น

- การติดเชื้อ hepatitis B virus (HBV) : การศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นว่า tumor suppress gene $p16^{INK4}$ มักจะถูกยับยั้งการทำงานในเซลล์ที่ติดเชื้อ HBV เนื่องจากการเกิดโปรโมเตอร์เมทิลเลชันเพิ่มขึ้น (Narimatsu *et al.*, 2004) อีกการศึกษาหนึ่งพบว่า บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน glutathione S-transferase (*GSTP1*) ซึ่งสร้างเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการปกป้องเซลล์จากการเกิด oxidation damage นั้น มีระดับการเกิดเมทิลเลชันถึง 65% ใน hepatocellular carcinoma (HCC) ที่ติดเชื้อ HBV (Zhong *et al.*, 2002) เป็นต้น

- การติดเชื้อ simian virus 40 (SV40) : มีการศึกษาระดับเมทิลเลชันของยีน 4 ยีน ได้แก่ hyperplastic polyps (*HPP1*), Ras-association domain family 1A (*RASSF1A*), cyclin D2 และ Ras-related associated with diabetes (*RRAD*) พบว่ายีนเหล่านี้มีระดับเมทิลเลชันสูงใน malignant mesothelioma (MM) ที่ติดเชื้อ SV40 มากกว่าใน MM ที่ไม่มีการติดเชื้อ SV40 อีกทั้งใน human mesothelial cell (HM) ที่ติดเชื้อ SV40 นั้นพบว่ามียีน 7 ยีน ได้แก่ *RASSF1A*, *HPP1*, *RRAD*, decoy receptor1(*DcR1*), target of methylation – induced silencing (*TMS1*), cellular retinol binding protein (*CRBP1*) และ hypermethylated in cancer (*HIC-1*) มีระดับเมทิลเลชันที่ผิดปกติ โดยเฉพาะใน HM ที่เลี้ยงมากกว่า 50 passages พบระดับการเกิดเมทิลเลชันที่ผิดปกติสูงมาก ซึ่งอาจเกิดจากการสะสมของ epigenetic error หรือความผิดพลาดในระหว่างช่วงการจำลองตัวของดีเอ็นเอ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อ SV40 มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเมทิลเลชันของยีนหลายๆ ยีนใน MM ซึ่งส่งผลให้เกิดโรค MM (Suzuki *et al.*, 2005)

- การติดเชื้อ Epstein-barr virus (EBV) : การติดเชื้อ EBV มีความสัมพันธ์กับการเกิด nasopharyngeal carcinoma (NPC), Burkitt's lymphoma, Tcell lymphoma และมะเร็งกระเพาะอาหาร ใน Burkitt's lymphoma พบว่ามีเมทิลเลชันของยีน *BIM* ใน B-cell ที่ติดเชื้อ EBV แต่ไม่มีเมทิลเลชันใน B-cell ที่ไม่มีการติดเชื้อ (Pachos *et al.*, 2009) เช่นเดียวกับ EBV latent membrane protein1 (*LMP1*) สามารถกระตุ้นและเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ DNMT1 และส่งผลให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ และการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน E-cadherin (Tsai *et al.*, 2006) เป็นต้น

- การติดเชื้อ human papillomavirus (HPV) : มีการศึกษาพบว่า ในมะเร็งศีรษะและคอมีการเกิด hypomethylation ของ *LCR* ของ HPV ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกในระดับต่ำของ *E6* และ *E7* ด้วย แต่ในช่วงที่มีการพัฒนาของ neoplasia พบว่า *LCR* จะมีระดับเมทิลเลชันสูงขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งส่งผลให้ *E6* และ *E7* ซึ่งเป็น oncogenic gene ของ HPV มีการแสดงออกสูงขึ้นเป็นลำดับตามระยะการพัฒนาของมะเร็ง (Park *et al.*, 2011) อีกทั้งยังพบว่า ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV มี Langerhans cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ต่อการตอบสนองของระดับภูมิคุ้มกันลดลง อีกทั้งโปรตีน *E7* ของ HPV สามารถเพิ่มกิจกรรมของ DNMT1 และลดระดับโปรตีน E-cadherin ได้ ซึ่งการเคลื่อนย้ายของ Langerhans cells จำเป็นต้องอาศัยโปรตีน E-cadherin ดังนั้น การยับยั้งการทำงานของ DNMT1 ด้วยการยับยั้ง *E7* จะส่งผลให้ระดับของ E-cadherin สูงขึ้น อาจเป็นอีกวิธีหนึ่งในการเพิ่ม Langerhans cell ให้มีจำนวนเพิ่มขึ้นได้ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV (Laurson *et al.*, 2010) นอกจากนี้ รูปแบบการติดเชื้อของ HPV แบบ integration ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* (Yanatsanejit *et al.*, 2011) ซึ่งในผู้ป่วยมะเร็งปาก

มดลูกพบว่ามี การเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* สูงถึง 93% (Kitkumthorn *et al.*, 2006) อีกทั้งโปรตีน E7 ของ HPV ยังสามารถจับกับ DNMT1 และเพิ่มกิจกรรมของ DNMT1 ได้ (Burgers *et al.*, 2007) เป็นต้น

Cyclin A1 (*CCNA1*)

ยีน *CCNA1* จัดอยู่ใน cyclin family ซึ่งเป็น family ที่มีความ conserve สูงมาก ยีน *CCNA1* ตั้งอยู่อยู่บนโครโมโซมแห่งที่ 13 ตำแหน่ง 13q12.3-q13 โดยปกติ cyclin ทำหน้าที่เป็น activating subunit ของ enzyme complex ร่วมกับ cyclin-dependent kinase (CDK) ซึ่งแต่ละ cyclin จะมีรูปแบบการแสดงออกและการย่อยสลายที่แตกต่างกันไปทำให้เกิดการทำงานร่วมกันในรูปแบบต่างๆ ในช่วงวัฏจักรของเซลล์

สำหรับ cyclin A (*CCNA*) ประกอบด้วย *CCNA1* และ *CCNA2* ทั้งคู่สามารถจับกับ CDK2 ได้ ซึ่ง *CCNA2* มีความจำเป็นต่อการจำลองตัวของดีเอ็นเอและการแบ่งตัวของ somatic cell ในขณะที่ *CCNA1* มีการแสดงออกสูงมากเฉพาะในอวัยวะแต่มีการแสดงออกในระดับต่ำในเนื้อเยื่อทั่วไป (Coverley *et al.*, 2002) และจากการทำ in situ hybridization ยืนยันได้ว่า *CCNA1* มีการแสดงออกใน germ cell จึงเป็นไปได้ว่า *CCNA1* อาจมีบทบาทในการแบ่งตัวของเซลล์แบบ meiotic (Sweeney *et al.*, 1996) การค้นพบนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาใน *Xenopus* ซึ่งพบว่า *CCNA1* มีการแสดงออกเฉพาะใน egg และในระยะแรกของ embryo แต่ไม่พบในระยะหลังของ embryo หรือแม้แต่ใน cultured cell (Hoew *et al.*, 1995) และสำหรับใน somatic cell นั้น พบว่าใน hematopoietic progenitor cells ยีน *CCNA1* ชักนำให้เกิด mitotic catastrophe คือรูปแบบการตายของเซลล์อื่นเนื่องมาจากความผิดปกติของ mitosis จึงนำไปสู่ในมะเร็งไต รังไข่ และปอดได้ (Rivera *et al.*, 2006) นอกจากนี้ Ji และคณะ (2005) ยังพบว่า *CCNA1* มีหน้าที่ในการขับเคลื่อนวัฏจักรของเซลล์ให้เข้าสู่ช่วง G1/S ได้มากขึ้นในอวัยวะอีกด้วย

อย่างไรก็ตาม Muller-Tidow และคณะ (2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของ *CCNA1* และ promoter activity ในหนูที่ได้รับ UV และ γ -irradiation พบว่าหนูที่มีจีโนไทป์ชนิด *cyclinA*^{-/-} มี radiosensitivity สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ wild type จึงได้พยายามศึกษาบทบาทที่อาจเป็นไปได้ของ *CCNA1* ต่อการซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วยวิธี yeast triple hybrid screen ผลการทดลองพบว่า บทบาทหนึ่งของ *CCNA1* คือการซ่อมแซมการกรอกรากของดีเอ็นเอสายคู่ผ่านกระบวนการ non-homologous end-joining และโปรตีน KU70 นอกจากนี้ยังพบการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ทำให้เกิดมะเร็งชนิดต่างๆ ดังนี้ Weiss และคณะ (2012) พบว่ามีการเกิดเมทิลเลชันของยีน *CCNA1* ส่งผลต่อการลดลงของโปรตีน *CCNA1* เองใน cervical neoplasia รวมถึงการศึกษาของ Kitkumthorn และคณะ (2006) ที่ได้กล่าวข้างต้นซึ่งพบว่าบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* มีการเกิดเมทิลเลชันถึง 93% ในมะเร็งปากมดลูก, การศึกษาใน primary cell culture ของมะเร็งโพรงหลังจมูก พบว่ามีการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ถึง 100% (ปฐมวดี ญาณทัศน์ย์จิต, 2007) และยังพบการเกิดเมทิลเลชัน ของยีน *CCNA1* ในมะเร็งตับด้วย (Yu *et al.*, 1988) ตลอดจนการศึกษาของ Rivera และคณะ (2006) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *CCNA1* นั้นเป็น downstream ของ *p53* ซึ่งการแสดงออกของ *CCNA1* ทำให้เกิดการชักนำของ wild type *p53* ที่ทำหน้าที่ซ่อมแซมดีเอ็นเอ

ในมะเร็งศีรษะและคอเพิ่มขึ้น ถึงแม้ว่า *CCNA1* ยังไม่ได้รับการพิสูจน์ว่าเป็นยีนต้านมะเร็ง แต่ด้วยหน้าที่ของ *CCNA1* ตามที่กล่าวมาในย่อหน้าข้างต้น ได้แก่ การซ่อมแซมดีเอ็นเอที่เสียหายภายในเซลล์ การชักนำให้เกิดการเข้าสู่โปรแกรมการตายของเซลล์ อีกทั้งการสูญเสียการทำงานของ *CCNA1* อันเนื่องมาจากการเกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ยังส่งผลให้เกิดมะเร็งหลายชนิด จึงอาจอนุมานได้ว่า *CCNA1* อาจมีหน้าที่เป็นยีนต้านมะเร็ง

จากการศึกษาข้างต้นที่ได้กล่าวมาทั้งหมด จึงนำไปสู่สมมติฐานในการทดลองครั้งนี้ว่าโปรตีน E7 ของ HPV มีความสามารถในการชักนำให้เกิดเมทิลเลชันบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *CCNA1* ด้วยการจับกับ DNMT1 ทำให้ยีน *CCNA1* ที่อาจมีบทบาทเป็นยีนต้านมะเร็งไม่สามารถแสดงออกได้ และนำไปสู่การเกิดมะเร็งปากมดลูกในที่สุด

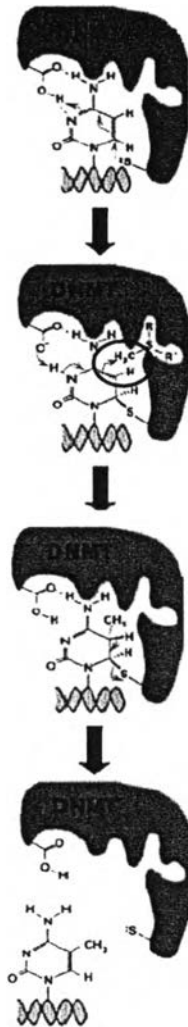
เทคนิคที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

1. การเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เติม 5'-azacytidine

เหตุการณ์ทาง epigenetics ได้แก่ DNA methylation และ histone modification ต่างจาก mutation ตรงที่ epigenetics สามารถผันกลับได้ ดังนั้น จึงเป็นไปได้ที่จะทำให้ยีนที่มีเมทิลเลชันกลับมามีการแสดงออกอีกครั้งด้วยการใช้ demethylating reagents (Yoo and Jones, 2006) ปัจจุบันมีการใช้ DNA demethylating drug ในระดับคลินิกเพื่อรักษามะเร็งบางชนิด ได้แก่ 5'-azacytidine และ 5'-aza-2'deoxyctidine ซึ่งใช้ในการรักษา myelodysplastic syndrome (MDS) และ leukemia (Mack, 2006)

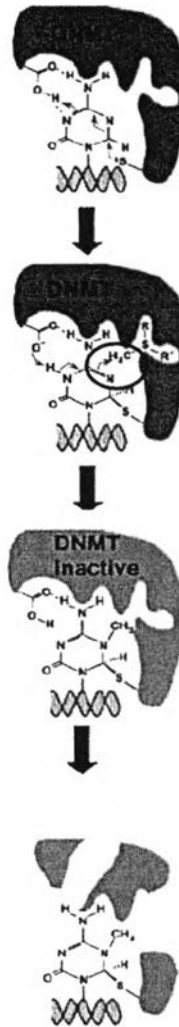
5'-azacytidine ได้รับการสังเคราะห์ขึ้นเกือบ 40 ปีมาแล้ว ซึ่ง 5'-azacytidine สามารถยับยั้งการเกิด DNA methylation ภายในเซลล์ได้ โดยปกติแล้วเมื่อ 5'-azacytidine เข้าสู่เซลล์แล้ว จะถูกเปลี่ยนเป็น 5'-azadeoxycytidine ด้วยเอนไซม์ ribonucleotide reductase ซึ่งจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการจำลองตัวของดีเอ็นเอ โดย azacytosine สามารถแทนที่ cytosine ได้ โดยทั่วไป cytosine-guanine dinucleotide จะเป็นบริเวณจดจำสำหรับ DNA methyltransferase (DNMT) จากนั้นจึงเกิด methylation reaction ผ่าน nucleophilic attack ที่ carbon ตำแหน่งที่ 6 ของ cytosine ring และ DNMT เกิดเป็น covalent bond ระหว่างกัน ในขั้นสุดท้ายจะเกิด β -elimination ระหว่าง carbon ตำแหน่งที่ 5 และ DNMT หลังจากนั้น methyl cytosine และ DNMT จึงแยกออกจากกัน แต่ใน azacytosine นั้นตำแหน่งที่ 5 ใน azacytosine carbon ring จะถูกแทนที่ด้วย nitrogen ดังนั้น DNMT จึงยังจับกับ DNA ได้ด้วย covalent bond ในกรณีนี้การทำงานของ DNMT จะถูกยับยั้ง อีกทั้งการจับกันระหว่าง DNA และ DNMT นี้ยังเป็น DNA damage signaling ส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของ DNMT ขึ้น ดังรูปที่ 11 ดังนั้น การเกิดเมทิลเลชันของยีนในเซลล์ที่ได้รับ 5'-azacytidine จึงลดลง (Stresemann and Lyko, 2008) ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนนั้นๆ ด้วย

(1) Cytosine



enzyme release

(2) 5'-Azacytidine



enzyme degradation

รูปที่ 11 การทำงานระหว่าง 1) DNMT-cytosine และ 2) DNMT-5'-azacytidine
ซึ่งส่งผลให้เกิดการย่อยสลายของ DNMT (Stresemann and Lyko, 2008)

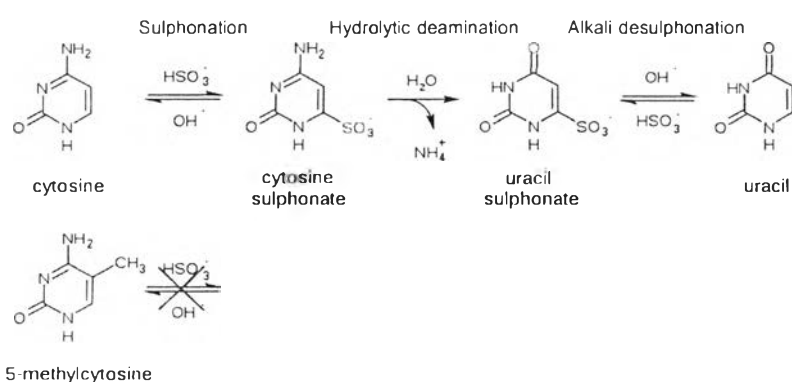
2. การตรวจสอบรูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

2.1 sodium bisulfite treatment

การทำ sodium bisulfite treatment เป็นวิธีการที่ใช้แยก cytosine และ 5'-methylcytosine ซึ่งเป็นรูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันออกจากกัน โดยนำ DNA เริ่มต้นที่ต้องการวิเคราะห์มาผ่านกระบวนการต่างๆ ดังนี้

- 1) Sulphonation เป็นการเปลี่ยน cytosine เป็น cytosine-6-sulphonate
- 2) Hydrolytic deamination ทำให้ cytosine-6-sulphonate กลายเป็น uracil-6-sulphonate ปฏิกริยานี้จะเกิดขึ้นเมื่อมี sodium bisulphite ความเข้มข้นสูง และมีอุณหภูมิสูง มักเกิดที่ pH 5.0-6.0
- 3) Alkali desulphonation เป็นการกำจัด sulphate ออกไปจาก uracil-6-sulphonate ทำให้ได้ uracil (Mills and Ramsahoye, 2002)

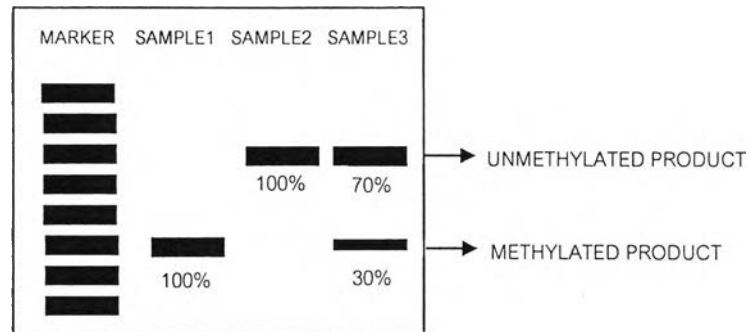
สำหรับขั้นตอนการทำ sodium bisulfite treatment จะกล่าวต่อไปในบทที่ 3 หัวข้อ 1.5 หลังการทำ sodium bisulfite treatment แล้ว cytosine จะถูกเปลี่ยนเป็น uracil และ uracil จะถูกแทนที่ด้วย thymine ในการทำ PCR ในขณะที่ 5'-methylcytosine จะไม่สามารถผ่านปฏิกิริยาดังที่กล่าวข้างต้นได้ จึงยังคงเป็น cytosine เหมือนเดิม ดังรูปที่ 12 ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ sodium bisulfite treatment จะถูกนำไปวิเคราะห์รูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันได้หลายวิธี เช่น methylation specific PCR (MSP) หรือ combined bisulfite restriction analysis (COBRA) เป็นต้น (Fraga *et al.*, 2002)



รูปที่ 12 ปฏิกริยาในการทำ sodium bisulfite treatment ซึ่ง cytosine จะถูกเปลี่ยนเป็น uracil ในขณะที่ 5'-methylcytosine ยังคงเป็น cytosine เหมือนเดิม (http://en.wikipedia.org/wiki/combined_bisulfite_restriction_analysis)

2.2 methylation specific PCR (MSP)

ปัจจุบัน MSP เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากสำหรับใช้ในการศึกษารูปแบบการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยจะใช้ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ sodium bisulfite treatment แล้วมาทำ

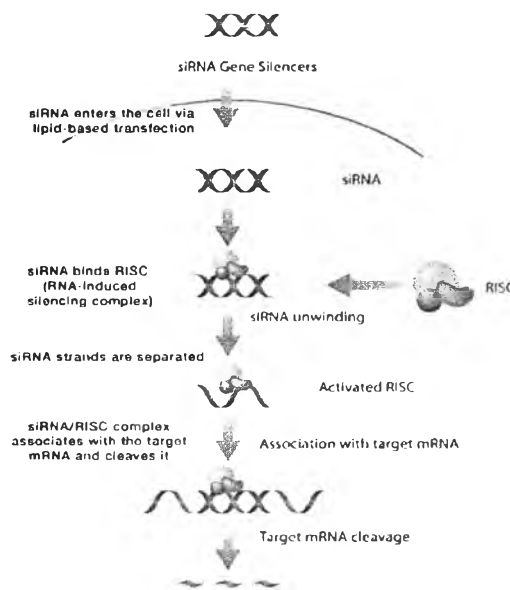


รูปที่ 14 methylated และ unmethylated PCR product ที่ได้จากการทำ duplex MSP

3. Small interfering RNA (siRNA)

siRNA เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในเซลล์ยูคาริโอต ซึ่งมีความสำคัญต่อการป้องกันและต่อต้านการติดเชื้อไวรัส การป้องกันจีโนมจาก jumping gene หรือ transposon และการควบคุมการแสดงออกของยีน สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ประโยชน์ของ siRNA ศึกษาการต่อต้านการติดเชื้อไวรัสที่ส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอน posttranscriptional process

siRNA มีโครงสร้างเป็น dsRNA สายสั้นๆ ประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ เมื่อเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์แล้วจะถูกจดจำด้วย RNA induced silencing complex (RISC) ซึ่งมี Argonaute (Ago) 2 เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการแยก siRNA สายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยว ซึ่ง RISC และ Ago2 จะจดจำเฉพาะ antisense หรือ guide RNA ของ siRNA ที่แยกออกมา antisense นี้เองเป็นคู่สมกับ mRNA เป้าหมาย จึงจับกับ mRNA เป้าหมายได้ แล้วทำให้เกิดการทำลาย mRNA เป้าหมาย ดังรูปที่ 18 ซึ่งอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (Whitehead *et al.*, 2009)



รูปที่ 15 กลไกการทำงานของ siRNA

2788028802

(http://www.scbt.com/gene_silencers.html)

การขนส่ง siRNA เข้าสู่เซลล์ทำได้หลายวิธี เช่น transfection, electroporation และ viral gene transfer เป็นต้น แต่ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธี lipid based transfection ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้สะดวก มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ มีประสิทธิภาพสูง และสามารถทำซ้ำได้หลายครั้ง อีกทั้งยังสามารถใช้ได้กับเซลล์หลายชนิด โดยปกติแล้ว siRNA จะมีประจุรวมเป็นลบจาก sugar-phosphate backbone ซึ่งในการนำ siRNA เข้าสู่เซลล์นั้นจะต้องผ่าน lipid bilayer ของเซลล์เมมเบรนซึ่งมีประจุลบเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงต้องมีตัวนำ siRNA เข้าสู่เซลล์ งานวิจัยนี้ได้ใช้ Lipofectamine 2000 ซึ่งเป็น cationic liposome base reagent ซึ่ง lipofectamine 2000 นี้จะรวมตัวกับ siRNA ได้ จากนั้น siRNA จึงถูกขนส่งผ่านเซลล์เมมเบรนเข้าไปภายในเซลล์ (Dalby, 2004)

4. Real time-PCR ด้วยการ ใช้ SYBR Green Dye

Real time PCR หรือ quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิคการตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาในแต่ละรอบของการทำ PCR ได้โดยทันทีโดยไม่ต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ SYBR green dye ในการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาจากการทำ real time PCR ซึ่ง SYBR เป็นสียฟลูออเรสเซนซ์ที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอได้ตรงตำแหน่ง minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ สามารถดูดแสงสีฟ้า ($\lambda_{max} = 488 \text{ nm}$) และปล่อยแสงสีเขียว ($\lambda_{max} = 522 \text{ nm}$) ในช่วง denaturation เพื่อแยกสายดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยวนั้น SYBR จะยังไม่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวได้ ต่อเมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ SYBR จึงเริ่มแทรกตัวเข้าไปในดีเอ็นเอสายคู่ และเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งสามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง real time thermocycler (Ali and Ali, 2011)

5. Delta-delta CT method ($\Delta\Delta\text{CT}$ method)

ปัจจุบันวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลจากการทำ real time-PCR มี 2 วิธี คือ

1) absolute quantification มักใช้ศึกษา input copy number ซึ่งมักจะใช้ PCR signal ของ standard curve มาวิเคราะห์ผล

อย่างไรก็ตามบางการทดลองนั้นไม่จำเป็นต้องทราบถึงจำนวน copy number เช่น การศึกษาที่สนใจการแสดงออกของยีน ตัวอย่าง ในกลุ่ม treatment นั้น gene X มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 2.5 เท่าซึ่งมีความสำคัญมากกว่าที่จะสนใจว่าในกลุ่ม treatment มีการแสดงออกของ gene X เพิ่มขึ้นจาก 1000 copies เป็น 2500 copies ต่อเซลล์ เป็นต้น

2) relative quantification มักใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน วิธีนี้จะใช้ PCR signal ของ target gene ในกลุ่มที่ได้รับ treatment (test) และกลุ่มที่ไม่ได้รับ treatment (control) มาวิเคราะห์ผล การวิเคราะห์ข้อมูลเช่นนี้ ได้แก่ วิธี $\Delta\Delta\text{CT}$

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี $\Delta\Delta\text{CT}$ method จะใช้เฉพาะค่า threshold cycle (Ct) ซึ่งได้จากจุดตัดระหว่าง amplification curve และ threshold line ของทั้ง target gene และ

reference gene (มักเป็น housekeeping gene) มาวิเคราะห์ผล ดังนั้นข้อมูลที่ได้จะได้เป็นส่วน การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนเป็นจำนวนเท่าของ Ct ของ target gene เมื่อถูก normalized ด้วย Ct ของ reference gene ของกลุ่ม test ต่อกลุ่ม control ซึ่งเขียนเป็นสมการได้ ดังนี้

$$\Delta \Delta CT = (Ct, target - Ct, reference)_{test} - (Ct, target - Ct, reference)_{control}$$

ซึ่งจาก derivation ของ Livak และ Schmittgen (2001) จะได้สมการ

$$\text{Fold change in gene expression} = 2^{-\Delta \Delta CT}$$

6. Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและดีเอ็นเอ ในเทคนิคนี้นั้น เซลล์ที่นำมาศึกษาจะได้รับ formaldehyde เพื่อทำให้เกิด crosslink ระหว่างโปรตีนและดีเอ็นเอ จากนั้นจึงนำเซลล์ไปผ่านการทำ sonication เพื่อตัด cross-linked chromatin ให้มีความยาว ประมาณ 200-1000 คู่เบส แล้วจึงตกตะกอน cross-linked chromatin ด้วย antibody against antigen ที่สนใจ หลังจากนั้น decrosslink โปรตีนและดีเอ็นเอด้วยการให้ความร้อน ตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วใช้ดีเอ็นเอนี้ในการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ ยีนที่เราสนใจ หากสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอขึ้นมาได้ แสดงว่าดีเอ็นเอในส่วนนี้เป็นบริเวณที่จับอยู่กับโปรตีนที่เราใช้ antibody ตกตะกอนลงมาจริง (Aparicio *et al.*, 2004)