



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

### เรื่อง

“คุณลักษณะของ HPV16 As variant E6 oncoprotein ที่ส่งผลให้เซลล์ติดเชื้อกลายเป็นมะเร็ง”

“Characteristics of HPV16 As Variant E6 oncogene induce cervical carcinoma”

### คณะผู้วิจัย

รศ.พญ. ทิพย์ยา เอกลักษณานันท์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รศ.ดร.พญ. แจ่มใส เพียรทอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

รศ.ดร. บุญเกิด คงยิ่งยศ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “บทบาทของการติดเชื้อ human papillomavirus

ต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูก และการหาแนวทางการรักษาเบื้องต้น”

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 - 2554

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้เป็นหนึ่งโครงการย่อยของชุดโครงการ “บทบาทของการติดเชื้อ human papillomavirus ต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูก และการหาแนวทางการรักษาเบื้องต้น” ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 - 2554 จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุนทำให้การทำวิจัยสำเร็จได้ตามวัตถุประสงค์ รวมถึงผู้ป่วยที่อนุญาตให้เก็บตัวอย่างตรวจสำหรับการศึกษาวิจัย

รศ.ทิพย์ เอกลักษณานันท์

(หัวหน้าโครงการวิจัย)

## บทคัดย่อ

โรคมะเร็งปากมดลูก เป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองในผู้หญิงทั่วโลก โดยพบมากรองจากโรคมะเร็งเต้านม และพบผู้ป่วยใหม่ได้ปีละประมาณ 500,000 ราย ความชุกพบอยู่ระหว่าง 6.2 ต่อ 100,000 คนในประเทศที่พัฒนาแล้ว และ 25 ต่อ 100,000 คนในประเทศกำลังพัฒนา สำหรับประเทศไทยมีรายงานในปี พ.ศ. 2551 มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุดคือ 24.5 ต่อ 100,000 คน และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบ 19.5 คนต่อ 100,000 คน สาเหตุของมะเร็งปากมดลูกคือ high risk human papillomavirus (HR-HPV) แต่เชื่อว่าผู้ติดเชื้อ HPV ทุกรายจะเป็นมะเร็งปากมดลูก การศึกษาในแต่ละภูมิภาคทั่วโลกพบว่า HPV16 เป็น HR-HPV ชนิดที่พบได้บ่อยทั้งในการติดเชื้อในเซลล์ปากมดลูกปกติ และในเซลล์มะเร็งปากมดลูก การศึกษาในประเทศไทยก็พบว่าเชื้อ HPV16 เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ และสัมพันธ์กับการที่ผู้ติดเชื้อ HPV16 พัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก

มีปัจจัยหลายชนิดที่ส่งเสริมให้เซลล์ที่ติดเชื้อ HR-HPV กลายเป็นมะเร็ง การเกิด intratypic variation ของ HPV16 โดยเฉพาะ variation ในส่วนของจีน E6 ซึ่งเป็น oncoprotein มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็ง ซึ่งเชื่อว่าเมื่อจีน E6 นี้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจะทำให้โปรตีน E6 ที่ถูกสร้างออกมามีคุณสมบัติในการทำงานเปลี่ยนแปลงไป โดยอาจมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของโปรตีน E6 ต่อการทำให้เกิดมะเร็งให้เพิ่มสูงขึ้น จากการศึกษา intratypic variation ของ HPV16 ในกลุ่มประชากรของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในจีน E6 ของ HPV DNA ที่สกัดจากตัวอย่างเซลล์ปากมดลูก พบ HPV16 As variants ได้มากถึงร้อยละ 74 และพบว่ามีความสัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อศึกษาบทบาทของ E6 oncoprotein ของ HPV16 As variants ที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง โดยการสร้าง E6 expression vector ของ HPV16 As variants และ HPV16 E6 prototype ให้ผลิตโปรตีน E6 ของแต่ละ variant ใน mammalian cell line แล้วตรวจสอบคุณสมบัติโปรตีน E6 โดยทดสอบความสามารถในการจับกับโปรตีน E6AP และทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน E6 ว่ามีผลต่อการทำงานของโปรตีน p53 เอนไซม์ telomerase และ การแสดงออกของ miR-21 เปลี่ยนไปอย่างไรโดยเปรียบเทียบระหว่าง HPV16 As variants E6 กับ HPV16 prototype E6

ผลการศึกษานี้สามารถสร้าง E6 recombinant expression vectors ได้ 3 ชนิดซึ่งมาจาก HPV16 E6 prototype 1 ชนิด และ HPV16 As variants 2 ชนิด คือ pcDNA3.2E6-prototype, pcDNA3.2E6-As variant (1.21) และ pcDNA3.2E6-As variant (N18) ตามลำดับ แต่เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

pcDNA3.2E6-As variant (1.21) ซึ่งได้มาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ paraffin-fixed formalin-embedded tissue ที่เป็น squamous cell carcinoma (SCC) และ pcDNA3.2E6-As variant (N18) ได้มาจาก fresh tissue biopsy ที่เป็น SCC นั้นเหมือนกัน ผู้วิจัยจึงเลือกเฉพาะ pcDNA3.2E6-As variant (N18) มาใช้ในการศึกษาต่อไป โปรตีน E6 ที่ถูกสร้างจาก E6 recombinant expression vectors ทั้ง 3 ชนิด สามารถจับกับโปรตีน E6AP ได้เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี co-immunoprecipitation assay

ผลการศึกษาคุณสมบัติการเป็น oncogenicity โดยการ transfect pcDNA3.2E6-As variant และ pcDNA3.2E6-prototype เข้าไปในเซลล์ C33A แล้วตรวจหาแสดงออกของโปรตีน p53 พบว่าโปรตีน E6-As variant มีคุณสมบัติในการ degrade โปรตีน p53 ได้ดีกว่าโปรตีน E6-prototype อย่างชัดเจน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า HPV16 As variant E6 ในการมีคุณสมบัติเป็น oncogenicity มากกว่า HPV16 prototype E6

การศึกษานี้ยังเป็นครั้งแรกที่แสดงให้เห็นถึงความสามารถของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 ในการชักนำให้มีการแสดงออกของ miR-21 เพิ่มขึ้น เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Real time PCR และยังพบว่าโปรตีน E6-As variant สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ miR-21 เพิ่มขึ้นมากกว่าโปรตีน E6-prototype อีกด้วย

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการที่ตรวจพบ เชื้อ HPV16 As variant ในเซลล์ปากมดลูกถือได้ว่ามีความเสี่ยงสูงที่เซลล์ที่ติดเชื้อนั้นจะมีการพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์มะเร็ง เนื่องจากเชื้อ HPV16 As variant มีความสามารถในการ degrade โปรตีน p53 ได้ดี และยังเพิ่มการแสดงออกของ miR-21 โดยกลไกในการก่อมะเร็งของเชื้อ HPV16 As variant คาดว่าเกี่ยวข้องและสัมพันธ์กับ cellular pathway ที่ควบคุมและดูแลการแสดงออกของโปรตีน p53 ซึ่งการ degrade โปรตีน p53 นั้นเป็นหน้าที่หลัก แต่เนื่องจาก miR-21 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น อาจมีผลต่อ Akt pathway แล้วทำให้เพิ่มการแสดงออกของ mdm2 ซึ่งเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของโปรตีน p53 ให้มีการแสดงออกของ p53 ที่ลดลงไปอีก จึงส่งเสริมให้เซลล์เพิ่มจำนวน และยับยั้งการเกิด apoptosis อาจเป็นทางหนึ่งที่ทำให้เพิ่มความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ HR-HPV แบบยัดเยียดและเกี่ยวกับการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกในที่สุด

ดังนั้นในการตรวจคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในประชากรไทย อาจจะต้องตรวจชนิดของ HPV16 variant ร่วมด้วย เพื่อให้มีการติดตามผู้ป่วยในช่วงเวลาที่ถี่ขึ้นในกรณีที่ตรวจพบ HPV16 As variant จึงจะทำให้สามารถป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

## สารบัญ

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์	3
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีดำเนินการวิจัย	17
ผลการวิจัย	30
อภิปรายผล/วิจารณ์	42
สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ	48
บรรณานุกรม	49
การเผยแพร่ผลงานวิจัย	53

## 1. บทนำ (Introduction)

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคมะเร็งปากมดลูก เป็นโรคมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับสองในผู้หญิงทั่วโลก โดยพบมารองจากโรคมะเร็งเต้านม และพบผู้ป่วยใหม่ได้ปีละประมาณ 500,000 ราย ความชุกพบอยู่ระหว่าง 6.2 ต่อ 100,000 คนในประเทศที่พัฒนาแล้ว และ 25 ต่อ 100,000 คนในประเทศกำลังพัฒนา สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าในปี พ.ศ. 2551 มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งที่พบมากที่สุด 24.5 ต่อ 100,000 คน และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบ 19.5 คนต่อ 100,000 คน จะเห็นได้ว่าอุบัติการณ์ของโรคนี้นั้นสูงมาก [1, 2] สาเหตุของมะเร็งปากมดลูกคือ high risk human papillomavirus (HR-HPV) แต่เชื่อว่าผู้ติดเชื้อ HPV ทุกรายจะเป็นมะเร็งปากมดลูกทุกคน มีการศึกษามากมายเพื่อบ่งบอกความสัมพันธ์ของการติดเชื้อ HPV กับการเพิ่มความรุนแรงในการเกิดมะเร็งปากมดลูก จากรายงานการศึกษาในแต่ละภูมิภาคทั่วโลกพบว่า HPV16 เป็น HR-HPV ชนิดที่พบได้บ่อยทั้งในการติดเชื้อในเซลล์ปกติและในเซลล์มะเร็งปากมดลูก การศึกษาในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยคณะผู้วิจัยเองก็พบว่าเชื้อ HPV16 เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญ และสัมพันธ์กับการที่ผู้ติดเชื้อ HPV16 พัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก

มีปัจจัยหลายชนิดที่ส่งเสริมให้เซลล์ที่ติดเชื้อ HR-HPV กลายเป็นมะเร็ง ซึ่งอาจเกิดขึ้นเร็วหรือช้า ปัจจัยด้านไวรัส ได้แก่ HPV genotype, viral load, viral integration และ viral gene variation ในการจำแนก HPV genotype อาศัยความแตกต่างของ viral genome ที่ตำแหน่งจำเพาะคือ L region โดยแต่ละ genotype มีความแตกต่างกันมากกว่าร้อยละ 10 แต่ถ้ามี gene variation ระหว่างร้อยละ 2-10 จะถูกจัดเป็น subtype และถ้าในกลุ่มเดียวกันนี้มี gene variation เกิดขึ้นน้อยกว่าร้อยละ 2 จะถูกจัดเป็น intratype variant ปัจจุบันมีการศึกษา intratype variant ของ HPV16 มากที่สุด และได้จัดแบ่งเป็น European (E), Asian (As), Asian American (AA), African 1 (Af-1), African 2 (Af-2) และ North American (NA) variants ซึ่งพบได้ในแต่ละภูมิภาคที่แตกต่างกันไปทั่วโลก ซึ่งการเกิด intratypic variation ของ HPV16 โดยเฉพาะ variation ในส่วนของจีน E6 ซึ่งเป็น oncoprotein มีบทบาทสำคัญในการเกิดมะเร็ง ซึ่งเชื่อว่าเมื่อจีน E6 นี้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจะทำให้โปรตีน E6 ที่ถูกสร้างออกมามีคุณสมบัติในการทำงานเปลี่ยนแปลงไป โดยอาจมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของโปรตีน E6 ต่อการทำให้เกิดมะเร็งให้เพิ่มสูงขึ้น จากการศึกษา intratypic variation ของ HPV16 ในกลุ่มประชากรของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ในจีน E6 ของ HPV DNA ที่สกัดจากตัวอย่าง

เซลล์ปากมดลูก พบ HPV16 As variants ร้อยละ 74 และพบว่ามีความสัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาบทบาทของ HPV16 As variants E6 ว่ามีความสัมพันธ์กับการทำให้เกิดโรครุนแรงกว่า HPV16 prototype E6 โดยสร้าง vector ที่มี E6 gene ของ HPV16 As variants และ E6 gene ของ HPV16 prototype และตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีน E6 ที่ถูกสร้างขึ้น โดยทดสอบความสามารถในการจับกับโปรตีน E6AP หลังจากนั้นทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน E6 ว่ามีผลต่อการทำงานของโปรตีน p53 เอนไซม์ telomerase และ การแสดงออกของ miR-21 เปลี่ยนไปอย่างไรโดยเปรียบเทียบคุณสมบัติดังกล่าวกับ HPV16 prototype E6 คณะผู้วิจัยคาดว่าข้อมูลที่ได้จะสามารถอธิบายบทบาทของ HPV16 As variants ในการก่อโรคมะเร็งในประชากรไทย ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษาและหาแนวทางป้องกันการเกิดมะเร็งปากมดลูก และศึกษาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพสำหรับประชากรไทย

## วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. เพื่อสร้าง E6 expression vector ของ HPV16 As variants และ HPV16 E6 prototype
2. เพื่อศึกษาคูณสมบัติโปรตีน E6 ของ HPV16 As variants และ HPV16 E6 prototype ใน vector ที่สร้างขึ้น
3. เพื่อศึกษาบทบาทของ E6 oncoprotein ของ HPV16 As variants ที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง

## 2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review literature)

Human papillomavirus (HPV) เป็น DNA virus จัดอยู่ใน family *Papillomaviridae* เป็นไวรัสที่มีขนาดเล็ก (small DNA virus) ไม่มีเอนเวลโลปหุ้มแคปซิด มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 55 นาโนเมตร แคปซิดที่ห่อหุ้มจีโนมประกอบด้วยแคปโซเมอร์ 72 หน่วย มีการเรียงตัวแบบ icosahedral จีโนมของ HPV เป็น DNA สายคู่ ที่มีลักษณะเป็นวงกลม (circular double stranded DNA) และพันกันเป็นเกลียวซับซ้อน DNA มีขนาด 7900 คู่เบส (base pairs) จีโนมของไวรัสนี้มี 8-10 open reading frame (ORF) โครงสร้างของจีโนมประกอบด้วย 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งคือ upper regulatory region หรือ noncoding region หรือ long control region (LCR) เป็นบริเวณที่ประกอบด้วย จุดเริ่มต้นของการ replication, enhancer, และ cellular binding site ต่างๆ และเป็นส่วนที่พบการเกิด variation มากที่สุดของจีโนมของไวรัส ที่สองคือ early (E) genes ซึ่งจะมีการแสดงออกในช่วงแรกของการเพิ่มจำนวน และ encode โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส ได้แก่ E1, E2, E3, E4, E5, E6 และ E7 และการก่อมะเร็ง ส่วนที่สามคือ late gene (L) จะ encode โปรตีนที่เป็นโครงสร้าง เช่น แคปซิด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน L1 และ L2 [3]

HPV ถูกจำแนกออกเป็น genotype ตามความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีน L1 ถ้า nucleotide sequence ต่างจาก HPV ที่มีอยู่แล้ว (prototype) มากกว่าร้อยละ 10 จะจัดเป็น type ใหม่ ถ้า nucleotide sequence ต่างกันร้อยละ 2-10 จะจัดเป็น subtype ใหม่ และถ้า nucleotide sequence ต่างกันน้อยกว่าร้อยละ 2 จะถูกจัดเป็น variant หรือ intratypic variation [4]

การติดเชื้อ HPV เกิดได้หลายวิธี ทั้งจากการรับเชื้อทางบาดแผล การร่วมเพศ และทารกอาจติดเชื้อขณะคลอดผ่านทางช่องคลอด HPV เป็นสาเหตุของโรคหูด หรือเนื้องอกในคนซึ่งพบได้ทั้งบริเวณ ผิวหนัง ช่องปาก และอวัยวะเพศ จากการศึกษาพบว่า เชื้อ HPV บางชนิดเป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากตรวจพบ DNA ของเชื้อ HPV ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกร้อยละ 99.7 ของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก จากความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้ทำให้แบ่งเชื้อ HPV ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่หนึ่งเรียกว่า high risk (HR) HPV ซึ่งได้แก่ HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 50, 51, 53, 55, 56, 58, 59, 64 และ 68 เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่สองเรียกว่า low risk (LR) HPV ซึ่งได้แก่ HPV 6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55 และ 70 เป็นต้น

วงจรชีวิตของเชื้อ HPV เกิดขึ้นใน keratinocytes ของชั้นเยื่อๆ (squamous epithelium) โดยจะมีการติดเชื้อครั้งแรกที่ basal cell แล้วการเพิ่มจำนวนของไวรัสอนุภาคใหม่จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ที่กำลังอยู่ในระยะที่มีการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (differentiation) ดังนั้นการเพิ่มจำนวนของ HPV จะเริ่มจากการที่ HPV ถูกนำเข้าไปยังชั้นของ basal cell ในเยื่อๆ HPV จะจับกับตัวรับบนผิวเซลล์ (heparan sulfates) แล้ว

เข้าสู่เซลล์ หลังจากนั้น DNA ของไวรัสจะเข้าสู่นิวเคลียส ซึ่งก็จะมีการถอดรหัสของจีโนมบางชนิด และทำสำเนาของจีโนมเพื่อให้คงจำนวนของจีโนมอยู่ในนิวเคลียสประมาณ 20-100 ชุด ต่อเซลล์ เมื่อเซลล์แบ่งตัวจะมีจีโนมของไวรัสติดไปด้วยทุกเซลล์ ภายใน basal cell เป็นช่วงที่ไวรัสยังไม่มีการสร้างไวรัสอนุภาคใหม่ โปรตีนต่างๆจึงมีการแสดงออกเพียงเล็กน้อย เมื่อโปรตีน E1 จับกับ E2 และไปจับตรงจุดเริ่มต้นของการเพิ่มจำนวน (ori) ซึ่งเอนไซม์และโปรตีนที่เกี่ยวข้องก็เข้ามาช่วย โดย E1 จะทำหน้าที่เป็น helicase ซึ่งจะแยก DNA สายคู่เป็นสายเดี่ยว และโปรตีน E2 ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของ E6 และ E7 ในระดับต่ำๆ เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) จะมีการกระตุ้นการสร้าง late protein เพื่อประกอบเป็นอนุภาคไวรัสขึ้น [5]

การเกิดมะเร็งปากมดลูกนั้นเกี่ยวข้องกับโปรตีน E6 และ E7 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น oncoprotein เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เชื่อว่าโปรตีน E6 จะไปจับกับ tumor suppresser protein ชนิด p53 ซึ่งเป็นตัวควบคุมให้ cell cycle ทำงานช้าลงโดยทำให้เซลล์หยุดวงจรอยู่ที่ระยะ G1 phase ไม่เข้าสู่ระยะ S phase (G1/S) และที่ระยะ G2 phase ไม่เข้าสู่ M ระยะ phase (G2/M) เพื่อซ่อมแซม DNA ที่ผิดปกติไป แต่เมื่อ p53 ทำงานไม่ได้ วงจรของเซลล์ก็ยังคงทำงานต่อไป โดย DNA ที่ผิดปกติก็จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทำให้เกิดเป็นเซลล์ที่ผิดปกติได้ในที่สุด นอกจากนี้โปรตีน E6 ยังสามารถลดการทำงานของโปรตีน p53 ได้ โดยไม่ต้องทำลายโปรตีน p53 แต่โปรตีน E6 จะไปจับกับ transcriptional co-activator CBP/p300 ส่งผลให้มีการลดการแสดงออกของโปรตีน p53 ส่วนโปรตีน E7 จะทำหน้าที่ในการจับกับ retinoblastoma (pRB) ซึ่งเป็น tumor suppressor protein ที่ทำหน้าที่ในการควบคุม cell cycle ซึ่งปกติ pRB จะจับอยู่กับ E2F เมื่อโปรตีน E7 มาจับทำให้ E2F ซึ่งเป็น transcription factor protein หลุดออก แล้วโปรตีน E2F จะไปกระตุ้นให้เกิดการ transcription ของจีนที่จำเพาะและจำเป็นต่อการทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้จะพบได้เฉพาะในกลุ่ม HR HPV แต่ไม่พบใน LR HPV type [6]

จากการศึกษาหาการติดเชื้อ HPV ในมะเร็งปากมดลูกทั่วโลก พบได้แตกต่างกัน ในทวีปเอเชียพบอัตราการติดเชื้ออยู่ระหว่างร้อยละ 83-89 [7] ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการติดเชื้อ HPV ในมะเร็งปากมดลูกของกลุ่มประชากรในจังหวัดขอนแก่นโดยพบร้อยละ 86 [8] จากการศึกษาส่วนใหญ่พบเชื้อ HPV16 บ่อยที่สุดในผู้หญิงที่มีเซลล์ปากมดลูกปกติ (ร้อยละ 13) รวมทั้งในกลุ่มมะเร็งปากมดลูก (ร้อยละ 46-63) ในกลุ่มมะเร็งปากมดลูกพบ HPV18 ได้บ่อยรองลงมา (ร้อยละ 10-14)

การติดเชื้อ HPV ที่บริเวณเซลล์เยื่อบุปากมดลูกในผู้หญิงวัยหนุ่มสาวหรือในวัยกลางคนมักเกิดขึ้นจากการติดต่อทางเพศสัมพันธ์ การติดเชื้อทั้งชนิด HR HPV และ LR HPV มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่บริเวณปากมดลูกขึ้น เซลล์ติดเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเรียก koilocyte atypia อย่างไรก็ตามมากกว่าร้อยละ 70 ของผู้ที่ได้รับการติดเชื้อจะเป็นการติดเชื้อแบบชั่วคราว (transient infection) และพบว่า

มีเพียงร้อยละ 25 ของผู้ติดเชื้อจะมีเซลล์ผิดปกติเปลี่ยนเป็นชนิด mild dysplasia หรือ low grade squamous intra epithelial lesions (LSIL) ขึ้นซึ่งมักมีผลจากการติดเชื้อกลุ่ม HR HPV และเซลล์ผิดปกติดังกล่าวถูกจัดเป็น premalignant cells โดยพบว่าในผู้ที่มีเซลล์ผิดปกติชนิด LSIL พบร้อยละ 20-40 ที่จะมีเซลล์เปลี่ยนแปลงไปเป็น high grade squamous intra epithelial lesion (HSIL) [9, 10] ซึ่งกลุ่มผิดปกติดังกล่าวถือว่าเป็น true precancerous lesion จากรายงานการศึกษาโดย Schlecht และคณะ [11] พบว่าร้อยละ 88 ของผู้ที่มีเซลล์ปากมดลูกผิดปกติแบบ LSIL จะเกิดภาวะ spontaneous regression ไปและในขณะเดียวกันในกลุ่มนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น HSIL ได้โดยมีระยะเวลาประมาณ 85.7 เดือน เช่นเดียวกับการศึกษาโดย Moscicki AB และคณะ [9] พบว่าร้อยละ 61 และร้อยละ 91 ในผู้ที่มีเซลล์ปากมดลูกผิดปกติชนิด LSIL จะมี spontaneous regression เกิดขึ้นภายใน 12 เดือนและ 36 เดือน ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ~20 % ของการติดเชื้อในระยะเริ่มแรกจะยังคงติดเชื้อยืดเยื้อ และในปัจจุบันนี้เชื่อว่ากลุ่มที่มีการติดเชื้อยืดเยื้อโดยเฉพาะ HR HPV จะมีความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งต่อไป

จากภาวะการติดเชื้อที่เกิดขึ้นดังกล่าวจะพบว่ามีส่วนหนึ่งของการติดเชื้อเกิดเปลี่ยนแปลงกลายเป็นการติดเชื้อแบบยืดเยื้อ ภาวะดังกล่าวเกิดขึ้นได้เชื่อว่ามีปัจจัยร่วมหลายชนิด เช่น จากภาวะการติดเชื้อ HPV หลายชนิดร่วมกัน หรือขึ้นกับชนิดของ HPV ว่าเป็น HR หรือ LR HPV และเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อเอง โดยเฉพาะการติดเชื้อในกลุ่ม HR HPV ในปัจจุบันยอมรับว่าเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ที่เปลี่ยนแปลงพัฒนามากลายเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยร่วม (cofactor) หลายปัจจัย เช่น จาก host เอง ได้แก่ จำนวนคู่นอน การคุมกำเนิด การสูบบุหรี่ ปัจจัยทางพันธุกรรม และระบบภูมิคุ้มกัน และจากตัวเชื้อ HPV ได้แก่ ปริมาณของไวรัส (viral load) ซึ่งจากการศึกษาพบมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคของมะเร็งปากมดลูก แต่ยังมีข้อมูลสนับสนุนน้อยยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป และการแทรกตัวของจีโนมของไวรัสเข้าไปอยู่ใน DNA ของ host cell (HPV integration) เป็นต้น โดยเชื่อว่า HPV integration เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นต่อเนื่องจากการติดเชื้อยืดเยื้อ ภาวะดังกล่าวจะสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โดยพบว่า การแทรกของไวรัสจีโนมเข้าไปใน DNA ของ host cell จะทำให้เกิดการขาดหายไปของ gene E2/E1 ซึ่งโปรตีนจาก gene ดังกล่าวจะทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ gene E6/E7 เมื่อมีภาวะการสอดแทรกของจีโนมไวรัสเกิดขึ้นและมีการขาดหายไปของ gene E2/E1 จึงเกิดการแสดงออกของ oncogene E6 และ E7 มากขึ้นและไม่สามารถควบคุมได้ ทำให้มี E6 และ E7 ออกมามากผิดปกติและมีผลทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและเพิ่มจำนวนผิดปกติขึ้น และภาวะของการสอดแทรกจีโนมไวรัสเข้าไปใน host cell นี้จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่าสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง เนื่องจากตรวจพบลักษณะนี้ในเซลล์ปากมดลูกที่ผิดปกติระดับต่างๆ และในเซลล์มะเร็งปากมดลูก โดยพบภาวะ HPV integration ร้อยละ 0, 5-100 และ 85-100 ใน CIN I, CIN II-III และเซลล์มะเร็ง ตามลำดับ โดยพบอัตราที่แตกต่างกันขึ้นกับวิธีที่ใช้ตรวจ

การเปลี่ยนแปลงลำดับเบส หรือ nucleotide sequence variation ของเชื้อ HPV พบว่าเป็นปัจจัยของไวรัสที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของ HPV แตกต่างจาก prototype จากการศึกษาดัง nucleotide sequence variation ที่เกิดขึ้นพบได้ในหลายๆ HPV genotypes เช่น HPV16, 18, 31 และ 35 ชนิดที่มีการศึกษามากที่สุดคือ HPV16 โดยพบ nucleotide sequence ที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นใน gene E6, E7, E2, L1, L2 และ LCR จาก nucleotide sequence ที่เปลี่ยนแปลงไปใน gene ดังกล่าวเกิดขึ้นแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคและลักษณะความแตกต่างที่เกิดขึ้นได้ถูกจัดเป็น phylogenetic branch แบ่ง HPV16 ออกเป็น variant ชนิดต่าง ๆ โดยมี nucleotide sequence แตกต่างกับ prototype อย่างน้อย 1 ชนิด หรือ 2% การจำแนก HPV16 variant อาจจะเปรียบเทียบจากส่วนของ gene E6 หรือ gene E6 ร่วมกับ gene ชนิดอื่นเช่น E7, L1 หรือ LCR HPV16 variant ที่พบในปัจจุบันคือ European prototype (EP), European (E) variants, Asian variant (As), Asia-American variant (AA), Africa1 variant (Af1), Africa2 variant (Af2) และ North-American1 variant (NA1) การศึกษา variants ต่าง ๆ เหล่านี้พบว่าชนิดของ variant จะพบได้แตกต่างกันไปตามภูมิภาค เช่น European variant จะพบได้มากที่สุด ในยุโรป อเมริกาเหนือ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ Asian variant พบได้มากที่สุด ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ Africa variant พบมากที่สุดที่แอฟริกา และ Asia-American variant พบมากที่สุดที่อเมริกากลางและอเมริกาใต้ [12]

Zehbe I และคณะ [13] ศึกษา HPV16 variant ในเซลล์มะเร็งพบ HPV16 variant ร้อยละ 94 ขณะที่พบ HPV16 prototype ร้อยละ 6 ส่วนเซลล์ผิดปกติในระดับ CIN III พบการกระจายของ prototype และ variant ใกล้เคียงกันคือร้อยละ 44 และ 56 และจากการศึกษาในผู้หญิงแมกซิกันซึ่งมีความชุกของการติดเชื้อ HPV ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกร้อยละ 87 พบ HPV16 variant ในเซลล์ผิดปกติชนิด LSIL เป็น European prototype (EP) (66%) และ European variant (33%) ขณะที่ในเซลล์มะเร็งพบชนิดของ variant เป็น EP, AA และ Af โดยจะพบ AA มากที่สุด (44%) และจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า HPV16 AA variant มีความสัมพันธ์ในการทำให้เกิดเป็นมะเร็งปากมดลูกที่รุนแรง โดยมีความเสี่ยง (Odd Ratio) สำหรับความสัมพันธ์ในการเกิดมะเร็งปากมดลูกเท่ากับ 27 เท่า ซึ่งสูงกว่าใน E variant ที่มีค่าเท่ากับ 3.4 เท่า และ HPV16 AA variant มักจะพบในผู้ป่วยที่มีอายุน้อย โดยเฉลี่ยประมาณ 7.7 ปี น้อยกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPV 16 EP Berumen J [14] และ del Refugio Gonzalez-Losa M [15] ทำการศึกษา มะเร็งปากมดลูกซึ่งพบสูงมากในประเทศแมกซิโก และหาความสัมพันธ์กับการเกิด variation ของเชื้อ HPV16 ทำการตรวจสอบโดยใช้ PCR ในการศึกษาพบ HPV16 กลุ่ม AA variant และกลุ่ม E variant โดยพบกลุ่ม AA ในตัวอย่างที่เป็นมะเร็งปากมดลูกมากกว่าในกลุ่มควบคุมที่เป็น prototype จากการศึกษาได้แนะนำว่าการเกิด variations ของเชื้อ HPV16 น่าจะมีความสัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูกที่รุนแรง Radhakrishna Pillai M และคณะ [16]

ศึกษาการเกิด variation ในโปรตีน E6 และ E7 ของเชื้อ HPV16 ที่แยกมาจากเซลล์และชิ้นเนื้อปากมดลูก โดยเขาพบ specific mutation ภายในโปรตีน E6 ของเด็กผู้หญิงอินเดียที่ถูกวินิจฉัยว่ามีเซลล์ปากมดลูกผิดปกติระดับ HSIL และ CA จากการศึกษาที่พบว่าการเกิดโปรตีน E6 mutation ในเชื้อ HPV16 และการที่ p53 ไม่ทำงานน่าจะเพิ่มการเกิดมะเร็งที่รุนแรงกว่า HPV 16 prototype Tornesello ML และคณะ [17] ศึกษาการเกิด HPV16 variations โดยศึกษา E6 gene จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกวินิจฉัยเป็น CIN I, II, III และ CA ในผู้หญิงชาวอิตาลี โดยเขาพบกลุ่มที่ไม่ใช่กลุ่ม prototype มีลำดับเบสของ E6 gene เปลี่ยนจาก G ไปเป็น T ที่ตำแหน่งที่ 350 มาก (E6G350T) และพบ E6 gene prototype ในกลุ่มควบคุมพบร้อยละ 43.7 ในกลุ่ม CIN I พบร้อยละ 41.2 กลุ่ม CIN II พบร้อยละ 28.6 และในกลุ่มที่เป็น CA พบร้อยละ 11.1 จากการศึกษาที่พบว่าการดำเนินโรคไปเป็นมะเร็งของ pre-neoplastic ไม่ได้มีความสัมพันธ์กับ prototype นี้ และการพบกลุ่มที่ไม่ใช่ prototype (non- prototype) ในเซลล์มะเร็งนั้นน่าจะมีความสามารถในการก่อมะเร็งดีกว่ากลุ่มที่เป็น prototype (E) ดังนั้นความสัมพันธ์กับการก่อมะเร็งของ HPV16 แต่ละ variant นี้จึงอาจจะมีกระบวนการที่แตกต่างออกไป อาจจะมีการสูญเสียการควบคุมการแสดงออกของ oncoprotein ดังนั้นการเกิด HPV16 variants ที่ต่างกันอาจมีผลต่อความรุนแรงที่ทำให้การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากมดลูกและการพัฒนากลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ต่างกัน

ต่อมา Grodzki M และคณะ ทำการศึกษาเชื้อ HPV16 E6 variants เป็นปัจจัยเสี่ยงในการเกิดการติดเชื้อแบบ persistence และพัฒนาไปสู่การเป็นมะเร็ง โดยทดลองในผู้หญิงชาวฝรั่งเศส โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ติดเชื้อแต่ถูกกำจัดไปแล้ว กลุ่มที่มีการติดเชื้อแบบ persistence และกลุ่มที่กำลังพัฒนาไปเป็น high grade lesion เมื่อตรวจหาเชื้อ HPV พบว่า 2 กลุ่มหลัง ตรวจพบเชื้อ HPV16 โดยมีความเสี่ยง (Odd ratio) 2.4 และ 4.2 ตามลำดับ และเมื่อตรวจหา variation พบว่าส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในกลุ่ม HPV16 350G variant โดยมีความเสี่ยง 3.0 และ 6.2 ตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษานี้สรุปว่าเชื้อ HPV และ HPV16 variant เป็นปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อแบบยืดยื้อ และการพัฒนาไปเป็น high-grade lesion [18] สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Zuna RE และคณะ โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ HPV16 variants กับการวินิจฉัยความรุนแรงของโรคในผู้หญิงชาว Oklahoman ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่มีการติดเชื้อ HPV16 จำนวน 354 คน หลังจากตรวจหา variation บนจีน E6 พบว่า เป็นกลุ่ม European ร้อยละ 86 และกลุ่ม non-European ร้อยละ 14 ประกอบด้วย กลุ่ม Asian-America, กลุ่ม African และกลุ่ม Native American และพบการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนในกลุ่ม European variant และกลุ่ม non-European variants ในกลุ่มตัวอย่างที่มีระดับความรุนแรงเพิ่มขึ้น ในขณะที่กลุ่ม European prototype นั้นพบว่าลดลง และเมื่อทดสอบทางสถิติแล้วพบว่า กลุ่ม non-European variants มีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นในการที่จะพัฒนาเป็นมะเร็งได้โดยมีค่าความเสี่ยง (Odd ration) เท่ากับ 3.8 และในการศึกษานี้สรุปได้ว่า กลุ่มของเชื้อ HPV16 variant ที่พบแตกต่างกัน

นั้น มีความเสี่ยงในการดำเนินโรคเข้าสู่มะเร็งได้ และ variant ทั้งหมดทุกกลุ่มนั้นมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาไปเป็นมะเร็ง [19] นอกจากนี้ Xi LF และคณะ ศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ผิดปกติ high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) กับกลุ่มของเชื้อ HPV16/18 variants ในตัวอย่างที่เป็น Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance (ASCUS) และ Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion (LSIL) พบความเสี่ยงของกลุ่ม CIN3 เพิ่มขึ้น 2.7 เท่า เมื่อมีการตรวจพบเชื้อ HPV16 Af-2 variant และ 3.1 เท่า เมื่อตรวจพบเชื้อ HPV16 AA โดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม E variant ส่วนเชื้อ HPV18 พบความเสี่ยงของกลุ่ม CIN3 เพิ่มขึ้น 3.8 เท่า เมื่อตรวจพบเชื้อ HPV18 E variant และพบ 4.8 เท่า เมื่อพบเชื้อ HPV18 AA variant จากการศึกษาที่สรุปได้ว่า กลุ่มของเชื้อ HPV16 และ 18 variants มีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็น high-grade CIN แตกต่างกัน [20] KrennHrubec K และคณะ ตรวจหาชนิดและ variants ของเชื้อ HPV16 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้หญิงชาวตุนิเซียจำนวน 142 ราย พบ HPV16 European variants ร้อยละ 64 และ HPV18 European variant ร้อยละ 100 ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลการติดเชื้อ HPV ในผู้หญิงชาวตุนิเซีย รวมทั้งทราบถึงพฤติกรรมและวัฒนธรรม ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปพัฒนาในการทำวัคซีนและการตรวจคัดกรองการติดเชื้อ HPV ได้ในอนาคต [21]

แตกต่างจากการศึกษาของ Shang Q และคณะ ทำการศึกษา sequence variation ในจีน E6, E7, และ L1 ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกในผู้หญิงชาวจีนทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่มีการติดเชื้อ HPV โดยตรวจพบ HPV16 73% และเมื่อนำไปตรวจหา variation พบเพียง 2 lineage คือ European lineage ประมาณ 67% และ Asian lineage พบประมาณ 33% ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ผู้วิจัยได้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับ variation ของเชื้อ HPV16 [22] สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Hu Y และที่ศึกษา variation ในจีน E6 ของเชื้อ HPV16 ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชาวจีน ซึ่งพบ As lineage ร้อยละ 65.45 นอกจากนี้ดูเหมือนว่า As lineage ยังพบได้บ่อยในกลุ่มผู้ป่วยที่อายุน้อยด้วยและอาจจะมีความสัมพันธ์ของอายุกับการวินิจฉัยการเกิดมะเร็งปากมดลูกในเด็กผู้หญิงวัยรุ่นได้ [23]

นอกจากการศึกษาที่พบว่าชนิดของ variants ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์ต่อความรุนแรงของการเกิดโรคได้แตกต่างกันแล้ว การศึกษาในแต่ละภูมิภาคที่แตกต่างกันยังทำให้พบชนิดของ variants ใหม่ ๆ เกิดขึ้น เช่น ในรายงานจากการศึกษาโดย de Boer MA และคณะ [24] พบ HPV16 variant ชนิดใหม่ที่แตกต่างจากที่เคยรายงานมาก่อนคือ HPV16 javanese variant โดยพบร้อยละ 73 ในประเทศอินโดนีเซีย นอกเหนือไปจากชนิดของ variant ที่เคยรายงานมาก่อนที่เป็น non European variants เช่น AA, As ,NA และ Af ซึ่งพบได้ร้อยละ 14, 28 และ 19 ในประเทศ อินโดนีเซีย Surinamese และ เนเธอร์แลนด์ ตามลำดับ ลักษณะของ variant ดังกล่าวจะพบการเปลี่ยนแปลงของ gene E7, L1 ร่วมกับ E6 ที่ตำแหน่ง 666A และ 6826T และ 276G ตามลำดับ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนขึ้น ขณะที่การศึกษาในผู้หญิงเกาหลี

พบ HPV16 E6 variant ที่ตำแหน่ง 178 (G178T) มากที่สุดโดยพบไม่แตกต่างกันระหว่างในเซลล์ปากมดลูกปกติ และในเซลล์มะเร็ง [25] จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของ nucleotide sequence และการเกิด variant ขึ้น จะแตกต่างกันได้ตามภูมิภาค จากสมมติฐานที่ว่าชนิดของ HPV ที่แตกต่างกันทาง genotype เช่น LR HPV และ HR HPV ซึ่งมีความสามารถในการทำให้เป็นมะเร็งได้แตกต่างกัน ดังนั้น variant ที่เกิดขึ้นจึงน่าจะมี ความสัมพันธ์ในการทำให้เกิดโรคแตกต่างกันตามที่ได้กล่าวมา เช่นใน E variant หรือ AA variant แต่จาก การศึกษาของ Zuna RE และคณะ ซึ่งศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ HPV16 variants กับความเสี่ยงในการ พัฒนาไปเป็น CIN3 และมะเร็ง โดยศึกษาในตัวอย่างทั้งหมด 155 ราย พบว่ามี ผู้หญิงที่ตรวจพบเชื้อ HPV16 European variants ร้อยละ 85.2% และ non-European variants ร้อยละ 14.8% และพบ 107 ราย มี ชีวิตอยู่และไม่มีประวัติการเป็นมะเร็ง อีก 42 ราย ตายจากการเป็นมะเร็งปากมดลูก มี 2 รายยังมีชีวิตอยู่แต่ ป่วยเป็นมะเร็งปากมดลูกและ 4 รายสุดท้าย ตายด้วยสาเหตุอื่น จากผลการศึกษาครั้งนี้ การตายของผู้ป่วยมี ความสัมพันธ์กับ European variant และพบว่ามีผู้ป่วยที่ตรวจพบ European variant ตายในระหว่าง ติดตามผล ร้อยละ 31 มีเพียงร้อยละ 4.4 ของผู้ป่วยที่ตรวจพบว่าเป็น non-European ตาย และกลุ่ม non-European variant มีการรอดชีวิตดีกว่าเพราะผู้ป่วยส่วนบางมีความผิดปกติอยู่ในระยะที่ยังไม่รุนแรงด้วย ดังนั้นในการศึกษานี้สรุปว่ากลุ่มผู้ป่วยมะเร็งที่พบเชื้อ HPV16 non-European variant มีการบุกรุกเซลล์น้อยกว่ากลุ่มที่เป็น European variant [26]

ปัจจุบันนี้นอกจากจะมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิด variation ในจีนต่างๆ ของเชื้อ HPV16 กับความรุนแรงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกแล้ว ยังมีการศึกษาการเกิด variation ในเชื้อ HPV ชนิดอื่นๆด้วย เช่นในการศึกษาของ Oliveira LH ศึกษา variation ในจีน E6, E7 และ L1ของเชื้อ HPV53ในผู้หญิงชาวบราซิล [27] Liu JH และคณะ ศึกษาการเกิด variation ในจีน E6, E7, L1 และ LCR ของเชื้อ HPV58 ในประชากรหญิงชาวจีน [28, 29] และพบว่ามีการศึกษาในกลุ่มประชากรหญิงชาวอิตาลีด้วย [30] นอกจากนี้ยังพบว่ามีการศึกษา variation ในเชื้อ HPV6 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม low risk ด้วย [31] แต่ variation ที่พบไม่สัมพันธ์กับการพัฒนาไปเป็นมะเร็ง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า nucleotide sequence ที่เปลี่ยนแปลงของ variant แต่ละชนิด เกิดขึ้นได้ในหลาย ๆ จีนไปพร้อม ๆ กัน เช่น เกิดขึ้นในส่วนของ gene E6, E7, E2, L1, L2 และ LCR ซึ่งการ เปลี่ยนแปลงของจีนดังกล่าวจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งในโครงสร้าง และหน้าที่ของโปรตีนที่สร้าง จากจีนแต่ละชนิดเปลี่ยนแปลงไป เช่น ใน HPV16 E6 gene ถ้าเป็น European prototype (EP) จะมี reference คือ E6 350T เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของจีนเกิดขึ้นจะเรียกว่าเกิด European variant ซึ่งพบ เกิดขึ้นในหลายๆตำแหน่ง แต่ที่พบได้บ่อยที่สุดคือ การเปลี่ยนแปลงของ nucleotide จาก T เป็น G ที่ ตำแหน่ง 350 (E6 G350T) ซึ่งทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจาก Leucine (L) เป็น Valine (V) ที่ตำแหน่ง

83 (L83V) ที่ตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวพบว่าสัมพันธ์กับความรุนแรงของการเกิดโรคได้รุนแรงมากกว่า prototype โดยพบได้ร้อยละ 88 และ 44 ในตัวอย่างเซลล์มะเร็ง และขึ้นเนื้อที่ผิดปกติชนิด CIN III ตามลำดับ และยังพบว่าใน E variant ที่มีการเกิด E6 L83V ร่วมกับการมี variation ที่ตำแหน่งอื่นๆ จะเป็นตัวบ่งบอกการดำเนินโรคที่รุนแรงขึ้นโดยไม่เพียงแต่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ผิดปกติชนิด CIN I ไปเป็น CIN III แต่ยังสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก CIN III ไปเป็น เซลล์มะเร็งขึ้น [13] นอกจากนี้ยังพบว่า nucleotide variation ที่เกิดขึ้นใน gene E6 ทำให้เกิด กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปในส่วนของโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับ transforming activity มีผลทำให้ degrade p53 ได้เร็วขึ้น [32] และมีความสำคัญต่อ host immune recognition ทำให้หลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ [33] Chakrabarti O และคณะ [34] ได้ศึกษาถึงกระบวนการก่อโรคที่มีความสัมพันธ์กับ HPV16 E6 L83V ต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกที่รุนแรงกว่า prototype พบว่า variant ชนิดนี้จะทำให้เกิดการสูญเสียการควบคุมการแสดงออกของ Notch1 ซึ่งเป็น transmembrane receptor ถ้า Notch1 ถูกกระตุ้นเชื่อว่าจะทำให้เกิด anti apoptosis signal ขึ้นและมีผลขัดขวาง p53 induce cell death มีผลทำให้เซลล์ที่ติดเชื่อและมีการเปลี่ยนแปลงผิดปกติเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้เร็วขึ้น

การแสดงออกของโปรตีน E6 ในเซลล์ติดเชื่อจะเป็นการนำเสนอแอนติเจนต่อ cytotoxic T lymphocytes (CTLs) หลังจากมีการจับกับ human leukocyte antigen (HLA) class I นอกจากนี้โดยเฉพาะ HPV16 variant พบว่ามีความสัมพันธ์กับ HLA B-7 allele ซึ่งทำให้เป็นปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก [35]. จากข้อมูลดังกล่าวนี้จึงได้มีสมมุติฐานว่า HPV16 variant ที่จำเพาะจะมีโอกาสที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับ prototype ในการหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและสามารถบุกรุกระบบภูมิคุ้มกัน ผ่านกระบวนการของระบบ HLA class I alleles ซึ่งมีความแตกต่างกันในกลุ่มประชากรที่ต่างกันจึงทำให้มีความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งเกิดขึ้นแตกต่างกันในกลุ่มที่ติดเชื่อ HPV16 variant

กลุ่ม As variants พบ E6 gene variation โดยมีการเปลี่ยนแปลงจาก G ไปเป็น T ที่ตำแหน่ง 178 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Aspartic Acid ไปเป็น Glutamic Acid ที่ตำแหน่ง 25 และพบว่าการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 25, 27, 58, 78 and 83 จะสัมพันธ์กับ host immune recognition [33] และจากการเปลี่ยนแปลงของ base ระหว่าง nucleotide ที่ 168 and nucleotide ที่ 188 ใน E6 gene อาจจะมีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ ส่วนปลาย (N-terminus) ของ E6 protein ซึ่งมีคุณสมบัติทาง antigenic structure ต่อการกระตุ้นหรือตอบสนองของ T cells อย่างดี จึงน่าจะมีผลทำให้การจดจำของ T cells ลดลง [36]

ปัจจุบันนี้ บทบาทของ HPV16 E6 variations ต่อความรุนแรงของการเกิดมะเร็งปากมดลูกยังไม่สามารถอธิบายได้ แต่พบได้ว่า HPV16 E6 variations ที่เกิดขึ้นจะมีกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงพบได้ในตำแหน่ง

ที่มีความสำคัญในการจดจำโดยระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้น HPV16 E6 variations ที่เกิดขึ้นน่าจะมีโอกาสที่เหนือกว่า prototype และมีบทบาทในการทำให้เกิด cell transformation และ บุกรุกรบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้เกิดโรครุนแรงได้ [13] ต่อมาการศึกษาเกี่ยวกับหน้าที่การทำงานของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปบนจีน E6 โดย Lichtig H และคณะ (2006) ศึกษาหน้าที่ของจีน E6 ที่พบว่าเกิด polymorphisms ทดสอบในตัวอย่างที่แยกมาจากปากมดลูกของผู้หญิงชาวสวีเดน จำนวน 10 ราย ซึ่งเกิด polymorphism บนจีน E6 แตกต่างกันได้แก่ R10G, K11T, N58S, R10G/L83V, I27R/L83V, Q14H/H78T/L83V, R48W, L83V, R8Q และ R10I/Q14D/I27TA61G/H78Y พบว่า E6 variants เหล่านี้มีความสามารถแตกต่างกันในการจับกับ calcium-binding protein (E6BP) ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายของ E6 ที่เกี่ยวข้องกับการ differentiation นอกจากนี้ยังมี โปรตีน Bax เป็น pro-apoptosis protein การยับยั้งการชักนำให้เซลล์เกิดการ differentiation ด้วย serum-calcium ลักษณะความผิดปกติทางด้าน genotype ในการ differentiation ของ human keratinocyte และการแสดงออกของพวก cytokeratins เมื่อมีการเจริญเติบโตแบบ raft culture [37] ต่อมาการศึกษาของ Asadurian Y และคณะ ได้ศึกษาหน้าที่และการทำงานของจีน E6 ของเชื้อ HPV16 ที่เกิด polymorphism ทางด้าน N-terminal ใน human keratinocyte พบว่า E6 variation ทั้ง 10 ตัวสามารถ degrade โปรตีน p53 and Bax ได้ไม่แตกต่างจาก E6 prototype เมื่อนำไปทดสอบ serum/calcium-differentiation resistant colony พบว่าให้ผลแตกต่างกันไป และ E6 ที่เกิด variant ในตำแหน่ง L83V ซึ่งในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าความสัมพันธ์กับความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้ในบางกลุ่มประชากร คือ มีความสามารถในการ degrade โปรตีน p53 และ Bax ได้ดีกว่า E6 prototype นอกจากนี้การเกิด variation ในตำแหน่ง L83V นั้นยังส่งเสริมความสามารถในการชักนำให้เกิด colonies resistant ต่อ serum/calcium-triggered differentiation แต่ไม่แตกต่างจาก E6 prototype อย่างมีนัยสำคัญ [38] ต่อมา Zehbe I และคณะ (2009) ศึกษาหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการก่อมะเร็งของกรดอะมิโนในจีน E6 ที่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ L83V, R10G/L83V และ Q14H/H78Y/L83V ในเซลล์ human normal immortalized keratinocyte (NIKS) พบว่า เซลล์ที่มีการแสดงออกของ R10G/L83V และ Q14H/H78Y/L83V มีแนวโน้มในการเกิด anoikis ได้ดีกว่าเซลล์ที่มีการแสดงออก E6 prototype และรูปแบบการ differentiation และ การเกิด apoptosis ของ E6 variant โดยเฉพาะ Q14H/H78Y/L83V อาจจะมี phenotype ที่เป็นประโยชน์ต่อการก่อมะเร็งและวงจรชีวิตของไวรัสด้วย [39] และในการศึกษาของ Ricared C และคณะ ได้ทดสอบความสามารถของโปรตีน E6 ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม AA โดยมีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนดังนี้ Q14H/H78Y/L83V ในการเพิ่มช่วงชีวิต (life span) และความสามารถในการ transformation ใน human foreskin keratinocyte (PHFK) โดยพบว่าในการทดสอบ long term cell culture เซลล์ที่ถูก infected ด้วย vector เปล่า ตายใน passage ที่ 9 แต่เซลล์ที่ถูก infected ด้วย E6

พบว่าสามารถเลี้ยงต่อไปได้นานกว่า passage ที่ 65 และเมื่อนำไปทดสอบเปรียบเทียบการแบ่งตัว การพัฒนาของเซลล์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้นใน E6/E7 PHFKs และ AA/E7 PHFKs พบว่า AA/E7 PHFKs มีการแบ่งตัวที่เร็วกว่าอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งการพัฒนาขนาดของเซลล์ให้ใหญ่ขึ้น และมีการแสดงออกของ cytokeratin 10 เมื่อทำการทดสอบให้มีการเจริญแบบ organotype raft cultures แต่เมื่อทดสอบการกระตุ้น telomerase และการ degrade p53 พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากทั้ง 2 กลุ่ม ดังนั้นในการศึกษานี้แสดงให้เห็นหลักฐาน ความสามารถของกลุ่ม AA variant ในความสัมพันธ์กับการเป็น oncogenic potential [40]

ปัจจุบันมีการศึกษา microRNAs (miRNAs) กันเป็นจำนวนมาก เป็น small non-coding RNA molecules มีขนาดประมาณ 21-23 นิวคลีโอไทน์ ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของจีน ส่วน miRNA ถูก transcript เป็น long primary transcripts ด้วย RNA polymerase II ซึ่งจะมีลักษณะเป็นสายยาว มีการเติม capped ที่ปลาย 5', และเติม polyadenylated ที่ปลาย 3' primary miRNA มีโครงสร้างคล้าย stem-loop hairpin ขนาดยาวประมาณ 90 นิวคลีโอไทน์ เรียก miRNA ในระยะนี้ว่า pri-miRNA จากนั้น pri-miRNA จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ RNase III 2 ตัว ได้แก่ Drosha และ Dicer ซึ่ง Drosha จะจับกับ DGCR8 และตัด pri-miRNA ที่ตำแหน่งจำเพาะ ได้ขนาดประมาณ 18-24 นิวคลีโอไทน์ ซึ่งจะเรียก miRNA ในระยะนี้ว่า pre-miRNA แล้วมันจะถูกส่งออกไปยัง cytoplasm ผ่านทาง exportin 5 โดย miRNA ที่ถูกส่งออกมานี้จะเรียกว่า mature miRNA มีลักษณะเป็นสายสั้นๆ 2 สายที่ complementary กัน จะมีหนึ่งสายที่เป็น mature miRNA และอีกสายจะเรียกว่า miRNA\* จับกันเป็นลักษณะ miRNA:miRNA\* โดยโมเลกุลนี้จะถูกจับด้วย RNA-induced silencing complex (RISC) ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ ซึ่ง RISC จะกระตุ้นให้ miRNA:miRNA\* แยกออกเป็นสายเดี่ยว โดย miRNA\* เมื่อแยกแล้วจะถูกย่อยสลายไป ส่วน mature miRNA ที่ติดอยู่กับ RISC จะทำหน้าที่ในการพา RISC ไปจับกับ mRNA เป้าหมายทำให้ mRNA สายนั้นไม่สามารถเกิดการ translation ได้ ส่งผลให้ลดการแสดงออกของโปรตีน

การจับกันระหว่าง miRNA กับ mRNA เป้าหมายมีความจำเพาะ โดย miRNA จะใช้ตรงส่วนบริเวณปลายของ 5' miRNA ไปจับกับบริเวณปลาย 3' ของ mRNA เป้าหมาย โดยจะเรียกบริเวณปลาย 5' ของ mRNA ที่จับกับปลาย 3' ของ miRNA แบบ complementary ว่า seed region ซึ่งเป็นกลไกของ miRNA ในการควบคุม mRNA เป้าหมาย ดังนั้นถ้า miRNA สามารถจับกับ mRNA เป้าหมายได้ข้างสมบูรณ์ ทำให้ RISC เข้าไปจับกับ mRNA เป้าหมายได้โดยตรงแล้วทำการย่อยหรือตัดสาย mRNA เป้าหมาย ทำให้ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนได้ แต่ถ้า miRNA จับกับ mRNA เป้าหมายได้เพียงบางส่วนส่งผลให้การควบคุมเป็นลักษณะการกดหรือลดการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด แต่คาดว่าจะไปมีผลต่อระดับการสร้างโปรตีนในระยะ pre-initiation หรือ post-initiation แต่ไม่มีผลต่อระดับของ mRNA [41] miRNA มีบทบาทสำคัญในหลายๆ ขั้นตอนทางชีวภาพของเซลล์ ได้แก่ cell proliferation, cell differentiation,

apoptosis, stress resistance และ fat metabolism นอกจากนี้ miRNA บางตัวยังทำหน้าที่ในการควบคุม oncogenic หรือ tumor suppressor activity อีกด้วย ดังนั้นจะเห็นได้ว่า เมื่อ miRNA มีความผิดปกติไป จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการควบคุมกลไกต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานที่จะทำให้เซลล์พัฒนาไปเป็นมะเร็งได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปพัฒนาใช้เป็น marker เพื่อใช้ในการบ่งชี้ หรือ วินิจฉัยรอยโรคก่อนที่จะมีพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้ [42]

จากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของ miRNA ทั้งจากเซลล์มะเร็งและในตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เป็นมะเร็งชนิดต่างๆ พบว่า miR-21 เป็นตัวหนึ่งที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติโดยมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหลายๆ มะเร็ง อาทิเช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งตับ มะเร็งลำไส้ มะเร็งตับอ่อน มะเร็งรังไข่ รวมทั้งในมะเร็งปากมดลูก ซึ่งการเพิ่มการแสดงออกของ miR-21 นั้นพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การ migration การป้องกันการเกิด apoptosis การ invasion รวมทั้ง การ metastasis ดังนั้นจะเห็นได้ว่า miR-21 เป็นโมเลกุลที่สำคัญในการที่จะทำให้เซลล์พัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง

จีน miR-21 อยู่บน chromosome ที่ 17q23.2 และ promoter ที่ควบคุมการแสดงออกของ pri-miR-21 อยู่บน intron ที่ 10 ซึ่งจะ overlapping กับส่วนของจีน TMEM49 แต่ไม่เกี่ยวข้องกับ transcription ของ miR-21 การแสดงออกของ miR-21 ถูกควบคุมผ่านทาง transcription factors หลายตัว โดยในการศึกษาแรกๆ มีรายงานว่า IL-6/STAT3 และ phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/AP-1 เป็น complex ที่สามารถชักนำการแสดงออกของ miR-21 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้ง Ras, ERK1/2, EGFR และ Estrogen Receptor อีกด้วย นอกจากนี้ยังมี Ets/PU.1, CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), nuclear factor-I (NFI), serum response factor (SRF), p53 และ signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) [43] แต่ในทางตรงข้าม miR-21 ถูกกดการแสดงออกผ่านทาง NFI, C/EBP, Gfi1 และ Estrogen Receptor [44] miR-21 มีบทบาทหน้าที่ในการเป็นทั้ง anti apoptosis และ pro-survival โดย target ของ miR-21 ได้แก่

Programmed Cell Death 4 (PDCD4) protein เป็น target อีกตัวหนึ่งของ miR-21 ทำหน้าที่เป็น tumor and metastasis suppressor พบว่าถูก downregulated ในหลายๆ เซลล์มะเร็ง มีการศึกษาแสดงให้เห็นว่า PDCD4 มีการเพิ่มขึ้น เมื่อมีการยับยั้งการทำงานของ miR-21 และในการทดลอง metastasis assay เมื่อทำการยับยั้งการทำงานของ miR-21 มีผลทำให้เซลล์ลดการ invasive การ metastasis นอกจากนี้ พบว่า PDCD4 มีการลดลงในระหว่างการกระตุ้น TLR4 ใน macrophage การทำงานของ PDCD4 เป็นตัวยับยั้งการ translation โดยการไปยับยั้ง eukaryotic translation-initiation factor 4F (EIF4F) ซึ่งต้องใช้ในเป็นตัวเริ่มต้นในการ translation ตรง 5' UTR ของ mRNA ดังนั้นเมื่อ mRNA จับกับ 5' UTR ก็

กลายเป็น complex ที่ยาว มี GC content สูง และสามารถเปลี่ยนโครงสร้างเป็น RNA secondary ซึ่งจะไวต่อการยับยั้งด้วย EIF4F และไวต่อระดับของ PDCD4 ภายในเซลล์ด้วย ต่อมามีการเสนอว่า mRNA มัน encode growth factor และ cytokine ที่สามารถจับกับ complex RNA ได้ และไวต่อ activity ของ PDCD4 โดยพบว่ามีโครงสร้าง IL-10 ซึ่งมันจะเพิ่มขึ้นหลังจากที่มีการกระตุ้นด้วย LPS ขึ้นกับ miR-21 และ PDCD4 และนอกจากนี้ PDCD4 สามารถยับยั้งการ translation ของ IL10 ยิ่งทำให้ชัดเจนว่า miR-21 ส่งเสริมการตอบสนอง anti-inflammatory โดยมีการสร้าง IL-10 เพิ่มขึ้น [45]

PTEN หรือ Phosphatase and tension homolog มีคุณสมบัติเป็นทั้ง lipid และ protein phosphatase activity ทำหน้าที่ไปดึงหมู่ Phosphate ออกจาก Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase (PIP3) กลายเป็น phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP2) ซึ่งส่งผลให้ยับยั้งการทำงานของ AKT pathway ซึ่งเป็น pathway ที่มีบทบาทสำคัญใน cell proliferation, cell differentiation, cell survival มีการศึกษาในมะเร็งเต้านมและมะเร็งตับ พบว่า PTEN เป็นเป้าหมายโดยตรงของ miR-21 ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มะเร็ง การ migration และการ invasion นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงของ miR-21 มีผลให้ไปเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่ phosphate ให้กับ focal adhesion kinase และการแสดงออกของ matrix metalloproteases (MMPs) 2 และ 9 ซึ่งทั้งคู่นั้นเป็นโปรตีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ PTEN ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการ migration และการ invasion [46, 47] และการ down-regulation ของ PTEN ด้วย miR-21 ส่งผลให้มีการ up-regulation ของ PI3K-AKT pathway หรือ MMPs ทำให้มีการเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์และการ motility

นอกจากนี้ยังมี target อื่นๆอีกหลายตัว เช่น Sprouty Proteins (Spry1,2) ทำหน้าที่เป็น negative regulator ของ ERK-MAP kinase และ เป็น inhibitor ของ branching morphogenesis, RECK เป็น tumor suppressor ที่เป็น negative regulator ของ MMP9, Bcl2 เป็น apoptosis inhibitor, MARCKS เป็น PKC substrate และ actin filament crosslinking protein, HNRPK เป็น pre-mRNA-binding protein และควบคุม cell cycle, IL-12p35 ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ allergic airway inflammation, JAG1 เป็น ligand สำหรับ receptor ของ Notch 1, BTG2 เป็น antiproliferative protein, LRRFIP1 เป็น inhibitor ของ NF- $\kappa$ B signaling, BMPRII เป็น receptor สำหรับ BMP2 และ BMP7, TGFBR2 เป็น Ser/Thr protein kinase ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ TGF $\beta$  receptor subfamily และ Cdc25A เป็น tyrosine protein phosphatase ซึ่งเป็น oncogene [48]

miR-21 มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการโปรตีนหลากหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่จะมีผลไปส่งเสริมการเกิดหรือการพัฒนาเซลล์ไปเป็นมะเร็งและทางผู้วิจัยมีแนวความคิดว่า HPV16As E6 D25E สามารถชักนำให้ miR-

21 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ส่งผลไปส่งเสริมให้มีการยับยั้งการแสดงออกของ PTEN ซึ่งทำให้การทำงานของ Akt pathway เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง Akt pathway เป็น pathway ที่สำคัญของเซลล์ในการเกิด cell proliferation, cell differentiation, survival เพราะฉะนั้นมีผลให้โปรตีนต่างๆใน pathway นี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น รวมทั้ง Mdm2 ซึ่งเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของโปรตีน p53 ในเซลล์ปกติ ทำให้โปรตีน p53 ที่อยู่ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ HPV16As E6 D25E ถูก degrade ได้ทั้งจากโปรตีน E6 D25E และจาก Mdm2 ด้วย ทำให้เซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV16 As E6 D25E สามารถ degrade โปรตีน p53 ได้เร็วกว่าเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV16 Prototype นอกจากนี้ยังทำให้เซลล์ที่ผิดปกติมีการตายลดลงและส่งเสริมให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอีกด้วย

### 3. วิธีดำเนินการวิจัย (Method)

#### 3.1 การเตรียม DNA ของ HPV16 As variants และ HPV16 prototype

HPV16 prototype ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็น HPV16 reference plasmid ส่วน HPV16 As variants ที่ใช้ในการศึกษานี้คัดเลือกมาจาก DNA ที่สกัดจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ (paraffin embedded biopsies) ที่มีผล pathology เป็น squamous cell carcinomas ซึ่งได้รับการศึกษาและทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจากผลการวิจัยเรื่อง “HPV16 variant in squamous cervical cell of women in northeast Thailand” ของ น.ส. พิษานิกา ขอบจิตต์ ซึ่งเผยแพร่ในวารสาร Int J Infect Dis. 2009 Mar;13(2):212-9.[49]

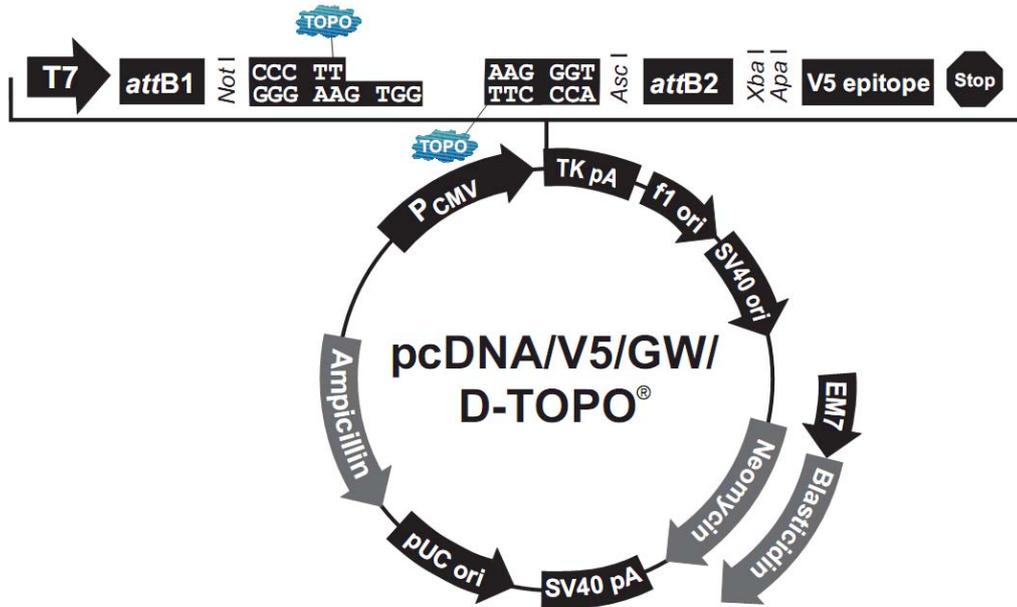
#### 3.2 การเพิ่มปริมาณ E6 gene

1. ออกแบบ primers ให้มีตำแหน่งที่จำเพาะกับลำดับ nucleotide ของ E6 gene ช่วงที่ 83-559 (ข้อมูลจาก GeneBank: K02718) และเหมาะสมกับการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ชนิด pcDNA™3.2/V5 Gateway® Directional TOPO® (Invitrogen) ซึ่งมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 3.1

2. เพิ่มจำนวนจีน E6-prototype และ จีน E6-As variants ด้วยวิธี PCR ตามขั้นตอนดังนี้  
เตรียม master mix ประกอบด้วย 1X PCR Buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 1µM primers, .02 U/Taq polymerase และ DNA แม่แบบ

3. ตั้ง condition ในการทำ PCR ตามนี้ 94°C 5 min, 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min, และ 72°C 5 min ทั้งหมด 40 cycles เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอสำหรับการนำไปเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์

4. นำ PCR products มาแยกบน 1.5% agarose gel โดยวิธี electrophoresis เพื่อตรวจหาขนาดของแบน PCR products ที่ได้ มีขนาดตรงกับที่ต้องการ



รูปที่ 3.1 โครงสร้างของ pcDNA™3.2/V5 Gateway® Directional TOPO®

### 3.3 การสร้าง recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ของเชื้อ HPV16

1. นำ PCR products ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ E6 gene ของ HPV16 prototype และ HPV16 As variant ไปเตรียมความเข้มข้นให้ได้ตามที่กำหนด
2. เติมนลงใน cloning reaction tube (ประกอบด้วย Fresh PCR products, salt solution, water, TOPO® vector)
3. ทำการ transformation เข้าไปใน competent cells *E. coli* สายพันธุ์ Top10 และคัดเลือกโคลนโดยใช้ LB plates ที่เติม Ampicillins 100 µg/ml นำโคลนที่ได้ไปเพิ่มจำนวนโดยทำการเลี้ยงใน LB broth ที่มี Ampicillins 100 µg/ml ที่ incubator shaker 37°C overnight
4. นำโคลน ที่ได้ไปต้ม 100°C 5 นาที แล้วใช้เป็น template ในการทำ PCR ตามขั้นตอนในข้อ 3.2 เพื่อตรวจหาจีน E6 นำโคลนที่มีจีน E6 ไปสกัดพลาสมิดด้วยวิธี miniprep

#### วิธีการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี miniprep

1. นำ LB broth culture มา centrifuge ให้เซลล์ตกตะกอนที่ 1,500 rpm นาน 10 นาที
2. เท supernatant ทิ้ง แล้วเติม Solution I (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH8.0) 100 µl ผสมให้เข้ากันโดยการดูด-เป่า ด้วย autopipette และ mix ด้วย vortex

3. เติม solution II (0.1 M NaOH, 1%SDS) 150  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา
4. เติม solution III (1.5M Potassium Acetate pH 5.4) 200  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที
- 5.ปั่นตกที่ 12,000 rpm 10 นาที แล้ว ดูด supernatant ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่
6. เติม phenol-chloroform (1:1) ในอัตราส่วน 1 เท่าของ supernatant ที่ดูดมาได้ แล้วผสมให้เข้ากัน โดยการคว่ำหลอดไปมา
7. ปั่นตกที่ 12,000 rpm 10 นาที แล้ว ดูด supernatant (ส่วนใสด้านบน) ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml หลอดใหม่
8. เติม Isopropanol อัตราส่วน 1 เท่าของ supernatant ที่ดูดได้ แล้วผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำ หลอดไปมา แล้วนำไป incubate ที่ตู้  $-70^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชม.
9. ปั่นตกที่ 12,000 rpm 15 นาที แล้วเท supernatant ที่ทิ้ง
10. ปั่นล้างพลาสติก ด้วย 70% ethanol ที่ 12,000 rpm 5 นาที
11. นำพลาสติกที่ได้ มา dry ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที
12. เติม TE solution 50  $\mu$ l เคาเบาๆ แล้ว incubate ที่  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชม.
13. นำไปวัดปริมาณความเข้มข้นของพลาสติกที่สกัดได้
14. นำไปตัดด้วย restriction enzyme และเก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$

### 3.4 การตรวจสอบพลาสติกโดยการนำไปตัดด้วย restriction enzyme

1. นำโคลนที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่า มีจีน E6 โดยตรวจหาจีน E6 ด้วยวิธี PCR มาสกัดพลาสติก ด้วยวิธี miniprep
2. นำไปตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* (Fermentas<sup>®</sup>) ประกอบด้วย Buffer, PCR products, *NdeI*, DW แล้ว incubate ที่  $37^{\circ}\text{C}$  overnight
3. เอนไซม์นี้มีตำแหน่งที่จำเพาะต่อพลาสติกที่สร้างขึ้น โดยสามารถตัดพลาสติกได้ 2 ตำแหน่ง คือ ตรงบริเวณพลาสติก 1 ตำแหน่ง และบริเวณจีนที่เชื่อมใส่เข้าไปอีก 1 ตำแหน่ง ดังนั้นเมื่อตัดพลาสติกที่มีจีน E6 อยู่ แล้วนำไปวิเคราะห์แยกแบนด้วยวิธี 0.7% gel electrophoresis จะพบแบน 2 ขนาด ได้แก่ 5340 bp และ 669 bp

### 3.5 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับ nucleotide โดยการ sequencing

นำโคลนที่ให้ผลบวกจากการทดสอบการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* ไปทำการ sequence เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทน์ของแต่ละโคลน และโคลนที่ให้ผลการ sequence ที่ถูกต้อง นำไปทำการเพิ่มจำนวนและเก็บไว้เพื่อศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนต่อไป

### 3.6 การทดสอบความสามารถในการแสดงออกของโปรตีน E6 ในแต่ละโคลนที่ได้

1. เพิ่มจำนวนของโคลนที่ได้ โดยนำไปเลี้ยงใน LB broth 10 ml ที่มี ampicilin 100 µg/µl บ่มในตู้ shaker incubator ที่ 37°C เป็นเวลา 18 ชม.

2. สกัดและ purify พลาสมิดด้วยวิธี miniprepation จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้นและหาค่า purity อีกส่วนหนึ่งนำไปแยกโดยใช้ 0.7% agarose gel electrophoresis เพื่อวัดและยืนยันปริมาณความเข้มข้นของพลาสมิดด้วย

3. ทดสอบความสามารถในการแสดงออกของพลาสมิดโดย transfected พลาสมิด เข้าไปในเซลล์ C33A ซึ่งเป็น HPV negative cervical cancer cells โดยใช้ Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ตามขั้นตอนดังนี้

- เตรียมเซลล์ C33A อายุ 1 วัน ใน 24-well tissue culture plate ตัวอย่างโคลนละ 3 หลุม โดย 1 หลุมนำไปสกัด RNA และอีก 2 หลุมที่เหลือนำไปสกัดโปรตีน

- เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ที่ไม่มี fetal bovine serum (FBS) และไม่มียาปฏิชีวนะ ปริมาณ 100 µl แล้วนำไปบ่มต่อที่ตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO<sub>2</sub> เพื่อรอการ transfection

- เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 50 µl ผสมกับ recombinant vector E6 แต่ละตัวให้มีความเข้มข้น 0.8 µg ขณะเดียวกัน ผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 50 µl กับ Lipofectamine 2000 ปริมาณ 2 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองมาผสมกัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

- นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมทั้ง recombinant vector และ Lipofectamine 2000 จากข้อ 3 โดยจะมีปริมาณทั้งหมด 100 µl มาหยดที่ละหยดบน เซลล์ C33A ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 2 เคาะและหมุนเบาๆ เพื่อให้ transfection reagent กระจายให้ทั่วเซลล์ นำไปบ่มต่อที่ตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 6 ชม.

- เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกไป แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS แต่ไม่มียาปฏิชีวนะเข้าไปแทน แล้วบ่มต่อที่ตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นเก็บเซลล์เพื่อนำไปสกัด RNA และโปรตีน

### 3.6.1 การสกัด RNA จาก transfected เซลล์ C33A

1. เก็บ transfected C33A cells ตามระยะเวลาที่กำหนดโดยการ trypsinize เซลล์ แล้วใส่ใน eppendroff ปั่นที่ 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C แล้วปั่นล้างด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง
2. เติม Trizol (Invitrogen) ปริมาณ 500  $\mu$ l ดูดเป่าขึ้น-ลง เพื่อให้เซลล์แตกด้วย autopipet แล้วปั่นตกที่ 14,000 rpm, 10 นาที ที่ 4 °C
3. ดูด supernatant ใส่ eppendroff ใหม่ แล้วเติม chloroform 100  $\mu$ l ผสมโดยการคว่ำ-หงาย แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที ปั่นตกที่ 14,000 rpm 15 นาที ที่ 4°C
4. ดูดตรงบริเวณตรงกลางที่มีลักษณะใสๆ (aqueous phase) ใส่ eppendroff ใหม่
5. เติม Isopropanol 250  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วปั่นตกที่ 14,000 rpm 10 นาที ที่ 4°C
6. เท supernate ที่ล้าง RNA ที่ได้ด้วย 75% ethanol 1 ml แล้วปั่นตกที่ 8,000 rpm 5 นาที 4°C
7. เท supernatant ที่แห้ง แล้ว dry RNA 10 นาที เติม DEPC-treated water 20  $\mu$ l
8. นำไปบ่มต่อที่ 55°C เป็นเวลา 10 นาที
9. นำ RNA ไปเปลี่ยนเป็น cDNA และเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่ -80°C

### 3.6.2 การเปลี่ยน RNA ที่สกัดได้ไปเป็น cDNA

1. เตรียม Master mix ซึ่งประกอบด้วย 5x iScript Reaction Mix (Bio Rad), iScript Reverse Transcriptase, Nuclease-free water และ RNA template
2. กำหนดเวลาในการ incubation โดยใช้เครื่อง thermocycle ตามนี้ 5 min 25°C, 30 min 42°C, 5 min 85°C

### 3.6.3 การตรวจหาระดับ mRNA ของจีน E6 ที่มีการแสดงออกใน transfected C33A

นำ cDNA ที่ได้ไปเป็น template เพื่อตรวจหาระดับ mRNA โดยวิธี real time PCR Primers ที่ใช้แสดงในตาราง

Primers	Sequences
$\beta$ actin-F	5' CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG 3'
$\beta$ actin-R	5' TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA 3'
E6-F-clone	5' CACCATGCACCAAAAGAGAACTGC 3'
E6-R-clone	5' GAGCAGCTGGGTTTCTCTACGT 3'

1. เตรียม Master mix 20  $\mu$ l ประกอบด้วย 2x Master mix 12.5  $\mu$ l, และ PCR qualified water 6.5  $\mu$ l เติม template 2  $\mu$ l
2. นำไปทำ PCR โดยใช้เครื่อง Real time PCR Lightcycler 480 (Roche) กำหนด condition ตามนี้ PCR initial activation step 95°C, 5 min, 3-step cycle, 40 cycles: 95°C, 60s, 55°C, 60s, 72°C, 2 min.
3. การเพิ่มขึ้นของสัญญาณ fluorescence ในแต่ละเซลล์ที่ทดสอบนั้นจะถูกวัดในระยะ extension step ของแต่ละรอบ ด้วย Detector software
4. ระดับ mRNA ของแต่ละเซลล์ที่ถูก transfect นั้น จะคำนวณตามสูตร  $\Delta\Delta CT$  และ normalize ด้วย  $\beta$ -actin

### 3.6.4 การตรวจหาโปรตีน E6 ที่มีการแสดงออกในเซลล์ C33A หลังจากทำการ transfection ด้วยวิธี Western blot hybridization

1. สกัดโปรตีนจากเซลล์ C33A ที่ถูก transfected ด้วย recombinant E6 expression vector โดย trypsinized เซลล์ แล้วปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง
2. เติม lysis buffer 30  $\mu$ l ดูดเป่าแล้ว mix ด้วย vortex เป็น 15 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็ง 30 นาที ทุก 15 นาที ทำการ mix ด้วย vortex เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นตกที่ 14,000 rpm 30 นาที 4°C
3. ดูด supernatant ใส่ tube ขนาด 1.5 ml นำไปวัดหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยวิธี Bradford (Bio Rad)
4. นำไปทำ western blot ส่วนที่เหลือเก็บที่ตู้ -80°C

### การทำ Western blot hybridization

1. นำโปรตีนที่สกัดได้ปริมาณ 30  $\mu\text{g}$  ผสมกับ sample buffer ต้ม 5 นาที จากนั้นนำไปแยกโปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE
2. ย้ายโปรตีนที่แยกด้วย 12%SDS-PAGE ลงบน PVDF membrane ด้วยวิธี semi-dry โดยใช้กระแสไฟ 150 volt และ 300 mA เป็นเวลา 1 ชม.
3. นำ membrane ไป block ด้วย 5% skim milk, 1XPBS+0.1% tween-20 เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง
4. นำไป incubate ร่วมกับ primary antibody คือ mouse monoclonal HPV16/18E6 primary antibodies (1:5,00, Abcam) ใน 1% skim milk, 1XPBS+0.1% tween-20 ที่ 4°C overnight
5. ล้าง membrane ด้วย 1XPBS + 0.1% tween-20 ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำไป incubate ร่วมกับ secondary antibody ซึ่งเป็น goat anti-mouse antibodies-HRP (1:1,000, Santa cruz) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม.
6. ล้าง membrane ด้วย 1XPBS + 0.1%tween-20 3 ครั้ง ตามด้วย 1XPBS 2 ครั้ง
7. นำ substrate (Supersignal West Pico substrate) ผสมอัตราส่วน 1:1 เทลงบน membrane แล้ว incubate เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปประกบบนแผ่นฟิล์ม ก็จะเกิดแบนให้เห็น

### 3.7 การเตรียม E6AP expression vector

นำ E6AP expression vector ซึ่งเป็น plasmid ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. JON M. HUIBREGTSE มา transform เข้าใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอสำหรับการใช้ในโครงการวิจัยนี้

1. เตรียม competent *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$
2. Transform plasmid เข้าไปใน competent *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยวิธี heat-shock assay
3. Spread เชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB-agar plate) ที่มียา ampicillin 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$
4. Incubate ที่ 37°C overnight
5. คัดเลือก clones ของแบคทีเรียที่ขึ้นบน LB-agar plate
6. สกัด plasmid ด้วยวิธี minipreparation และตรวจสอบ plasmid ที่สกัดได้โดยการแยกด้วย 0.7% agarose gel electrophoresis

7. วัดปริมาณและค่า purity ของพลาสมิดที่ได้ แล้วเก็บที่  $-20^{\circ}\text{C}$

### 3.7.1 การ transfection E6AP expression vector

เพื่อทดสอบว่าจีน E6AP ที่อยู่ใน E6AP expression vector ที่เตรียมได้ สามารถแสดงออกได้จริงใน mammalian cell line จึงทำการ transfection E6AP expression vector เข้าใน เซลล์ 293FT

1. เตรียม เซลล์ 293FT อายุ 1 วัน ใน 24-well tissue culture plate
2. Transfect E6AP expression vector จำนวน  $0.8\ \mu\text{g}$  เข้าเซลล์ 293FT ที่เตรียมไว้ ด้วย Lipofectamine 2000 (Invitrogen) จำนวน  $2\ \mu\text{L}$
3. Incubate  $37^{\circ}\text{C}$  ที่ตู้  $\text{CO}_2$  incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

### 3.7.2 การทดสอบการแสดงออกของ E6AP expression vector โดยวิธี western blot

หลังจากทำการ transfection เซลล์ 293FT ด้วย E6AP expression vector โดยใช้ Lipofectamine 2000 บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงทดสอบการแสดงออกของจีน E6AP โดยการตรวจหาโปรตีน E6AP โดยวิธี western blot

1. เก็บ transfected cells จาก 24-well plate ด้วยการ trypsinization ใส่ใน tube ขนาด 1.5 ml
2. เติม lysis buffer สกัดโปรตีนตามขั้นตอนในข้อ 3.6.4
3. นำโปรตีนที่ได้ผสมกับ sample buffer แล้วต้ม 5 นาที
4. นำไปแยกโปรตีนด้วย 10% SDS-PAGE
5. Transfer โปรตีนในแผ่น gel ลงบน PVDF membrane ด้วยวิธี semi-dry
6. block membrane ด้วย 5% skim milk,  $1\times\text{PBS}+0.1\%$  tween-20 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม.
7. เจือจาง 1:1,000 mouse monoclonal anti-E6AP antibody (Santa cruz Biotechnology Inc) ใน 1% skim milk,  $1\times\text{PBS}+0.1\%$  tween-20
8. Incubate โปรตีนบน PVDF membrane ด้วย 1:1,000 mouse monoclonal anti-E6AP antibody (Santra cruz Biotechnology Inc) ที่  $4^{\circ}\text{C}$  overnight
9. ล้าง membrane ด้วย  $1\times\text{PBS} + \text{tween-20}$  3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

10. เจือจาง 1:10,000 goat anti-mouse antibody-HRP (Santa cruz Biotechnology Inc) ใน 1% skim milk, 1XPBS+0.1% tween-20

11. Incubate PVDF membrane ด้วย 1:10,000 goat anti-mouse antibody-HRP ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม.

12. ล้าง membrane ด้วย 1XPBS + tween-20 อีก 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

13. ล้าง membrane ด้วย 1XPBS 2 ครั้ง

14. ใส่ substrate ลงไป เมื่อสาร chemiluminescences เปล่งออกมา แล้วนำไปประกบบนแผ่นฟิล์ม ก็จะเกิดแบนให้เห็น

### 3.8 การทดสอบความสามารถของ recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ของเชื้อ HPV16 ในการจับกับ E6 association protein (E6AP)

1. เลี้ยงเซลล์ C33A ใน dish culture ขนาด 60 mm overnight

2. ทำการ co-transfection ระหว่าง recombinant vector ของ E6-prototype หรือ E6-As variant ปริมาณ 6 µg และ recombinant vector ของ E6AP ปริมาณ 2 µg โดยใช้ Lipofectamine 2000 (invitrogen) เหมือนข้อ 3.6

3. สกัดโปรตีนเหมือนข้อ 3.6.4 นำโปรตีนที่ได้ไปทำ immunoprecipitation assay ดังนี้

1. นำโปรตีนที่ได้ทั้งหมด มา pre-clean ด้วยการเติม protein G plus (Santra cruze) 10 µl นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่มีอุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชม.

2. บั่นที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C ดูด supernatant ใส่ tube ขนาด 1.5 ml

3. ล้าง protein G plus ด้วย lysis buffer จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำ supernatant ไปรวมกับที่เก็บมาก่อนหน้านี้แล้ว

4. เติม anti-HPV16/18 E6 antibody 1:50 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่มีอุณหภูมิ 4°C overnight

5. เติม protein G plus 60 µl นำไปบ่มต่อบนเครื่องเขย่าที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชม.

6. บั่นที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C ดูด supernatant ทิ้ง ล้าง protein G ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

7. เติม sample buffer 50 µl นำไปต้มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วบั่นที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูด supernatant ไปทำ western blot เพื่อตรวจหาโปรตีน E6AP ตามข้อ 3.7.2

### 3.9 การทดสอบความสามารถของ recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ของเชื้อ HPV16 ในการ degraded โปรตีน p53

#### 3.9.1 Transfection recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ในเซลล์ C33A

นำ recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ไป transfected เข้าเซลล์ C33A ด้วย Lipofectamine 2000 (Invitrogen) เหมือนข้อ 3.6

#### 3.9.2 การตรวจหาโปรตีน p53 ด้วยวิธี Western blot assay

สกัดโปรตีนจาก transfected เซลล์ตามขั้นในข้อ 3.6.4 ด้วย lysis buffer จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้ ไปวัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Braddford (BioRad) แล้วนำไปตรวจหาโปรตีน p53 ด้วยวิธี Western blot assay ดังนี้

1. นำโปรตีนที่สกัดได้ปริมาณ 30  $\mu$ g ผสมกับ sample buffer ต้ม 5 นาที จากนั้นนำไปแยกโปรตีน ด้วย 10% SDS-PAGE
2. ย้ายโปรตีนที่แยกด้วย 10%SDS-PAGE ลงบน PVDF membrane ด้วยวิธี semi-dry โดยใช้ กระแสไฟ 150 volt และ 300 mA เป็นเวลา 1 ชม.
3. นำ membrane ไป block ด้วย 5% skim milk, 1XPBS+0.1% tween-20 เป็นเวลา 1 ชม.
4. นำไป incubate ร่วมกับ primary antibody คือ mouse monoclonal p53 primary antibodies (1:1,000, Santa cruz) ใน 1% skim milk, 1XPBS+0.1% tween-20 ที่ 4°C overnight
5. ล้าง membrane ด้วย 1XPBS+0.1% tween-20 ทั้งหมด 3 ครั้ง แล้วนำไป incubate ร่วมกับ secondary antibody ซึ่งเป็น goat anti-mouse antibodies-HRP (1:10,000, Santa cruz) ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม.
6. ล้าง membrane ด้วย 1XPBS+0.1%tween-20 3 ครั้ง ตามด้วย 1XPBS 2 ครั้ง
7. นำ substrate (Supersignal West Pico substrate) ที่ผสมอัตราส่วน 1:1 เทลงบน membrane แล้ว incubate เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปประกบบนแผ่นฟิล์ม ก็จะเกิดแบนให้เห็น

#### 3.9.3 การทดสอบผลของ recombinant vectors ของ E6-prototype และ E6-As variant ต่อ การลดครึ่งชีวิตของโปรตีน 53 (half life p53)

1. เตรียมเซลล์ C33A อายุ 1 วัน ใน 24-well tissue culture plate

2. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ที่ไม่มี fetal bovine serum (FBS) และไม่มียาปฏิชีวนะ ปริมาณ 100  $\mu$ l แล้วนำไปบ่มต่อที่ตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO<sub>2</sub> เพื่อรอการ transfection

3. เตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 50  $\mu$ l ผสมกับ recombinant vector E6 แต่ละตัวให้มีความเข้มข้น 0.8  $\mu$ g ขณะเดียวกัน ผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 50  $\mu$ l กับ Lipofectamine 2000 ปริมาณ 2  $\mu$ l บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งสองมาผสมกัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

4. นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมทั้ง E6 recombinant vectors และ Lipofectamine 2000 จากข้อ 3 โดยจะมีปริมาณทั้งหมด 100  $\mu$ l มาหยดที่ละหยดบน เซลล์ C33A ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 2 เคาะและหมุนเบาๆ เพื่อให้ transfection reagent กระจายให้ทั่วเซลล์ นำไปบ่มต่อที่ตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 6 ชม.

5. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกไป แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS แต่ไม่มียาปฏิชีวนะเข้าไปแทน แล้วบ่มต่อที่ตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 48 ชม.

6. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมทิ้ง แล้วเติม DMEM ที่มี 150  $\mu$ g/ml cyclohexamide (CHX) จากนั้นนำไป incubate ที่ตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO<sub>2</sub> แล้วเก็บเซลล์ตามเวลาที่กำหนดคือที่ 0, 1, 2, 3 ชม.

7. สกัดโปรตีนจากเซลล์ที่เก็บมาตามขั้นในข้อ 3.6.4 ด้วย lysis buffer จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้ไปวัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Braddford (BioRad) แล้วนำไปตรวจหาโปรตีน p53 ด้วยวิธี Western blot assay เหมือนข้อ 3.9.2

8. นำแบนโปรตีนที่ได้ทั้งหมด ไปวิเคราะห์หาค่า density ด้วยโปรแกรม ImageJ จากนั้น normalize กับโปรตีน  $\beta$ -actin แล้วเปรียบเทียบระหว่าง E6-prototype กับ E6 As variant

### 3.10 การทดสอบคุณสมบัติของ recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variant ของเชื้อ HPV16 ในการกระตุ้นเอนไซม์ telomerase

#### 3.10.1 Transfection recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ในเซลล์ C33A

นำ recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ไป transfected เข้าเซลล์ C33A ด้วย Lipofectamine 2000 (Invitrogen) เหมือนข้อ 3.6

### 3.10.2 การตรวจหา activity ของเอนไซม์ telomerase

สกัดโปรตีนจาก transfected cell ในข้อ 3.3.2 ด้วย lysis buffer จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้ไปวัดปริมาณของโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Braddford (BioRad) แล้วนำไปตรวจหา activity ของเอนไซม์ telomerase โดยใช้ Quantitative Telomerase Detection Kit (Allied Biotech, Inc) assay ดังนี้

1. เตรียม mastermix ซึ่งมีปริมาตรทั้งหมด 25  $\mu$ l ประกอบด้วย premix 12.5  $\mu$ l, PCR qualified water 11.5  $\mu$ l และโปรตีนที่สกัด 1  $\mu$ l (ประมาณ 0.1  $\mu$ g)

2. นำไปทำ PCR โดยใช้เครื่อง Real time PCR (ABI) ตั้ง condition ดังนี้ Telomerase reaction 25 °C, 20 min, PCR initial activation step 95°C, 10 min, 3-step cycle, 40 cycles: 95°C, 30s, 58°C, 30s, 72°C, 30s. 5.

3. การเพิ่มขึ้นของสัญญาณ fluorescence ในแต่ละเซลล์ที่ทดสอบนั้นจะถูกวัดในระยะ extension step ของแต่ละรอบ ด้วย Detector software

4. เตรียม standard curve ทำการเจือจาง telomerase positive telomerase substrate oligonucleotide (TSR) template เป็น 5 fold dilution โดย telomerase activity ของแต่ละเซลล์ที่ถูก transfect นั้น จะคำนวณตาม standard curve

### 3.11 ทดสอบความสามารถของ recombinant vector E6-prototype และ E6-As ในการกระตุ้นการแสดงออกของ miR-21

นำ RNA ส่วนที่เหลือจากข้อ 3.6 ซึ่งวัดปริมาณและคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์แล้ว โดยวิเคราะห์ค่า 18s rRNA และ 28s rRNA โดยวิธี UV-VIS spectrophotometer และ run gel electrophoresis ดู band ของ 18s rRNA และ 28s rRNA นำ RNA ที่ได้ไปตรวจหาการแสดงออกของ miR-21 โดยการตรวจวัดการแสดงออกของ miR-21 โดยใช้ TaqMan® MicroRNA Assays (Ambion) เป็น two-step RT-PCR ประกอบด้วย 1) ปฏิกริยา reverse transcription (RT) step, total RNA จะถูกเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วย small RNA-specific, stem-loop RT primer 2) PCR step, PCR products จะถูก amplified จาก cDNA samples โดยใช้ U6 snRNA และ DW เป็น positive และ negative control มีขั้นตอนดังนี้

#### 1. Reverse transcription for cDNA synthesis

เตรียม RT master mix ประกอบด้วย master mix 7  $\mu$ l, 5X RT primer 3  $\mu$ l, และ RNA sample 5  $\mu$ l แล้วปั่นตก จากนั้นกำหนด condition บนเครื่อง PCR ตามนี้ 30 min 16 °C, 30 min 42 °C, 5 min 85 °C, 4 °C  $\infty$ .

## 2. PCR Amplification

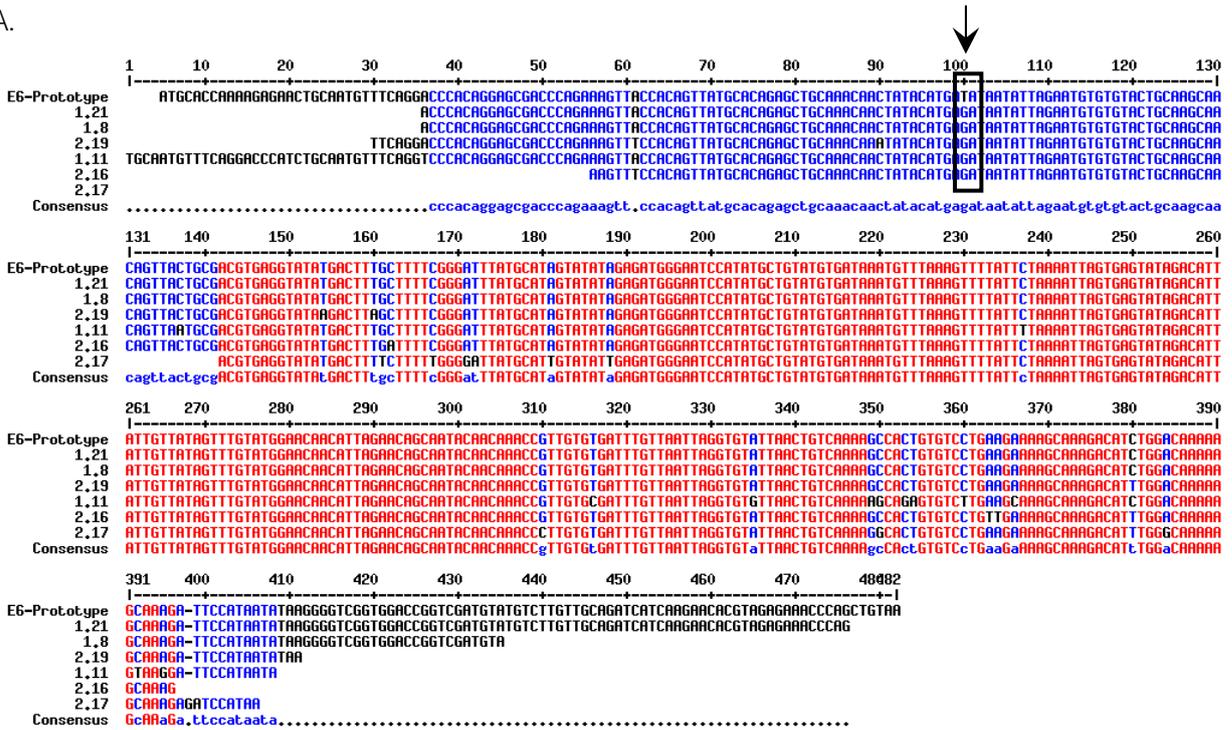
เตรียม master mix ทั้งหมด 20  $\mu$ l ประกอบด้วย 20X TaqMan MicroRNA assay 1  $\mu$ l, Product from RT reaction 1  $\mu$ l, TaqMan 2X Universal PCR Master Mix 10  $\mu$ l และ Nuclease-free water 8  $\mu$ l จากนั้นนำไปทำ real time PCR โดยกำหนด condition ดังนี้ 95°C 10 min 40 cycles: denature 95 °C 15s, anneal/extend 60 °C 60s

## 4. ผลการวิจัย (Result)

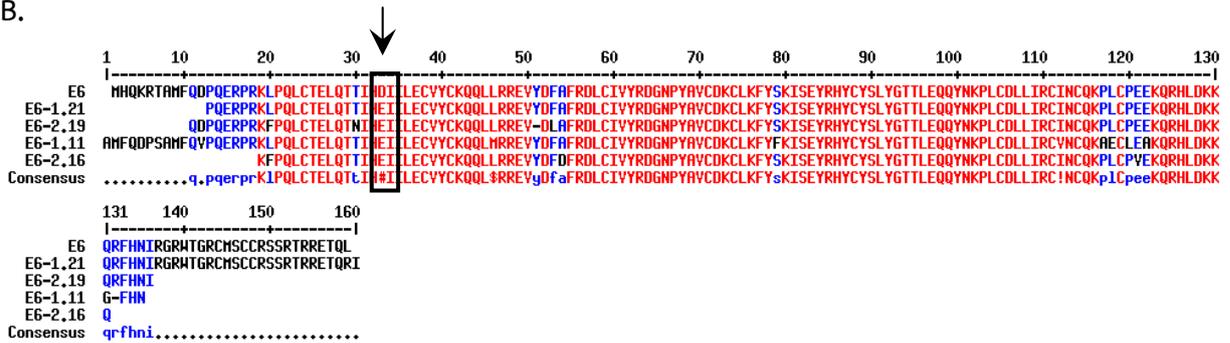
### 4.1 ลำดับเบสใน DNA ของตัวอย่าง HPV16 As variants และ HPV16 prototype

จากผลการศึกษาของโครงการวิจัยที่ผ่านมา ได้คัดเลือกตัวอย่างตรวจที่มี E6 ของเชื้อ HPV16 As variants ซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงในรูปที่ 4.1 มาศึกษาในโครงการวิจัยนี้

A.



B.



รูปที่ 4.1 A. แสดงลำดับเบสนจีน E6 ในของตัวอย่าง HPV16 As variants และ HPV16 prototype โดยตำแหน่งที่ถูกครชี้แสดงถึงตำแหน่งที่ใช้ในการจัดกลุ่ม As variant โดยนิวคลีโอไทน์เปลี่ยนจาก T ไปเป็น G ในตำแหน่งที่ 178

B. แสดงตำแหน่งที่กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปโดยเปลี่ยนจาก Aspartic Acid (D) ไปเป็น Glutamic Acid (E) ที่ตำแหน่งที่ 25

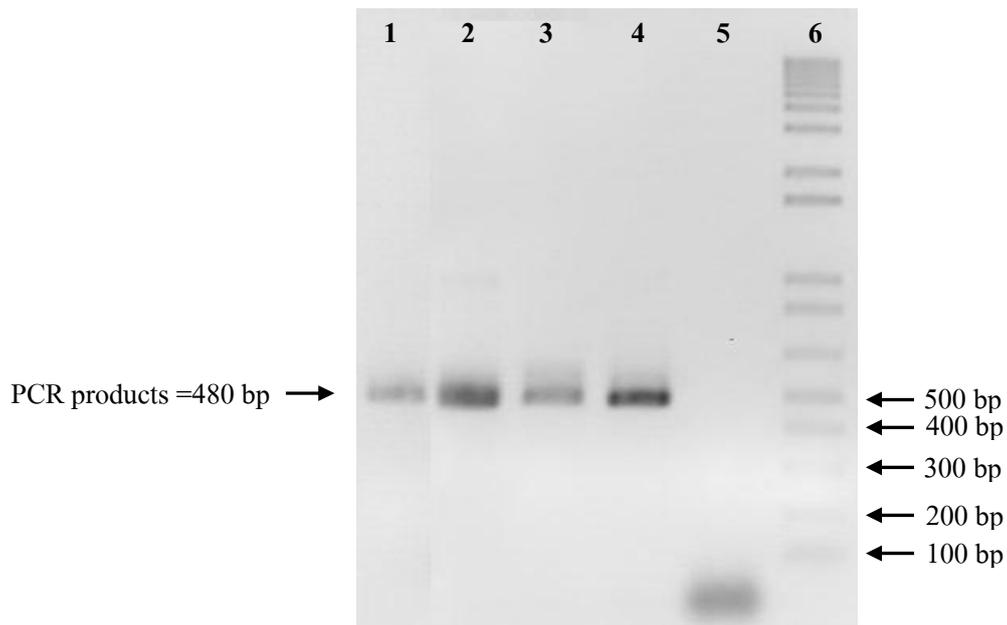
## 4.2 การเพิ่มปริมาณ E6 gene

ในการเพิ่มจำนวนจีน E6-prototype และ จีน E6-As variants ด้วยวิธี PCR ได้ออกแบบ primers จำนวน 1 คู่ ให้มีตำแหน่งจำเพาะกับลำดับ nucleotide ของ E6 gene ช่วงที่ 83-559 และเหมาะสมกับการเชื่อมต่อเข้ากับ pcDNA™3.2/V5 Gateway® Directional TOPO® ซึ่งมีลำดับเบสดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 Primers ที่จำเพาะกับ HPV16 E6 gene

Primer	Sequence	Size (bp)
E6-F	CACCATGCACCAAAAGAGAACTGC	480
E6-R	GAGCAGCTGGGTTTCTCTACGT	

เมื่อเพิ่มปริมาณจีน E6-prototype และ จีน E6-As variants ด้วยวิธี PCR ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2 จากนั้นนำ PCR products ที่ได้ไปวัดความเข้มข้นเพื่อใช้ในขั้นตอนการโคลน



รูปที่ 4.2 แสดงผลการทำ PCR เพื่อตรวจหาจีน E6 แล้วนำมาแยกบน 1.5% gel electrophoresis

Lane 1 คือ PCR product จาก Plasmid HPV16

Lane 4 คือ PCR product จาก CINII- III/2.16

Lane 2 คือ PCR product จาก SCC/1.11

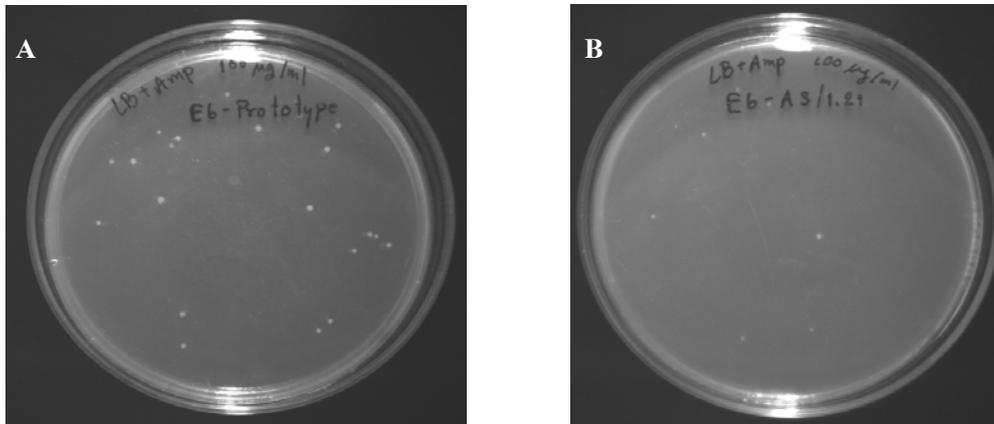
Lane 5 คือ Blank

Lane 3 คือ PCR product จาก SCC/1.21

Lane 6 คือ marker 1 kb plus

#### 4.3 การสร้าง recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ของเชื้อ HPV16

หลังจากสร้าง recombinant vectors และ transformation แล้วทำการคัดเลือกโคลน



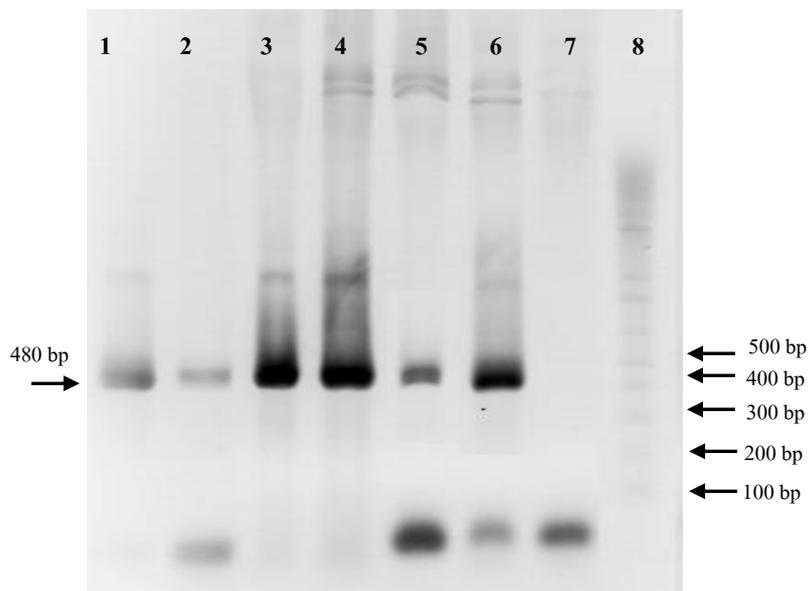
รูปที่ 4.3 แสดงผลการ transformation

A คือ LB plates ที่เติม Ampicillins 100 µg/ml ที่คัดเลือก clone E6-prototype

B คือ LB plates ที่เติม Ampicillins 100 µg/ml ที่คัดเลือก clone E6-As variant

#### 4.4 การตรวจหาจีน E6 จากโคลนของ *E.coli* ที่สามารถเจริญบน LB plates ที่เติม Ampicillins 100 µg/ml โดยใช้ PCR

นำโคลนที่ได้ไปเพิ่มจำนวน และสกัดพลาสมิด เพื่อตรวจสอบว่ามีจีน E6 อยู่ใน clone ที่เลือกมาจริงหรือไม่ โดยใช้วิธี PCR กับ primer คู่ที่ใช้เพิ่มจำนวนของจีน E6 เพื่อใช้ในการโคลน ผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 4.4



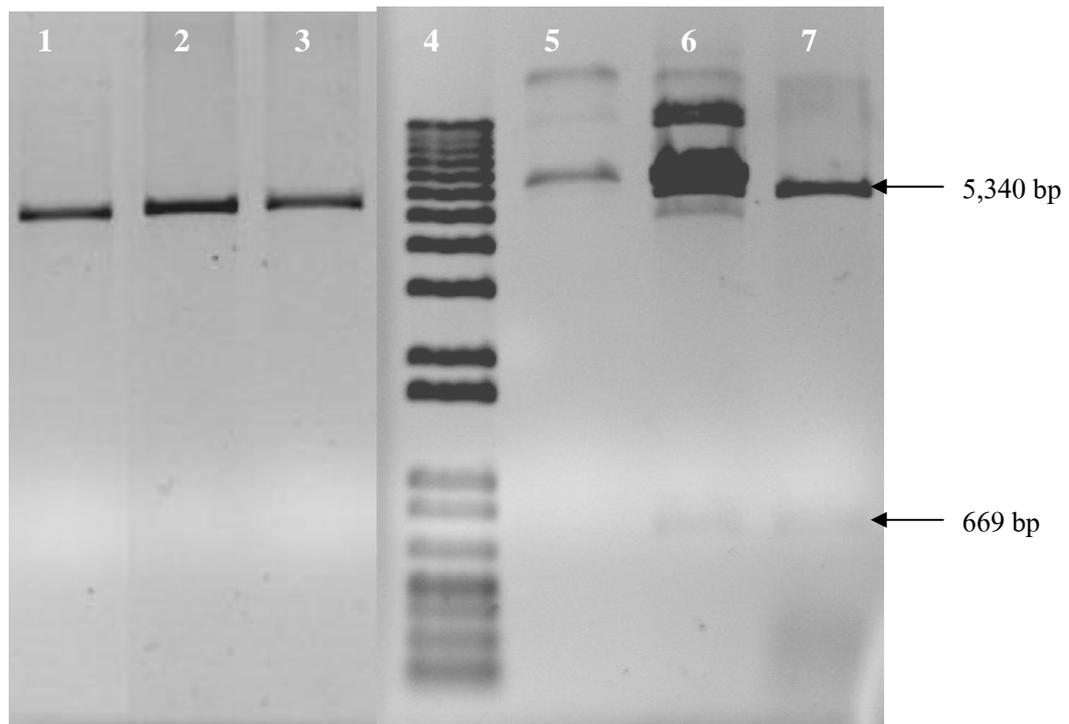
**รูปที่ 4.4** แสดงผลการตรวจหาจีน E6 ด้วยวิธี PCR โดยแยกด้วย 1.5% gel electrophoresis

Lane 1 คือ positive control	Lane 5 คือ E6-As/1.21 clone 1
Lane 2 คือ E6-Prototype clone 1	Lane 6 คือ E6-As/2.16 clone 1
Lane 3 คือ E6-Prototype clone 2	Lane 7 คือ Blank
Lane 4 คือ E6-As/1.11 clone 1	Lane 8 คือ marker 1 kb plus

**4.5 การตรวจสอบพลาสมิดโดยการนำไปตัดด้วย restriction enzyme**

นำโคลนที่มีจีน E6 ไปสกัดพลาสมิดแล้วนำไปตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* ซึ่งตอนนี้ได้โคลนที่ให้ผล PCR เป็นบวกจำนวนทั้งหมด 6 clones ดังนี้

1. pcDNA3.2E6-prototype (pcDNA3.2E6-P) คือ พลาสมิดที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับ nucleotide ของจีน E6
2. pcDNA3.2E6-As variants (pcDNA3.2E6-As-1.21) คือ พลาสมิดที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับ nucleotide ของจีน E6 ใน ตำแหน่ง 178 จาก T ไปเป็น G และถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม Asian variants
3. pcDNA3.2E6-As-1.11
4. pcDNA3.2E6-As-2.16
5. pcDNA3.2E6-As-N18
6. pcDNA3.2E6-As-N19



รูปที่ 4.5 แสดงผลการตัด restriction enzyme (*NdeI*) แล้วนำไปแยกดูแบนด้วย 0.7% gel agarose electrophoresis

1: pcDNA3.2E6-As-1.11

5: pcDNA3.2E6-As-1.21

2: pcDNA3.2E6-As-2.16

6: pcDNA3.2-E6-P

3: pcDNA3.2E6-As-N19

7: pcDNA3.2E6-As-N18

4: Marker 1 kb plus

#### 4.6 การตรวจสอบความถูกต้องของลำดับ nucleotide โดยการ sequencing

หลังจากสกัดพลาสมิดทั้งหมดแล้วและพบว่าให้ผลการตัดด้วยเอนไซม์ถูกต้อง จากนั้นนำไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสด้วยวิธี sequencing ผลของลำดับเบสแสดงในรูปที่ 4.6



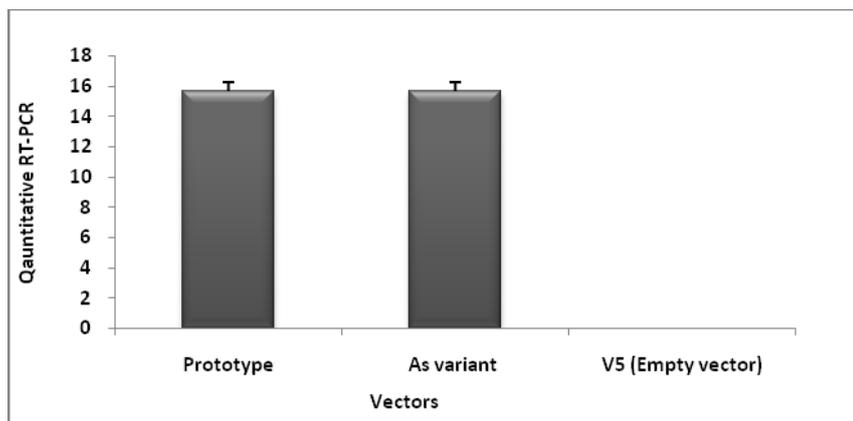


**รูปที่ 4.7** แสดงผลการทำ western blot เพื่อตรวจหาโปรตีน E6 โดยที่ A. คือ การทำ western blot เพื่อตรวจหาโปรตีน E6 โดยใช้ mouse-anti goat antibodies เป็น secondary antibodies ส่วน B. เป็นการทำให้ western blot เพื่อตรวจหาโปรตีน E6 โดยใช้ rabbit-anti goat antibodies เป็น secondary antibodies

- |                          |                           |
|--------------------------|---------------------------|
| 1: SiHa cell line 50 µg  | 4: C33A cell line 50 µg   |
| 2: SiHa cell line 100 µg | 5: C33A cell line 100 µg  |
| 3: CaSki cell line 50 µg | 6: CaSki cell line 100 µg |

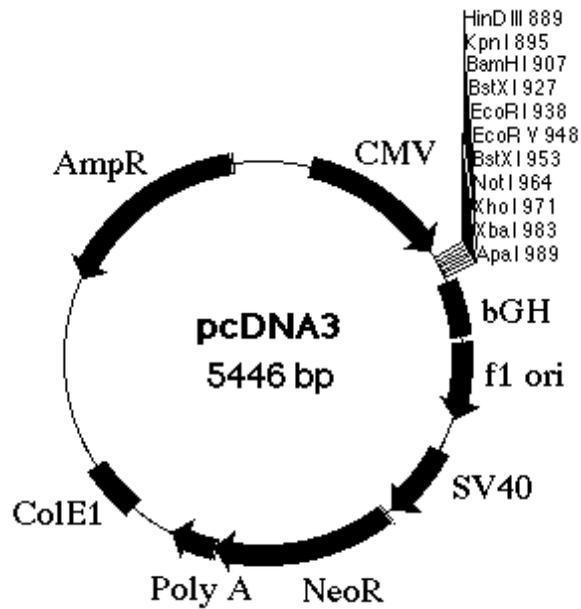
**4.8 การทดสอบความสามารถในการแสดงออกของ recombinant expression vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ของเชื้อ HPV16 ที่สร้างได้**

จากการทดสอบความสามารถในการแสดงออกของจีน E6 ใน recombinant vector ของ HPV E6-prototype และ HPV16 E6-As variant โดยนำ vector แต่ละชนิด transfect เข้าในเซลล์ C33A แล้วสกัด RNA มาตรวจหาปริมาณ E6 mRNA โดยวิธี real time RT-PCR พบว่า recombinant E6 vector ทุกตัวที่สร้างขึ้นสามารถตรวจพบระดับ mRNA ของจีน E6 ได้โดยมีค่า Ct อยู่ที่ประมาณ 16 ดังแสดงในรูปที่ 4.8



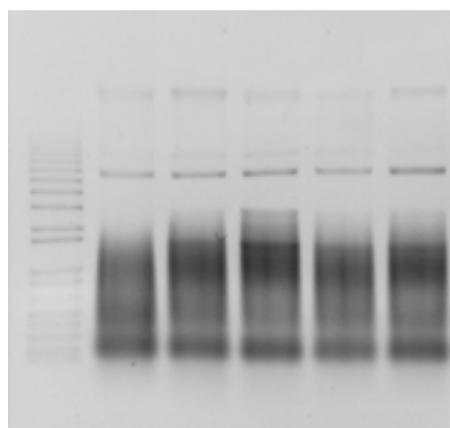
**รูปที่ 4.8** ระดับของ mRNA ของ E6 recombinant vectors ทั้งหมด ประกอบด้วย HPV16 E6-prototype, HPV16 E6-As variants และ V5 vector (vector เปล่า)

#### 4.9 การเตรียม E6AP expression vector



รูปที่ 4.9 แสดงโครงสร้างของ vector ที่ใช้ในการ construct E6AP expression vector

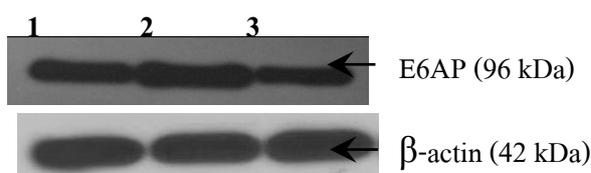
ผลจากการนำ E6AP expression vector มา transform เข้าใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  เพื่อเพิ่มปริมาณ หลังจากสกัดพลาสมิดจาก แล้วตรวจดูขนาดของพลาสมิดโดยการทำ agarose gel electrophoresis ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 แสดง plasmid profile ของ E6AP expression vector บน 0.7% agarose gel electrophoresis

#### 4.10 การทดสอบการแสดงออกของ E6AP expression vector

เมื่อทำการ transfect E6AP expression vector เข้าไปในเซลล์ 293FT แล้วสกัดโปรตีนนำไปตรวจหาโปรตีน E6AP ด้วยวิธี western blot พบว่า E6AP expression vector ที่เตรียมนั้นมี ความสามารถในการแสดงออกใน mammalian cell ได้จริงๆ เมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบในเซลล์ที่ไม่ ถูก transfect กับเซลล์ที่ถูก transfect ซึ่งใช้ปริมาณโปรตีนต่างกัน โดยผลการทดลองได้แสดงให้เห็นในรูป ที่ 4.11



รูปที่ 4.11 แสดงผลการตรวจหาปริมาณของโปรตีน E6AP ในเซลล์ 293FT ที่ถูก transfect ด้วย

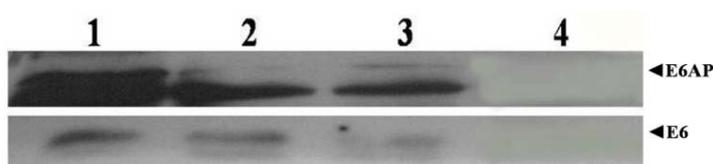
E6AP expression vector และเซลล์ที่ไม่ได้ถูก transfect

Lane 1 = โปรตีนปริมาณ 30 µg จากเซลล์ 293 FT

Lane 2 = โปรตีนปริมาณ 30 µg จากเซลล์ 293 FT ที่ถูก transfect ด้วย E6AP expression vector

Lane 3 = โปรตีนปริมาณ 10 µg จากเซลล์ 293 FT ที่ถูก transfect ด้วย E6AP expression vector

#### 4.11 การทดสอบความสามารถของโปรตีน E6 ที่สร้างจาก recombinant expression vector ของ E6-Prototype และ E6-As variants ของเชื้อ HPV16 ในการจับ E6 association protein (E6AP)



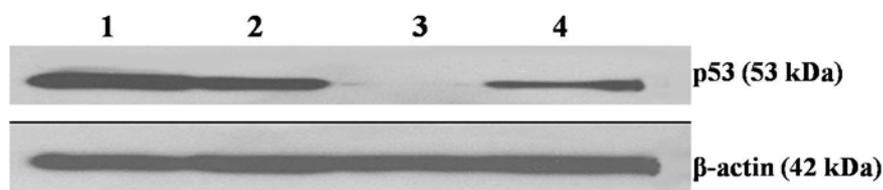
รูปที่ 4.12 แสดงผลการทดสอบความสามารถของโปรตีน E6 ทั้งจาก prototype และ As variant ในการจับกับโปรตีน E6AP โดย

- 1: โปรตีนจากเซลล์ SiHa (positive control)
- 2: โปรตีน จากเซลล์ C33A ที่ถูก co-transfected ระหว่าง E6AP expression vector และ E6-prototype
- 3: โปรตีน จากเซลล์ C33A ที่ถูก co-transfected ระหว่าง E6AP expression vector และ E6-As variant
- 4: โปรตีนจากเซลล์ C33A (negative control)

#### 4.12 การทดสอบความสามารถของโปรตีน E6 ที่สร้างจาก recombinant expression vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ของเชื้อ HPV16 ในการ degrade โปรตีน p53

ในการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน E6 ที่ถูก translate จาก recombinant expression vector ที่สร้างขึ้น จึงทำการ transfect recombinant E6 expression vector แต่ละชนิดเข้าไปในเซลล์ C33A เพื่อทดสอบความสามารถในการ degrade โปรตีน p53 ที่อยู่ภายในเซลล์ โดยการตรวจวัดปริมาณโปรตีน p53 ในเซลล์ด้วยวิธี western blot โดยใช้  $\beta$ -actin เป็น internal control

ผลการศึกษาซึ่งแสดงผลการทดลองในรูปที่ 4.8 พบว่าโปรตีน E6 As-variant สามารถ degrade โปรตีน p53 ได้อย่างชัดเจนในแถว 3 เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน E6-prototype ซึ่งแสดงในแถวที่ 4

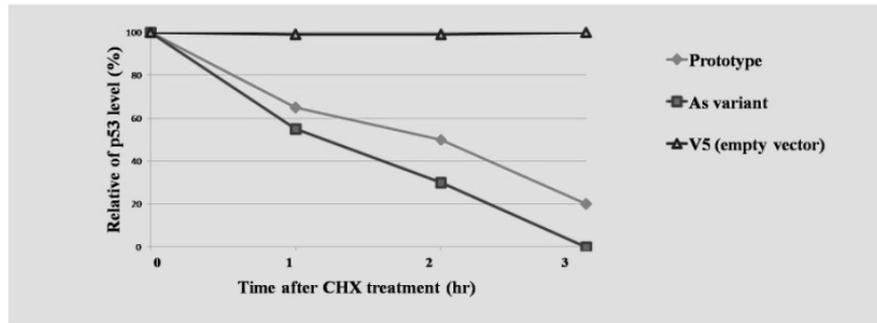
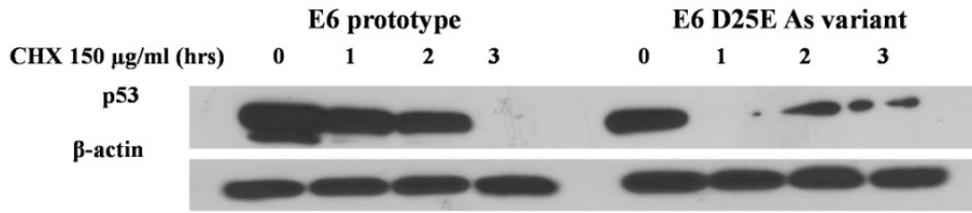


รูปที่ 4.13 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการ degrade โปรตีน p53 ของ recombinant expression vectors ที่สร้างขึ้น

- 1: คือโปรตีนจากเซลล์ C33A
- 2: โปรตีนจากเซลล์ C33A ที่ใส่ Lipofectamine 2000
- 3: คือ เซลล์ C33A ที่ถูก transfect ด้วย E6-As variant
- 4: คือ เซลล์ C33A ที่ถูก transfect ด้วย E6-prototype

#### 4.13 การทดสอบผลของ recombinant vectors ของ E6-prototype และ E6-As variant ต่อการลดครึ่งชีวิตของโปรตีน 53 (half life p53)

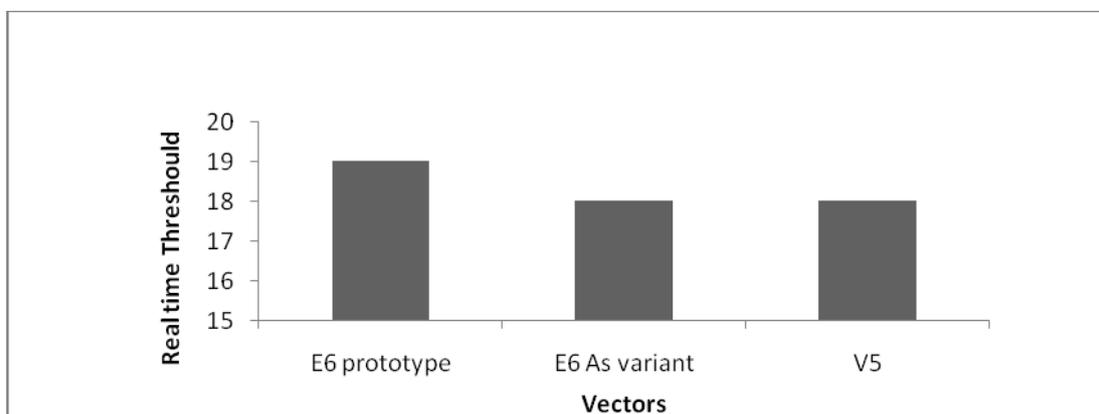
หลังจากทดสอบความสามารถของโปรตีน E6 prototype และ As variant ในการ degrade โปรตีน p53 แล้ว เพื่อยืนยันผลดังกล่าวอีกครั้ง ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบความสามารถในการลด half life ของโปรตีน p53 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.14 half life ของโปรตีน p53 จะลดลงอย่างชัดเจนในเซลล์ C33A ที่ถูก transfected ด้วย E6 As variant ภายใน 1 ชม. แต่สำหรับเซลล์ที่ถูก transfected ด้วย E6 prototype นั้น half life ของโปรตีน p53 ลดลงภายใน 3 ชม. ซึ่งซ้ำและใช้เวลานานโปรตีน E6 As variant



รูปที่ 4.14 แสดงผลการทดสอบความสามารถของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 ทั้งจาก prototype และ As variant

#### 4.14 การทดสอบคุณสมบัติของ recombinant vector ของ E6-prototype และ E6-As variants ของเชื้อ HPV16 ในการกระตุ้นเอนไซม์ telomerase

เพื่อที่จะศึกษาความสามารถในการกระตุ้นเอนไซม์ telomerase ของ recombinant vector ทั้งหมด ที่สร้างได้ จึงทำการตรวจหาเอนไซม์ telomerase ในเซลล์ C33A ที่ถูก transfect ด้วย recombinant vector แต่ละตัวด้วยวิธี SYBR Green real-time quantitative TRAP assay จากรูปที่ 4.15 จะเห็นได้ว่า ระดับของ telomerase activity ในแต่ละเซลล์ที่ทดสอบไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ control (transfected ด้วย vector เปล่า) หรือเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย recombinant E6 prototype และ recombinant E6 As variants โดยจะอยู่ระหว่าง 18-19

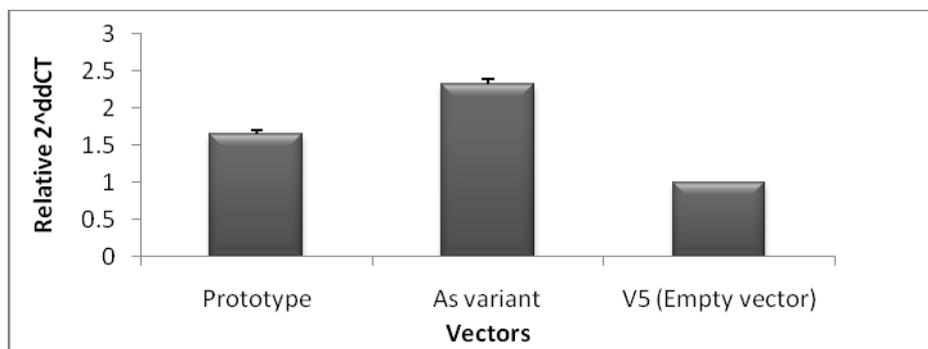


รูปที่ 4.15 แสดงผลการวัดเอนไซม์ telomerase activity ของโปรตีน E6 ทั้ง prototype และ As variant

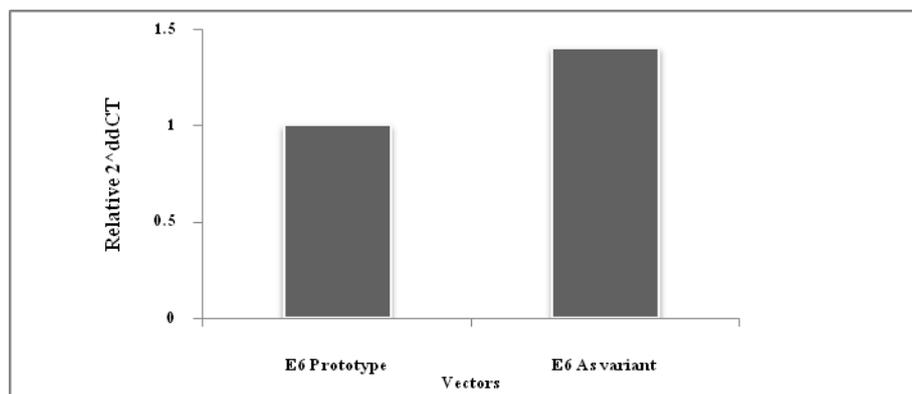
#### 4.15 การทดสอบความสามารถของโปรตีน E6 ในการชักนำการแสดงออกของ miR-21

เพื่อทดสอบคุณสมบัติในการเป็น oncoprotein ของโปรตีน E6 ซึ่งนอกจากจะความสามารถในการ degrade โปรตีน p53 และการกระตุ้น telomerase activity แล้วรวมทั้งโปรตีนของโฮสต์อีกหลายชนิดแล้ว ในการศึกษาครั้งยังพบว่าโปรตีน E6 สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ miR-21 โดยโปรตีน E6 ทั้งจาก prototype และ As variant โดยสามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ miR-21 ได้ 1.6 และ 2.3 เท่าเมื่อเทียบกับ vector เปล่า โดยที่โปรตีน E6 As variant นั้นสามารถชักนำให้มีการแสดงออกมากกว่า E6 prototype 1.4 เท่า ด้วย ดังรูปที่ 4.1.6

A.



B.



รูปที่ 4.16 แสดงความสามารถของโปรตีน E6 prototype และ As variant ในการชักนำการแสดงออกของ miR-21 โดยรูป A เปรียบเทียบระหว่างโปรตีน E6 ทั้ง 2 ตัว กับ vector เปล่า ส่วนรูป B เปรียบเทียบระหว่างโปรตีน E6 prototype กับ โปรตีน E6 As variant

## 5. อภิปรายผล/วิจารณ์ (Discussion/comment)

### การสร้าง E6 expression vector ของ HPV16 As variants และ HPV16 E6-prototype

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสร้าง E6 expression vectors ทั้งหมด 7 ตัวได้แก่ pcDNA3.2-E6Pro คือ พลาสมิดที่มีจีน E6 ของเชื้อ HPV16 ที่เป็น prototype และ pcDNA3.2E6-As-1.11, pcDNA3.2E6-As-1.21, pcDNA3.2E6-As-2.17, pcDNA3.2E6-As-2.19, pcDNA3.2E6-As-N18 และ pcDNA3.2E6-As-N19 คือ พลาสมิดที่มีจีน E6 ของเชื้อ HPV16 ที่ตรวจพบว่าเป็น As variant ซึ่งพบมากในกลุ่มตัวอย่างมะเร็งปากมดลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย [49] โดยมีลำดับของนิวคลีโอไทด์บนจีน E6 ที่ตำแหน่ง 178 มีการเปลี่ยนจาก T เป็น G ส่งผลให้กรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 25 มีการเปลี่ยนแปลงจาก Aspartic acid (D) ไปเป็น Glutamic acid (E) หลังจากทำการ ligase ขึ้น insert หรือ จีน E6 เข้าไปในพลาสมิด pcDNA3.2 แล้วคัดเลือกโคลนด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ Ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยได้ทั้งหมด 7 โคลนจากตัวอย่างทั้งหมด 7 ตัวอย่าง แล้วนำไปทดสอบโคลนที่ได้ด้วยการทำ PCR ตรวจหาจีน E6 และต่อจากนั้นนำไปตัดด้วย restriction enzyme และส่ง sequence พบว่าในทั้งหมด 7 โคลนนั้น มีเพียง 3 โคลน เท่านั้น ที่เมื่อถูกตัดด้วย restriction enzyme แล้วให้ขนาดตรงตามที่กำหนด และมีลำดับเบสที่ตรงกับจีน E6 ของเชื้อ HPV16 ที่ต้องการ ได้แก่ pcDNA3.2E6-Pro, pcDNA3.2E6-As-1.21 และ pcDNA3.2E6-As-N18 แต่เนื่องจากว่า pcDNA3.2E6-As-1.21 และ pcDNA3.2E6-As-N18 นั้น เป็นจีน E6 ที่เป็น As variants และมีลำดับเบสที่เหมือนกัน โดยต่างกันเพียงชนิดของตัวอย่างที่นำมาสกัด DNA โดย pcDNA3.2E6-As-1.21 มาจากตัวอย่างที่เป็น formalin-fixed paraffin embedded tissue ที่อยู่ในกลุ่ม squamous cell carcinoma ส่วน pcDNA3.2E6-As-N18 มาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่เป็น cervical cancer จากนั้นนำ recombinant E6 expression vector ที่สร้างได้นี้ ไปทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน E6 ต่อไป

การศึกษาหน้าที่และการทำงานของโปรตีน E6 นั้น เริ่มแรกต้องสร้างและผลิตโปรตีน E6 ออกมาให้ได้ก่อน โดยนำจีน E6 ไปตัดต่อเข้าสู่ expression vector และเพื่อให้แน่ใจว่า E6 expression vector ที่สร้างขึ้นนั้นมีความสามารถในการแสดงออกของโปรตีน E6 ได้จริง ต้องนำไปตรวจหาโปรตีน E6 ด้วยวิธี western blot analysis แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า ในการตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 นั้น ค่อนข้างยากเนื่องจากโปรตีนชนิดนี้มีขนาดเล็ก (17-18 kDa) และยังมีการแสดงออกอยู่ในระดับต่ำๆ อีกด้วย [50] โดยในบางการศึกษาก็จะตรวจหา mRNA ของจีน E6 เท่านั้น [39, 51] แต่ก็มีอีกหลายการศึกษาที่พยายามตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน E6 โดยทำการสร้าง expression vector ที่มีจีน E6 ติดกับ tag ต่างๆ เช่น สร้าง E6 recombinant ให้เชื่อมกับ glutathione S-transferase; GST (GST-E6

fusion) [52]หรือ maltose-binding protein; MBP (MBP-E6) [53] ซึ่งเมื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีน E6 ที่เชื่อมกับโปรตีนเหล่านี้ ใน *E.coli* พบว่า โปรตีน E6 มีการแสดงออก แบบ over expression และอยู่ในรูป soluble ด้วย โดยโปรตีน E6 ที่แสดงออกเหล่านี้สามารถนำไปศึกษาหน้าที่และการทำงานอื่นๆ ได้ดีด้วย [54] รวมทั้งการเชื่อมด้วย hemagglutinin (HA) ในการศึกษาของ Elbel M และคณะ ศึกษาความสามารถของโปรตีน E6 โดยสร้าง E6 expression vector โดยที่ E6 เชื่อมต่อกับ HA ซึ่งจะทำให้โปรตีน E6 มีขนาดใหญ่ขึ้นประมาณ 22 kDa และผู้วิจัยตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน E6 โดยตรวจสอบโปรตีน HA ซึ่งเชื่อมกับโปรตีน E6 ทางด้าน C-terminal แทน [55, 56] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Jang M และคณะที่เชื่อมโปรตีน E6 กับ GFP แล้วดูการแสดงออกของโปรตีน E6 โดยดูการเรืองแสงผ่านกล้อง Fluorescent microscope [57] ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบเพื่อยืนยันว่าเวกเตอร์ที่สร้างขึ้นมานี้มีจีน E6 ที่ต้องการเมื่อตัดด้วย restriction enzyme ที่จำเพาะแล้ว พบว่าให้ผลตรงตามที่ควรจะเป็น และมีลำดับเบสที่ถูกต้องเมื่อเปรียบเทียบกับ DNA ต้นแบบ

### การศึกษาคุณสมบัติโปรตีน E6 ของ HPV16 As variants และ HPV16 E6-prototype ใน E6 recombinant expression vectors ที่สร้างขึ้น

สำหรับการทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน E6 ที่สร้างขึ้นมานั้น เริ่มแรกทำการทดสอบว่า recombinant E6 expression vectors ทุกตัว สามารถถูก transfected เข้าไปในเซลล์ C33A ซึ่งจะใช้ในการศึกษาได้หรือไม่ โดยใช้ วิธี transfection ด้วย Lipofectamine 2000 จากนั้นสกัด RNA แล้วตรวจหาจีน E6 ด้วยวิธี real time PCR ซึ่งแสดงผลการทดสอบในรูปแบบที่ 4.8 และจากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า E6 expression vectors ทุกตัว สามารถ transfected เข้าไปในเซลล์ C33A และสามารถถูก transcript ออกมาเป็น RNA ได้ เนื่องจากสามารถตรวจพบ จีน E6 จากการทำ RT-Real time PCR ได้

การศึกษการตรวจหาโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 ในหลายๆ งานวิจัยก่อนหน้านี้ บอกไว้ว่า โปรตีน E6 มีคุณสมบัติเป็นทั้ง soluble และ insoluble protein ที่พบอยู่ในทั้งนิวเคลียส ไซโตพลาสซึม และmembrane fraction โดยจะพบในนิวเคลียส เป็นส่วนใหญ่ ลักษณะที่สำคัญอีกอย่างของโปรตีน E6 คือจะมีการแสดงออกในระดับต่างๆ จนไม่สามารถตรวจเจอได้ด้วยวิธี western blot ซึ่งในการศึกษครั้งนี้ ผู้วิจัยเองก็พบปัญหาเช่นกัน คือ ไม่สามารถตรวจหาโปรตีน E6 ในเซลล์ C33A ที่ถูก transfected ด้วย recombinant E6 expression vectors ได้ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากว่าทางผู้วิจัยพบว่า recombinant E6 expression vectors หลังจากที่ถูก transfected เข้าไปในเซลล์ C33A แล้ว สามารถที่จะถูก transcript ออกมาเป็น mRNAได้ จากการทดสอบด้วยวิธี RT-real time PCR คาดว่า E6 expression vectors ทั้งหมดนี้สามารถที่จะสร้างโปรตีน E6 ออกมาได้ จึงนำไปศึกษาคุณสมบัติใน interaction โดยในการศึกษานี้ทางผู้วิจัยทำการศึกษาความสามารถในการจับกัน

ระหว่างโปรตีน E6 และโปรตีน E6AP (E6 association protein) จริงๆแล้ว โปรตีน E6 มีความสามารถในการจับกับ cellular protein ได้หลายตัว แต่เนื่องจากว่าคุณสมบัติหลักในการเป็น oncoprotein ของโปรตีน E6 คือ สามารถ degrade โปรตีน p53 ซึ่งเป็น tumor suppressor ได้ แต่โปรตีน E6 จะต้องจับกับโปรตีน E6AP ก่อน ถึงจะสามารถไป degrade โปรตีน p53 ได้ ก่อนหน้านั้นมีการศึกษาหน้าที่และการทำงานของโปรตีน E6 โดยทดสอบความสามารถในการ degrade โปรตีนอื่น ๆ ในการศึกษาของ [58] ทดสอบความสามารถของโปรตีน E6 ในการ degrade Dlg โดยไม่โปรตีน E6 ไม่ผ่านการจับกับโปรตีน E6AP นอกจากนี้ในการศึกษาของ Jang M และคณะ ซึ่งทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน E6 โดยการ transfected E6 recombinant expression vector เข้าไปในเซลล์ C33A จากนั้นวัดการแสดงออกของจีน survival เนื่องจากจีนเป็นโปรตีนอีกตัวที่เป็นเป้าหมายของโปรตีน E6 ด้วยวิธี RT-PCR [57]

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกโปรตีนตัวนี้มาทำการศึกษาความสามารถในการ interaction ของ โปรตีน E6 โดยใช้วิธี immunoprecipitation assay และในการศึกษานี้เองทำให้ผู้วิจัยสามารถตรวจพบโปรตีน E6 ได้ ดังรูปที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่าโปรตีน E6 ที่ถูกสร้างออกมาหลังจากการ transfection เข้าไปในเซลล์ C33A มีการแสดงออกที่ต่ำมาก จนไม่สามารถตรวจพบได้จากวิธี western blot แต่สามารถตรวจเจอได้จากวิธี immunoprecipitation assay อาจเนื่องมาจากวิธีนี้ในหลักการ antigen-antibodies complex ซึ่งผู้วิจัยเติม anti-E6 antibodies เพื่อที่จะให้ไปจับกับโปรตีน E6 ที่แสดงออกใน transfected cell โดยที่โปรตีน E6 นั้นจะจับอยู่กับโปรตีน E6AP แล้วนำไปตรวจหาโปรตีน E6AP และโปรตีน E6 ด้วยวิธี western blot analysis

#### **การศึกษาบทบาทของ E6 oncoprotein ของ HPV16 As variants ที่สัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง**

การ degrade โปรตีน p53 และการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ telomerase เป็นหน้าที่ที่สำคัญและเด่นชัดของโปรตีน E6 ในการทำให้เซลล์มีความผิดปกติและพัฒนาเกิดเป็นมะเร็ง ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบความสามารถของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16Pro และ HPV16As variant ในการ degrade โปรตีน p53 ในเซลล์ C33A โดยทำการ transfect พลาสมิด pcDNA3.2E6Pro และ pcDNA3.2E6As เข้าไปในเซลล์ C33A ซึ่งเป็น HPV negative cervical carcinomas cell line ซึ่งเซลล์นี้จะมีโปรตีน p53 ที่เกิดการ mutation ในตำแหน่งที่ 273 กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Arg (R) เป็น Cys (C) [59] แล้วตรวจดูความสามารถของโปรตีน E6 แต่ละตัวในการ degrade โปรตีน p53 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า โปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant มีความสามารถในการ degrade โปรตีน p53 ได้ดีกว่าโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 Prototype อย่างชัดเจน แสดงในรูปที่ 4.13 โดยตำแหน่งที่เกิด variation ของโปรตีน E6 ของ HPV16 As variant นั้น น่าจะมีผลต่อการ degrade โปรตีน p53 ซึ่งผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน

การศึกษาของ Jang M และคณะ ทดสอบหา gene expression profile ในเซลล์ C33A ที่ถูก transfected ด้วย E6 D25E พบว่ามีจีนที่ down regulation คือ จีน RPL23 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ cell cycle และ apoptosis โดย RPL23 จะช่วยให้โปรตีน p53 stabilize ป้องกันไม่ให้ p53 เกิดการ degrade ทำให้ cell cycle เข้าสู่ G1-S checkpoint และหรือเกิดการ apoptosis เมื่อจีน RPL23 มีการแสดงออกลดลง มีผลต่อการสังเคราะห์ DNA และการยับยั้งการเกิด apoptosis ผ่านทาง p53 pathway [57] นอกจากนี้ในการศึกษาของ Mesplède T และคณะ ทำการเปรียบเทียบความสามารถของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV ทั้งหมด 29 ชนิด และเปรียบเทียบระหว่าง prototype กับ variant ของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 และ HPV33 ต่อการ degrade โปรตีน p53 โดยวัดเอนไซม์ *Renilla luciferase* (RLuc-p53) ผลการศึกษาพบความแตกต่างในการ degrade โปรตีน p53 ระหว่างเชื้อ HPV ชนิดต่างๆ ชัดเจนมากกว่าการเปรียบเทียบระหว่าง prototype กับ variant โดย E6 ของเชื้อ HPV16 ทั้ง prototype และ variant มีความสามารถ degrade โปรตีน p53 ได้ไม่แตกต่างกัน แต่ในเชื้อ HPV33 พบว่า E6 variant สามารถ degrade โปรตีน p53 ได้ดีกว่า E6 prototype อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งตำแหน่งของจีน E6 ของเชื้อ HPV16 ที่เปลี่ยนแปลงไปคือ R10G และ L83V เป็นคนละตำแหน่งกับจีน E6 As variant (D25E) ที่ใช้ศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่า E6 As variant ซึ่งมีกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไปนั้น มีผลต่อการ degrade โปรตีน p53 [60] นอกจากนี้ยังมีอีกหลายการศึกษาที่เปรียบเทียบความสามารถของโปรตีน E6 ที่มาจากเชื้อ HPV ที่ต่างชนิดกัน ในการ degrade โปรตีน p53 [61, 62]

การทดสอบความสามารถในการกระตุ้น Telomerase activities ของโปรตีน E6 prototype และ E6 As variant ในเซลล์ C33A จะเห็นได้ว่าไม่พบความแตกต่างระหว่างโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในเซลล์ C33A ที่ใช้ในการทดลองมีคุณสมบัติไม่เหมาะสมเนื่องจากเซลล์นี้เป็นเซลล์มะเร็งอยู่แล้ว และโดยส่วนใหญ่จะศึกษาใน human foreskin keratinocyte เพื่อทดสอบการกระตุ้นเอนไซม์ telomerase ที่เพิ่มขึ้น [63, 64] นอกจากนี้จะศึกษาความสามารถในการ degrade โปรตีน p53 แล้ว ยังมีการศึกษาความสามารถของโปรตีน E6 ในการ degrade โปรตีนของโฮสต์ตัวอื่นๆด้วยเช่น ในการศึกษาของ Nakagawa S และคณะ ทดสอบความสามารถของโปรตีน E6 หลังจากที่จับกับ E6AP แล้วนอกจากจะ degrade โปรตีน p53 แล้ว ยังสามารถจับและ degrade โปรตีน hScrib ซึ่งเป็น tumor suppressor protein เหมือนกัน [65] แต่จะแตกต่างจากการศึกษาของ Thomas M และคณะที่พบว่า โปรตีน E6 สามารถ degrade โปรตีน MAGI-1 [66]

อย่างไรก็ตาม เพื่อให้เห็นความสามารถของโปรตีน E6 As variant ที่ชัดเจนเพิ่มขึ้น ผู้วิจัยจึงทดสอบหาค่า ครึ่งชีวิต (Half life) ของโปรตีน p53 ในเซลล์ C33A โดยใช้ cycloheximide (CHX) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน แล้วเปรียบเทียบระหว่างโปรตีน E6 prototype และ As variant ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นครึ่งชีวิตของโปรตีน p53 ลดลง ภายใน 1 ชม. ในเซลล์ที่ถูก transfected ด้วย E6 prototype และ E6

As variant แต่ในเซลล์ที่มี E6 As variant พบว่าครึ่งชีวิตของ p53 ลดลงมากกว่า แต่ผลการศึกษาของ Fu Leiping และคณะ แสดงผลการทดลองหาครึ่งชีวิตของโปรตีน p53 ในเซลล์ 293T ที่ co-transfected ระหว่าง E6 expression vector (HPV11, 61,18, 53 และ 56) และ p53 expression vector พบว่าครึ่งชีวิตของโปรตีน p53 นั้นลดลงเหลือประมาณ 30 นาที ในเซลล์ที่มี E6 expression vectors ของ HPV18, 53 และ 56 [62] ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะต่างจากผลของผู้วิจัยศึกษา ส่วนหนึ่งอาจมาจากการออกแบบการทดลองรวมทั้งชนิดของเซลล์ที่ในการศึกษา แต่อย่างไรก็ตามสามารถสรุปผลการศึกษานี้ได้ว่าโปรตีน E6 As variant สามารถลดระดับการแสดงออกของโปรตีน p53 ได้โดยผ่านทาง post-translation

ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับ micro RNAs (miRNAs) กันอย่างกว้างขวาง miRNAs เป็น noncoding regulatory RNAs มีขนาด 18-25 nucleotide มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของจีนต่างๆของโฮสต์ โดยกลไกของมันจะไปจับกับ mRNA เป้าหมาย แล้วยับยั้งหรือ degrade การ translation ของโปรตีนนั้นจะขึ้นกับระดับในการจับ (complementary) กันระหว่าง miRNA กับ mRNA ของจีนเป้าหมาย [67] โปรตีน E6 เป็นอีกตัวหนึ่งที่มีการศึกษากันมาก โดยจะพบว่าโปรตีน E6 นั้นสามารถไปเพิ่มการแสดงออกและไปลดการแสดงออกของ miRNA ได้ ในการศึกษาของ Yeung A และคณะศึกษาแสดงให้เห็นว่า โปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 สามารถลดการแสดงออกของ miR-23b ได้ ส่งผลให้เพิ่มการแสดงออกของ uPA และชักนำให้เพิ่มการ migration ของเซลล์ SiHA และ Caski เนื่องจาก uPA เป็นเป้าหมายหนึ่งของ miR-23b และโปรตีน p53 จะถูก inactivated จากโปรตีน E6 ซึ่งบริเวณ consensus p53 binding site นั้นเป็นตำแหน่ง promoter region ของ miR-23b เป็นไปได้ว่าเมื่อโปรตีน E6 ไป inactivated โปรตีน p53 มีผลให้ โปรตีน p53 จับกับ promoter ของ miR-23b ได้ลดลง ดังนั้นโปรตีน p53 เป็นตัวเชื่อมให้โปรตีน E6 ไป downregulation miR-23b [68] และในการศึกษาของ Wang X และคณะแสดงให้เห็นว่า cervical cancer tissue และเซลล์ที่มีเชื้อ HPV พบว่า miR-34a มีการแสดงออกลดลง เมื่อ knockdown จีน E6 ออกไป พบการเพิ่มขึ้นของทั้ง โปรตีน p53 และ miR-34a นอกจากนี้ยังพบการสะสมของ miR-34a ในระยะ G(0)/G(1) อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่ามีการลดลงของ p18In4c ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ INK4 family ของ CDK4 และ CDK6 inhibitors ทำหน้าที่เป็น tumor suppressor ป้องกัน cell cycle progression จาก G1ไปยัง S phase ในการศึกษาแสดงนี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16, โปรตีน p53, miR-34a และ p18Ink4c และ plnk4c อาจนำไปใช้เป็น biomarker สำหรับมะเร็งปากมดลูกได้ [69, 70] เหมือนกับการศึกษาของ Martinez l และคณะ พบว่าโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 สามารถลดการแสดงออกของ miR-218 ใน HPV-positive cell lines รวมทั้ง cervical lesion และ cancer tissue ที่มี HPV16 DNA อยู่ [71] ในการศึกษาของผู้วิจัยเองพบว่าโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 ทั้งที่เป็น prototype และ As variant สามารถชักนำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ miR-21 ได้อย่างมีนัยสำคัญ และโปรตีน E6 As variant สามารถ

ชักนำให้มีการแสดงออกของ miR-21 สูงกว่า โปรตีน E6 prototype และในการทดสอบความสามารถในการ degradation โปรตีน p53 พบว่าโปรตีน E6 As variant สามารถ degrade โปรตีน p53 ได้ดีกว่าโปรตีน E6 prototype อาจมีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการชักนำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ miR-21 ก็ได้ เพราะโปรตีนเป้าหมายของ miR-21 ได้แก่ ส่วนใหญ่แล้วจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ การพัฒนาไปเป็นมะเร็ง เช่น กลุ่มที่เป็น tumor suppressor, anti-apoptosis, cell cycle progression โปรตีนเหล่านี้ได้แก่ PDCD4 [45], PTEN [46], Bcl2 และ Cdc2 [48] เมื่อ miR-21 ถูกชักนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น มีผลไปยับยั้งการแสดงออกของ PTEN ซึ่งทำให้การทำงานของ Akt pathway เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง Akt pathway เป็น pathway ที่สำคัญของ เซลล์ในการเกิด cell proliferation, cell differentiation, survival [72, 73] เพราะฉะนั้นมีผลให้โปรตีนต่างๆใน pathway นี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น รวมทั้ง Mdm2 ซึ่งเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของโปรตีน p53 ในเซลล์ปกติ ทำให้โปรตีน p53 ที่อยู่ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 As variant ถูก degrade ได้ทั้งจากโปรตีน E6 As variant และจาก Mdm2 ด้วย ทำให้เซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV16 E6 As variant สามารถ degrade โปรตีน p53 ได้เร็วกว่าเซลล์ที่มีการติดเชื้อ HPV16 E6 Prototype สอดคล้องกับผลการทดสอบหา half life ของโปรตีน p53 ซึ่งพบว่า HPV16 E6 As variant มีผลทำให้ half life ของโปรตีน p53 ลดลง ภายใน 30 นาที นอกจากนี้ยังทำให้เซลล์ที่ผิดปกติมีการตายลดลงและส่งเสริมให้เซลล์ที่ติดเชื้อนี้มีการเพิ่มจำนวนอีกด้วย

## 6. สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ (Conclusion/suggestion)

การศึกษาคั้งนี้ผู้วิจัยสามารถสร้าง E6 recombinant expression vectors ได้ 3 ชนิด ได้แก่ pcDNA3.2E6-prototype, pcDNA3.2E6-As variant (1.21) และ pcDNA3.2E6-As variant (N18) แต่เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทน์ของ pcDNA3.2E6-As variant (1.21) ซึ่งได้มาจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ paraffin fix formalin embedded tissue ที่เป็น SCC และ pcDNA3.2E6-As variant (N18) ได้มาจาก fresh biopsy tissue ที่เป็น SCC นั้นเหมือนกัน ผู้วิจัยเลือก pcDNA3.2E6-As variant (N18) มาใช้ในการศึกษาต่อไป เนื่องจากให้ผลการตัดด้วย restriction enzyme *NdeI* ที่ชัดเจนคือ พบชิ้นส่วน (fragment) ของเวกเตอร์ที่ถูกตัดจำนวน 2 ชิ้น และเวกเตอร์ที่สามารถสร้างขึ้นมานี้ มีคุณสมบัติที่สามารถที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป เพราะมีคุณสมบัติในการจับกับโปรตีน E6AP ได้ และในการทดลองเดียวกันนี้สามารถตรวจพบการแสดงออกของโปรตีน E6 จากทั้ง prototype และ As variant ด้วย

การศึกษาคั้งนี้ผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของเชื้อ HPV16 As variant E6 ในการมีคุณสมบัติเป็น oncogenicity มากกว่า HPV16 prototype E6 เนื่องจากโปรตีน E6-As variant มีคุณสมบัติในการ degrade โปรตีน p53 ได้ดีกว่าโปรตีน E6-prototype อย่างชัดเจน รวมทั้งยังมีผลต่อ half life ของโปรตีน p53 โดยทำให้ half life ลดลงภายใน 1 ชม. ซึ่งเร็วกว่าโปรตีน E6-prototype เช่นกัน นอกจากนี้ยังเป็นครั้งแรกที่การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 ในการชักนำให้มีการแสดงออกของ miR-21 เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน E6-As variant สามารถชักนำ miR-21 ให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากกว่าโปรตีน E6-prototype อีกด้วย

จากผลการศึกษาในคั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการที่ตรวจพบ เชื้อ HPV16 As variant ในตัวอย่างที่เป็นปากมดลูกพบว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงอีกอย่างหนึ่งต่อการพัฒนาไปเป็นมะเร็ง เนื่องจากเชื้อ HPV16 As variant มีความสามารถในการ degrade โปรตีน p53 ได้ดี และน่าจะเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ miR-21 ที่เพิ่มขึ้น ด้วย โดยอาจมีผลต่อโปรตีนเป้าหมายของ miR-21 เช่น PTEN, PDCD4 แล้วทำให้เซลล์ผิดปกติมีการเพิ่มจำนวนและยังไปยับยั้งการเกิด apoptosis ของเซลล์ ที่ถูกติดเชื้อ HPV16 As variant ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ HR-HPV แบบยืดเยื้อและเกี่ยวข้องกับการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกในที่สุด

## บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer. **127**(12): p. 2893-917.
2. Kimman, M., et al., *The burden of cancer in member countries of the Association of Southeast Asian Nations (ASEAN)*. Asian Pac J Cancer Prev. **13**(2): p. 411-20.
3. Burd, E.M., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(1): p. 1-17.
4. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
5. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 362-72.
6. Hebner, C.M. and L.A. Laimins, *Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity*. Rev Med Virol, 2006. **16**(2): p. 83-97.
7. Clifford, G.M., et al., *Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis*. Br J Cancer, 2003. **88**(1): p. 63-73.
8. Pientong, C., et al., *Immunocytochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human papillomavirus infection*. Diagn Cytopathol, 2004. **31**(4): p. 235-42.
9. Moscicki, A.B., et al., *Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females*. Jama, 2001. **285**(23): p. 2995-3002.
10. Nash, J.D., T.W. Burke, and W.J. Hoskins, *Biologic course of cervical human papillomavirus infection*. Obstet Gynecol, 1987. **69**(2): p. 160-2.
11. Schlecht, N.F., et al., *Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(17): p. 1336-43.
12. Yamada, T., et al., *Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 2463-72.
13. Zehbe, I., et al., *Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype*. Cancer Res, 1998. **58**(4): p. 829-33.
14. Berumen, J., et al., *Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(17): p. 1325-30.
15. del Refugio Gonzalez-Losa, M., et al., *Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer*. J Clin Virol, 2004. **29**(2): p. 95-8.
16. Radhakrishna Pillai, M., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations in Indian cervical cancer*. Gynecol Oncol, 2002. **87**(3): p. 268-73.
17. Tornesello, M.L., et al., *Analysis of human papillomavirus type-16 variants in Italian women with cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer*. J Med Virol, 2004. **74**(1): p. 117-26.
18. Grodzki, M., et al., *Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(4): p. 820-2.
19. Zuna, R.E., et al., *Association of HPV16 E6 variants with diagnostic severity in cervical cytology samples of 354 women in a US population*. Int J Cancer, 2009. **125**(11): p. 2609-13.
20. Xi, L.F., et al., *Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(1): p. 4-10.
21. KrennHrubic, K., et al., *HPV types and variants among cervical cancer tumors in three regions of Tunisia*. J Med Virol. **83**(4): p. 651-7.

22. Shang, Q., et al., *Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 [corrected] genes and long control region in [corrected] cervical carcinomas in patients in northeast China*. J Clin Microbiol. **49**(7): p. 2656-63.
23. Hu, Y., et al., *Human papillomavirus type 16 e6 gene variations in young Chinese women with cervical squamous cell carcinoma*. Reprod Sci. **18**(4): p. 406-12.
24. de Boer, M.A., et al., *Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and The Netherlands*. Gynecol Oncol, 2004. **94**(2): p. 488-94.
25. Kang, S., et al., *Polymorphism in the E6 gene of human papillomavirus type 16 in the cervical tissues of Korean women*. Int J Gynecol Cancer, 2005. **15**(1): p. 107-12.
26. Zuna, R.E., et al., *HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer*. Infect Agent Cancer. **6**: p. 19.
27. Oliveira, L.H., et al., *Identification of human papillomavirus type 53 L1, E6 and E7 variants in isolates from Brazilian women*. Infect Genet Evol. **12**(1): p. 71-6.
28. Liu, J.H., et al., *Variations of human papillomavirus type 58 E6, E7, L1 genes and long control region in strains from women with cervical lesions in Liaoning province, China*. Infect Genet Evol. **12**(7): p. 1466-1472.
29. Ding, T., et al., *Distribution of human papillomavirus 58 and 52 E6/E7 variants in cervical neoplasia in Chinese women*. Gynecol Oncol. **119**(3): p. 436-43.
30. Cento, V., et al., *Intratype variations of HPV 31 and 58 in Italian women with abnormal cervical cytology*. J Med Virol. **83**(10): p. 1752-61.
31. Combrinck, C.E., et al., *Novel HPV-6 variants of human papillomavirus causing recurrent respiratory papillomatosis in southern Africa*. Epidemiol Infect. **140**(6): p. 1095-101.
32. Crook, T., J.A. Tidy, and K.H. Vousden, *Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation*. Cell, 1991. **67**(3): p. 547-56.
33. Kast, W.M., et al., *Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins*. J Immunol, 1994. **152**(8): p. 3904-12.
34. Chakrabarti, O., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5934-45.
35. Ellis, J.R., et al., *The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer*. Nat Med, 1995. **1**(5): p. 464-70.
36. Qiu, A.D., et al., *HPV prevalence, E6 sequence variation and physical state of HPV16 isolates from patients with cervical cancer in Sichuan, China*. Gynecol Oncol, 2007. **104**(1): p. 77-85.
37. Lichtig, H., et al., *HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6*. Virology, 2006. **350**(1): p. 216-27.
38. Asadurian, Y., et al., *Activities of human papillomavirus 16 E6 natural variants in human keratinocytes*. J Med Virol, 2007. **79**(11): p. 1751-60.
39. Zehbe, I., et al., *Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis*. Virology, 2009. **383**(1): p. 69-77.
40. Richard, C., et al., *The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer*. Oncogene. **29**(23): p. 3435-45.
41. Lynam-Lennon, N., S.G. Maher, and J.V. Reynolds, *The roles of microRNA in cancer and apoptosis*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2009. **84**(1): p. 55-71.
42. Hwang, H.W. and J.T. Mendell, *MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis*. Br J Cancer, 2006. **94**(6): p. 776-80.

43. Li, S., et al., *MicroRNA-21: a ubiquitously expressed pro-survival factor in cancer and other diseases*. Mol Cell Biochem. **360**(1-2): p. 147-58.
44. Ribas, J. and S.E. Lupold, *The transcriptional regulation of miR-21, its multiple transcripts, and their implication in prostate cancer*. Cell Cycle. **9**(5): p. 923-929.
45. O'Neill, L.A., F.J. Sheedy, and C.E. McCoy, *MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol. **11**(3): p. 163-75.
46. Wickramasinghe, N.S., et al., *Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(8): p. 2584-95.
47. Meng, F., et al., *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer*. Gastroenterology, 2007. **133**(2): p. 647-58.
48. Jazbutyte, V. and T. Thum, *MicroRNA-21: from cancer to cardiovascular disease*. Curr Drug Targets. **11**(8): p. 926-35.
49. Chopjitt, P., et al., *Prevalence of human papillomavirus type 16 and its variants in abnormal squamous cervical cells in Northeast Thailand*. Int J Infect Dis, 2009. **13**(2): p. 212-9.
50. Garcia-Alai, M.M., et al., *High-risk HPV E6 oncoproteins assemble into large oligomers that allow localization of endogenous species in prototypic HPV-transformed cell lines*. Biochemistry, 2007. **46**(2): p. 341-9.
51. Zehbe, I., et al., *Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential*. Mol Cancer. **10**: p. 77.
52. Lipari, F., et al., *Purification and biophysical characterization of a minimal functional domain and of an N-terminal Zn<sup>2+</sup>-binding fragment from the human papillomavirus type 16 E6 protein*. Biochemistry, 2001. **40**(5): p. 1196-204.
53. Nomine, Y., et al., *Domain substructure of HPV E6 oncoprotein: biophysical characterization of the E6 C-terminal DNA-binding domain*. Biochemistry, 2003. **42**(17): p. 4909-17.
54. Nomine, Y., et al., *Formation of soluble inclusion bodies by hpv e6 oncoprotein fused to maltose-binding protein*. Protein Expr Purif, 2001. **23**(1): p. 22-32.
55. Elbel, M., et al., *A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential*. Virology, 1997. **239**(1): p. 132-49.
56. Pim, D., V. Tomaic, and L. Banks, *The human papillomavirus (HPV) E6\* proteins from high-risk, mucosal HPVs can direct degradation of cellular proteins in the absence of full-length E6 protein*. J Virol, 2009. **83**(19): p. 9863-74.
57. Jang, M., et al., *Gene expression profiles are altered in human papillomavirus-16 E6 D25E-expressing cell lines*. Virol J. **8**: p. 453.
58. Pim, D., et al., *HPV E6 targeted degradation of the discs large protein: evidence for the involvement of a novel ubiquitin ligase*. Oncogene, 2000. **19**(6): p. 719-25.
59. Scheffner, M., et al., *Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 5100-5.
60. Mesplede, T., et al., *p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes*. J Virol. **86**(1): p. 94-107.
61. Hiller, T., et al., *Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(7): p. 1262-7.
62. Fu, L., et al., *Degradation of p53 by human Alphapapillomavirus E6 proteins shows a stronger correlation with phylogeny than oncogenicity*. PLoS One. **5**(9).

63. Katzenellenbogen, R.A., et al., *Cytoplasmic poly(A) binding proteins regulate telomerase activity and cell growth in human papillomavirus type 16 E6-expressing keratinocytes*. J Virol. **84**(24): p. 12934-44.
64. Klingelutz, A.J., S.A. Foster, and J.K. McDougall, *Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16*. Nature, 1996. **380**(6569): p. 79-82.
65. Nakagawa, S. and J.M. Huibregtse, *Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(21): p. 8244-53.
66. Thomas, M., et al., *HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation*. Oncogene, 2001. **20**(39): p. 5431-9.
67. Hermeking, H., *The miR-34 family in cancer and apoptosis*. Cell Death Differ. **17**(2): p. 193-9.
68. Au Yeung, C.L., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway*. Oncogene. **30**(21): p. 2401-10.
69. Wang, X., et al., *Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6*. Rna, 2009. **15**(4): p. 637-47.
70. Wang, X., et al., *Upregulation of p18Ink4c expression by oncogenic HPV E6 via p53-miR-34a pathway*. Int J Cancer. **129**(6): p. 1362-72.
71. Martinez, I., et al., *Human papillomavirus type 16 reduces the expression of microRNA-218 in cervical carcinoma cells*. Oncogene, 2008. **27**(18): p. 2575-82.
72. Patel, H., et al., *Activation of AKT and nuclear accumulation of wild type TP53 and MDM2 in anal squamous cell carcinoma*. Int J Cancer, 2007. **121**(12): p. 2668-73.
73. Chen, X., et al., *Human papillomavirus seropositivity synergizes with MDM2 variants to increase the risk of oral squamous cell carcinoma*. Cancer Res. **70**(18): p. 7199-208.