

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480055

ชื่อโครงการ: (Thai) บทบาทของดีเอ็นเอเมธิลเลชันต่อการแสดงออกของ
แทบพาคินระหว่างการพัฒนาโรคมะเร็งปากมดลูก

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน ผศ.ดร.สุรศักดิ์ แว่นรัมย์
วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

อีเมล: Surasak.w@ubu.ac.th, Mdsurawa@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ:

แรงบันดาลใจ : ดีเอ็นเอเมธิลเลชันแสดงบทบาทสำคัญประการหนึ่งในกระบวนการเกิดของ
มะเร็ง ด้วยการปรับแต่งแบบเหนือพันธุกรรมและการเติมหมู่เมธิลที่จีนตรงตำแหน่งโปรโมเตอร์
ไม่ให้แสดงออกได้ ซึ่งมักเป็นเหตุการณ์สำคัญที่เกิดขึ้นได้ในมะเร็งหลายชนิดของมนุษย์ โดยมี
ศักยภาพสำคัญต่อการทำให้จีนต้านมะเร็งไม่สามารถทำงานได้ปกติ อย่างไรก็ตามบทบาทและ
กลไกในการควบคุมเซลล์มะเร็งในระดับเหนือพันธุกรรมผ่านจีนที่ควบคุมภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ยัง
มีการศึกษาน้อยอยู่

ปัญหาการวิจัย : มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งของสตรีเพศที่พบบ่อยเป็นอันดับสองทั่วโลก
กระบวนการเกิดหลากหลายขั้นตอนมีความสัมพันธ์ต่อการลดการควบคุมของจีนต้านมะเร็ง
โปรตีน p53 และ Rb โดยผ่านปัจจัยต้านตัวเชื้อ E6 และ E7 ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด
เซลล์มะเร็งในโรคมะเร็งปากมดลูก นอกจากนี้ปัจจัยการลดการแสดงออกของเอ็มเอชซี คลาส I
ที่สัมพันธ์กับความผิดปกติของจีนองค์ประกอบของการนำเสนอแอนติเจนต่อเอ็มเอชซีคลาส I
ถือเป็นหลักฐานสำคัญต่อการหลบหลีกการทำลายของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม
กลไกที่แน่ชัดยังไม่เป็นที่กระจ่าง ผู้วิจัยมีสมมุติฐานความผิดปกติของดีเอ็นเอเมธิลเลชัน
โดยเฉพาะภาวะโปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมธิลเลชัน เป็นกุญแจสำคัญสำหรับกลไกการแสดงออกที่
ลดลงของแทบพาคิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการนำเสนอแอนติเจนต่อเอ็มเอชซีคลาส
I ประกอบกับกลไกดังกล่าวยังเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลทางคลินิกที่รุนแรงมากขึ้นหรือไม่

วัตถุประสงค์ : เพื่อวิเคราะห์สถานะของดีเอ็นเอเมธิลเลชันตรงตำแหน่งโปรโมเตอร์ของแทบ
พาคินในระหว่างการพัฒนาโรคมะเร็งปากมดลูกจากระยะก่อนมะเร็งจนถึงมะเร็งปากมดลูกระยะ

ลูกกลม และศึกษาในกลไกดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับผลทางคลินิกที่มีการดำเนินโรคที่รุนแรงมากขึ้น

ยุทธศาสตร์ : ไพรมอร์สำหรับเมธิลเลชั่นและอันเมธิลเลชั่นของแทบพาทซินถูกออกแบบด้วยฐานข้อมูลเมธิลไพรมอร์ ภายหลังการเติมหมู่เมธิลได้ตรวจคัดกรองด้วย MS-PCR และตรวจหาปริมาณด้วย QMSP แบบ HRM ตัวอย่างชิ้นเนื้อผู้ป่วยฝังในพาราฟิ์มถูกศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเอ็มเอชซีคลาส I; เฮฟวีเชน เบต้าทูโมโครโกลบูลินและ แทบพาทซินด้วยการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี ชนิดของไวรัสเอชพีวีกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงถูกจำแนกด้วย E6/E7 NMPCR รูปแบบของไวรัสถูกตรวจวัดด้วย PCR แบบเสมือนจริงในขณะนั้น โดยแปลผลรูปแบบไวรัสจากบ่งชี้อัตราส่วน E2 ต่อ E6 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกที่ลดลงของเอ็มเอชซีคลาส I และกลไกไฮเปอร์เมธิลเลชั่นที่ตรงตำแหน่งโปรโมเตอร์ของแทบพาทซิน ร่วมกับข้อมูลทางคลินิกในการดำเนินโรคที่รุนแรงมากขึ้นที่สัมพันธ์กับปัจจัยสำคัญของตัวเชื้อไวรัสที่เหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็ง

ความสำคัญ : ผลการศึกษาพบการแสดงออกที่ลดลงของเอ็มเอชซีคลาส I ตั้งแต่ในระยะแรกของการพัฒนาในระยะก่อนมะเร็งจนกระทั่งกลายเป็นมะเร็งระยะลูกกลม การแสดงออกที่ลดลงดังกล่าวพบว่าการแสดงออกที่ลดลงเพียงบางส่วนและสูญเสียการแสดงออกตั้งแต่ระยะก่อนมะเร็งในระดับสูงจนกระทั่งมะเร็งปากมดลูกระยะลูกกลม และผลทางคลินิกที่รุนแรงมากขึ้นตามลำดับ การศึกษาพบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกที่ลดลงของเอ็มเอชซีคลาส I และความบกพร่องของแทบพาทซิน โดยความผิดปกติเริ่มแรกถูกสะสมจากระยะก่อนมะเร็งจนทำให้สูญเสียการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญ ในการศึกษาสถานะเมธิลเลชั่นของแทบพาทซินด้วย MS-PCR พบการมีแทบพาทซินโปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมธิลเลชั่น ร้อยละ () และ () ในระยะก่อนมะเร็งและมะเร็งระยะลูกกลมตามลำดับ สำหรับการศึกษาด้วย MS-HRM พบร้อยละที่เพิ่มขึ้นเป็น ร้อยละ () และ () ในระยะก่อนมะเร็งและมะเร็งระยะลูกกลม ตามลำดับตามลำดับ เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อศึกษาร่วมกันระหว่างการแสดงออกที่ลดลงของเอ็มเอชซีคลาส I กับกลไกของแทบพาทซินโปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมธิลเลชั่น และโดยอาศัยปัจจัยในรูปแบบของไวรัสได้ถูกนำมาวิเคราะห์พบว่ามีความสัมพันธ์กันและเกี่ยวข้องกับการดำเนินของโรคที่รุนแรงมากขึ้นในระหว่างการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกตั้งแต่ระยะก่อนมะเร็งจนกระทั่งมะเร็งระยะลูกกลมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิจัยบ่งชี้ถึงการแสดงออกที่ลดลงดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับกลไกของแทบพาทซินโปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมธิลเลชั่น และข้อมูลร่วมกันในรูปแบบของไวรัสที่บ่งชี้การดำเนินโรคที่รุนแรงมากขึ้นน่าจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ในพยากรณ์โรคของผู้ป่วยในการทำนายผลการรักษาทางคลินิกที่รุนแรงเพิ่มขึ้นในระหว่างพัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูก ผู้วิจัยได้กล่าวไว้ว่าการสนองตอบในภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อการแสดงออกที่ลดลงของเอ็มเอชซีคลาส I กับกลไกของแทบพาทซินโปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมธิลเลชั่น สัมพันธ์กับผลทางคลินิกที่รุนแรงขึ้น การศึกษาในกลไกเหนี่ยวนำกรรมในเอ็มเอชซีคลาส I และองค์ประกอบตัวอื่น ๆ น่าจะได้ศึกษาต่อไป

คำสำคัญ : แทบพาซินไฮเปอร์เมธิลเลชั่น, การลดการแสดงออกของเอ็มเอชซี คลาส I, ความบกพร่องของแทบพาซิน, เอชพีวี 16 รูปแบบแทรกในจีโนม, ผลทางคลินิกที่รุนแรงมากขึ้น

Abstract

Project Code: MRG5480055

Project Title: (English) Role of DNA methylation on expression of antigen processing Tapasin during cervical carcinogenesis

Investigator: Assist.Prof.Dr. Surasak Wanram
College of Medicine and Public Health
Ubon Ratchathani University

E-mail Address: Surasak.w@ubu.ac.th, Mdsurawa@gmail.com

Project Period: 2 years

Abstract:

Motivation: DNA methylation plays an important role in tumorigenesis by epigenetic modification and silencing critical promoter hypermethylated genes. The global hypomethylation is primarily due to loss of methylation in repetitive elements and other non-transcribed regions of the genome. This genome-wide hypomethylation potentially leads to loss of imprinting, chromosomal instability, cellular hyperproliferation, and activation of oncogenes.

Problem: Cervical cancer is the second most common malignancy among women worldwide. The multistep processes are associated with deregulation of tumor suppressor p53 and Rb by oncogenic E6 and E7, respectively are well known factors for cervical carcinogenesis. Moreover, the loss of expression in MHC class I related to antigen processing machinery defect is the crucial event for cancer evasion from host immune response but the exact mechanism is still unclear. According to our previous research, especially in host immune responsive genes of antigen processing, transporter associated with antigen processing (TAP) is associated with Tapasin TAP binding protein (TAPBP) down-regulation. We hypothesized whether aberrant DNA methylation is a key factor for down regulation of Tapasin as well as crucial factors for clinical outcome of progression.

Objective: To analyze DNA methylation status at promoter of antigen processing Tapasin during cervical cancer development from pre-invasive lesions through invasive cervical carcinomas and its association with clinical outcome of progression.

Strategy: The methylated and unmethylated primers used for PCR based methylation assay will be designed by methPrimer database. After bisulfite modification, Screening using MS-PCR and quantitative methylation-specific PCR (QMSP) of the Tapasin promoter was performed by methylation-sensitive high-resolution melting curve analysis (MS-HRM). Embedded paraffin samples were examined for protein expression of MHC class I; heavy chain and beta-2-microglobulin (β_2m), and transporter associated with antigen processing (TAP) binding protein--tapasin using immunohistochemical EnVision system staining. High risk (HR) HPV16 genotype was identified by E6/E7 nested multiplex polymerase chain reaction (PCR). The HPV16 physical state was determined using quantitative PCR via TaqMan probe assay, indicating for HPV16 E2 and E6 ratio interpretation. Association study of MHC class I and Tapasin promoter hypermethylation mechanism as well as clinical outcome of progression were investigated relevance to HR-HPV crucial factors.

Significance: Our findings characterized expression patterns of MHC class I-- heavy chain and β_2m as a membranous and cytoplasmic pattern according to its localization on cell surface or cytoplasm, respectively. Our results showed downregulation of MHC class I as the early event in development from preinvasive to invasive CXCA. The MHC class I downregulation referring to partial and total loss of expression were earlier observed at high-grade preinvasive lesions and invasive CXCA as well as clinical outcome of progression, respectively. Our investigation showed association between overall MHC class I downregulation and Tapasin impairment. The defect was initially accumulated from preinvasive lesion regarding to loss Tapasin expression significantly. Study of tapasin methylation status, our MS-PCR results showed percentage of tapasin promoter hypermethylation at 19.04% (8/42 cases) and 54.34% (25/46 cases) of pre-invasive and invasive cervical cancer, respectively. For evaluation by MS-HRM, our findings showed increase percentage of tapasin promoter hypermethylation at 19.04% (8/42 cases) and 54.34% (25/46 cases) of pre-invasive and invasive cervical cancer, respectively. Interestingly, the combination study between MHC class I and Tapasin downregulation mechanism and HPV16 physical status were discovered. We found that MHC class I loss of expression associated with Tapasin promoter hypermethylation value for integrated HPV16 occurrence as well as progression result during cervical

cancer development, significantly. Our results strongly recommend that MHC class I downregulation associated with Tapasin promoter hypermethylation. The combination of HPV16 physical status and MHC class I with Tapasin expression should be used for prognostic markers to predict clinical outcome of progression during cervical carcinogenesis. We proposed that host immune responses according to downregulation of MHC class I associated with Tapasin promoter hypermethylation related to clinical outcome of progression. The epigenetic study and their relevance to downregulation of MHC class I with other antigen processing machinery mechanisms especially how to be results of progression should be further investigated.

KEY WORDS: Tapasin hypermethylation, MHC class I downregulation,
Tapasin impairment, Integrated HPV16, Clinical outcome of progression