5 APR 1994

STUDY ON CORRELATION BETWEEN ACTIVATED RAS ONCOGENE AND HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN CERVICAL CANCER IN THAILAND

NAMCHAI CHEWAWIWAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1993

Copyright by Mahidol University

25759

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายเบสของยีนมะเร็ง Ras และการติดเชื้อไวรัส Papilloma ของมะเร็งปากมดลูกในคนไทย

ผู้วิจัย นำชัย ชีววิวรรธน์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล, Ph.D.

ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.

สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 21 ธันวาคม พ.ศ. 2536

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายที่จะ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง การกลายของเบสในยีนมะเร็ง Ras และ การติดเชื้อ Papilloma ชนิด 16 และ 18 ของมะเร็งปากมดลูกในคนไทย

ในการศึกษานี้ ได้เลือกวิธีการตรวจสอบ การกลายของเบสมาใช้รวม 3 วิธี คือ S1 nuclease cleavage, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) , และ PCR-primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA) สองวิธีแรกไม่เหมาะสมที่จะใช้ศึกษา เนื่องจากมีความไม่แน่นอนของวิธีการสูง ดังนั้นจึงเลือก PCR-PIRA มาใช้ในการตรวจสอบ การกลายของเบสในยีนมะเร็ง K-ras และ H-ras ในตัวอย่างชิ้นเนื้อมะเร็งปากมดลูกของคนไข้ วิธีนี้มีหลักการ คือ อาศัยการสร้างลำดับเบสขึ้นในไพรเมอร์เพื่อให้สามารถตรวจหาได้โดย เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ภายหลังเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR แล้ว เฉพาะ ดีเอ็นเอผลิตผล จาก PCR ที่มีลำดับเบสปกติเท่านั้น ที่จะถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ส่วนดีเอ็นเอผลิตผล ที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจะไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้สามารถ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ เบสเพียง 1 ตัว ที่ตำแหน่ง codon ที่ 12 ของยีนมะเร็ง K-ras และ ที่ตำแหน่ง codon ที่ 61 ของ ยีนมะเร็ง H-ras ได้ และ สังเกตความแตกต่างของ ขนาดระหว่างดีเอ็นเอลำดับเบสปกติ ที่ถูกตัดให้สั้นลง กับดีเอ็นเอลำดับเบสที่ผิดปกติซึ่งมีขนาดยาวกว่าได้ใน 8 % acrylamide gel แถบของดีเอ็นเอ บน ฟิล์มเนกาทีฟจะถูกนำมาวัดปริมาณด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่มี ค่าอัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป ต่อ ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสปกติ มากกว่า 0.36 จะถูกนำมาตรวจสอบอีกครั้ง การตรวจสอบซ้ำนี้จะกระทำได้ โดยการนำดีเอ็นเอของตัวอย่างที่สงสัยว่าจะมี

Copyright by Mahidol University

ลำดับเบสผิดปกติ และถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะแล้ว มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่เดิม ฉะนั้น เฉพาะ ดีเอ็นเอ ที่มี ลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปเท่านั้น ที่สามารถใช้เป็นแม่พิมพ์ได้ และให้ดีเอ็นเอผลิตผล ที่สามารถตรวจสอบได้ด้วย การดูขนาดเมื่อถูกตัดด้วยเอ็นไซม์เดิม ส่วนการตรวจสอบการติดเชื้อ และ ชนิดของไวรัส Papilloma นั้น ใช้วิธี in situ Hybridization และ PCR-RFLP

จากคนไข้มะเร็งปากมดลูกจำนวน 49 ราย ที่นำมาตรวจสอบหาการกลายของเบสที่ตำแหน่ง codon ที่ 12 ของ ยีนมะเร็ง K-ras พบ การกลายของเบสในคนไข้รวม 6 ราย โดยพบทั้งในส่วนของเนื้อเยื่อที่เป็นมะเร็ง และ เนื้อเยื่อปกติของผู้ป่วยทุกราย ตัวอย่างชิ้นเนื้อส่วนใหญ่ที่พบการกลายของเบส ไม่พบการติดเชื้อไวรัส Papilloma มีเพียงรายเดียวเท่านั้นที่พบการติดเชื้อไวรัสในเนื้อเยื่อมะเร็ง ตัวอย่างเนื้อเยื่อคู่หนึ่งที่พบการกลายของเบส ถูกนำมายืนยันความถูกต้องด้วยวิธี direct PCR sequencing และ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของเบสจาก GGT ไปเป็น GTT จากการตรวจสอบ การกลายของเบสใน ยีนมะเร็ง H-ras ที่ตำแหน่ง codon 61 ของ คนไข้กลุ่มเดียวกัน พบว่า มีเพียงรายเดียวที่พบ การกลายของเบสโดยมีการเปลี่ยนแปลงของ นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่สอง จาก A เป็น T และ ชิ้นเนื้อดังกล่าวไม่พบว่ามีการติดเชื้อไวรัส Papilloma

ผลการตรวจสอบใน กลุ่มคนไข้มะเร็งปากมดลูกข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง การกลายของเบสในยีนมะเร็ง K-ras และ H-ras และ การติดเชื้อไวรัส Papillloma ชนิด 16 และ 18 นอกจากนั้น การกลายของเบสที่ตรวจพบ ในเนื้อเยื่อปกติของคนไข้ ได้ชี้ให้เห็นถึง การเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของยีนมะเร็ง Ras ก่อนที่จะแสดงให้เห็นถึงความผิดปกติทางเนื้อเยื่อวิทยา

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Study on Correlation between Activated Ras Oncogene and Human Papillomavirus Infection in Cervical Cancer in Thailand

Name Namchai Chewawiwat

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Mathurose Ponglikitmongkol, Ph.D.

Prapon Wilairat, Ph.D.

Sakol Panyim, Ph.D.

Date of Graduation 21 December B.E. 2536 (1993)

ABSTRACT

This project was aimed of investigating whether there was any correlation between point mutation in ras oncogene and human papillomavirus type 16 and 18 infection in cervical cancer.

Three methods were tested for screening of point mutations in K-ras and H-ras genes in cervical biopsies, namely, S1 nuclease cleavage, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). The first two methods proved to be unsuitable for our use due to their lacks of consistency , and therefore, PCR-PIRA was selected to be used to analyse the specimens. This method is based on the presence of enzyme recognition site created by bases in primer with base sequence of interest. Only PCR products with normal sequence were recognized and digested by restriction enzyme but not the mutant PCR products. This allowed the detection of a single base change at codon 12 of K-ras gene and codon 61 of H-ras gene by size discrimination between normal and mutant sequences in 8 %

Copyright by Mahidol University

polyacrylamide gel. The digested product was photographed after electrophoresis and then DNA band on negative film was quantitated by scanning method. Samples with high mutant:normal DNA ratio of more than 0.36 were selected for confirmation. Mutant DNA in these samples was enriched by selective amplification of digested PCR product using the same set of primer. Typing of human papillomavirus in each sample was performed by *in situ* hybridization and PCR-RFLP method.

In total of 49 patients examined for point mutation at codon 12 of K-ras gene, the result showed that samples from six patients , both from cancerous tissues and their normal counterparts , were positive. All samples were found HPV negative except one cancerous sample.A point mutation detected in one pair of specimens was confirmed by direct PCR sequencing method and determined to be a base change from GGT to GTT. Among the same group of patients examined for H-ras mutation at codon 61, only one specimen indicated a base change from A to T at the second nucleotide. This specimen was found HPV negative.

Data summarized from this group of samples showed no association between K-ras or H-ras gene mutations and infection by HPV type 16 or 18. In addition, the mutations observed in normal cervical tissues indicated that alterations at the molecular level of ras genes occured before histological change.

Copyright by Mahidol University