ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E41033

ANALYSIS OF HPV 16 ASIAN VARIANT LCR TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY

MISS PARICHAT WONGWARISSARA

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
KHON KAEN UNIVERSITY
2010

600255429

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E41033

ANALYSIS OF HPV 16 ASIAN VARIANT LCR TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY

MISS PARICHAT WONGWARISSARA

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

A THESIS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

KHON KAEN UNIVERSITY

2010

ANALYSIS OF HPV 16 ASIAN VARIANT LCR TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY

MISS PARICHAT WONGWARISSARA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MEDICAL MICROBIOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY
2010

THESIS APPROVAL
KHON KAEN UNIVERSITY
FOR
MASTER OF SCIENCE
IN MEDICAL MICROBIOLOGY

Thesis Title: Analysis of HPV 16 Asian variant LCR transcriptional activity

Author: Miss Parichat Wongwarissara

Thesis Examination Committee

Assoc. Prof. Dr. Sumalee Siriaungkul	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Kobkul Tangsinmunkong	Member
Assoc. Prof. Dr. Chamsai Pientong	Member
Assoc. Prof. Dr. Tipaya Ekalaksananan	Member

Thesis Advisors:

..... Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Tipaya Ekalaksananan)

..... Co-Advisor
(Assoc. Prof. Dr. Kobkul Tangsinmunkong)

.....
(Assoc. Prof. Dr. Lampang Manmart)
Dean, Graduate School

.....
(Prof. Dr. Pisake Lumbiganon)
Dean, Faculty of Medicine

Copyright of Khon Kaen University

ปาริชาติ วงษ์วริศรา. 2553. **การวิเคราะห์ transcriptional activity ของ LCR ของ HPV 16 As variant.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ. ทิพยา เอกลักษณานันท์, รศ. กอบกุล ตั้งสินมั่นคง

บทคัดย่อ

E 41033

การติดเชื้อ high risk human papillomavirus (HR-HPV) บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เป็นสาเหตุสำคัญของมะเร็งปากมดลูกในสตรี การพบ HPV16 ได้มากที่สุดทั้งในตัวอย่างเซลล์ปากมดลูกที่ปกติและผิดปกติทำให้เชื่อว่า HPV16 เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่ทำให้เกิดรอยโรคที่รุนแรงขึ้นจนกระทั่งกลายเป็นมะเร็งระยะลุกลาม นอกจากนี้การศึกษา intratypic variant ของ HPV16 ยังพบความแตกต่างกันตามสภาพทางภูมิศาสตร์ โดยตรวจพบ HPV16 Asian (As) variant ได้มากที่สุดในกลุ่มสตรีชาวเอเชียที่เป็นมะเร็งปากมดลูก

กลไกการก่อมะเร็งของ HPV เกิดจากการแสดงออกที่มากผิดปกติของจีน E6 และ E7 ซึ่งเป็น oncogene ของ HPV การแสดงออกของจีนเหล่านี้ถูกควบคุมโดย long control region (LCR) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ HPV genome โดยมีตำแหน่งให้โปรตีนที่จำเพาะของทั้งโฮสต์และไวรัสมาจับเพื่อควบคุม viral transcription ดังนั้นหากลำดับนิวคลีโทด์บริเวณนี้มีการเปลี่ยนแปลงไป อาจมีผลต่อความสามารถในการก่อมะเร็งของไวรัส

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความชุกของการติดเชื้อ HPV และชนิดของ HPV (HPV genotype) ในกลุ่มประชากรสตรีจากทั้ง 4 ภูมิภาคของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างDNA จาก formalin-fix, paraffin-embedded (FFPE) cervical tissues ซึ่งมีผลการตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาเป็น normal, low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) และ squamous cervical cancer (SCC) ตรวจหา HPV DNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers GP5+/GP6+ และตรวจ HPV genotype โดยวิธี reverse line blot hybridization แล้วคัดเลือกตัวอย่างที่มี HPV16 มาศึกษาหา intratypic variants จากลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงของจีน E6 จากนั้นเลือกตัวอย่างที่มี HPV16 As variant มาวิเคราะห์ถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงตรงบริเวณ LCR โดยใช้วิธี nucleotide sequencing และเปรียบเทียบ transcriptional activity ของ LCR ของ HPV16 As variant กับ HPV16 E prototype เพื่อหาความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก

E 41033

ผลการศึกษาพบความชุกของการติดเชื้อ HPV ร้อยละ 91.19, 84.62, 90.08 และ 93.33 ในกลุ่ม normal, LSIL, HSIL และ SCC ตามลำดับ และตรวจพบ HPV genotype ที่แตกต่างกันจำนวน 20 genotypes โดย 5 อันดับแรกของ HR-HPV genotype ที่พบมากที่สุดคือ HPV16 ร้อยละ 86, HPV18 ร้อยละ 67.27, HPV58 ร้อยละ 6.36, HPV45 ร้อยละ 4.36 และ HPV52 ร้อยละ 2.91 พบว่าความชุกของการติดเชื้อ HPV 16 เพิ่มขึ้นตามระดับรอยโรคที่สูงขึ้น ผลจากการวิเคราะห์หา HPV16 variant ในตัวอย่างที่มีการติดเชื้อ HPV16 พบ 6 variants โดยเป็น HPV16 As variant มากที่สุดคือ ร้อยละ 58.11 และมีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของเซลล์ปากมดลูก และเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงของ HPV16 As variant LCR ในตัวอย่างจาก FFPE และ fresh cervical tissue พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LCR จากทั้งสองกลุ่มตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงที่ใกล้เคียงกัน และพบการเปลี่ยนแปลงจำนวน 32 ตำแหน่ง โดยพบว่ามี 10 ตำแหน่งที่ยังไม่เคยมีการรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงมาก่อน ประกอบด้วย 7218T>A, 7384C>T, 7429G>A, 7430C>T, 7618 C insertion with A, 7844A>C, 7874C>G, 28G insertion with A, 46T insertion with A และ 61T insertion with A

การศึกษา LCR transcriptional activity ได้เลือกตัวอย่าง HPV16 As variant จำนวน 2 ตัวอย่างที่มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LCR ที่แตกต่างกัน มาทำการประเมิน transcriptional activity เทียบกับ HPV16 E prototype พบว่า HPV 16 As variant ทั้ง 2 ตัวอย่าง มีค่า LCR transcriptional activity มากกว่า HPV 16 prototype โดยเฉพาะตัวอย่างที่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่พบครั้งแรกในการศึกษาครั้งนี้ บริเวณใกล้กับตำแหน่ง promoter ของจีนก่อเกิดมะเร็งของเชื้อไวรัสนี้ พบว่ามีค่า LCR transcriptional activity สูงมากที่สุด โดยมีความสัมพันธ์กับการเกิดเป็นมะเร็งปากมดลูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาคือ การติดเชื้อ HPV16 เป็นปัจจัยสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูก และพบว่าการติดเชื้อ HPV16 As variant เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญสำหรับประชากรผู้หญิงไทย โดยพบว่าการเกิดการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของ LCR โดยเฉพาะบริเวณที่ใกล้กับตำแหน่ง promoter ของจีนก่อให้เกิดมะเร็ง น่าจะส่งผลช่วยเพิ่มความรุนแรงของเชื้อไวรัสในการทำให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูกได้

Parichat Wongwarissara. 2010. ***Analysis of HPV16 Asian variant LCR transcriptional activity***. Master of Science Thesis in Medical Microbiology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors: Assoc Prof. Tipaya Ekalaksananan, Assoc Prof. Dr. Kobkul Tangsinmunkong

ABSTRACT

E41033

HPV16 is the most common type found in cervical cancer worldwide and it has been suggested to be an oncogenic risk for development of cervical cancer. HPV intratypic variation has been most extensively studied for HPV16 classified in 5 variants predominated within geographical region. HPV16 Asian (As) variant is the most common variant found in Asian women with cervical cancer.

Expression of E6 and E7 viral oncogenes is a necessary step of cervical carcinogenesis. Their transcription are regulated by the long control region (LCR) containing several binding sites of both cellular and viral proteins, so nucleotide variation in the LCR may affect oncogenic potential of the virus.

This study aims to investigate the prevalence of HPV infection and HPV genotype distribution in formalin-fix, paraffin-embedded (FFPE) cervical tissue samples derived from 4 regions of Thailand by PCR using GP5+/GP6+ primers and reverse line blot hybridization assay. The samples are histologically diagnosed as normal, low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL), high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and squamous cell carcinoma (SCC). HPV16-positive samples were selected for detection of variant base on HPV16 E6 gene. LCR nucleotide variation was investigated in HPV16 As variant positive samples then the LCR transcriptional activities of the HPV16 As variants of cervical cancer cases were analyzed and compared with HPV16 E prototype.

HPV DNA was found in 91.19%, 84.62%, 90.08% and 93.33% of normal, LSIL, HSIL and SCC cases. Twenty HPV genotypes were found in Thai women population. The five most common HR-HPV included HPV16 (86%), HPV18 (67.27%), HPV58 (6.36%), HPV45 (4.36%) and HPV52 (2.91%). The most common type is HPV16

E41033

(86%) and its prevalence increased with severity of the disease: 74.13% of LSIL, 87.16% of HSIL and 91.96% of SCC. Among 6 different identified HPV16 variants, HPV16 As variant was the most common variant (58.11%). The result showed the associated risk of HPV16 As variant in infected women diagnosed as HSIL and SCC with odd ratio 10 (95% CI 1.732 – 57.723) when comparing with European branch (E prototype and E variant).

FFPE samples of 19 HSIL and 20 SCC cases and fresh tissue samples of 10 SCC cases which are HPV16 As variant positive were analyzed the nucleotide variation in LCR. Their nucleotide variations are similar. Compared with prototype, 32 nucleotide variations spanning nucleotide position 7083-103 were detected in this study. Twenty-two out of 32 show a good correspondence with previous reports. Ten positions of nucleotide variation have not been reported yet, including 7218T>A, 7384C>T, 7429G>A, 7430C>T, 7617C insertion with A, 7844A>C, 7874C>G, 28G insertion with A, 46T insertion with A and 61T insertion with A. Moreover, this study found triallelic change at position 7289, 7339 (A>C,T) and 7842 (G>A,T).

Two HPV16 As cases containing different nucleotide variation at position proximal to p97 promoter and HPV16 E prototype were selected to analyze LCR transcriptional activity by insertion into the pGL3-Basic vector, a promoterless luciferase reporter vector. Both of HPV16 As LCRs showed higher transcriptional activity than the prototype. The HPV16 As LCR with novel variations at nt position 46 T insertion with G, 61 T insertion with G and 28G insertion with A showed the highest transcriptional activity with 35-folds of the HPV16 E prototype (P = 0.000; 95% CI 26.294-42) and 3-fold of HPV16 As variant (P = 0.000; 95% CI 19.482-35.773). Another HPV16As LCR with previously reported variation had the activity 10 folds higher than the prototype but no statistical significance (P = 0.110).

These results imply that HPV16 As, especially the variant containing LCR nucleotide variation at 3' end proximal to p97 promoter could lead to the overexpression of the HPV16 oncoproteins and contribute to the carcinogenesis of cervical cancer in Thai women.

Goodness portion to the present thesis is dedicated

for my parents, my brother, relatives and the entire teaching staffs.

ACKHOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest and sincere gratitude to my advisor, Assoc. Prof. Tipaya Ekalaksananan for her valuable advises guidance, intense interest, and kindness the course in the study and also to my advisor committee, Assoc. Prof. Dr. Chamsai Pientong and Assoc. Prof. Kobkul Tangsinmunkong for their helpfulness, useful comments and suggestions. I deeply appreciate the time they spared me during the preparation of this thesis.

Gratefulness is also expressed to teaching staff and members in the Department of Microbiology for their practical help, providing the kindness, wonderful environment, and friendship during the time of this study.

My special thanks are expressed to my friends for their helps in any ways and also expressed to whom that may be concerned to my study, as I did not mention here.

I would like to gratefully acknowledge financial support from Gradate School, Faculty of Medicine, Khon Kaen University and the Department of Medical Services; Ministry of Public Health.

Finally, I would like to express my deepest appreciation and sincere gratitude to my family for their love, devoting, understanding, and encouragement through entire my study.

Parichat Wongwarissara

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (IN THAI)	i
ABSTRACT (IN ENGLISH)	iii
DEDICATION	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
LIST OF ABBREVIATIONS	xii
CHAPTER I INTRODUCTION	
1. Rationale and background	1
2. Objectives	3
3. Scope and limitation of research	4
4. Anticipate outcome	4
CHAPTER II LITERATURE REVIEWS	
1. The HPV classification and genome organization	5
2. HPV life cycle	9
3. HPV and cervical cancer	12
4. HPV infection and other co-factors of cervical cancer development	14
5. HPV 16 prevalence	16
6. HPV 16 variant and HPV 16 As variant	17
7. HPV 16 LCR polymorphism and transcriptional activity	19
CHAPTER III RESEARCH METHODOLOGY	
1. Materials	22
2. Methods	26
3. HPV 16 variants determination	30
4. HPV 16 As LCR polymorphism analysis	31
5. HPV 16 As variant LCR transcriptional analysis	33
6. Statistic analysis	38

TABLE OF CONTENTS (Cont.)

		Page
CHAPTER IV RESULTS		
1. HPV DNA detection		39
2. Prevalence of HPV genotypes in Thai women		41
3. HPV 16 As variant		45
4. LCR polymorphism of HPV 16 As		46
5. Transcriptional activity of HPV 16 As LCR		50
CHAPTER V DISCUSSION		55
REFERENCES		64
APPENDICES		77
APPENDIX A	List of chemicals and instruments	78
APPENDIX B	Reagents for polymerase chain reaction	81
APPENDIX C	Reagents for reverse line blot hybridization assay	83
APPENDIX D	Reagents for construction of cloning vector and promoterless luciferase reporter vector	85
APPENDIX E	Cell line culture	88
RESEARCH PRESENTATION		91
CURRICULUM VITAE		92

LIST OF TABLES

		Page
Table 1	Functions of the products of HPV early and late region open reading frames and HPV non-coding upstream regulatory region (LCR)	8
Table 2	HPV types and diseases association	10
Table 3	Epidemiological classification of HPV types	11
Table 4	37 HPV type–specific 5'-amino-linked oligonucleotide probes used for HPV genotyping by RLBH assay	29
Table 5	The Three E6 primer sets used for HPV 16 E6 PCR amplification	31
Table 6	Patterns of HPV 16 E6 nucleotide position changes used for HPV16 variant classification	31
Table 7	Four LCR primer pairs used for HPV 16 LCR amplification	33
Table 8	The prevalence of HPV DNA in 614 FFPE cervical tissues histological diagnosed as normal, LSIL, HSIL and SCC using GP5+/GP6+ primers PCR amplification	41
Table 9	Number of the top five HR-HPV genotypes found in each histological diagnosis	44
Table 10	The prevalence of HPV 16 in 550 FFPE HPV positive cases from women in 4 regions of Thailand	45
Table 11	Distribution of HPV 16 variants in normal-LSIL cases, HSIL case and SCC case	46
Table 12	Nucleotide sequence variation in HPV 16 As variant LCR compared to HPV 16 LCR reference sequence	49
Table 13	Two HPV 16 As variant samples and LCR nucleotide sequence variation, which selected for analysis of HPV 16 As LCR transcriptional activity compared with HPV 16 LCR prototype	51

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	A schematic representation of the circular HPV 16 DNA genome organization	5
Figure 2	Schematic represents the linear map of LCR and specific transcriptional binding site genome organization of HPV 16 European prototype	6
Figure 3	The HPV life cycle	12
Figure 4	The percentage of cervical cancer cases attributed to the most frequent HPV types in all regions	16
Figure 5	Geographical distribution of HPV 16 variant worldwide	19
Figure 6	Restriction map and multiple cloning site (MCS) of pDRIVE cloning vector	23
Figure 7	Restriction map and multiple cloning site (MCS) of pGL3 basic vector	24
Figure 8	Restriction map and multiple cloning site (MCS) of pSV-β-Galactosidase control vector	25
Figure 9	Position of three E6 primer sets overlapping used for HPV 16 E6 amplification	30
Figure 10	Position of four LCR primer sets overlapping used for HPV 16 LCR amplification	32
Figure 11	DNA qualification, PCR amplification for a 268-bp fragment of the β-globin gene (the housekeeping gene)	39
Figure 12	HPV DNA detection	40
Figure 13	HPV genotype detection by RLBH assay	42
Figure 14	HPV genotype distribution and frequency of infection among HPV DNA positive samples from Thai women histologically diagnosed with normal, LSIL, HSIL and SCC	43
Figure 15	Pattern of HPV infection in FFPE sample from Thai women with different grade lesion	44

LIST OF FIGURES (Cont.)

		Page
Figure 16	Nucleotide alignment of HPV 16 As variant LCR compared with HPV 16 reference sequence AY686584	47
Figure 17	HPV 16 reference plasmid and two HPV 16 As variant LCR amplification.	51
Figure 18	The pDRIVE cloning vector containing HPV 16 LCR digested with restriction endonuclease *KpnI* and *Hind III* (NEB) restriction enzymes	52
Figure 19	The promoterless luciferase expression vector (pGL3 basic vector) containing HPV16 LCR digested with restriction endonuclease *KpnI* and *Hind III* (NEB) restriction enzymes	53
Figure 20	LCR transcriptional activity of the HPV 16 E prototype, HPV 16 As variant and HPV16 As lineage	54

LIST OF ABBREVIATIONS

/	Per
%	Percent
μ	Micro (10^{-6})
°C	Degree Celsius
μg	Microgram
μl	Microliter
cm	Centimeter
DNA	Deoxyribonucleic acid
DW	Distilled water
e.g.	For example
et al.	*Et. Alii* (Latin), and others
g	Gram
h	Hour
k	Kilo (10^{3})
l	Liter
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
n	Nano (10^{-9})
nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffer saline
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
OD	Optical density
PCR	Polymerase chain reaction
s	Second
SDS	Sodium dodecyl sulfat

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt
TAE	Tris-acetate EDTA
TE	Tris-EDTA buffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethane
U	Unit
UV	Ultraviolet
V	Volt
V/V	Volume by volume
W/V	Weight by volume