

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RMU5380038

ชื่อโครงการ: คุณลักษณะเฉพาะของโปรตีน E6 ของ human papillomavirus 16 Asian variant ในการก่อมะเร็งปากมดลูก

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: รศ.ดร.พญ. แจ่มใส เพียรทอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

E-mail Address: chapie@kku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี

High risk human papillomavirus type 16 As variant (HPV16 As variant) เป็นปัจจัยเสี่ยงที่มีความสัมพันธ์กับการก่อมะเร็งปากมดลูกในผู้หญิงไทย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายคุณลักษณะของและกลไกที่เกี่ยวข้องกับการการก่อมะเร็งของ E6 gene variation (E6D25E) ของเชื้อ HPV16 As โดยทำการสร้าง expression vector, retrovirus vector และ lentivirus vectors ที่มีจีน E6D25E และ E6 prototype (E6Pro) เพื่อใช้ทดสอบคุณสมบัติในการจับโปรตีน E6AP และนำไป transduce เข้าใน cervical keratinocyte หรือ HCK1T แล้วศึกษาหน้าที่ของ E6D25E ต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ ดูการย่อยสลาย p53, และผลต่อการกระตุ้น interferon regulatory factor genes (IRFs) ดูผลต่อการเปลี่ยนแปลงทาง epigenetic เช่น การกระตุ้นการแสดงออกของ miR-21, histone deacetylases 6 (HDAC-6) นอกจากนี้ยังดูผลการแสดงออกของ protein profile โดยเปรียบเทียบกับ HPV16 E6Pro ผลการศึกษา พบว่าโปรตีน E6D25E ยังคงมีคุณสมบัติจับกับ E6AP ได้เหมือน E6Pro ส่วนความสามารถก่อมะเร็งพบว่า E6D25E นำให้ HCK1T มีการเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง โดยมี doubling time ได้เท่ากับโปรตีน E6Pro รวมทั้งสามารถสลาย โปรตีน p53 และ p21 ไม่แตกต่างจากโปรตีน E6Pro ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญในการก่อมะเร็ง และพบว่าโปรตีน E6D25E และ E6Pro มีผลต่อการแสดงออกของจีนในกลุ่ม IRFs ได้ต่างกันโดยพบ down-regulation ของ IRF-1 และ IRF-7 mRNA ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการลดลงของ IFN- α และ IFN- β เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ E6Pro ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าโปรตีน E6D25E สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ miR-21 ได้สูงกว่าโปรตีน E6Pro ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก และใน transduced HCK1T cells ที่เลี้ยงภายใต้ condition medium และ condition medium จากเซลล์ Hela cells และใน transduced HCK1T cells ที่มี E6Pro มีการแสดงออกของโปรตีน HDAC6 สูงมากเมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ E6D25E ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ตรวจหารูปแบบของโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ E6Pro เปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ E6D25E พบว่ามีโปรตีนจำนวนทั้งหมด 9 จุด ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้พบว่าโปรตีน E6D25E มีคุณสมบัติกระตุ้นให้เซลล์เปลี่ยนกลายเป็นมะเร็งได้ไม่ต่างจากโปรตีน E6Pro แต่ E6D25E น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ติดเชื่อในการหลบหลีกภูมิคุ้มกันและทำให้เซลล์ไม่ตายกลายเป็นภาวะติดเชื่อแบบยืดยาวได้เร็วกว่า E6Pro ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อมะเร็ง

คำหลัก: HPV16; E6D25E; human cervical keratinocyte;

Abstract

Project Code: RMU5380038

Project Title: Characteristics of the Asian HPV16 E6 variant in cervical carcinogenesis

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Chamsai Pientong, M.D., Dr.Sc.Hum.

E-mail Address: chapie@kku.ac.th

Project Period: 3 years

High risk human papillomavirus type 16 has previously been classified into four major lineages and HPV16 Asian variant (HPV16 As variant) is frequently found in Asian population. A common gene variation classified as HPV16 As variant is 178 (T>G) that is localized in the E6 oncogene, and leads to an amino acid change from aspartic acid (D) to glutamic acid (E) or E6D25E. HPV16 As variant was identified as the associated risk for cervical cancer in Thai population as well as in Asian population. This study aimed to construct plasmid vector containing E6D25E (E6As) and determine its function by binding E6AP compared to E6 prototype (E6Pro). The recombinant retrovirus and lentivirus tet system containing E6D25E and E6Pro genes were prepared and used to establish the stable transduced cervical keratinocytes or HCK1T cells. The oncogenic properties of E6D25E such as cell proliferation, p53 degradation and expression of interferon regulatory factors (IRFs) as well as the specific effects on miR-21, histone deacetylases 6 (HDAC-6) were investigated and compared to E6Pro. The result showed that E6D25E protein still maintains E6 function by binding with E6AP protein. E6D25E induces cell proliferation by extension of cell life span, the Proliferation Doubling time of the E6D25E and E6-Pro expressing HCK1T cells are comparable as well as degradation of p53 protein and p21 protein, which is a hallmark of cancer cell. Moreover, E6D25E and E6Pro exhibited the different effects on IRF genes.; E6D25E suppressed IRF-1 and IRF-7 corresponding with low level of IFN α and β , whereas the E6Pro suppressed IRF-3. For activity on epigenetic change, E6D25E showed higher activity of miR-21 induction than E6Pro in transient transfection model, corresponding with the stable transduced HCK1T cells treated with Hela-CM than treated with CM that miR-21 was higher upregulated in E6D25E than E6Pro expressing HCK1T. In addition, E6-Pro protein induced high HDAC6 expression but could not observe by E6D25E. Interestingly, 9 spots of protein profile were detected with significant different intensity between E6D25E and E6 Pro expressing HCK1T. These result demonstrated that E6D25E maintains the oncogenic properties similar to E6Pro and has different specific activities from E6Pro on invasion of the innate immunity and high ability of HPV persistent promotion that support high potential oncogenicity of HPV16 As variant.

Keyword: HPV16; HPV16 Asian variant; E6D25E; oncogenic properties; cervical cancer.