



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “คุณลักษณะเฉพาะของโปรตีน E6 ของ
human papillomavirus 16 Asian variant ในการก่อมะเร็งปากมดลูก”
(Characteristics of the Asian HPV16 E6 variant
in cervical carcinogenesis)

โดย

รศ.ดร.พญ. แจ่มใส เพียรทอง และคณะ

สิงหาคม 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “คุณลักษณะเฉพาะของโปรตีน E6 ของ
human papillomavirus 16 Asian variant ในการก่อมะเร็งปากมดลูก”
(Characteristics of the Asian HPV16 E6 variant
in cervical carcinogenesis)

คณะผู้วิจัย

รศ.ดร.พญ. แจ่มใส เพียรทอง (หัวหน้าโครงการ)

รศ. พญ. ทิพย์ เอกลักษณะนันท์ (ผู้ร่วมวิจัย)

สังกัด

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สกอ. และมหาวิทยาลัยขอนแก่น

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. สกอ. และ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “คุณลักษณะเฉพาะของโปรตีน E6 ของ human papillomavirus 16 Asian variant ในการก่อมะเร็งปากมดลูก” (Characteristics of the Asian HPV16 E6 variant in cervical carcinogenesis) เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการก่อมะเร็งปากมดลูกซึ่งยังไม่ทราบได้ชัดเจนว่าเกิดขึ้นได้อย่างไร โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนพัฒนานักวิจัย ประเภททุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลางในสถาบันอุดมศึกษา ประจำปี 2553 ตามโครงการความร่วมมือระหว่างสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากับสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ มหาวิทยาลัยขอนแก่นเป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุนทำให้การทำวิจัยสำเร็จได้ตามวัตถุประสงค์ โครงการวิจัยนี้สำเร็จได้จากความร่วมมือของ Tohru Kiyono, MD, PhD (Chief, Division of Virology, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan) และ รศ.ดร.สมชาย ปิ่นละออ (ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

รศ.แจ่มใส เพียรทอง
(หัวหน้าโครงการวิจัย)

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	7
วิธีการทดลอง	7
ผลการทดลอง	20
สรุปผลการวิจัย	43
บทวิจารณ์	45
หนังสืออ้างอิง	49
Output จากโครงการ	55
ภาคผนวก	56

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.

1. บทนำ

โรคมะเร็งปากมดลูกพบเป็นอันดับ 1 ของมะเร็งทุกชนิดในสตรีไทย จึงยังถือว่าโรคนี้มีความสำคัญและเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขของประเทศไทย จากการศึกษาระบาดวิทยาของมะเร็งปากมดลูกในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้แก่ อินโดนีเซีย มาเลเซีย ไทย และเวียดนาม พบว่ามะเร็งปากมดลูกจัดเป็นมะเร็งที่พบมากเป็นอันดับ 1 ในสตรีไทยและเวียดนาม อีกทั้งยังเป็นสาเหตุการตายของสตรีเป็นอันดับ 3 ในไทย การศึกษาในประชากรเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มี incidence ของมะเร็งปากมดลูก (age-standardized rate, ASR) ในอินโดนีเซียและมาเลเซียเท่ากับ 15.7 ต่อ 100,000 ในขณะที่พบค่า ASR สูงขึ้นใน ไทย (ASR = 19.8) เวียดนาม (ASR = 20.2) และฟิลิปปินส์ (ASR = 20.9) ตามลำดับ ในไทยพบว่าอายุของสตรีที่สามารถตรวจพบมะเร็งปากมดลูกจะเริ่มจาก 20 ปีเป็นต้นไป และพบสูงสุดในสตรีที่มีอายุ 45-50 ปี โดยส่วนใหญ่แล้วจะตรวจพบในระยะท้ายๆ ของการเกิดโรค โดยมักตรวจพบเป็น International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage II (51%) และ stage III (31%) อีกทั้งยังพบว่ามี overall 5-year survival เป็น 68.2% ในเชียงใหม่ และ 54.5% ในขอนแก่น [1]

สาเหตุสำคัญของมะเร็งปากมดลูกคือ การติดเชื้อ high risk human papillomavirus (HR-HPV) โดย HPV จัดอยู่ใน family *Papillomaviridae* เป็น non-envelope viruses ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 55 นาโนเมตร มีจีโนมเป็นวงกลม สายคู่ (double stranded DNA) ขนาดประมาณ 8000 คู่เบส แคปซิดมีการเรียงตัวแบบ icosahedral symmetry ประกอบด้วยแคปโซเมอร์ 72 หน่วย และ ไม่มีเอนเวลโลป [2] HPV genome ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ non-coding URR (upstream regulatory region) ประมาณ 1 kb, early region ประกอบด้วย open reading frames (ORFs) สำหรับ encode โปรตีนของ E6, E7, E1, E2, E4 และ E5, และ late region ประกอบด้วย 2 ORFs สำหรับ encode โปรตีน 2 ชนิด คือ L1 ซึ่งเป็น major capsid protein และ L2 เป็น minor capsid protein [3] HPV ตรวจพบมากกว่า 120 genotype ในกลุ่มที่ติดเชื้อบริเวณ mucosal epithelium สามารถจัดแบ่งเป็นกลุ่ม low risk HPV และ high risk HPV ตามความสามารถในการก่อให้เกิดรอยโรคหรือ lesion โดย low-risk HPV สามารถทำให้เกิด benign genital warts ได้แก่ HPV6 และ 11 ส่วน high-risk HPV เช่น HPV16, 18, 31, 33, 45, 58 และ 56 พบว่าทำให้เกิด cervical cancer โดยสามารถตรวจพบ HPV DNA ได้ถึง 99% ของ cancer [4] ในการศึกษาความชุกของการติดเชื้อ HPV พบว่าการติดเชื้อ HPV16 และ HPV58 เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคมะเร็งปากมดลูกได้ 50% และ 20% ของการเป็นโรคมะเร็งปากมดลูกทั้งหมด [5] การก่อโรคมะเร็งปากมดลูกเนื่องจากการติดเชื้อ HR-HPV จะเกี่ยวข้องกับ viral oncoprotein E6 และ E7 ซึ่งสามารถชักนำให้เซลล์ติดเชื้อเกิด transformation และ immortalization ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้อย่างไม่สิ้นสุด กลายเป็นเซลล์มะเร็ง โดยการติดเชื้อทั้ง LR-HPV และ HR-HPV ที่เซลล์เยื่อบุปากมดลูกบริเวณ transformation zone จะสามารถก่อให้เกิดเซลล์ผิดปกติ เรียกว่า koilocyte atypia แต่ส่วนใหญ่ 90% ของผู้ติดเชื้อมักจะสามารถกำจัดเชื้อ (viral clearance) และเซลล์ติดเชื้อจะกลับคืนสู่ภาวะเซลล์

ปกติ (spontaneous regression) เนื่องจากผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยเฉพาะผู้ที่ยังมีอายุน้อยเชื่อว่าหายไปหมดภายใน 1-3 ปี [6] อย่างไรก็ตามขึ้นอยู่กับสถานะของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้น แต่มีบางกลุ่มโดยเฉพาะผู้ที่ติดเชื้อกลุ่ม HR-HPV อาจพบการติดเชื้อยาวนาน เรียก การติดเชื้อแบบยืดเยื้อ (persistent infection) ซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญของการเกิดมะเร็งปากมดลูกได้ถ้าเซลล์ติดเชื้อนี้เพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปเป็น cervical intraepithelial neoplasia II หรือ III (CINIII) ต่อไป การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะมีปัจจัยร่วมแตกต่างกันไป และมีหลายชนิด เช่น HR-HPV genotype ต่างกันจะมีผลต่อการเกิด persistent และ รอยโรค ได้ในระดับต่างกัน จากการศึกษาในผู้หญิงภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีภาวะมะเร็งปากมดลูกพบค่าความเสี่ยงในการเกิดโรค (odd ratio, OR) ประมาณ 130.6 (95% CI 11.7–1457.0) เมื่อมีการติดเชื้อในกลุ่ม HR-HPV และมีรายงานว่า ค่า OR ของการติดเชื้อ HPV 16, 18 and 16/18 กับการมีภาวะมะเร็งปากมดลูกคือ 12.3, 3.2 and 15.7 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ HPV [7] อย่างไรก็ตาม ปัจจัยด้านปริมาณของไวรัส (viral load) ก็ถูกรายงานว่ามีผลในการตรวจวินิจฉัยได้ เช่นใน ระยะที่มี low viral load จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แต่ในระยะที่มี high viral load จะมีผลที่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่มี low viral load ดังกล่าวนี้อุบัติการณ์การของการตรวจพบภาวะของเซลล์ผิดปกติได้ (accumulate risk) ร้อยละ 25-40 ที่ 1-3 ปีหลังการตรวจพบ HPV DNA จึงเป็นอีกภาวะหนึ่งของการเกิด persistent infection [8]

ในภาวะของ HPV persistent infection มีกลไกการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันของ host ได้หลายวิธี ซึ่งลักษณะจำเพาะ life cycle ของ HPV แบบ non-lytic life cycle นั้นเป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้ HPV สามารถหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยเมื่อติดเชื้อ HPV แล้วไม่พบว่ามีอาการอักเสบและมีผลเกิดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ต่ำ การไม่พบ dendritic cells ในบริเวณ lesion ทำให้ไวรัสสามารถหลบหลีกอยู่ในเซลล์ได้เป็นระยะเวลานานและไม่ถูกกำจัดด้วยระบบภูมิคุ้มกันได้ [9] จาก non-lytic life cycle นี้เองทำให้เกิดการบกพร่องในการสร้างและ processing ของ antigen (Ag) ให้กับ adaptive immune response และ HPV ยังมีการสร้างโปรตีนที่เป็น non-secreted proteins ได้แก่ early protein E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 ในระดับต่ำและพบในบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันไม่สามารถตรวจเจอ [10-12] นอกจากนี้ E6 และ E7 ของ HR-HPV มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกันได้ โดย E6 มีผลต่อขั้นตอนการ processing และการนำเสนอของแอนติเจน โดย HPV positive tumor cells นั้นไม่มีประสิทธิภาพในการนำเสนอแอนติเจน ซึ่งแสดงถึงการลดการนำเสนอของ human leukocyte antigen (HLA) class I, proteasome subunits low molecular mass protein (LMP) 2 and 7 และ the transporters of antigenic peptides (TAP) 1 และ 2 ใน cervical carcinoma cell lines [13] นอกจากนี้ HR-HPV E6 และ E7 oncoprotein ยังรบกวนการสร้าง IFN type I ของเซลล์ที่ติดเชื้อและลดการทำงานของ IFN type I ได้ โดยพบว่า HPV E7 ไปยับยั้ง Interferon-sensitive response element (ISRE) [14] รวมถึงกลไกในการยับยั้ง IFN- α -mediated signal transduction โดยผ่านการจับกันของ p48/IRF-9 (interferon regulatory factor 9) และป้องกันการเข้าสู่นิวเคลียส ทำให้ไม่มีการจับของ Interferon-

stimulated gene factor 3 (ISGF3) transcription complex ที่ ISRE ในนิวเคลียสได้ [15, 16] E7 protein มีกลไกที่ไปรบกวน IFN-mediated signaling โดยการยับยั้ง IRF-1 mediated activation ของ IFN- β promoter ด้วยการ recruitment histone deacetylase ไปยังบริเวณ promoter และทำให้เกิดการ transcription ของ IFN- β ได้ [17] ใน In vivo พบว่า HPV18 E7 ลดการแสดงออกของ IRF-1 target genes เช่น TAP-1, IFN- β และ monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1) โดยผ่านการยับยั้ง trans-activation function ของ IRF-1 [18] สภาวะที่มี E7 protein พบว่าสามารถยับยั้ง NF- κ B DNA binding activity และทำให้ไม่เกิด NF- κ B-induced gene expression ได้ [19] HPV E6 protein สามารถจับกับ IRF-3 ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้ง trans-activation function ของ IRF-3 ซึ่งทำให้ไม่มีการ transcription ของ IFN- β mRNA [20] E6 ยังสามารถจับกับ Tyk2 และขัดขวางการจับของ Tyk2 กับ cytoplasmic portion ของ IFN- α receptor 1 และยับยั้งการ phosphorylation ของ Tyk2, STAT-1 และ STAT-2 ทำให้เกิดความบกพร่องของ Jak-STAT activation ซึ่งไปรบกวน IFN- α mediated signaling ได้ [21] HPV16 E6 และ E7 protein ยังสามารถยับยั้งการสร้าง cytokine และ chemokine ที่มีความสำคัญในการ recruitment ของ immune cell เช่น Langerhans cell ให้มายังบริเวณที่มีการติดเชื้อ เช่น การยับยั้งการสร้าง CCL20 ซึ่งเป็น chemokine ที่สร้างจาก infected cell โดยผ่าน NF- κ B pathway [22] การ recruitment ของ LC มายังบริเวณ lesion นั้น นอกจากต้องใช้ chemokine แล้ว พบว่า adhesion molecules ก็มีผลต่อการ migration ของ LC โดยในสภาวะปกติพบว่า LC มีการ express adhesion molecules like E-cadherin [23] ICAM-1, VCAM-1 [24], LFA-3 [25] เป็นต้น แต่ไม่พบการ expression ของ adhesion หรือ co-stimulation molecule โดย epithelial LC ใน pre-malignant หรือ malignant cervical biopsy specimens [26]

การศึกษา HPV 16 genome พบว่ามีการเกิด intratype variants ซึ่งมี gene variation ร้อยละ 2 และ genome แตกต่างกับ prototype เชื่อว่าการเกิด gene variation ใน oncogene มีผลต่อความสามารถในการก่อมะเร็งปากมดลูก เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงเบสใน genome ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง การเกิด variation ของจีน E6 และ E7 พบได้บ่อยในตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ในการทำให้เกิด cell transformation และการหลบหลีกต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษา HPV variants พบว่ามี variant เกิดขึ้นแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาคประเทศ อาทิเช่น European variants จะพบได้มากที่สุดในยุโรป และอเมริกาเหนือ ส่วน Asian variants พบได้มากที่สุดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ Africa variants พบมากที่สุดในแอฟริกา และ Asia-American variants พบมากที่สุดที่อเมริกากลางและอเมริกาใต้ HPV16 variants ที่พบในปัจจุบันได้แก่ European (E), Asian (As), Asian-American (AA), African-1 (Af-1), African-2 (Af-2) และ North American-1 (NA-1) variants โดยในแต่ละภูมิภาคของโลกจะพบ variants ได้แตกต่างกัน [27] ล่าสุด Cornet และคณะ (2013) ได้จัดกลุ่ม HPV16 variants ออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่ 1) European Asian (ประกอบด้วย sublineages European (EUR) และ Asian (As) 2) African 1 (AFR1) 3) African 2 (AFR2) และ 4) Asian American/North American (AA/NA) ซึ่งประกอบไปด้วย sublineages Asian American 1, Asian American 2 และ North American [28]

การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า variant มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งได้มากกว่า prototype อาทิเช่น Zehbe และคณะ (1998) พบ HPV16 variant และ HPV16 prototype ร้อยละ 94 และร้อยละ 6 ของมะเร็งปากมดลูกตามลำดับ ในขณะที่เนื้อเยื่อปากมดลูกที่ผิดปกติในระดับ 3 (CIN III) พบ HPV16 prototype และ variant ใกล้เคียงกันคือร้อยละ 44 และ 56 การศึกษาในผู้หญิงแม็กซิกันที่มีความชุกของการติดเชื้อ HPV ในมะเร็งปากมดลูก ร้อยละ 87 พบ HPV16 variant ในเซลล์ผิดปกติชนิด low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) เป็น European prototype (EP) ร้อยละ 66% และ European (E) variant ร้อยละ 33% ขณะที่ในมะเร็งพบชนิดของ variant เป็น EP, AA และ Af โดยจะพบ AA มากที่สุด (ร้อยละ 44) และการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า HPV16 AA variant มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกที่รุนแรง โดยมีความเสี่ยง (OR) สำหรับความสัมพันธ์ในการเกิดมะเร็งปากมดลูกเท่ากับ 27 เท่าซึ่งสูงกว่าใน E variant ที่มีค่าเท่ากับ 3.4 เท่า และ HPV16 AA variant มักจะพบในผู้ป่วยที่มีอายุน้อย โดยเฉลี่ยประมาณ 7.7 ปี ซึ่งน้อยกว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPV16 EP [29] กลุ่มวิจัยของ Berumen และคณะ (2001) และกลุ่มของ del Refugio Gonzalez-Losa M และคณะ (2004) ทำการศึกษามะเร็งปากมดลูกซึ่งพบสูงมากในประเทศแม็กซิโก และหาความสัมพันธ์กับการเกิด variation ของเชื้อ HPV16 ทำการตรวจสอบโดยใช้ PCR ในการศึกษาพบ HPV16 กลุ่ม AA variants และกลุ่ม E variant โดยพบกลุ่ม AA ในตัวอย่างที่เป็นมะเร็งปากมดลูกมากกว่าในกลุ่มควบคุมที่เป็น prototype จากการศึกษาได้แนะนำว่าการเกิด variations ของเชื้อ HPV16 น่าจะมีความสัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูกที่รุนแรง [30, 31] Radhakrishna Pillai M และคณะ ศึกษาการเกิด variation ในโปรตีน E6 และ E7 ของเชื้อ HPV16 ที่แยกมาจากเซลล์และชิ้นเนื้อปากมดลูก และพบ specific mutation ภายในโปรตีน E6 ของเด็กผู้หญิงอินเดียที่ถูกวินิจฉัยว่ามีเนื้อเยื่อปากมดลูกผิดปกติระดับ High grade SIL(HSIL) และ squamous cervical carcinoma (SCC) จากการศึกษาพบว่าการเกิดโปรตีน E6 mutation ในเชื้อ HPV16 และมีผลร่วมกับการทำลาย p53 น่าจะเพิ่มการเกิดมะเร็งที่รุนแรงกว่า HPV 16 prototype [32] Tornesello ML และคณะ (2004) ศึกษาการเกิด HPV16 variations โดยศึกษา E6 gene จากตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ถูกวินิจฉัยเป็น CIN I, II, III และ SCC ในผู้หญิงชาวอิตาลี โดยพบได้มากคือ variant ที่มีลำดับเบสของ E6 gene เปลี่ยนจาก G ไปเป็น T ที่ตำแหน่งที่ 350 (E6G350T) ขณะที่ E6 gene prototype พบในกลุ่มควบคุม (คนปกติ) ร้อยละ 43.7 ในกลุ่ม CIN I ร้อยละ 41.2 กลุ่ม CIN II ร้อยละ 28.6 และในกลุ่มที่เป็นมะเร็ง พบร้อยละ 11.1 จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ HPV16 variants ในเซลล์มะเร็งนั้นน่าจะมีความสามารถในการก่อมะเร็งได้มากกว่ากลุ่มที่เป็น prototype ดังนั้นความสัมพันธ์กับการก่อมะเร็งของ HPV16 variant แต่ละนี้ อาจจะมีกระบวนการทำให้เกิดโรคที่แตกต่างไป และอาจจะเกิดการสูญเสียการควบคุมการแสดงออกของ oncoprotein ดังนั้นการเกิด HPV16 variants แต่ละชนิดที่ต่างกันอาจมีผลต่อความรุนแรงที่ทำให้การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ปากมดลูกและการพัฒนามากลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ต่างกัน [33] Tornesello ML และคณะ (2011) ศึกษา viral genotype และ HPV16 intratypic variants ในเซลล์มะเร็งแบบ adenocarcinoma และ SCC ในผู้หญิงชาวอิตาลี และพบว่า HPV16 ถูกพบมากที่สุดคิดเป็น 64% และ 73% ในมะเร็ง adenocarcinoma และ SCC ตามลำดับ

โดยพบ variant ที่เป็น AA ร้อยละ 33 ในมะเร็ง adenocarcinoma และพบร้อยละ 20 ใน SCC จากการศึกษาเป็นการยืนยันว่า HPV16 variant โดยเฉพาะ AA variant เป็นปัจจัยเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก รวมทั้งมะเร็ง adenoglandular ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ HPV16 E variants โดยอาจจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการก่อมะเร็งของ variant ที่เกิดขึ้น (oncogenic properties) [34]

มีรายงานว่า nucleotide variation ที่เกิดขึ้นใน gene E6 ทำให้เกิด กรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลงไปในส่วนของโปรตีน E6 ที่ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับ transforming activity และมีผลทำให้ degrade p53 ได้เร็วขึ้น [35] และมีความสำคัญต่อ host immune recognition โดยมีผลทำให้หลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ [36] Chakrabarti O และคณะ (2004) ได้ศึกษาถึงกระบวนการก่อโรคที่มีความสัมพันธ์กับ HPV16 E variants ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (E6L83V) และมีผลต่อการเกิดมะเร็งปากมดลูกที่รุนแรงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ E6 prototype พบว่า E variant ชนิดนี้จะทำให้เกิดการสูญเสียการควบคุมการแสดงออกของ Notch1 ซึ่งเป็น transmembrane receptor จากผลการกระตุ้น Notch1 เชื่อว่าจะทำให้เกิด anti apoptosis signal ขึ้น และยังมีส่วนขัดขวาง p53 induce cell death ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงผิดปกติเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้เร็วขึ้น [37] การแสดงออกของโปรตีน E6 ในเซลล์ติดเชื้อจะเป็นการนำเสนอแอนติเจนต่อ cytotoxic T lymphocytes (CTLs) หลังจากมีการจับกับ human leukocyte antigen (HLA) class I นอกจากนี้ โดยเฉพาะ HPV16 variant พบว่ามีความสัมพันธ์กับ HLA B-7 allele ซึ่งทำให้เป็นปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก [38] จากข้อมูลดังกล่าวนี้จึงได้มีสมมุติฐานว่า HPV16 variant ที่จำเพาะต่อ HLA B-7 allele จะมีโอกาสที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับ prototype ในการหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและสามารถบุกรุกระบบภูมิคุ้มกัน ผ่านกระบวนการของระบบ HLA class I alleles ซึ่งมีความแตกต่างกันในกลุ่มประชากรที่ต่างกันจึงทำให้มีความเสี่ยงในการพัฒนาไปเป็นมะเร็งเกิดขึ้นแตกต่างกัน ในกลุ่มที่ติดเชื้อ HPV16 variant ชนิด As variants พบ E6 gene variation โดยมีการเปลี่ยนแปลงจาก G ไปเป็น T ที่ตำแหน่ง 178 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Aspartic Acid ไปเป็น Glutamic Acid ที่ตำแหน่ง 25 (E6D25E) และพบว่าการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 25, 27, 58, 78 and 83 จะสัมพันธ์กับ host immune recognition 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 จึงน่าจะมีผลต่อการจดจำของ T cells [39] ปัจจุบันบทบาทของ HPV16 E6 variations ต่อความรุนแรงของการเกิดมะเร็งปากมดลูกยังไม่สามารถอธิบายได้ แต่พบได้ว่า HPV16 E6 variations ที่เกิดขึ้นจะมีกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงพบได้ในตำแหน่งที่มีความสำคัญในการจดจำโดยระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้น HPV16 E6 variations ที่เกิดขึ้นน่าจะมีโอกาสที่เหนือกว่า prototype และมีบทบาทในการทำให้เกิด cell transformation และ บุกรุกระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้เกิดโรครุนแรงได้ [29] Chopjitt และคณะ (2009) ได้ตรวจหา HPV DNA ในเนื้อเยื่อปากมดลูก

ของสตรีภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพบการติดเชื้อ HPV16 ได้บ่อยที่สุดทั้งในเนื้อเยื่อปากมดลูก ปกติและมะเร็งปากมดลูก เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสใน HPV16 E6 gene ที่พบ ในมะเร็งปากมดลูกของสตรีภาคตะวันออกเฉียงเหนือเทียบกับ HPV16 prototype พบ HPV16 As variant ถึงร้อยละ 74 ซึ่งมี variation ในส่วนของ E6 oncogene ที่มีบทบาทสำคัญในการก่อมะเร็ง [40] ในปี 2011 Jang M และคณะ (2011) ศึกษา HPV16 E6 D25E หรือ As variants ว่ามีผลต่อการพัฒนาไปเป็นมะเร็งหรือไม่ โดยใช้วิธี oligonucleotide microarray ในการบ่งชี้รูปแบบการแสดงออกของจีนที่เปลี่ยนแปลงไปจาก E6 prototype และ E6 D25E ใน HPV negative cancer cells (C33A) และพบจีนทั้งหมด 211 ชนิด มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (อย่างน้อย 1.5 เท่า $p < 0.05$) ซึ่งในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ HPV16As variant, E6 D25E นั้นพบว่า มีจีนจำนวน 14 ชนิด ที่มีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไป โดยมีจีน 9 ชนิดมีการแสดงออกลดลง ได้แก่ ZMZ1, RPL23, MAPK4, RPL31, RARA, LAMB3, HSPA14, AIFM2, IFRD1 และ 5 ชนิดที่เหลือมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ได้แก่ UBC, RPS9, HLA-A, -B, ROCK2 เมื่อเปรียบเทียบกับ E6 prototype และเมื่อศึกษาหน้าที่การทำงานของจีนเหล่านี้ ก็พบว่ามีข้องเกี่ยวกับการพัฒนาไปเป็นมะเร็ง เช่น จีน AIFM2 ทำหน้าที่เป็น pro-apoptotic และพบว่ามันมีการแสดงออกลดลงในเซลล์มะเร็งเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ ดังนั้น E6-D25E อาจจะเกี่ยวข้องกับการส่งเสริมการรอดชีวิตของ HPV-infected cells ได้ นอกจากนี้ยังมี จีน RPL23 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ cell cycle และ apoptosis โดยจีน RPL23 จะรักษาเสถียรภาพของ p53 ไม่ให้ถูกทำลาย และสามารถเข้าสู่ cell cycle ในระยะพักหรือ checkpoint และหรือเกิด apoptosis ได้ และจีน ROCK2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ kinase ทำหน้าที่สำคัญในการส่งเสริมการเกิด centrosome duplication และ amplification โดยเอนไซม์นี้ถูกพบว่ามี การแสดงออกมากในเซลล์มะเร็งหลายชนิดและเป็นสาเหตุหลักในการเกิด Chromosomal instability จากการศึกษาทำให้สามารถอธิบายได้อย่างคร่าวๆว่า E6-D25E ของ HPV16As variant นี้ มีผลในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องหรือส่งเสริมการเกิดหรือการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูกได้ [41]

การตรวจหา HPV DNA ในเซลล์ปากมดลูกของสตรีภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบการติดเชื้อ HPV16 ได้บ่อยที่สุดซึ่งไม่แตกต่างจากรายงานที่พบทั่วโลก โดยพบการติดเชื้อทั้งในเซลล์ปากมดลูก ปกติ และในเซลล์มะเร็งปากมดลูก และพบว่าการติดเชื้อ HPV16 ในสตรีเอเชียรวมทั้งสตรีไทยส่วนใหญ่เป็น HPV16 As variant ซึ่งเป็นผลจากการเกิด intratypic variation โดยเฉพาะ variation ในส่วนของจีน E6 ซึ่งเป็น oncogene ที่มีบทบาทสำคัญในการก่อมะเร็ง ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของจีน HPV16 E6 ที่พบในสตรีภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เทียบกับ HPV16 prototype พบ HPV16 As variants ถึงร้อยละ 60-70 ของมะเร็งปากมดลูก [42, 43] กลุ่มวิจัยนี้จึงมีสมมุติฐานว่าเมื่อจีน E6 เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจะทำให้โปรตีนที่ถูกสร้างออกมามีคุณสมบัติในการทำงานเปลี่ยนแปลงไป และโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant น่าจะมีประสิทธิภาพการในการก่อมะเร็งสูงกว่าโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype ซึ่งจะเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งได้มากกว่าการติดเชื้อ HPV16 prototype

ดังนั้นการวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาว่า โปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant มีคุณลักษณะพิเศษในการก่อโรคมะเร็งปากมดลูกที่รุนแรงกว่า HPV16 prototype อย่างไร โดยสร้าง E6 expression vectors ที่มี E6 ของเชื้อ HPV16 As variant ที่ได้จากตัวอย่างแตกต่างกัน และมี E6 ของเชื้อ HPV16 prototype สำหรับนำมาใช้ตรวจสอบคุณลักษณะเฉพาะ โดยนำ constructed vectors ที่ได้ transfect ใน packaging cell line (293T) เพื่อเตรียมไวรัสที่มีจีโนม E6 ที่ต้องการ แล้วทำ transduction เข้าใน human cervical keratinocyte (HCK1T) และ human foreskin keratinocyte (HFK) และศึกษาความสามารถที่ทำให้เกิด immortalized keratinocyte ขึ้น โดยตรวจสอบ การแสดงออกของโปรตีน E6 ทดสอบหา population doubling times (PDs) ทดสอบคุณสมบัติในการก่อมะเร็ง เช่น p53 และ p21 degradation โดยวิธี western blot และศึกษาความสามารถในการยับยั้ง การแสดงออกของจีนในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ผลการเปลี่ยนแปลงทาง epigenetic และการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนโฮสต์ (protein profile) ด้วย

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 2.1 เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variants
- 2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการก่อมะเร็งของ E6D25E โปรตีน
- 2.3 เพื่อศึกษาถึงผลของ E6D25E โปรตีน ต่อการแสดงออกของจีนในระบบภูมิคุ้มกัน
- 2.4 เพื่อศึกษาถึงผลของ E6D25E โปรตีน ต่อการเปลี่ยนแปลงทาง epigenetic
- 2.5 เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนใน cervical keratinocytes (HCK1T) ที่ถูก transduced โดย E6 gene ของเชื้อ HPV16 As variants เปรียบเทียบกับ prototype

3. วิธีการทดลอง

3.1 การสร้างเวกเตอร์

3.1.1 การสร้าง expression vectors ของ E6 genes

3.1.1.1 การเตรียม DNA ของ HPV16 As variants และ HPV16 prototype

สำหรับการศึกษานี้ DNA ของ HPV16 prototype ได้ใช้ HPV reference plasmid ส่วน HPV16 As variants ได้คัดเลือกมาจาก DNA ที่สกัดจากตัวอย่างชิ้นเนื้อ (paraffin embedded biopsies) ที่มีผล pathology เป็น SCC ซึ่งได้รับการศึกษาและทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจากการศึกษาของผู้วิจัยก่อนหน้านี้ [40] จาก DNA ดังกล่าวได้ทำการเพิ่มปริมาณ E6 gene โดยออกแบบ primers ให้มีตำแหน่งจำเพาะกับลำดับ nucleotide ของ E6 gene ช่วงตำแหน่งที่ 83-559 (ข้อมูลจาก GeneBank: K02718) และเหมาะสมกับการต่อเข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ชนิด

pcDNA™3.2/V5 Gateway® Directional TOPO® (Invitrogen) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ดังแสดงด้านล่าง

HPV16 E6 forward primer: 5'-**CACCATGCACCAAAGAGAACTGC**-3'

HPV16 E6 reverse primer: 5'-**GAGCAGCTGGGTTTCTCTACGT**-3'

ทำการเพิ่มจำนวน gene E6-prototype และ gene E6-As variants ด้วยวิธี PCR ตาม condition ดังนี้ 95 °C for 5 min; followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min and 72 °C for 2 min; final extension at 72 °C for 7 min ได้ PCR product ขนาดประมาณ 500 bp

3.1.1.2 การสร้าง expression vectors ของ E6-prototype และ E6-As variants ของเชื้อ HPV16

นำ PCR products ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ E6 gene ของ HPV16 prototype และ HPV16 As variant ไปเตรียมความเข้มข้นให้ได้ตามที่กำหนดแล้วเติมลงใน cloning reaction tube (ประกอบด้วย Fresh PCR products, salt solution, water, TOPO® vector) จากนั้นทำการ transformation เข้าไปใน competent cells *E. coli* และคัดเลือกโคลนโดยใช้ LB plates ที่เติม Ampicillins 100 µg/ml นำโคลนที่ได้ไปเพิ่มจำนวนโดยทำการเลี้ยงใน LB broth ที่มี Ampicillins 100 µg/ml ที่ incubator shaker 37°C overnight จากนั้นนำโคลน ที่ได้ไปต้ม 100°C 5 นาที แล้วใช้เป็น template ในการทำ PCR เพื่อตรวจหาจีโนม E6 นำโคลนที่มีจีโนม E6 ไปสกัดพลาสมิดโดยใช้ Quick Plasmid Miniprep kit (Invitrogen) จากนั้นทำการตรวจสอบพลาสมิดโดยการนำไปตัดด้วย restriction enzyme โดยนำไปตัดด้วยเอนไซม์ *Not I* และ *Apa I* (Fermentas) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถตัดพลาสมิดที่สร้างขึ้นได้ 2 ตำแหน่ง คือ ตรงบริเวณพลาสมิด 1 ตำแหน่ง และบริเวณจีโนมที่เชื่อมใส่เข้าไปอีก 1 ตำแหน่ง ดังนั้นเมื่อตัดพลาสมิดที่มีจีโนมที่สนใจแล้วนำไปแยกโดยการ run ด้วย 0.7% agarose gel จะพบแบน 2 ขนาด ได้แก่ 5500 bp และ 500 bp และทำการยืนยันผลอีกครั้งด้วยการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับ nucleotide โดยการ sequencing

3.1.2 การสร้าง virus vectors ได้แก่ retrovirus และ lentivirus vectors

Retrovirus vectors ประกอบด้วย pCLXSN16E6D25E, pCLXSN16E6SD-D25E และ pCLXSN16E6D25E/E7

Lentivirus vectors ประกอบด้วย CSII(ins)-TRE-Tight-16E6D25E, CSII(ins)-TRE-Tight-16E6SD-D25E และ CSII(ins)-TRE-Tight-16E6D25E/E7

3.1.2.1 การสร้าง Entry vectors ที่มี HPV16 E6D25, HPV16E6SD-D25E และ HPV16E6D25E/E7

สร้าง Entry clones ด้วย QuickChange® II site-directed mutagenesis kit (Stratagen) โดยให้

- pENTR(DONR)201-16E6 เป็น template สำหรับสร้าง pENTR(DONR)201-16E6D25E

- 16E6 คือ จีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype
- pENTR(DONR)201-16E6SD เป็น template สำหรับสร้าง pENTR(DONR)201-16E6SD-D25E
- 16E6SD คือ จีน E6 ของเชื้อ HPV16 ที่เกิด splicing ตรึงนิวคลีโอไทด์ G ที่ตำแหน่ง 226
- pENTR(DONR)201-16E6E7 เป็น template สำหรับสร้าง pENTR(DONR)201-16E6D25E/E7
- 16E6E7 คือ จีน E6 และจีน E7 ของเชื้อ HPV16 prototype

จากนั้นทำการออกแบบ mutagenesis primers ได้ดังนี้;

F: 16E6D25toE25A; 5' AACAACTATACATGAaATAATATTAGAATGT

R: 16E6D25toE25AS; 5' ACATTCTAATATTATtTCATGTATAGTTGTT

เตรียม master mix และทำ PCR ตามขั้นตอนของ QuickChange® II site-directed mutagenesis kit จากนั้น นำ PCR product ที่ได้ มาตัดด้วย DpnI ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไป run gel เพื่อตรวจสอบ PCR product ที่ได้ โดยจุด PCR product 2 µl ใส่ลงใน tube ที่มี competent cell (GT116) 40 µl, incubate on ice 10 นาที, 42°C 1 นาที และ on ice 2 นาที. แล้วเติม S.O.C. medium 400 µl และนำไป incubate ที่ shaker incubator 37°C นาน 45 นาที จุด 150 µl มา spread บน LB medium ที่มี Kanamycin (LB+Km plate) แล้วเลือกโคโลนีใส่ลงใน LB + Km broth แล้ว incubate 6-8 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี mini preparation ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการ sequencing พลาสมิด Entry vectors ที่ได้นี้จะนำไปใช้ในการ สร้าง retrovirus และ lentivirus ต่อไป

3.2 การ transfection

เตรียมเซลล์ที่ต้องการ อายุ 1 วัน ใน plate เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี fetal bovine serum (FBS) และไม่มียาปฏิชีวนะ ปริมาณ ครึ่งหนึ่งของอาหารเลี้ยงเซลล์เดิม แล้วนำไปบ่มต่อที่ตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO₂ เพื่อรอการ transfection ทำตามคู่มือของ Lipofectamine 2000 และ TransIT293 Transfection reagent โดยจะกำหนดความเข้มข้นของพลาสมิด (expression vectors) และปริมาณของ lipofectamine 2000 ที่เหมาะสมในแต่ละขนาดของ plate เลี้ยงเซลล์มาให้ หลังจากผสมพลาสมิดกับ lipofectamine 2000 แล้วหยดลงบนเซลล์ที่เตรียมไว้ หมุนเบาๆ เพื่อผสมให้ transfection reagent กระจายให้ทั่วเซลล์ นำไปบ่มต่อที่ตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 6 ชม. เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกไป แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่มี 10% FBS แต่ไม่มียาปฏิชีวนะเข้าไปแทน แล้วบ่มต่อที่ตู้บ่ม 37°C ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นเก็บเซลล์เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3 การสร้าง transduced cervical keratinocyte หรือ HCK1T ด้วยการติดเชื้อ HPV16 E6 As variant (E6-D25E) และ HPV16 Prototype (E6-Pro)

3.3.1 การสร้าง retrovirus และ lentivirus vectors ที่มี HPV16 E6D25, HPV16E6SD-D25E และ HPV16E6D25E/E7

การสร้าง retrovirus และ lentivirus vectors โดยใช้ Gateway system ใน LR reaction (Gateway system, Invitrogen) เตรียม LR master mix ซึ่งประกอบด้วย Entry vectors (pENTR(DOR)201), Destination vector (pCLXSN-rfA/CSII(ins)-TRE-Tight-RfA) และ LR clonase II Mix จากนั้น incubate at 25°C overnight จากนั้นเติม 0.3 µl Proteinase K solution incubate ที่ 37°C นาน 10 min แล้วทำการ transform เข้า competent cell (GT116) หลังจากนั้นเลือกโคโลนี ลง LB broth ที่มี Ampicillin (100 µg/ml) และสกัด plasmid vectors ด้วยวิธี mini-prep จากนั้นตรวจพลาสมิดที่ได้ด้วยการตัดด้วย restriction enzyme *BsrGI* เปรียบเทียบกับ Destination vectors และนำไปใช้ในการเตรียม retrovirus และ lentivirus ต่อไป

3.3.2 การผลิต retrovirus และ lentivirus supernatant

3.3.2.1 Retrovirus

เตรียมเซลล์ 293T 2.5×10^6 cell ลงใน plate ขนาด P100 ก่อนวัน transfection 1 วัน จากนั้นเตรียมพลาสมิดและน้ำยาต่างๆทั้งหมด ดังนี้ DMEM ปริมาตร 800 µl และ TransIT293 reagent ปริมาตร 30 µl แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที จากนั้นดูดลงไปใน tube ที่มี พลาสมิดเหล่านี้ Retrovirus vectors (1 mg/ml) ปริมาตร 5 µl, Gag pol (GP) pCL-GagPol (1mg/ml) ปริมาตร 3.3 µl และ Rev+VSVG pHCMV-VSV-G (1mg/ml) 1.7 µl ผสมแล้ว mix by vortex วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที จากนั้นหยดลง plate เซลล์ 293 ที่เตรียมไว้ incubate 24 ชั่วโมง จึงเปลี่ยน medium ปริมาตร 9 ml แล้ว incubate ต่อ 48 ชั่วโมง (72 ชั่วโมง นับจาก transfection) เก็บไวรัสโดยการดูดเอา supernatant ทั้งหมด กรอกผ่าน filter ขนาด 0.45 µl แล้วแบ่งใส่ 1.5 ml tube ละ 1 ml และ 50 µl, 10 µl สำหรับไว้ตรวจหา virus titer เก็บที่ -80°C

3.3.2.2 Lentivirus

เตรียมเซลล์ 293T 2.5×10^6 cell ลงใน plate ขนาด P100 ก่อนวัน transfection 1 วัน จากนั้นเตรียมพลาสมิดและน้ำยาต่างๆทั้งหมด ดังนี้ DMEM ปริมาตร 800 µl และ TransIT293 reagent ปริมาตร 30 µl แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นดูดลงไปใน tube ที่มี พลาสมิดเหล่านี้ Lentivirus vectors (1 mg/ml) ปริมาตร 4.6 µl, Gag pol (GP) pCAG-HIVgp (1mg/ml) ปริมาตร 2.7 µl และ Rev+VSVG pCMV-G-RSV-Rev (1mg/ml) ปริมาตร 2.7 µl แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที หยดลง plate เซลล์ 293T ที่เตรียมไว้ incubate 24 ชั่วโมง จึงเปลี่ยน medium ปริมาตร 9 ml แล้ว incubate ต่อ 48 ชั่วโมง (72 ชั่วโมง นับจาก transfection) เก็บไวรัสโดยการดูดเอา supernatant ทั้งหมด กรอกผ่าน filter ขนาด 0.45 µl แล้วแบ่งใส่ 1.5 ml tube ละ 1 ml และ 50 µl (สามารถตรวจ

ด้วย real time PCR เท่านั้น เพราะเวกเตอร์นี้ไม่มี antibiotic marker) สำหรับไว้ตรวจหา virus titer เก็บที่ -80°C

วิธีการตรวจหา virus titer

เตรียม Hela 5×10^4 cell ใน 12 well plate วันต่อมาทำการ infection โดยเตรียม DMEM medium ที่มี 8 μg Polybrene ใส่ลงในแต่ละหลุม 2 ml และดูด 990 μl ลงไปใน tube ที่มี ไวรัส อยู่ 10 μl จากนั้นดูด 500 μl ใส่หลุมที่ 1, 100 μl ใส่หลุมที่ 2, 10 μl ใส่หลุมที่ 3 หลุมที่ 4 เป็น control ทำการ incubate นาน 2 วัน จากนั้นเปลี่ยนเป็น selective medium (0.8 mg/ml G418) เลี้ยงต่อไปนาน 2 สัปดาห์ โดยเปลี่ยน medium ทุกสัปดาห์ จากนั้นทำการ fixation โดยดูด medium เก่าทิ้ง แล้วเติม MeOH หลุมละ 1 ml นาน 1 นาที จากนั้นเติม Gimsa stain นาน 30 min แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา 4-5 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง แล้วนับโคโลนีที่ขึ้น

วิธีการ transduction

เลี้ยง human foreskin keratinocyte (HFK) human cervical keratinocyte infected telomerase (HCK1T) 2×10^5 ใน 6 well plate เตรียมไวรัส เพื่อทำการ infection โดยใช้ $\text{MOI}=0.5$ สำหรับ retrovirus และ $\text{MOI}=20$ สำหรับ lentivirus เปลี่ยน medium เก่าออก แล้วเติม medium (K-SFM) ที่มี 4 $\mu\text{g/ml}$ polybren ดูดไวรัสตามที่กำหนดไว้ ลงในเซลล์ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปลี่ยน medium ออก เติม medium ใหม่ และ incubate นาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยน medium เก่าออก แล้วเติม medium ที่มี 50 $\mu\text{g/ml}$ G418 (*สำหรับ Lentivirus เปลี่ยนเป็น medium ไม่ต้องเติม antibiotic เพราะ ไวรัสตัวนี้ไม่มี antibiotic resistance gene) เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนจน confluence ประมาณ 90% ทำการ trypsinize ลง P100 plate โดยเลี้ยงใน medium ที่มี 50 $\mu\text{g/ml}$ G418 สำหรับเซลล์ที่ถูก infected retrovirus

3.4 การทำ Western blot assay

3.4.1 การสกัดโปรตีน

เตรียมโปรตีนจากเซลล์ที่ทำการทดลองด้วยการ trypsinization แล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อล้างเซลล์ด้วย cold PBS 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 4°C , 1,500 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ใส่ RIPA buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.5% SDS, 1X PMSF) ปริมาตร 100 μl ดูด ขึ้น-ลง นำไปเขย่าด้วย vortex นาน 15 วินาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C 15 นาที แล้วนำไป vortex นาน 15 วินาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C , 14,000 rpm นาน 20 นาที ดูด total protein ใส่หลอดใหม่ แล้วทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้ ด้วยวิธี Bradford assay

3.4.2 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay

นำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumine (BSA) (2 mg/ml) เจือจางแบบ 2 fold dilution ทั้งหมด 5 dilutions ด้วย lysis buffer (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 mg/ml) และนำไปตีตัวอย่างมาเจือจางด้วย lysis buffer จากนั้นปีเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA และโปรตีนตัวอย่าง ที่เจือจางแล้วลง 96 well plate ปริมาตร 5 μ l อย่างละ 3 ซ้ำ เติม Bio-Rad reagent (เจือจางด้วย water, 1:4) ปริมาตร 200 μ l วางไว้ในอุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 nm นำค่าที่ได้มาหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน BSA ที่ทราบความเข้มข้น

3.4.3 การทำ Western blot assay

นำโปรตีนจากตัวอย่างในการศึกษาที่มีความเข้มข้น 20 μ g ผสมกับ sample buffer แล้วนำไปต้มที่ 95°C นาน 5 นาที จากนั้นนำไป run เพื่อแยกขนาดของโปรตีนด้วย 12% SDS-PAGE ที่ 100 โวลต์ นาน 1.30 ชั่วโมง นำเจลที่ได้มาทำการ transfer ย้ายโปรตีนจากเจลลงสู่ nitrocellulose membrane ด้วยวิธี semi-dry ที่ 250 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการ block membrane ด้วย 5% skim milk ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ตามด้วยการ incubate กับ primary antibody ต่อโปรตีนที่ต้องการตรวจแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ antibody ต่อ HPV16 E6 (1:200), p53 (1:1,000), p21 (1:1000), HDAC6 (1:1000), β -actin (1:2000) ที่อุณหภูมิ 4°C overnight จากนั้นล้าง membrane ด้วย washing buffer (1XPBS, 0.1% Tween-20) บน shaker นาน 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้ว incubate กับ secondary antibody ที่จำเพาะต่อ primary antibody ของแต่ละชนิดที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง membrane ด้วย washing buffer บน shaker นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และตามด้วย 1xPBS อีก 2 ครั้ง แล้วจึงนำไปตรวจหาแบนของโปรตีนที่สนใจด้วยเครื่อง ImageQuant LAS 4000 Mini (GE Healthcare Life Sciences)

3.5 การทำ immunoprecipitation assay

เลี้ยงเซลล์ C33A ใน dish culture ขนาด 60 mm overnight ทำการ co-transfection ระหว่าง expressing vector ของ pE6-As หรือ pE6-Pro และ expressing vector ของ E6AP โดยใช้ Lipofectamine 2000 (invitrogen®) เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดโปรตีนนำโปรตีนที่ได้ไปทำ immunoprecipitation assay ดังนี้ นำโปรตีนที่ได้ทั้งหมด มา pre-clean ด้วยการเติม protein G plus (Santa cruz) นำไปปั่นบนเครื่องเขย่าที่มีอุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชม. บั๊นท์ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C หลังจากนั้นดูด supernatant ใส่ tube ขนาด 1.5 ml และทำการล้าง protein G plus ของส่วนตะกอน ด้วย lysis buffer จำนวน 2 ครั้ง แล้วนำ supernatant ไปรวมกับส่วน supernatant ที่เก็บมาแล้ว แล้วเติม anti-HPV16/18 E6 antibody 1:50 นำไปปั่นบนเครื่องเขย่า

ที่มีอุณหภูมิ 4°C overnight เติม protein G plus นำไปปั่นต่อบนเครื่องเขย่าที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชม. ปั่นที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4°C ดูด supernatant ที่ล้าง protein G ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง เติม sample buffer 50 นำไปต้มที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูด supernatant ไปทำ western blot เพื่อตรวจหาโปรตีน E6AP

3.6 การหา population doubling time (PD)

เลี้ยงเซลล์ HCK1T ที่ติดเชื้อ retrovirus ที่มีจีโนม E6 ชนิดต่างๆ เริ่มต้น 2×10^5 ใน 6 well plate เปลี่ยน medium ทุก 3 วัน จนกว่าเซลล์จะเพิ่มจำนวนถึง 90% แล้วทำการ sub passage และนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด นำจำนวนเซลล์ที่นับได้มาคำนวณหา PD ตามสูตรข้างล่างนี้ แล้วนำ PDs คำนวณได้มาพล็อตกราฟระหว่างเวลากับ PDs

$$PDs = \log_2(N/N_0)$$

โดยที่ N = จำนวนเซลล์มีชีวิตทั้งหมดที่เก็บในแต่ละครั้ง

N_0 = จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่จะ seed ลง plate

จากนั้นนำไป plot กราฟ ระหว่าง ค่า PDs และจำนวนวันทั้งหมดที่ศึกษา เพื่อดู population doubling times (PDs) ของเซลล์

3.7 Treatment condition

เลี้ยงเซลล์ HCK1T ที่ติดเชื้อ retrovirus ที่มีจีโนม E6 ชนิดต่างๆ เริ่มต้น 2×10^5 ใน 6 well อย่างละ 3 ขั้วเลี้ยง overnight แล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่คือ DMEM ที่มี 10%FBS หรือเรียกว่า culture medium (CM) และอีกการทดลองให้เติม อาหารเลี้ยงเซลล์ Hela คือ (CM-He) เป็นอาหารที่เลี้ยงเซลล์ Hela มาแล้ว 48 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นตกที่ 1,500 rpm จากนั้นนำมาเติมแทนที่อาหารเลี้ยงเซลล์เดิม ทำการเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดนานเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัด total RNA เพื่อนำไปศึกษาต่อ

เลี้ยงเซลล์ HCK1T ที่ติดเชื้อ retrovirus ที่มีจีโนม E6 ชนิดต่างๆ เริ่มต้น 2×10^5 ใน plat ขนาด P100 แบ่งเซลล์ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เติม Actinomycin ที่ความเข้มข้น 5 nM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ 2 นำเซลล์ไปฉายรังสีที่ 10 Gy นาน 10 นาที เลี้ยงเซลล์จนกว่าจะได้ confluence 90% ในระหว่างนั้นทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จากนั้นทำการเก็บโปรตีนทั้งหมดเพื่อนำไปศึกษาต่อ

3.8 การทำ real time PCR

3.8.1 การสกัด RNA

ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ที่ทำการทดลอง บีบ TRIZOL® reagent 1000 µl ลงไป แล้วดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C 14,000 rpm นาน 5 นาที ดูด supernatant ใส่หลอดใหม่ แล้วเติม Chloroform ปริมาตร 200 µl เขย่าให้เข้ากันนาน 15 วินาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C 14,000 rpm นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอน RNA โดยเติม Isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใสที่ดูดมา เขย่าโดยการพลิกหลอดกลับไปมา วางทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ อุณหภูมิ 4°C 14,000 rpm นาน 10 นาที เท supernatant ทิ้ง แล้วล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C 14,000 rpm นาน 5 นาที เท supernatant ทิ้ง ปล่อยให้ ethanol ที่อยู่ใน RNA ระเหยให้หมด นาน 10 นาที จากนั้น ละลายตะกอน RNA ด้วย RNase free water ปริมาตร 30 µl แล้วทำการวัดปริมาณ RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 RNA ที่เหลือนำไปเก็บที่ -80°C

3.8.2 Quantitative Real time PCR

3.8.2.1 การสังเคราะห์ cDNA

RNA จะถูกนำมา convert เป็น cDNA ด้วย SuperScript III Reverse Transcriptase (invitrogen) โดยใช้ RNA ตัวอย่าง 5 µg ผสมกับ 50 µM oligo (dT) 10 mM dNTP mix และ DEPC-treat water จากนั้นนำไป incubate ที่ 65°C นาน 5 นาที เสร็จแล้ววางบนน้ำแข็งทันที นาน 1 นาที จากนั้นนำ master mix ที่ประกอบไปด้วย 1 x RT buffer, 5 mM MgCl₂, 0.02 M DTT, 1 µl RNaseOUT (40U/µl) และ 1 µl SuperScript III RT (200 U/µl) ผสมกับ cDNA synthesis Mix ที่เตรียมไว้แล้วก่อนหน้านี้ จากนั้นนำไป incubate ตามลำดับดังนี้ อุณหภูมิ 50°C นาน 5 นาที ตามด้วย อุณหภูมิที่ 85°C นาน 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นเติม 1 µl RNase H แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 20 นาที นำ cDNA ที่ได้มาทำ real time เพื่อตรวจหาการแสดงออกของยีนที่สนใจ

3.8.2.2 การทำ quantitative real time PCR

เตรียม master mix ประกอบด้วย 1xSsoAdvanced SYBR Green supermix, primers ที่จำเพาะต่อยีนที่ศึกษา (ดังแสดงในตารางที่ 1) ประกอบด้วย 0.4 µM forward primer, 0.4 µM reverse primer, cDNA template (เจือจาง 1:10) และ Nuclease-free water จากนั้นนำไปทำ PCR โดยกำหนด condition สำหรับการศึกษารายการแสดงออกของยีนแต่ละชนิดดังแสดงในตาราง 1 เช่น enzyme activation ที่ 95°C 30 วินาที ตามด้วยdenature ที่ 95°C 5 วินาที, annealing/extension ที่ 60°C 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และ melt curve ที่ 65-95°C 2-5

วินาที/step จากนั้นนำผลที่ได้ไปคำนวณหาสัดส่วนการแสดงออกของจีนที่สนใจ โดย เซลล์ control เป็นตัว calibrator และ ให้ β -actin ซึ่งเป็น internal control ในการ normalized โดยคำนวณตามสูตร $\Delta\Delta Ct$

3.9 การตรวจหาการแสดงออกของ miR-21

เตรียม total RNA จากเซลล์ที่ทำการศึกษา แล้ววัดปริมาณและ คุณภาพของ RNA ที่สกัดได้จากเซลล์ 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 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 ตามรายละเอียดข้างล่าง

3.9.1 Reverse transcription for cDNA synthesis

เตรียม RT master mix ทั้งหมด ประกอบด้วย master mix 7 μ l, 5X RT primer 3 μ l, และ RNA sample 5 μ l แล้วปั่นตก จากนั้นกำหนด condition ตามนี้ 30 min 16 °C, 30 min 42 °C, 5 min 85 °C, 4 °C.

3.9.2 PCR Amplification

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

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ที่ใช้ในการศึกษาและ condition ในการตรวจ

Genes	Sequence (5'-3')	Conditions
E6	F; TTGAACCGAAACCGGTTAGT	95°C for 5 min; 40 cycles 95°C for 1 min, 55°C for 30 sec 72°C for 1 min, Final extension 72°C for 5 min
	R; GCATAAATCCCGAAAAGCAA	
IRF-1	F; TCTTAGCATCTCGGCTGGA CTTC	98°C for 30 sec; 40 cycles 98°C for 1 sec, 65°C for 1 sec Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
	R; CGATACAAAGCAGGGGAAAAGG	
IRF-3	F; CAGGGCCTTG GTAGAAATGG	98°C for 30 sec; 40 cycles 98°C for 1 sec, 65°C for 1 sec Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
	R; GGGTGGCTGTTGGAAATGTG	
IRF-7	F; GATGTCGTCATAGAGGCT GTTGG	98°C for 30 sec; 40 cycles 98°C for 1 sec, 65°C for 1 sec Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
	R; TGGTCCTGGTGAAGCTGGAA	
IFNα	F; AGGAGGAGTTTGATGGCAACCA GT	98°C for 30 sec; 40 cycles 98°C for 1 sec, 65°C for 1 sec Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
	R; TGCTGGTAGAGTTCGGTGCAGAAT	
IFNβ	F; TGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAA	98°C for 30 sec; 40 cycles 98°C for 1 sec, 65°C for 1 sec Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
	R; TCTCATAGATGGTCAATGCGGCGT	

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ที่ใช้ในการศึกษาและ condition ในการตรวจ (ต่อ)

Genes	Sequence (5'-3')	Conditions
HDAC6	F; TGGCTATTGCATGTTCAACC	98°C for 30 sec; 40 cycles 98°C for 1 sec, 65°C for 1 sec
	R; GTCGAAGGTGAACTGTGTTCT	Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
PDCD4	F; GATTAAGTGTGCCAACCAGTCCAAAG	98°C for 30 sec; 40 cycles 98°C for 1 sec, 65°C for 1 sec
	R; CATCCACCTCCTCCACATCATACAC	Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
β-actin	F; ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA	98°C for 30 sec; 40 cycles 98°C for 1 sec, 65°C for 1 sec
	R; TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA	Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step

3.10 การทำ two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)

3.10.1 การสกัดโปรตีน

หลังจากเก็บเซลล์ HCK1T ที่ติดเชื้อ retrovirus ที่มีจีโนม E6 ชนิดต่างๆ ด้วยการ trypsinization แล้ว นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อล้างเซลล์ด้วย cold PBS 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 4°C, 1,500 rpm นาน 5 นาที เท supernatant ทิ้ง แล้วใส่ lysis buffer (8M Urea, 4%(w/v) CHAPS, 2%(v/v) IPG buffer, 40 mM DTT) ปริมาตร 150 μ l ตูด ขึ้น-ลง นำไปเขย่าด้วย vortex นาน 15 วินาที จากนั้นนำไปแช่ใน nitrogen เหลวให้แข็ง แล้วนำไปละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 1 นาที เขย่าด้วย vortex (ทำซ้ำ 5 ครั้ง) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C, 14,000 rpm นาน 20 นาที ตูด lysate ใส่หลอดใหม่ แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้

3.10.2 การทำ 2D-gel

ตูดโปรตีน 150 μ g ผสมกับสารละลาย rehydration (7 M Urea, 2 M thiourea, 2%(w/v) CHAPS, 0.5% (v/v) ampholytes (pH4-7), 18 mM DTT and 0.002% (w/v) bromophenol Blue) ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 125 μ l หลังจากผสมให้เข้ากันด้วย vortex แล้ว spindown จากนั้นนำสารละลายที่ได้ load ลงใน strip holder ตามด้วย immobilized pH gradient

(IPG) strip (pH 4-7, 7 cm) (GE Healthcare) และตามด้วย mineral oil ปริมาตร 330 μ l ตามลำดับ นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing Unit (GE Healthcare) ที่อุณหภูมิ 20°C ที่ความต่างศักย์ 500 ถึง 6000 โวลต์ ใช้เวลานาน 16 ชั่วโมง จากนั้น นำ IPG strip ไปปรับสมดุลในสารละลาย equilibrium buffer (75 mM Tris-Cl pH8.8, 6M Urea, 29.3%(w/v) Glycerol, 2%(w/v)SDS , 0.002% (w/v) bromophenol Blue) ที่มี 100 mg DTT โดยเขย่าเบาๆ นาน 15 นาที จากนั้นนำ IPG strip มาปรับสมดุลด้วย equilibrium buffer ที่มี 2.5% (w/v) iodoacetamide เขย่าเบาๆ นาน 15 นาที เสร็จแล้วนำ IPG strip มาวางลงบน 12% SDS-PAGE ทำการแยกขนาดโปรตีน โดยกำหนดแอมเทกกับ 0.04 แอมแปร์ run จนกว่าสี bromophenol blue จะถึงขอบกระจกด้านล่าง นำเจลที่ได้มาทำการ fix ด้วยสารละลาย fixing (45% methanol, 5% acetic acid) เขย่าเบาๆ นาน 1 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วย Coomassie blue (0.25% Coomassie Brilliant Blue R250, 50% (V/V) methanol, 10% (V/V) acetic acid) เขย่าเบาๆ นาน 1 ชั่วโมง ตามด้วย fix อีกครั้ง เขย่าเบาๆ นาน 1 ชั่วโมง สุดท้ายนำเจลไป destain ด้วย destain solution (7% (V/V) acetic acid, 5% (V/V) methanol) เขย่าเบาๆ นาน 2 ชั่วโมง ตามลำดับ นำเจลที่ได้ไปสแกนด้วยโปรแกรม ImageScanner (Amersham Biosciences) จากนั้นนำรูปเจลของแต่ละตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์จุดโปรตีนที่มีความแตกต่างกันด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum software (Amersham Biosciences)

หลังจากทำการเลือกจุดโปรตีนได้แล้ว จากนั้นทำการย่อยเจลเพื่อเอาจุดโปรตีนที่ต้องการโดย ทำการตัดและเจาะจุดโปรตีน ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml เติมน้ำ DW ปริมาตร 200 μ l แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ 20 mM AmB ปริมาตร 200 μ l แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ 20 mM AmB/ACN (1:1) ปริมาตร 200 μ l แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ ACN ปริมาตร 200 μ l แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ 20 mM AmB ปริมาตร 200 μ l แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ 20 mM AmB/ACN (1:1) ปริมาตร 200 μ l แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ ACN ปริมาตร 200 μ l แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง แล้วให้แห้งประมาณ 5 นาที จากนั้นเติมน้ำ 10 mM DTT/20 mM AmB ปริมาตร 100 μ l แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 45 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ 55 mM IAA/20 mM AmB ปริมาตร 100 μ l แล้ว incubate ในที่มืด นาน 30 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ 20 mM AmB/ACN (1:1) ปริมาตร 200 μ l แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ 20 mM AmB/ACN (1:1) ปริมาตร 200 μ l แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ ACN ปริมาตร 200 μ l แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง แล้วให้แห้งประมาณ 5 นาที แล้วเติมน้ำ enzyme solution (trypsin) ปริมาตร 40 μ l แช่ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 นาที แล้วเทส่วนของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ 25 mM AmB ปริมาตร 10 μ l เพื่อให้เจลไม่แห้ง แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน จากนั้นเติมน้ำ 20 mM AmB ปริมาตร

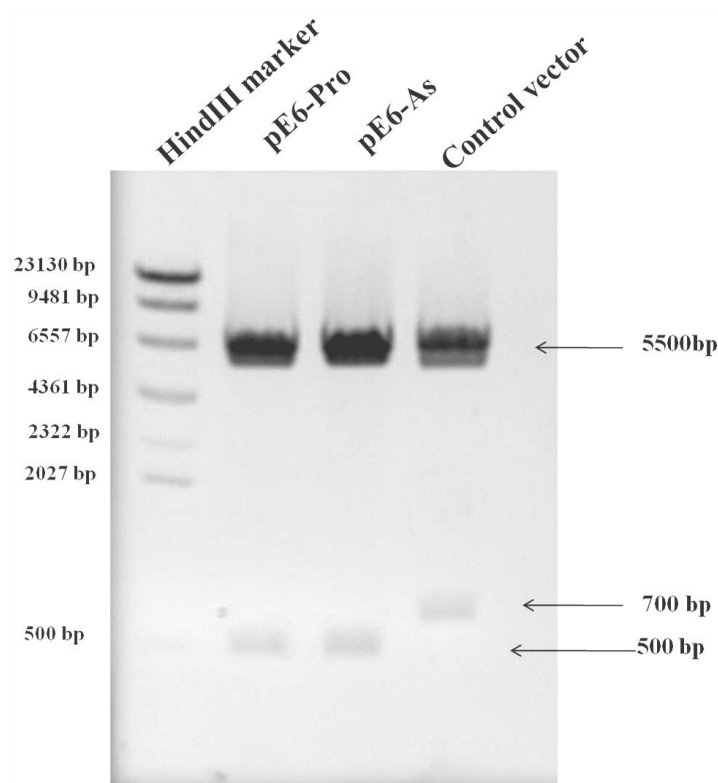
50 μ l แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที แล้วเก็บส่วนของเหลวใส่หลอดขนาด 1.5 ml เติม extract buffer 1 แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที เก็บส่วนของเหลวใส่หลอดขนาด 1.5 ml เติม extract buffer 2 แล้วเขย่าด้วย shaker นาน 10 นาที เก็บส่วนของเหลวใส่หลอดขนาด 1.5 ml นำของเหลวที่ได้ไปทำให้แห้งด้วย speed Vacuum ที่อุณหภูมิ 45°C นาน 2 ชั่วโมง แล้ว resuspend ด้วย Buffer ปริมาตร 20 μ l จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย LC/MS/MS หรือเก็บที่ -80°C

4. ผลการทดลอง

4.1 การสร้างเวกเตอร์

4.1.1 Expression vectors

การศึกษานี้สร้าง expression vectors ทั้งหมด 2 ตัวได้แก่ pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO ที่มีจีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant (pE6As) และ E6 ของเชื้อ HPV16 prototype (pE6Pro) หลังจากที่ได้โคลนของเวกเตอร์และยืนยันผลความถูกต้องด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *NdeI* แล้ว พบว่าได้ชิ้นส่วนทั้งหมด 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 5500 bp และ 500 bp ตามที่คาดไว้ ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการทดลองการยืนยันผลของเวกเตอร์ที่ได้ ในการตัดด้วย restriction enzyme *Not I* และ *Apa I* โดยพบชิ้นส่วนทั้งหมด 2 ชิ้น ขนาด 5500 bp และ 500 bp สำหรับ pE6-Pro ซึ่งมีจีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype และ pE6-As ของเชื้อ HPV16 As variant

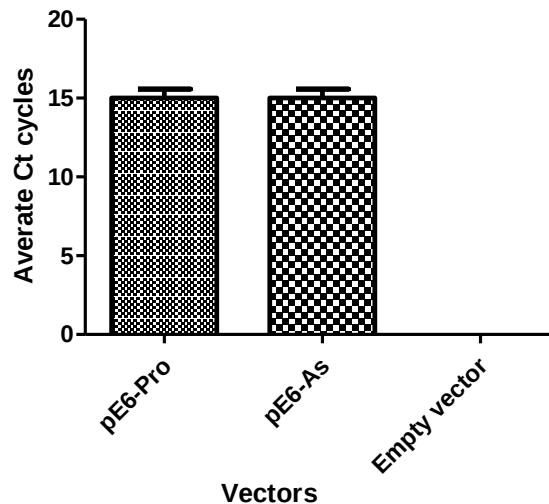
จากนั้นนำเวกเตอร์นี้ไป sequence อีกครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้ ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant และจีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2

HPV16 E6 Prototype DNA;	↓	nt change T>G at 178
83...TGCACAGAGCTGCAAACAACACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCG.		
HPV16 E6 As variant DNA;		
83...TGCACAGAGCTGCAAACAACACTATACATGAGATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCG		
	↓	aa change D (Aspartic acid) > E (Glutamic acid) at 25
HPV16 E6 Prototype amino acid; C T E L Q T T I H D I I L E C V Y C K Q Q L L R		
HPV16 E6 As variant amino acid; C T E L Q T T I H E I I L E C V Y C K Q Q L L R		

รูปที่ 2 แสดงผลการ sequencing โดยจีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งที่ 178 โดยเปลี่ยนจาก T เป็น G การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 25 โดยเปลี่ยนจาก aspartic acid (D) ไปเป็น glutamic acid (E)

4.2 การทดสอบความสามารถในการแสดงออกของ expression vectors ที่มีจีน E6

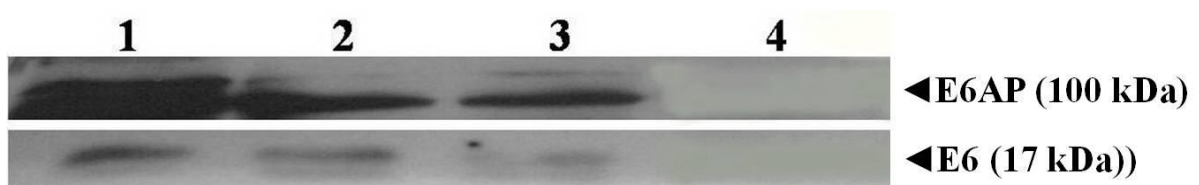
เพื่อทดสอบความสามารถในการแสดงออกของจีน E6 ของ pE6-Pro ซึ่งมีจีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype และ pE6-As ของเชื้อ HPV16 As variant การทดลองนี้จึงทำการ transfect plasmids ที่มีจีน pE6-Pro และ pE6-As ลงในเซลล์ C33A เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ RNA นำมาตรวจหา mRNA ของ E6 ด้วยวิธี real time PCR ซึ่งผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3 โดยพบว่าเวกเตอร์ทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถแสดงออกของจีน E6 ได้ มีค่าเฉลี่ยของ ct cycles ไม่แตกต่างกัน โดยพบค่าเฉลี่ย Ct (Cycle threshold) เท่ากับ 16 ทั้งคู่ ซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่า expression vectors นี้ นำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3 แสดงระดับการแสดงออกของ mRNA ของจีน E6 หลังจากทำการ transfection ของ expression vectors ที่มีจีน E6 เข้าไปในเซลล์ C33A เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง

4.3 การทดสอบคุณสมบัติของโปรตีน E6 ของ expression vector pE6-As และ pE6-Pro ในการจับกับ E6 association protein (E6AP)

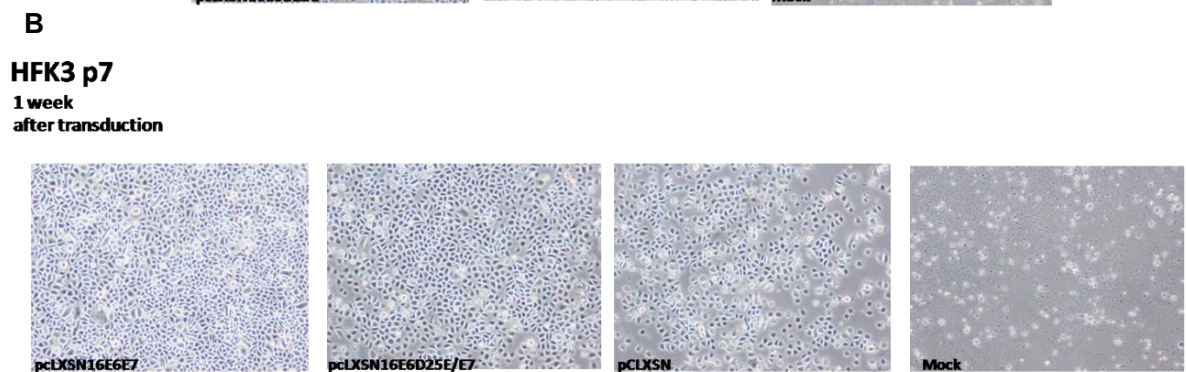
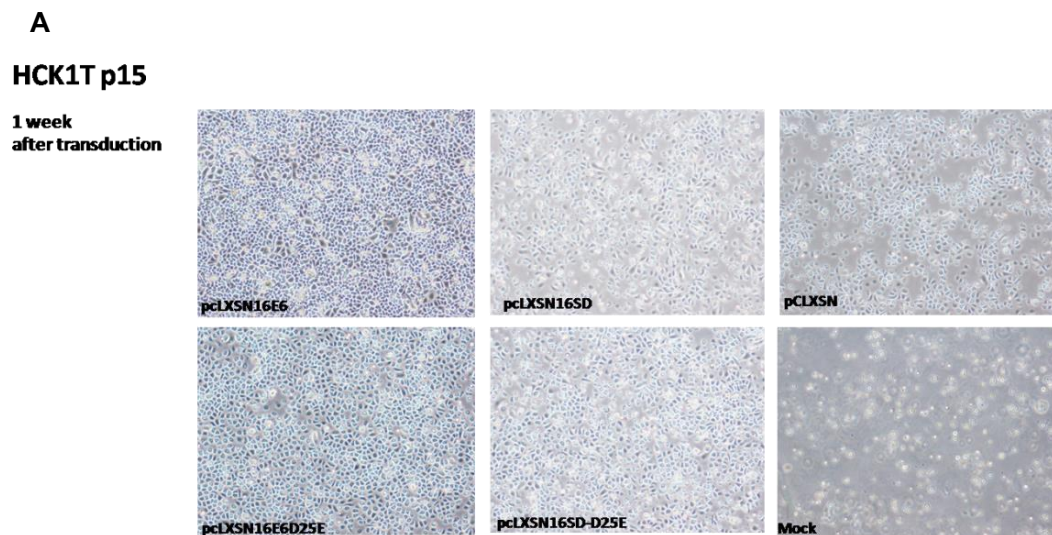
จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าเวกเตอร์ pE6-As และ pE6-Pro สามารถแสดงออกของจีน E6 ได้ แต่ยังไม่ทราบว่าโปรตีน E6 ที่แสดงออกมานั้นสามารถทำงานได้จริงหรือไม่และยังคงมีคุณสมบัติทางชีววิทยา ดังนั้นการทดลองนี้จึงต้องการทดสอบความสามารถในการทำงานของโปรตีน E6 โดยทดสอบการจับกับโปรตีน E6AP ในการทดลองนี้ทำการ co-transfect ระหว่าง expression vectors ของจีน E6 และ expression vector ของจีน E6AP ลงในเซลล์ C33A แล้วตรวจสอบการจับกันของโปรตีน E6 กับ E6AP ด้วยวิธี immunoprecipitation assay ผลการทดลองพบว่าโปรตีน E6 ที่มาจาก expression vector แต่ละตัวสามารถจับกับโปรตีน E6AP ได้ ดังแสดงในรูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่าเวกเตอร์ pE6-As และ pE6-Pro สามารถแสดงออกโปรตีน E6 และโปรตีน E6 นั้นยังคงมีการทำงานได้ตามปกติสามารถจับกับโปรตีน E6AP ได้มีผลไม่ต่างจาก E6Pro



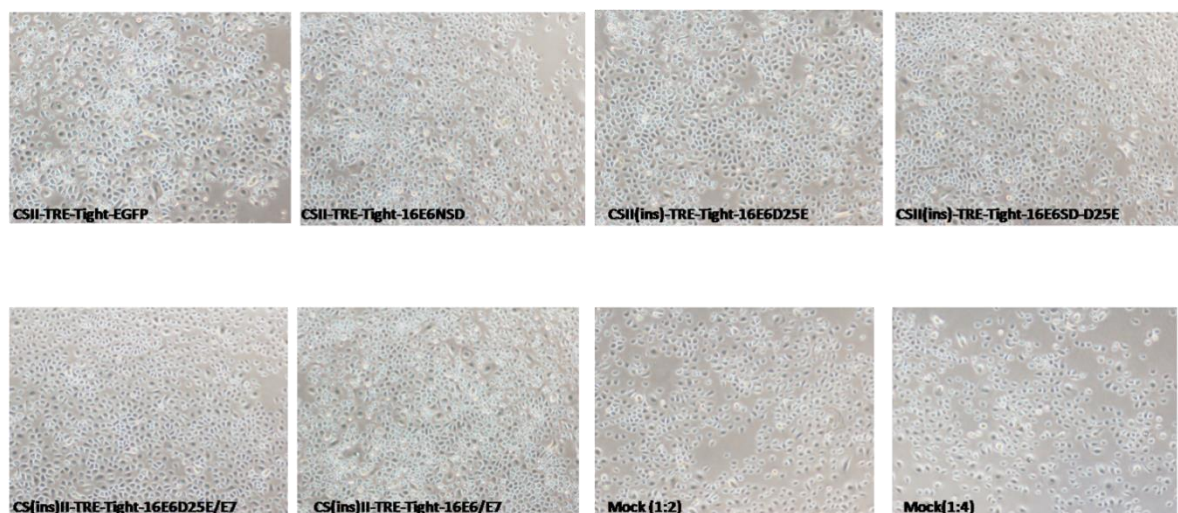
รูปที่ 4 แสดงผลการทดลองการทดสอบการจับกันของโปรตีน E6 และ โปรตีน E6AP ด้วยวิธี immunoprecipitation assay หมายเลข 1 คือ lysate ของเซลล์ SiHa, 2 คือ lysate ของ C33A ที่ถูก transfect ด้วยเวกเตอร์ pE6-Pro, 3 คือ lysate ของ C33A ที่ถูก transfect ด้วยเวกเตอร์ pE6-As และ 4 คือ lysate ของ C33A

4.4 การสร้าง immortal keratinocyte (HFK) และ transduced cervical keratinocyte (HCK1T)

การศึกษานี้ได้ทำการสร้างและผลิต retroviruses และ lentiviruses ที่มี HPV16 E6D25E และ HPV16 E6Pro โดยได้ทำการติดเชื้อ retrovirus ในเซลล์ HFK และ tet/on system HCK1T ส่วน lentivirus ทำการติดเชื้อเฉพาะในเซลล์ tet/on system HCK1T หลังจากทำการติดเชื้อไวรัสใน HFK และ tet/on system HCK1T แล้วทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีการติดเชื้อด้วยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ G418 ที่มีความเข้มข้น 50 µg/ml เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ **รูปที่ 5** แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์หลังจากการทำการติดเชื้อ retroviruses และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ G418 ที่มีความเข้มข้น 50 µg/ml เป็นเวลานาน 1 สัปดาห์ โดยพบการตายของเซลล์ control ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่ได้ถูกติดเชื้อ retroviruses (Mock) แตกต่างจากเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ retroviruses พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง ส่วนการติดเชื้อ lentivirus ที่มี E6 ของเชื้อ HPV16 As variant ในเซลล์ HCK1T tet/on system นั้น เนื่องจาก lentivirus vector ไม่มี resistance gene จึงไม่สามารถคัดเลือกเซลล์ที่ติดเชื้อด้วยการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องทำการติดเชื้อ lentivirus ที่มีจีน GFP ด้วยเพื่อใช้ในการยืนยันและเป็นตัว control ว่าการทดลองนี้มีเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ lentivirus ดังแสดงใน**รูปที่ 6** จะเห็นว่าเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ lentivirus และเซลล์ control ไม่มีความแตกต่างกันเลยเซลล์แต่ละกลุ่มสามารถเจริญเติบโตได้ดี

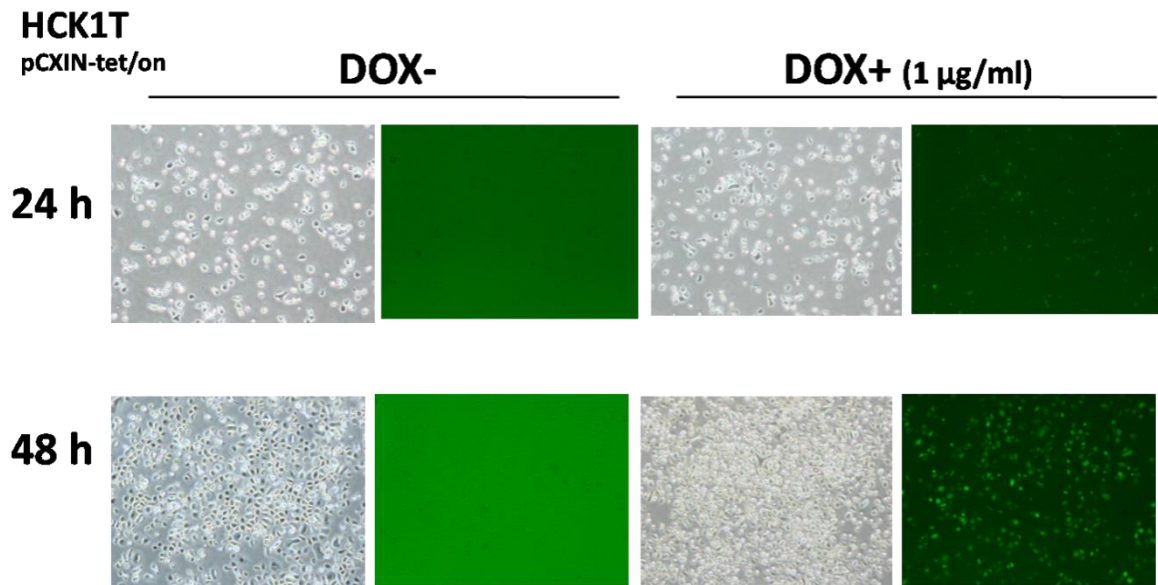


รูปที่ 5 แสดงลักษณะของเซลล์ human primary keratinocytes หลังจากทำการติดเชื้อด้วย retroviruses เป็นเวลา 1 อาทิตย์ A คือเซลล์ Human cervical keratinocyte, HCK1T และ B คือ Human foreskin keratinocyte, HFK โดยตรวจดูรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้อง inverted microscope กำลังขยาย X400



รูปที่ 6 แสดงลักษณะของเซลล์ HCK1T tet/on หลังจากทำการติดเชื้อด้วย Lentivirus เป็นเวลา 1 อาทิตย์ โดยตรวจดูรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้อง inverted microscope ที่กำลังขยาย X400

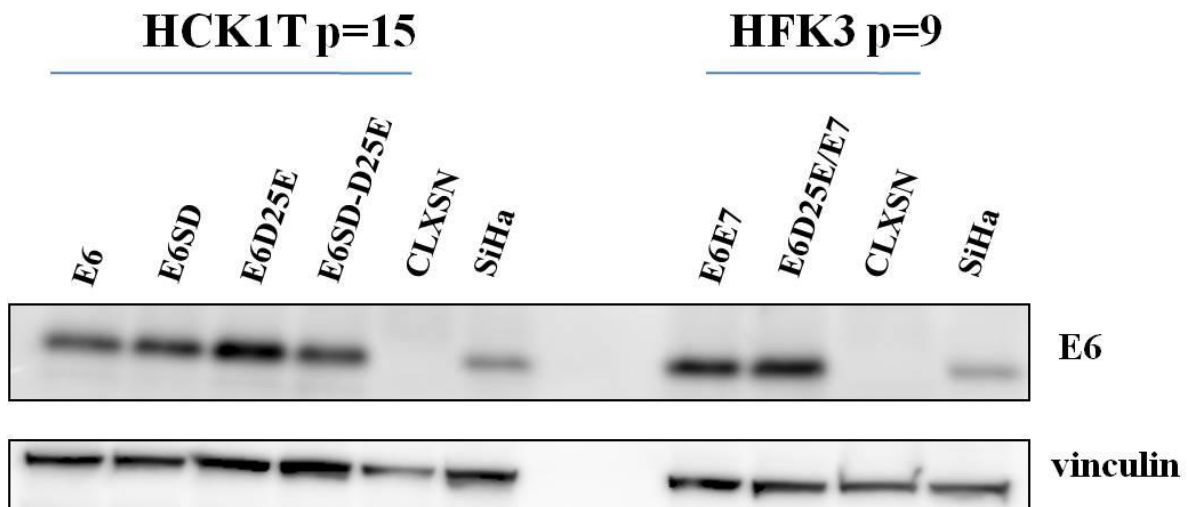
เพื่อยืนยันว่า lentivirus สามารถติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ HCK1T tet/on ได้ ทำการทดสอบโดยเติม 1 μg doxycyclin (Dox) ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจการแสดงออกของ GFP (เซลล์ control) ภายใต้จุลทรรศน์ชนิด Fluorescence microscopes แสดงผลในรูปที่ 7 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ HCK1T tet/on ถูกติดเชื้อ lentivirus ที่มีจีโนม GFP โดยพบการแสดงออกของ GFP มากที่สุดในช่วงเวลาที่ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 7 แสดงผลการแสดงออกของ GFP จากการชักนำด้วยการเติม 1 $\mu\text{g/ml}$ Dox ในอาหารเลี้ยงเซลล์ HCK1T tet/on หลังจากทำการ infection ด้วย lentivirus ที่มีจีโนม E6 และจีโนม GFP เป็นเวลา 24 และ 48 ชม. ตรวจดูรูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้อง Fluorescence microscopes ที่กำลังขยาย 400X

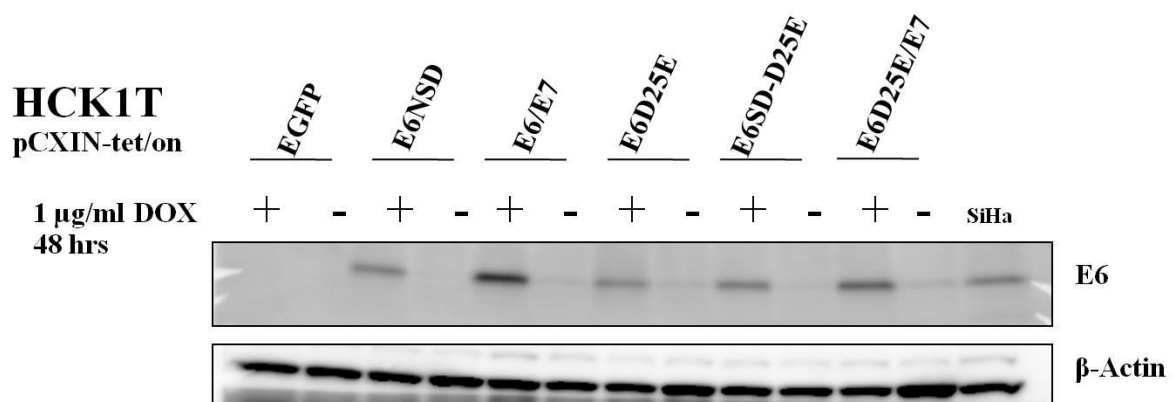
4.5 การทดสอบการแสดงออกของโปรตีน E6

เพื่อทดสอบการแสดงออกของโปรตีน E6 ด้วยวิธี Western blot analysis ในเซลล์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วย retrovirus และ lentivirus โดยหลังจากคัดเลือกเซลล์ที่ถูกติดเชื้อด้วย retrovirus ทำการสกัดโปรตีนจากเซลล์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัส ได้แก่ HFK และ HCK1T tet/on system แล้วนำไปแยกขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE แล้วใช้ antibody ที่จำเพาะต่อ HPV16 E6 ในการตรวจจับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสมีการแสดงออกของโปรตีน E6 ยกเว้นเซลล์ control ซึ่งถูกติดเชื้อด้วย retrovirus ที่ไม่มีจีโนม E6 การแสดงออกของโปรตีน E6 ในแต่ละเซลล์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน vinculin ซึ่งเป็น internal control ในการทดลองนี้ โดยแสดงผลการทดลองในรูปที่ 8 การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ถูกติดเชื้อไวรัสมีการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการหรือโปรตีน E6



รูปที่ 8 แสดงผลการแสดงออกของโปรตีน E6 ชนิดต่างๆ ในเซลล์ที่ทำการติดเชื้อด้วย retrovirus โดย ทำการทดลองใน passage ที่ 15 และในกลุ่มเซลล์ HFK ทำการทดลองใน passage ที่ 9 โดยวิธี western blot, vinculin คือ internal protein control

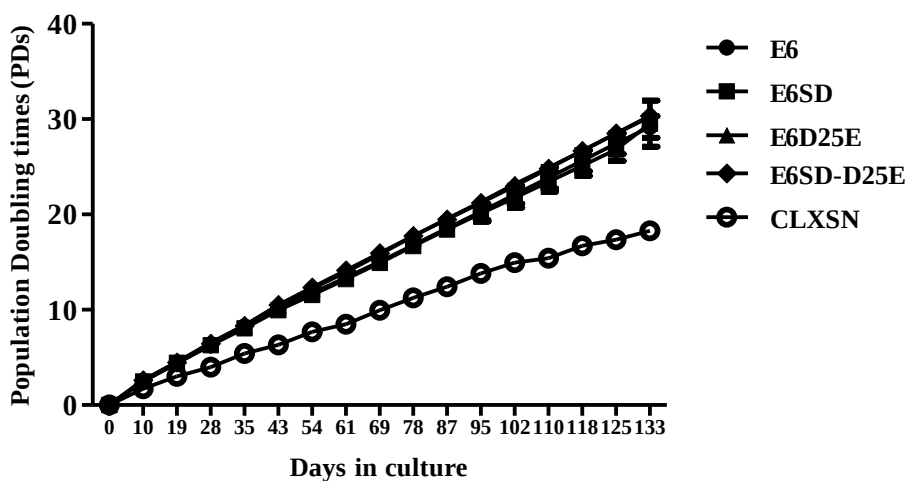
สำหรับกลุ่มเซลล์ HCK1T tet/on system การทดสอบการแสดงออกของโปรตีน E6 นั้น ต้องทำการเติม DOX ที่มีความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงเก็บเซลล์มาสกัดโปรตีนเพื่อตรวจหาโปรตีน E6 ด้วยวิธี Western bolt assay ผลการทดสอบแสดงใน**รูปที่ 9** ซึ่งพบว่าโปรตีน E6 มีการแสดงออกในเซลล์ที่ทำการเติม DOX แต่ในเซลล์ที่ไม่ได้เติม DOX นั้น ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน E6 การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าระบบ tet/on ทำงานได้ปกติและพบการแสดงออกของโปรตีน E6 ในแต่ละเซลล์ที่ทำการติดเชื้อไวรัส ยกเว้นในเซลล์ที่ถูกติดเชื้อด้วย lentivirus ที่มีจีน GFP ซึ่งถูกใช้เป็นเซลล์ control และในการทดลองนี้ใช้ β -actin เป็น internal control



รูปที่ 9 แสดงผลการแสดงออกของโปรตีน E6 ในเซลล์ที่ทำการติดเชื้อด้วย lentivirus ซึ่งถูกนำมาทำการทดลองใน passage ที่ 25 ทดสอบโดยวิธี western blot, β -actin เป็น internal control

4.6 การทดสอบความสามารถของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์

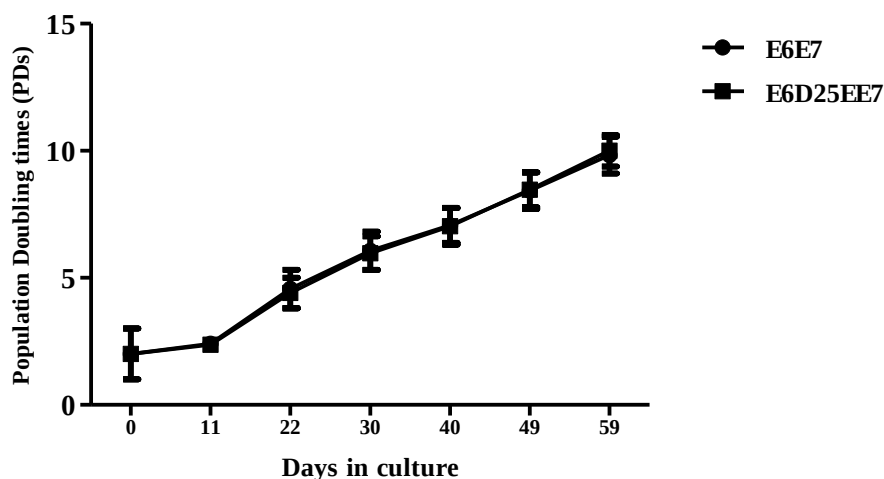
เพื่อทดสอบความสามารถของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับโปรตีน E6Pro ของเชื้อ HPV16 prototype เซลล์ HCK1T ที่ได้ถูก transduce และมีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ได้ถูกเพาะเลี้ยงนานเป็นเวลา 4 เดือน โดยนับจำนวนเซลล์ที่ seed เริ่มต้นและนับจำนวนเซลล์เมื่อเลี้ยงเซลล์จนเต็ม flask แล้วนำไปคำนวณหาค่า Population doubling time (PDs) จากนั้นนำมา plot กราฟระหว่างค่า PDs และจำนวนวันที่เลี้ยงเซลล์ แสดงให้เห็นในรูปที่ 10 จากรูปจะเห็นว่าโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant ได้แก่ E6D25E และ E6SDD25E มีค่า PDs อยู่ที่ช่วง 28-30 ไม่แตกต่างจากโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype ได้แก่ E6Pro และ E6SD แต่แตกต่างจากเซลล์ control โดยพบว่า PDs อยู่ที่ 18 การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ไม่แตกต่างจากโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype



รูปที่ 10 แสดงผลการศึกษาหา PDs ของเซลล์ HCK1T ที่ถูกทำให้ติดเชื้อ retrovirus ที่มีโปรตีน E6 ชนิดต่างๆ ของ HPV16; E6Pro= E6, E6SDPro= E6SD, E6D25E= E6D25E, E6SDD25E= E6SDD25E และ pCLXSN= empty vector

นอกจากนี้ยังทำการทดลองในเซลล์ HFK ซึ่งถูกทำให้เป็น immortal keratinocyte โดยการชักนำด้วย HPV16 E6D25EE7 เปรียบเทียบกับ HPV16 E6E7 การทดลองในเซลล์กลุ่มนี้จะไม่แตกต่างจากการทดลองในเซลล์กลุ่ม HCK1T ซึ่งแสดงผลการทดลองไว้ด้านบน โดยในเซลล์กลุ่มนี้จะทำการติดเชื้อโปรตีน E7 เข้าไปด้วย เนื่องจากโปรตีน E6 ตัวเดียวไม่สามารถที่จะทำให้เซลล์กลายเป็น immortal ได้หรืออีกนัยหนึ่งคือเซลล์ที่ติดเชื้อเฉพาะ E6 อย่างเดียวจะสามารถเลี้ยงและ

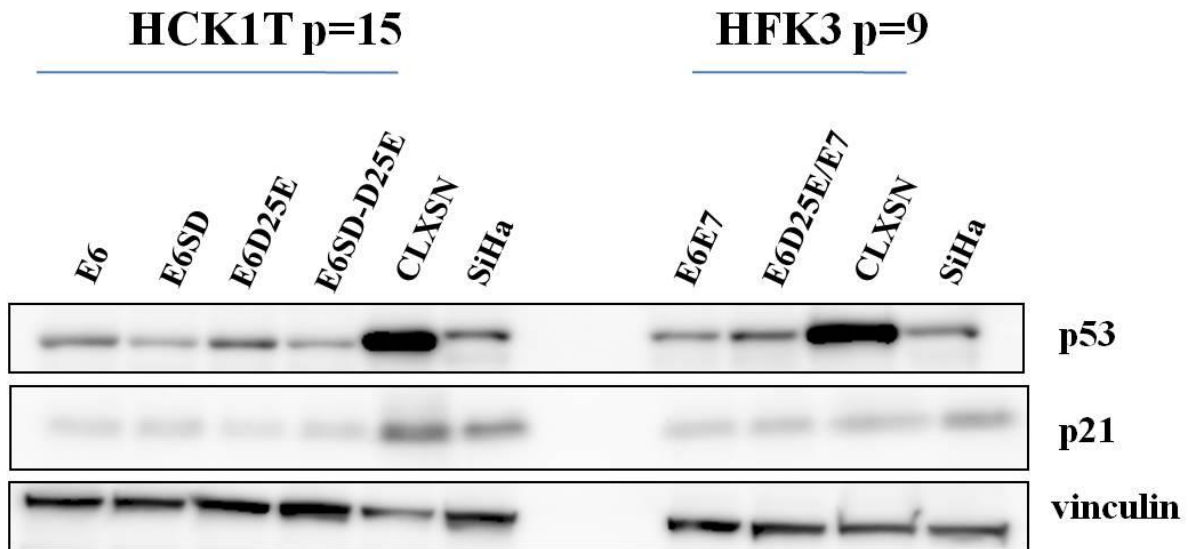
sub culture ได้ไม่กี่ครั้ง เซลล์ก็จะตายไปในที่สุด ดังนั้นการทดลองนี้จึงจำเป็นต้องทำการติดเชื้อ HPV16 E7 เข้าไปด้วย โดยในการศึกษานี้ทำการเลี้ยงเซลล์และ sub culture เป็นเวลานาน 3 เดือน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 11 โดยพบว่า E6 ของ HPV16 As variant (E6D25EE7) มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ไม่แตกต่างจาก E6 ของ HPV16 prototype (E6E7)



รูปที่ 11 แสดงผลการศึกษาค่า PDs ของเซลล์ HFK3 ที่ถูกทำให้ติดเชื้อ retrovirus ที่มี HPV16 E6E7 และ HPV16E6D25E/E7; E6E7=E6ProและE7Pro, E6D25EE7= E6D25EE7Pro

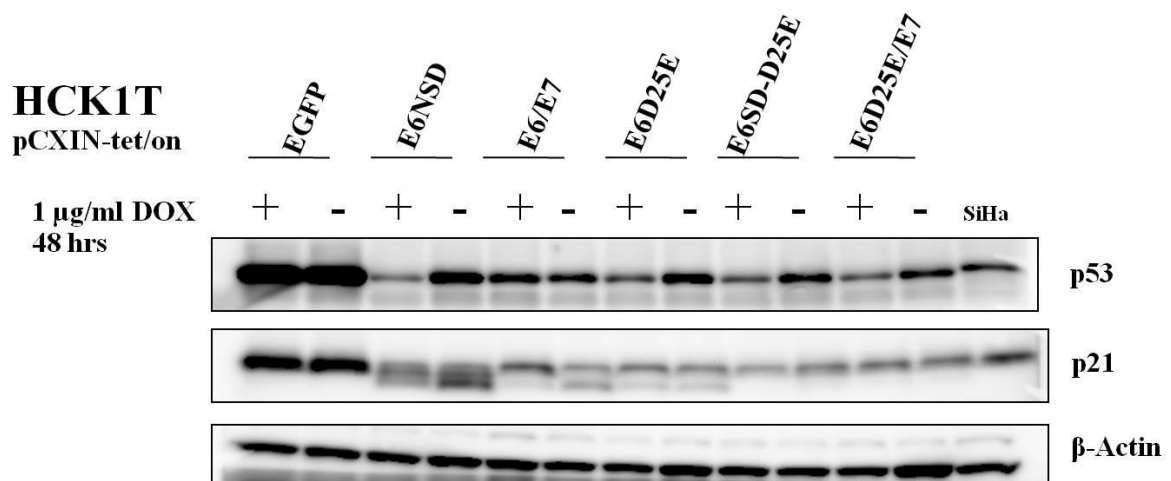
4.7 การทดสอบความสามารถของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ในการย่อยสลายโปรตีน p53

เนื่องจากหน้าที่ที่สำคัญอย่างหนึ่งของโปรตีน E6 คือสามารถย่อยสลายโปรตีน p53 ได้ ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าเป็น tumor suppressor cell ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน p53 ของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant เปรียบเทียบกับโปรตีน E6Pro ของเชื้อ HPV16 prototype โดยสกัดโปรตีนจากเซลล์ HCK1T ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ชนิดต่างๆ แล้วตรวจหาโปรตีน p53 และ p21 ซึ่งเป็น downstream ของโปรตีน p53 ด้วยวิธี Western blot assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีน E6D25E สามารถย่อยสลายโปรตีน p53 ได้ ไม่แตกต่างจากโปรตีน E6Pro ในทั้ง 2 กลุ่มเซลล์ที่ทำการทดลอง นอกจากนี้ยังตรวจโปรตีน p21 เพื่อยืนยันว่าโปรตีน p53 ถูกย่อยสลายไปจริงและส่งผลกระทบต่อ downstream ของโปรตีน p53 โดยพบว่ามีการลดลงของโปรตีน p21 นั้นสอดคล้องกับผลการลดลงของโปรตีน p53 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 12 สรุปได้ว่าโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน p53 ได้ และไม่แตกต่างจากโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype



รูปที่ 12 แสดงระดับของโปรตีน p53 และ p21 ในเซลล์ HCK1T ที่ passage 15 และ HFK3 ที่ passage 9 ที่ถูกติดเชื้อ retrovirus ที่มีโปรตีน E6 ชนิดต่างๆตรวจโดยวิธี western blot

จากนั้นทำการทดลองในเซลล์ HCK1T tet/on system โดยทำการเติม DOX ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/ml}$ ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วสกัดโปรตีนนำมาตรวจโปรตีน p53 และโปรตีน p21 ด้วยวิธี Western blot assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีน p53 มีการลดลงในเซลล์ที่มีการเติม DOX ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของโปรตีน p21 เช่นกัน สรุปได้ว่าโปรตีน E6 มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน p53 ซึ่งส่งผลต่อไปยังโปรตีน p21 ด้วย แสดงในรูปที่ 13

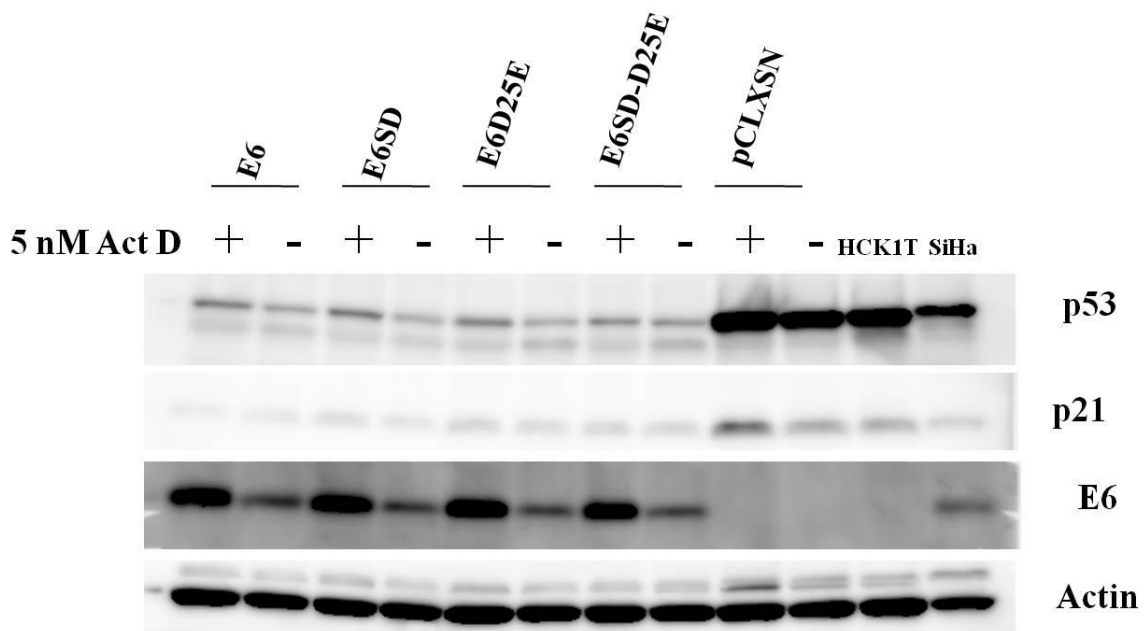


รูปที่ 13 แสดงผลการย่อยสลายโปรตีน p53 ของโปรตีน E6 ชนิดต่างๆ ในเซลล์ HCK1T tet/on system ซึ่งที่ถูกติดเชื้อ lentivirus ที่มีโปรตีน E6 ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี western blot assay

4.8 การเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยโปรตีน p53 ของโปรตีน E6D25E กับโปรตีน E6Pro

4.8.1 การทดสอบโดย actinomycin D treatment

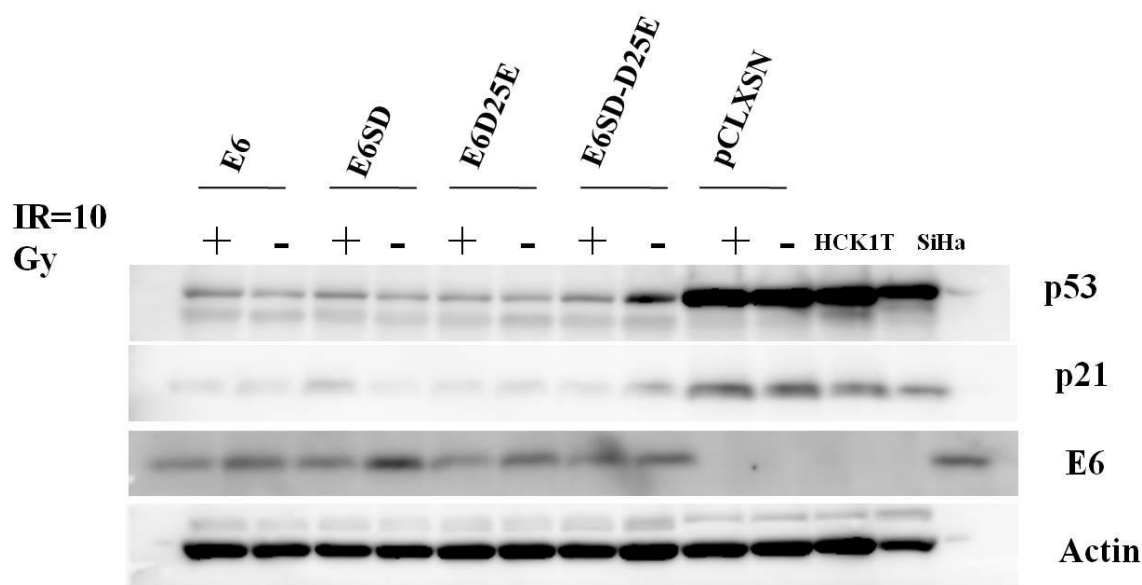
เพื่อตรวจสอบความสามารถของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ต่อการย่อยสลายโปรตีน p53 ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการ treat เซลล์ HCK1T tet/on system ที่ถูกติดเชื้อด้วย retrovirus และ treat เซลล์ติดเชื้อด้วย actinomycin D ที่ความเข้มข้น 5 nM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วสกัดโปรตีนนำมาตรวจโปรตีน p53 โปรตีน p21 และโปรตีน E6 ด้วยวิธี Western blot assay ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 14 จะพบระดับของ E6 ชนิดต่างๆมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นชัดเจนใน tet on system ปริมาณของโปรตีน p53 ทั้งในเซลล์ที่ treat ด้วย actinomycin D และในเซลล์ที่ไม่ได้ treat ด้วย actinomycin พบมีความแตกต่างกันเล็กน้อย เช่นเดียวกับปริมาณของโปรตีน p21 และโปรตีนทั้งสองชนิดลดลงแตกต่างจาก cell control เพราะตามหลักแล้ว actinomycin D จะส่งผลต่อโปรตีน p53 โดยจะไปชักนำให้โปรตีน p53 เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจาก actinomycin D มีหน้าที่ในการยับยั้งการ transcription ของเซลล์ ส่งผลให้มีการเพิ่มสูงขึ้นของโปรตีน p53 เพื่อที่จะยับยั้งการ replication ของเซลล์ จะพบว่า การแสดงออกของโปรตีน E6 แต่ละชนิดมีผลต่อการย่อยสลายโปรตีน p53 ได้ไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 14 แสดงระดับการแสดงออกของโปรตีน p53, p21 และ E6 ในเซลล์ HCK1T ที่ถูกติดเชื้อ retrovirus ของโปรตีน E6 ชนิดต่างๆ หลังจากได้รับ actinomycin D นาน 24 ชั่วโมง โดยวิธี western blot

4.8.2 การทดสอบโดยการฉายรังสีหรือ irradiation (IR)

เพื่อตรวจสอบความสามารถของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ต่อการย่อยสลายโปรตีน p53 ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการ treat เซลล์ HCK1T ที่ถูกติดเชื้อด้วย retrovirus ด้วยรังสีแกมมาที่ 10 Gray เป็นเวลานาน 10 นาที แล้วสกัดโปรตีนนำมาตรวจโปรตีน p53 โปรตีน p21 และโปรตีน E6 ด้วยวิธี Western blot assay ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 15 พบว่าระดับการแสดงออกของ โปรตีน E6 แต่ละชนิดไม่แตกต่างกัน และปริมาณของโปรตีน p53 ทั้งในเซลล์ที่ได้รับรังสีและในเซลล์ที่ไม่ได้รับรังสี พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกับปริมาณของโปรตีน p21 ซึ่งพบว่าการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกันในทั้ง 2 condition ที่ทำการทดลอง แต่จะแตกต่างจาก cell control ซึ่งอธิบายถึงผลการย่อยสลายโปรตีน p53 และ p21 โดยโปรตีน E6 แต่ละชนิดได้ไม่แตกต่างกัน

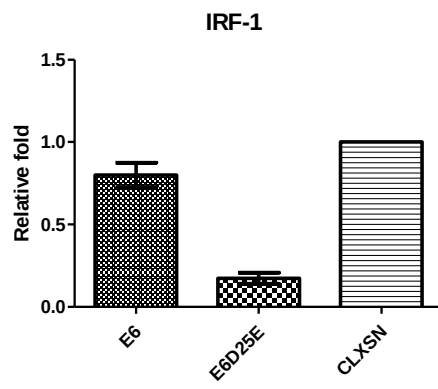
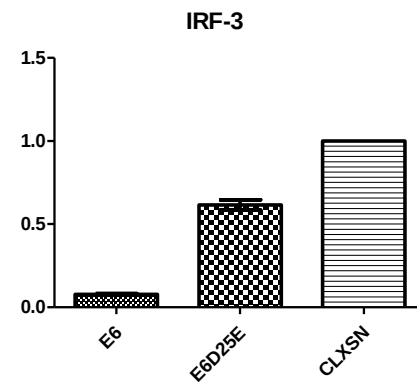
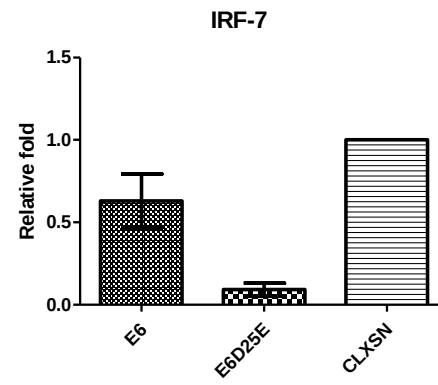
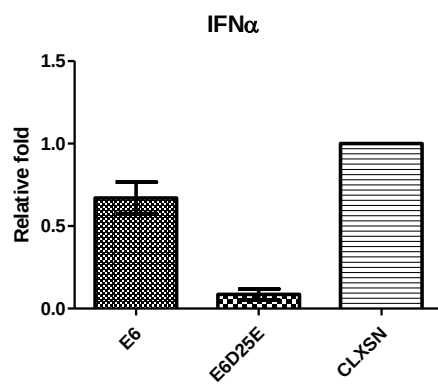
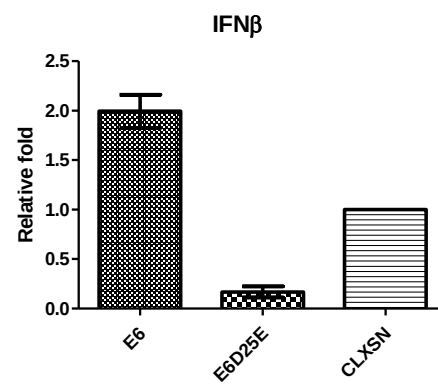


รูปที่ 15 แสดงระดับการแสดงออกของโปรตีน p53, p21 และ E6 ในเซลล์ HCK1T ที่ถูกติดเชื้อ retrovirus ของโปรตีน E6 ชนิดต่างๆ หลังจากได้รับ รังสี นาน 10 นาที โดยวิธี western blot

การทดลองนี้สรุปได้ว่าโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน p53 ไม่มีความแตกต่างจากโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype อย่างชัดเจน

4.9 การทดสอบความสามารถของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ต่อการ แสดงออกของจีนในระบบภูมิคุ้มกัน แบบ innate immunity

เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant นั้นมีผลต่อการหลบลี้ระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์โดยไปเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการเป็น immunogenicity และช่วยให้ไวรัสสามารถติดเชื้อแบบยืดยาวได้นานยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นการส่งเสริมการพัฒนาไปเป็นมะเร็งในที่สุด ดังนั้นในการศึกษานี้ต้องการทราบถึงอิทธิพลของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 E6 As variant ต่อการแสดงออกของจีนในระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ได้แก่ IRF-1, IRF-3, IRF-7 และ down stream signaling คือการแสดงออกของจีน $IFN\alpha$ และ $IFN\beta$ โดยเปรียบเทียบกับโปรตีน E6Pro ของ HPV16 E6 prototype ในการศึกษาได้เก็บเซลล์ที่ passages ที่ 25 (p25) มาสกัด RNA และ convert เป็น cDNA จากนั้นนำไปทำ real time PCR เพื่อตรวจหาการแสดงออกของจีน IRF-1, IRF-3, IRF-7 $IFN\alpha$ และ $IFN\beta$ โดย normalize กับจีน β -actin ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 16 การแสดงออกของ IRF-1 และ IRF-7 พบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ retrovirus ที่มี gene E6 ของ HPV16 As variant เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ HPV16 prototype (รูปที่ 12A และ 12C) ซึ่งแตกต่างจากการแสดงออกของ IRF-3 โดยพบว่าการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ HPV16 prototype เมื่อเปรียบเทียบกับ ที่ถูกติดเชื้อ HPV16 As variant (รูปที่ 12B) นอกจากนี้ยังทำการยืนยันผลการทดลองที่ได้โดยวัดการแสดงออกของ $IFN\alpha$ (รูปที่ 12C) และ $IFN\beta$ (รูปที่ 12D) ซึ่งเป็น downstream signaling proteins ของ IRFs พบว่าการแสดงออกของ $IFN\alpha$ และ $IFN\beta$ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ HPV16 As variant เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ HPV16 prototype

A**B****C****D****E**

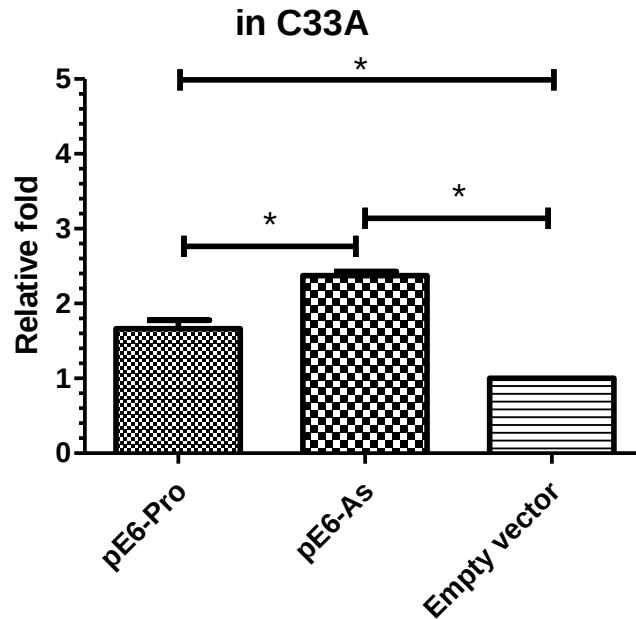
รูปที่ 16 การตรวจหาการแสดงออกของจีน IRF-1, IRF-3, IRF-7, IFN α และ IFN β ในเซลล์ HCK1T ที่ถูกติดเชื้อ retrovirus ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant, HPV16 prototype และเซลล์ control ใน passage ที่ 25 ด้วยวิธี real time PCR

4.10 การทดสอบความสามารถของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้าน epigenetic

การเปลี่ยนแปลงทางด้าน epigenetic (epigenetic change) หมายถึงการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของจีนโดยปราศจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับ DNA ซึ่งการเกิด epigenetic change มีบทบาทสำคัญในการก่อมะเร็ง ขบวนการการเปลี่ยนแปลงทาง epigenetic ประกอบด้วย DNA methylation, histone modifications and non coding RNAs สำหรับการเปลี่ยนแปลงทาง epigenetic ของ HPV ในมะเร็งปากมดลูก พบการศึกษาทางด้าน DNA methylation เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นในการศึกษานี้สนใจศึกษาผลของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant ต่อการชักนำการแสดงออกของ miR-21 และการแสดงออกของโปรตีน histone deacetylases 6 (HDAC6)

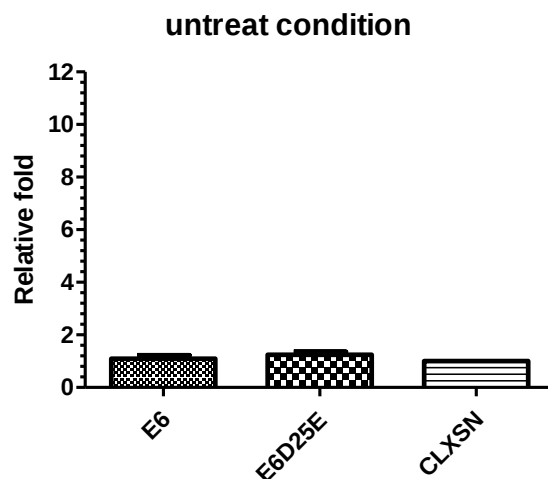
4.10.1 ผลของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant ต่อการชักนำการแสดงออกของ miR-21

เริ่มแรกเป็นการทดลองในระบบ transient transfection โดยตรวจหาระดับการแสดงออกของ miR-21 ในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A (ไม่มีการติดเชื้อ HPV) ที่ถูก transfect ด้วย expression vector pE6-As เปรียบเทียบกับ pE6-Pro ผลการทดลองพบระดับของ miR-21 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่ถูก transfect ด้วย pE6-As และ pE6-Pro เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ control ดังแสดงในรูปที่ 17 และนอกจากนี้พบว่า E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ miR-21 ได้ 2.3 เท่า ซึ่งสูงกว่า E6 ของเชื้อ HPV16 prototype ที่ชักนำให้มีการแสดงออกของ miR-21 ได้ 1.6 เท่า

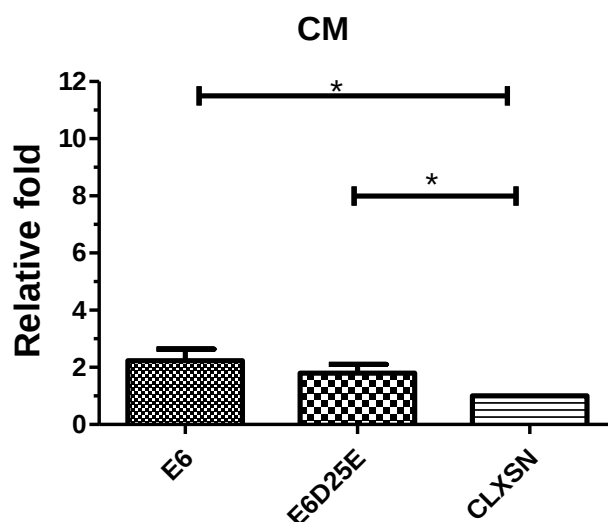


รูปที่ 17 แสดงระดับการแสดงออกของ miR-21 ในเซลล์ C33A ที่ถูก transfect ด้วย pE6-As เปรียบเทียบกับ pE6-Pro (*; มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$)

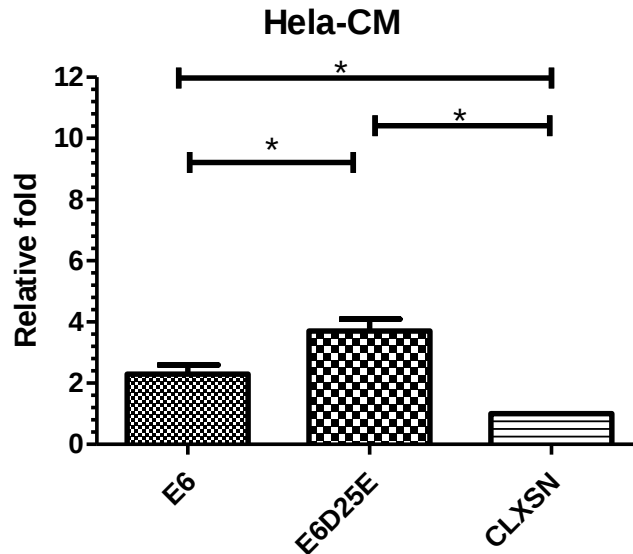
เพื่อยืนยันผลการทดลองว่า E6 สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของ miR-21 ได้ จึงทำการทดลองใน human cervical keratinocyte ซึ่งเซลล์นี้มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant (pCLXSNE6D25E) และ โปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype (pCLXSNE6) และเซลล์ control ซึ่งเป็นเซลล์ที่มี เวกเตอร์ pCLXSN (pCLXSN) โดยการทดลองนี้ใช้เซลล์ passage ที่ 25 มาทำการตรวจหาระดับของ miR-21 ผลการทดลองพบว่า miR-21 มีการแสดงออกต่ำมากในทุกเซลล์ไม่แตกต่างจากเซลล์ control ดังแสดงในรูปที่ 18 จากผลที่ได้คาดว่า โปรตีน E6 น่าจะไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ miR-21 ในเซลล์ที่พึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน E6 หรือเซลล์ที่ยังเลี้ยงอยู่ใน passage ต่ำๆ สภาวะดังกล่าวอาจมีความแตกต่างจากสภาวะ in vivo ซึ่งบริเวณที่เซลล์ติดเชื้ออาจจะสัมผัสกับปัจจัยต่างๆ รอบบริเวณที่มีการติดเชื้อ ดังนั้นจึงนำเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 นี้ ไป treat ด้วย culture medium (CM) และอีกการทดลองให้เติม อาหารเลี้ยงเซลล์ Hela คือ (CM-He) นาน 48 ชั่วโมง ในการทดลองที่ treat ด้วย CM พบว่า ระดับของ miR-21 สูงขึ้นในทั้ง 2 เซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ control และระดับของ miR-21 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro สูงกว่าในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E เล็กน้อย แสดงในรูปที่ 19 ผลที่ได้นี้ตรงกันข้ามกับผลของการทดลองที่ treat ด้วย CM-HeLa โดยพบระดับของ miR-21 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype ดังแสดงในรูปที่ 20



รูปที่ 18 แสดงระดับของ miR-21 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro และ โปรตีน E6D25E ในเซลล์ในเซลล์ HCK1T ที่ถูกติดเชื้อ retrovirus ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant (E6D25E), HPV16 prototype (E6) และเซลล์ control ใน passage ที่ 25 ในสภาวะที่เลี้ยงปกติ ตรวจโดยวิธี real time PCR

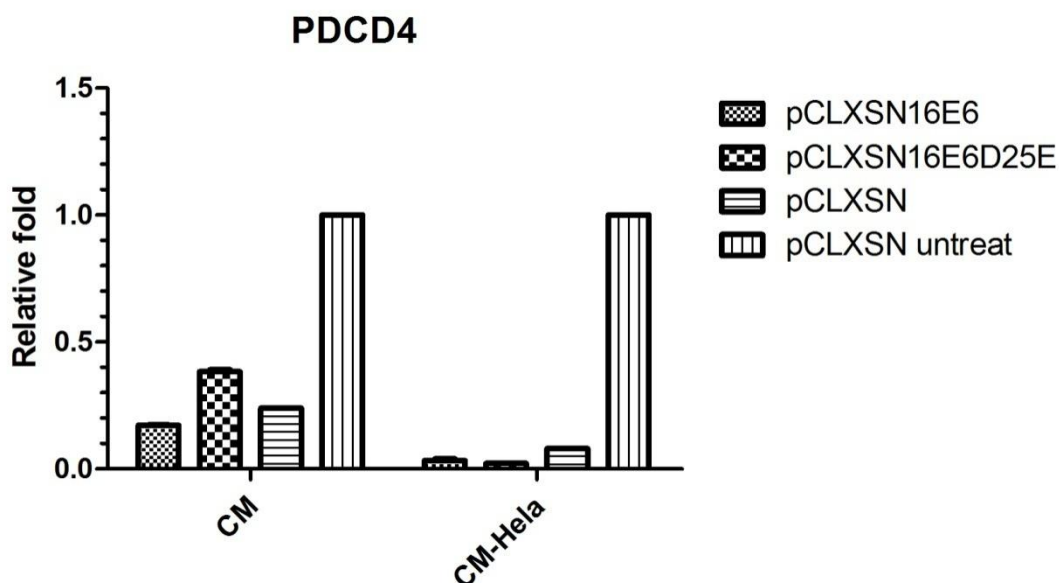


รูปที่ 19 แสดงระดับของ miR-21 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro และ โปรตีน E6D25E ในเซลล์ในเซลล์ HCK1T ที่ถูกติดเชื้อ retrovirus ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant (E6D25E), HPV16 prototype (E6) และเซลล์ control ใน passage ที่ 25 ในสภาวะที่ treat ด้วย culture medium (CM) นาน 48 ชั่วโมง (*; มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$)



รูปที่ 20 แสดงระดับของ miR-21 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro และ โปรตีน E6D25E ในเซลล์ในเซลล์ HCK1T ที่ถูกติดเชื้อ retrovirus ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant (E6D25E), HPV16 prototype (E6) และเซลล์ control ใน passage ที่ 25 ในสภาวะที่ treat ด้วย culture medium ของเซลล์ Hela (HeLa-CM) นาน 48 ชั่วโมง (*; มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$)

จากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่า E6 มีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของ miR-21 ดังนั้นเพื่อตรวจสอบผลการทดลองดังกล่าว จึงทำการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ programmed cell death (PDCD4) ซึ่งเป็น target ของ miR-21 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E และ โปรตีน E6Pro และเซลล์ control (pCLXSN) ทุกสภาวะที่เลี้ยง ซึ่งได้แก่ สภาวะเลี้ยงปกติ ภาวะที่ treat ด้วย CM และ treat ด้วย CM-HeLa จากการทดลองพบว่าระดับการแสดงออกของ PDCD4 มีการลดลงในทุกเซลล์ที่มีการ treat ด้วย CM และ treat ด้วย CM-HeLa แต่ระดับการแสดงออกของ PDCD4 จะแตกต่างกันไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ เมื่อ ได้รับการ treat ด้วย CM ขณะที่การ treat ด้วย CM-HeLa พบว่ามีผลทำให้ลดระดับการแสดงออกของ PDCD4 ในทุกภาวะทั้งในเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ซึ่งอธิบายผลของสารจาก CM-HeLa ซึ่งเป็น HPV infected cells และมีผลลดลงอย่างชัดเจนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ E6 โดยเฉพาะโปรตีน E6D25E ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า E6 สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ miR-21 ได้จริงโดยเฉพาะ E6D25E ภายใต้สภาวะที่มีสาร mediators จากเซลล์ติดเชื้อ HPV เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ miR-21 มีผลต่อการแสดงออกของ PDCD4 ซึ่งพบว่าการลดลงในเซลล์ที่ miR-21 เพิ่มขึ้น ดังแสดงใน **รูปที่ 21**

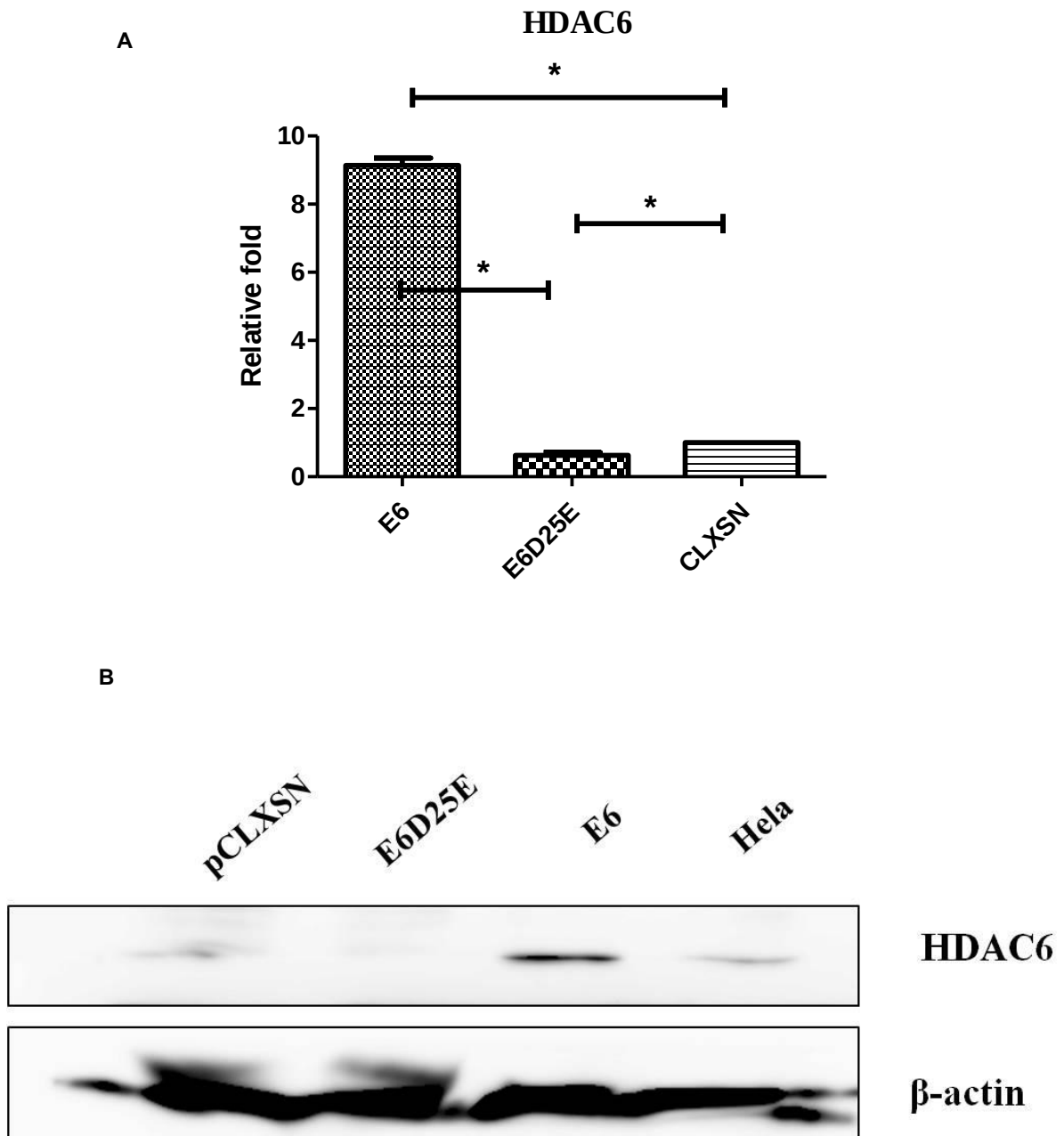


รูปที่ 21 ระดับการแสดงออกของ mRNA ของ PDCD4 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant (pCLXSN16E6D25E) โปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype (pCLXSN16E6) และเซลล์ control (pCLXSN) ที่ถูกเลี้ยงภายใต้การ treat ด้วย CM, การ treat ด้วย CM-Hela และการเลี้ยงภายใต้ภาวะปกติ

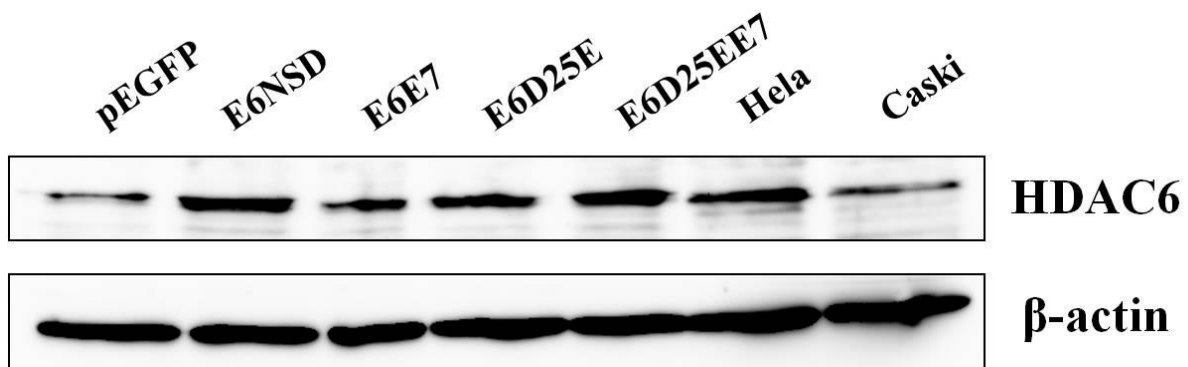
4.10.2 ผลของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ต่อการชักนำการแสดงออกของ HDAC6

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบการ overexpression ของ HDAC6 ในมะเร็งต่างๆ เช่น มะเร็งตับ มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ แต่ข้อมูลการแสดงออกของ HDAC6 ในมะเร็งปากมดลูก มีน้อยมาก ซึ่งก่อนหน้านี้กลุ่มของผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหา gene expression profiles ในเซลล์ human keratinocyte ที่ถูก trasduce ด้วย recombinant adenovirus ที่มี HPV16 E2 ทำให้ทราบว่า HDAC6 มีการแสดงลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากโปรตีน E2 ของเชื้อ HPV16 นั้นเอง [44] ดังนั้นในการศึกษาจึงต้องการทดสอบผลของโปรตีน E6 ต่อการแสดงออกของ HDAC6 ทั้งในระดับ mRNA และระดับโปรตีน ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 22 พบว่า HDAC6 มีระดับการแสดงออกสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E และระดับการแสดงออกของ HDAC6 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ control ดังแสดงในรูปที่ 22 A และไม่สามารถตรวจพบโปรตีน HDAC6 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ดังแสดงในรูปที่ 22 B แต่สามารถพบการแสดงออกของโปรตีน HDAC6 ในระดับสูงในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro นอกจากนี้ได้ตรวจหาระดับการแสดงออกของโปรตีน HDAC6 ในเซลล์ HCK1T tet/on system เช่นกันเพื่อยืนยันผลการทดลองที่โปรตีน E6 มีผลต่อการแสดงออกของ HDAC6 ซึ่งพบว่าในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 prooototype มีระดับการแสดงออก

ของโปรตีน HDAC6 สูงกว่าในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant ดังแสดงในรูปที่ 23



รูปที่ 22 ระดับการแสดงออกของ HDAC6 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 (HPV16 prototype) เซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E (HPV16 As variant) และ เซลล์ control (CLXSN) โดบมีเซลล์ HeLa เป็น positive control

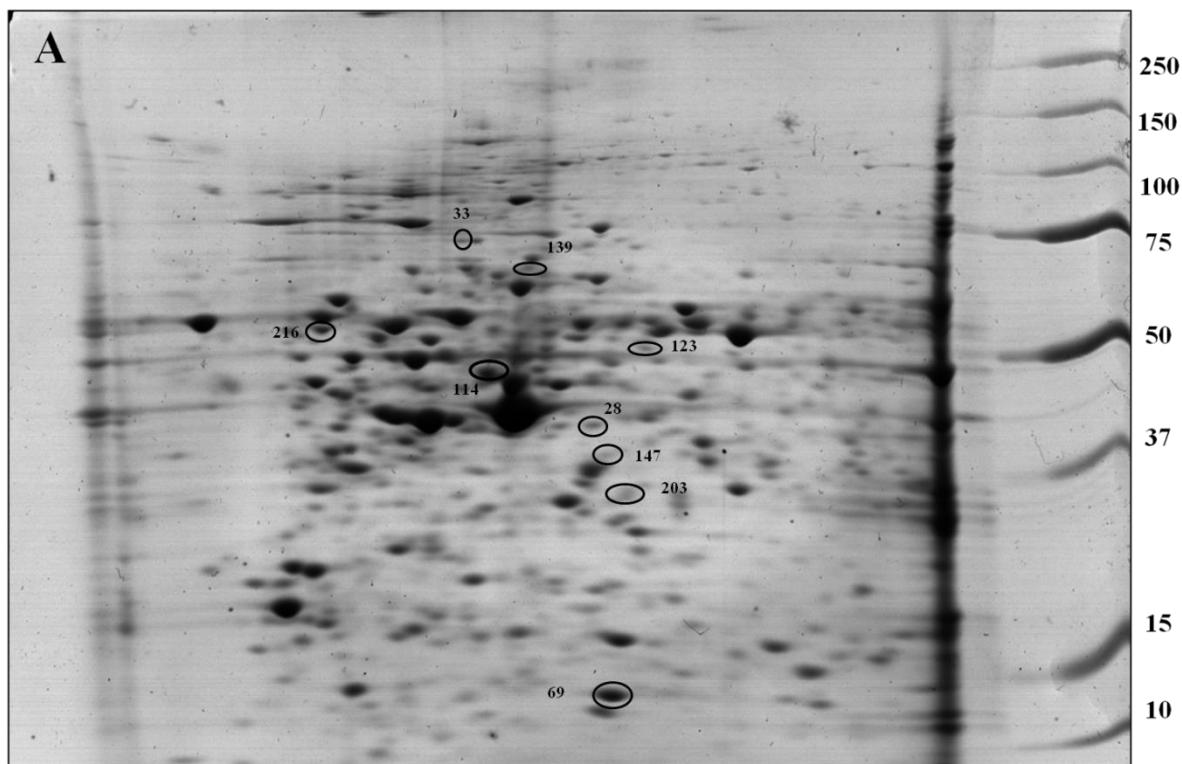


รูปที่ 23 ระดับการแสดงออกของ HDAC6 ในเซลล์ HCK1T tet/on ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro (E6NSD), เซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 และโปรตีน E7 ของเชื้อ HPV16 prototype (16E6E7), เซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant (E6D25E), เซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant และโปรตีน E7 ของเชื้อ HPV16 prototype (E6D25EE7) เซลล์ control (pEGFP) และเซลล์ HeLa และ Caski เป็น positive control

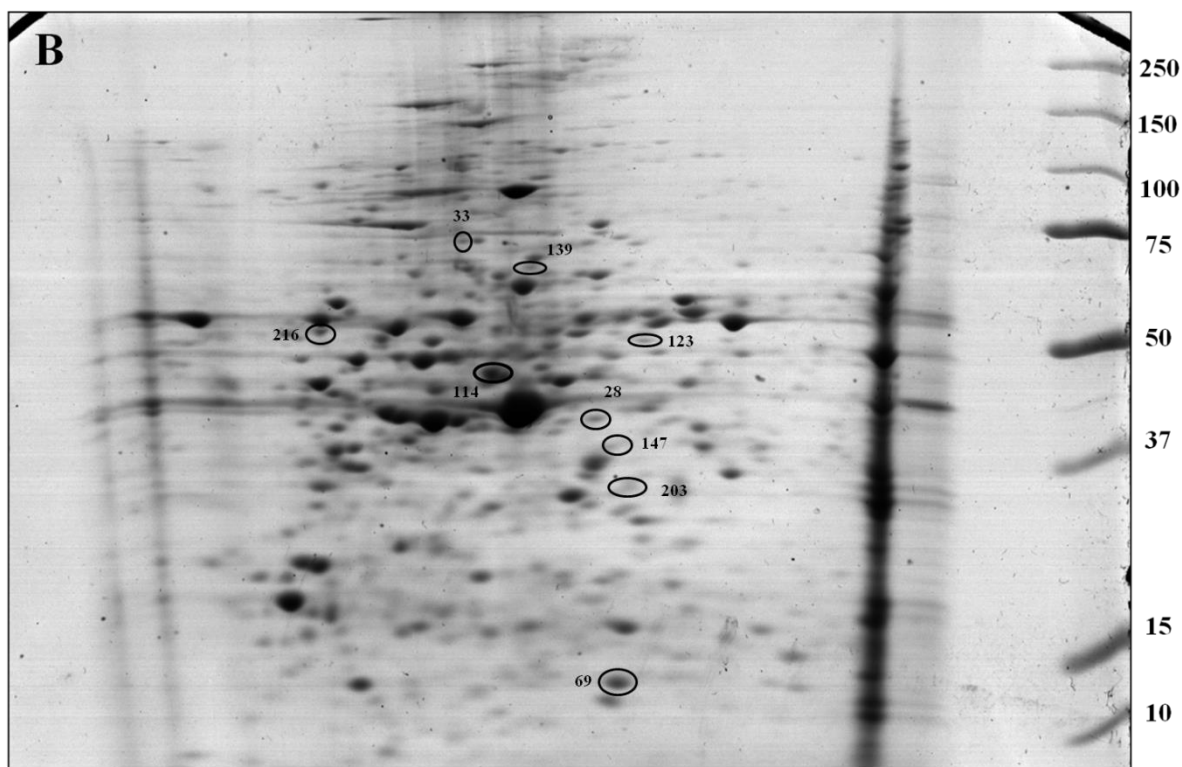
4.11 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant

การศึกษานี้เพื่อต้องการทราบลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant โดยเก็บเซลล์ดังกล่าวที่ p25 มาสกัดโปรตีน แล้วนำไปแยกด้วยการทำ 2 D gel electrophoresis ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ผลการทดลองทั้ง 2 กลุ่ม พบจุดโปรตีนเฉลี่ยประมาณ 300-320 จุดดัง แสดงในรูปที่ 24 หลังจากทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageMaster 2D Platinum 7 และทดสอบทางสถิติด้วยวิธี one way ANOVA พบจุดโปรตีนทั้งหมด 9 จุดที่มีความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E เชื้อ HPV16 As variant และเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro เชื้อ HPV16 prototype ตารางที่ 2 แสดงจุดโปรตีนทั้งหมดที่มีการแสดงออกที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งชื่อจุดโปรตีนทั้งหมด โดยพบว่า มีโปรตีน 4 ชนิด ที่มีการแสดงออกมากกว่า 1.5 เท่า ได้แก่ keratintype II, tumor rejection antigen (gp), actin และ keratin 7

pH 4 ← → pH 7 MW (kDa)



pH 4 ← → pH 7 MW (kDa)



รูปที่ 24 แสดงรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro เชื้อ HPV16 prototype (A) และเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E เชื้อ HPV16 As variant (B) ด้วยวิธี 2D gel

ตารางที่ 2 Protein identified in E6D25E and E6Pro expressing HCK1T by LC MS/MS and MASCOT software.

Spot No.	Protein name	ID. number	Fold	pI	Score	Match	P-value
123	Keratin type II	gi 908801	1.67	8.09	922	21	0.001
33	Lamin-B1 isoform 1	gi 5031877	1.25	5.11	753	18	0.015
216	Tumor rejection antigen (gp96) 1 variant	gi 62088648	2.13	5.08	772	19	0.026
147	Actin, cytoplasmic1	gi 4501885	1.61	5.29	175	7	0.028
69	Glutathione S-transferase	gi 2204207	1.37	5.43	871	26	0.033
28	Keratin type II	gi 908801	1.16	8.09	897	16	0.040
139	MTHSP75	gi 292059	1.16	5.97	112	3	0.040
203	Annexin A8	gi 49257004	1.33	5.56	284	8	0.041
114	Keratin 7	gi 12803727	1.57	5.42	1705	42	0.047

5. สรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้ได้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติและความสามารถในการก่อโรคมะเร็งของ E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant โดยเปรียบเทียบกับ E6Pro ของเชื้อ HPV16 prototype ซึ่งประกอบด้วยการทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน p53 และความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของจีนในระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ โดยทำการสร้าง retrovirus vectors และ lentivirus vectors ที่มีจีน E6 แบบต่างๆ ตามที่ได้กล่าวไว้ในขั้นตอนการทดลอง จากนั้นทำการสร้างเซลล์ HCK1T และ HFK ให้มีการติดเชื้อ retroviruses และเซลล์ HCK1T tet/on system ให้มีการติดเชื้อ lentiviruses แล้วทำการตรวจยืนยันผลการทดลองว่าเซลล์ทั้งหมดนั้นหลังจากติดเชื้อไวรัสแล้วมีการแสดงออกของโปรตีน E6 จริง ด้วยวิธี Western blot assay จากนั้นนำเซลล์ HCK1T และ HFK ที่ทำการติดเชื้อ retroviruses มาทดสอบความสามารถในการเพิ่มจำนวนโดยทำการเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน 3-4 เดือน แล้วคำนวณหาค่า PDs ของแต่ละเซลล์ พบว่าค่า PDs ของแต่ละเซลล์ที่มีจีน E6 นั้นไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า PDs อยู่ในช่วง 28-30 ยกเว้นในเซลล์ control ที่มีค่า PDs เท่ากับ 18 ในการศึกษาครั้งนี้สรุปว่าความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ E6 ของเชื้อ HPV16 As variant ไม่แตกต่างจากความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์ของ E6 ของเชื้อ HPV16 As variant จากนั้นทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน p53 ซึ่งเป็นหน้าที่ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของโปรตีน E6 โดยทำการตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน p53 และโปรตีน p21 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 แบบต่างๆ ด้วยวิธี western blot assay พบว่า การแสดงออกของโปรตีน p53 ในเซลล์ที่มี E6 ของเชื้อ HPV16 As variant ลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแสดงออกของโปรตีน p53 ในเซลล์ที่มี E6 ของเชื้อ HPV16 prototype ดังนั้นเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้ จึงทำการทดลองเพิ่มเติม โดยชักนำให้เซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 แบบต่างๆ มีการแสดงออกของโปรตีน p53 เพิ่มขึ้นโดยการเติม actinomycin D และการฉายรังสี ผลการทดลองของทั้ง 2 วิธี พบว่าการแสดงออกของโปรตีน p53 ในแต่ละเซลล์ไม่มีความแตกต่างกัน การทดลองนี้สรุปได้ว่าโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน p53 ได้ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 As variant มีคุณสมบัติในการก่อมะเร็งได้ไม่แตกต่างจากโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype

การทดลองการวัดการแสดงออกของจีนในระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity โดยพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของ IRF-1 และ IRF-7 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant และพบว่า IRF-3 มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro ของเชื้อ HPV16 prototype นอกจากนี้การแสดงออกของ IFN- α และ IFN- β ซึ่งเป็น down stream signaling proteins ของ IRFs พบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant

การศึกษาผลของโปรตีน E6 ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของ miR-21 การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารคัดหลั่งจากเซลล์บริเวณที่มีการติดเชื้อ HPV มีผลต่อการทำงานของโปรตีน E6 และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ miR-21 ด้วย แต่อย่างไรก็ตาม E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant และ E6Pro ของเชื้อ HPV16 prototype ก็สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ miR-21 ได้แตกต่างกันด้วย ข้อมูลที่ได้นี้อาจเป็นส่วนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับความแตกต่างในการก่อมะเร็งระหว่าง HPV16 As variant และ HPV16 prototype นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าโปรตีน E6 มีผลต่อการแสดงออกของ HDAC6 ด้วย โดยพบว่าในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ E6Pro ของเชื้อ HPV16 prototype มีระดับการแสดงออกของ HDAC6 สูงมากอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของ E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ HDAC6 มีความเกี่ยวข้องกับเชื้อ HPV16 และอาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งเสริมให้เซลล์ที่ติดเชื้อมีการพัฒนาไปเป็นมะเร็ง

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant เปรียบเทียบกับรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro ของเชื้อ HPV16 prototype ผลการทดลองนี้ พบจุดโปรตีนทั้งหมด 9 จุด ที่มีความความเข้มของแบนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และมี 4 จุดโปรตีน มีการแสดงออกมากกว่า 1.5 เท่า ได้แก่ โปรตีน keratintype II, tumor rejection antigen, actin และ keratin 7 โดยที่ keratintype II, actin และ keratin 7 เป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ cytoskeleton ซึ่งทำหน้าที่ในการรักษาสภาพโครงสร้างของเซลล์

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant เปรียบเทียบกับรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro ของเชื้อ HPV16 prototype พบจุดโปรตีนทั้งหมด 11 จุด ที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

6. บทวิจารณ์

การศึกษาก่อนหน้านี้ของกลุ่มผู้วิจัยเองพบว่า HPV16 As variant ถูกพบมากที่สุด ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกและพบว่ามีความสัมพันธ์ในการพัฒนาของมะเร็งปากมดลูก [40, 43] และเป็น ที่ทราบกันแล้วว่า HPV16 gene variation เป็นอีกหนึ่งปัจจัยเสี่ยงในการเกิดการติดเชื้อแบบ persistence ที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาไปเป็นมะเร็งปากมดลูก [42, 45-47] ดังนั้น การศึกษาหน้าที่และการทำงานของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 variant จึงได้รับการศึกษาและเผยแพร่ออกมา มากขึ้น เนื่องจาก E6 มีคุณสมบัติเป็น oncoprotein มีคุณสมบัติทำให้เกิด cell transformation และสามารถจับและทำลายโปรตีนของโฮสต์ที่ทำหน้าที่ในหลายระบบได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาการทำงานของ E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ยังมีข้อมูลของการศึกษาน้อย ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการก่อยมะเร็งของ E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ในเซลล์ HCK1T จากผลการทดลองพบว่า การเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As และ E6Pro ของเชื้อ HPV16 prototype มีลักษณะเหมือนกัน ผลที่ได้ นี้ไม่แตกต่างจากความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน p53 ซึ่งพบว่าโปรตีน E6D25E และ E6Pro มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน p53 ได้ ไม่แตกต่างกัน ในการทดสอบถึงผลต่อการแสดงออกของจีนในระบบภูมิคุ้มกันนั้น พบว่า E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant สามารถยับยั้ง การแสดงออกของ mRNA ของ IRF-1 และ IRF-7 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของ IFN α และ IFN β ลดลง การศึกษานี้ยังพบว่า E6 ของ HPV มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง epigenetic โดยกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ miR-21 และ HDAC6 ได้ในระดับแตกต่างกัน โดยที่ E6D25E จะสามารถกระตุ้น miR-21 ได้ดีกว่า E6Pro ขณะที่ไม่มีผลต่อการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ HDAC6 ซึ่งต่างจาก E6Pro นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังได้แสดงรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant เปรียบเทียบกับรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ E6 ของเชื้อ HPV16 prototype โดยพบจุดโปรตีนทั้งหมด 11 จุด ที่มีการแสดงออกของที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็ง คือ เกิด cell immortalization ซึ่ง สาเหตุของการติดเชื้อ HPV16 ในการเกิดมะเร็งปากมดลูก โดยเกิดจากการทำงานของโปรตีน E6 และ E7 ซึ่งมีหน้าที่ที่สำคัญคือ ย่อยสลายโปรตีน p53 และยับยั้งการทำงานของโปรตีน pRb ตามลำดับ อย่างไรก็ตามโปรตีน E7 เพียงชนิดเดียวพบว่าสามารถชักนำให้เซลล์เกิด immortal ได้ แต่คุณสมบัติดังกล่าวนี้โปรตีน E6 เพียงชนิดเดียวมีผู้รายงานว่าไม่สามารถทำได้ จะต้องอาศัยหน้าที่ของโปรตีน E7 ร่วมด้วยจึงจะเหนี่ยวนำทำให้เซลล์เกิด immortal ได้ [48, 49] งานวิจัยนี้ต้องการทราบการทำงานของ E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ HCK1T และ HFK ซึ่งเซลล์ HCK1T นั้นทำการติดเชื้อเฉพาะจีน E6 ส่วนเซลล์ HFK ต้องทำการติดเชื้อทั้ง E6 และ E7 เนื่องจากคุณสมบัติของ primary cells ไม่สามารถที่จะเลี้ยงได้เป็นเวลานานและตามที่กล่าวมาเนื่องจากมีรายงานว่า การแสดงออกของ E6 อย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะทำ

ให้เซลล์กลายเป็น immortal ได้ ผลการศึกษาพบว่า เซลล์ทั้งสองชนิดมีผลการทดลองไม่แตกต่างกัน คือมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง มี PD เท่ากันทั้งในภาวะที่มีโปรตีน E6 อย่างเดียวหรือในเซลล์ที่มีโปรตีน E6 และ E7 อย่างไรก็ตามในการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Ricard และคณะ (2010) เปรียบเทียบความสามารถของ E6 variations ร่วมกับ E7 ในการเพิ่มช่วงชีวิตของเซลล์ immortal keratinocyte ซึ่งพบว่าโปรตีน E6 ของ HPV16 AA variant มีความสามารถในการเจริญเติบโตไวกว่า E6Pro แต่ผลในการย่อยสลายโปรตีน p53 นั้นไม่แตกต่างกัน [50] นอกจากนี้ในการศึกษาของ Sichero และคณะ (2012) เปรียบเทียบคุณสมบัติในการเพิ่มช่วงชีวิตของเซลล์โดยโปรตีนที่ได้จาก HPV16 E6 variants ชนิดต่างๆ ได้แก่ AA, E-P และ E-350G พบว่า E-P ที่ถูกแสดงออกในเซลล์ keratinocyte มีประสิทธิภาพน้อยสุดในการกระตุ้นเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเซลล์ [51] จากการศึกษาของ Niccoli และคณะ (2012) ทำการเปรียบเทียบการทำงานของโปรตีน E6 เพียงชนิดเดียวในการชักนำให้เซลล์กลายเป็น immortal และโปรตีน E6 ของ HPV16 AA variant มีความสามารถในการในการทำให้เซลล์กลายเป็น immortal ได้ดีกว่า E6Pro [52] ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของผู้วิจัยนี้ที่พบว่าประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนและการเจริญเติบโตระหว่าง E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant กับ prototype ไม่แตกต่างกัน

การศึกษาหน้าที่การทำงานของโปรตีน E6 variant ส่วนใหญ่มีรายงานการศึกษาในกลุ่มที่เป็น European variant เนื่องจากพบมากในแควยุโรป เช่น โปรตีน E6 L83V ของ European variant พบว่าจะสามารถส่งเสริมการทำงานของ MAPK signaling และ Ras activity นอกจากนี้ยังยับยั้ง Notch1 signal ได้ดีกว่า E6 prototype [37] และสำหรับการย่อยสลายโปรตีน p53 เป็นหน้าที่สำคัญอย่างหนึ่งของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 คุณสมบัติของ E6 ได้มีการทดสอบเปรียบเทียบกันระหว่าง E6 variants ต่างๆ ทั้งการทดลองแบบ transfection assay และ stable transduction assay ในการทดลองโดย Lichtig และคณะ (2006) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงานของโปรตีน E6 variants ทั้งหมดจาก 10 variants เช่น ศึกษาการย่อยสลายโปรตีน p53, โปรตีน Bax ซึ่งทำการทดลองแบบ transient transfection [53] และจากนั้นในปี 2007 Asadurian และคณะ ได้นำ E6 variants เหล่านี้ไปทดลองคุณสมบัติในการก่อมะเร็งในเซลล์ HFK [54] ซึ่ง E6 variants ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งและย่อยสลายโปรตีน p53 ได้ดี ในการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลาย p53 ด้วย E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant โดยเปรียบเทียบกับ E6 L83V ของเชื้อ HPV16 European variant ใน expressing cell lines ซึ่งพบความสามารถในการย่อยสลาย p53 ของทั้งสอง variant ไม่มีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกับผลการตรวจวัด p21 CIP/WAF1 พบว่ามีการลดลงและไม่ต่างกันในทุก 2 เซลล์ [55] และจากผลการศึกษาของ Hand และคณะ (2014) พบว่า E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant สามารถย่อยสลายโปรตีน p53 ได้ดีและไม่แตกต่างจาก E6 ของเชื้อ HPV16 prototype [56] สอดคล้องกับผลการศึกษาของทางผู้วิจัยนี้ที่พบว่า E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant กับ prototype มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน p53 ได้ดีเหมือนกัน

ระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity เป็นด่านแรกในการที่จะป้องกันการติดเชื้อไวรัส [57] และ IFN type I ได้แก่ IFN- α และ IFN- β จะเป็นตัวแรกที่ถูกกระตุ้นภายหลังจากการติดเชื้อด้วยไวรัส

โดยหน้าที่ของมันคือจะไปขัดขวางการ replication และการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ (57) และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Ref 58?...). IRFs จึงมีบทบาทสำคัญมากเนื่องจากโปรตีนกลุ่มนี้จะทำงานกระตุ้นให้มีการสร้างหรือหลั่ง IFN type I ออกมา จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เซลล์ที่ถูกติดเชื้อ HPV โปรตีน E6 และ E7 จะมีคุณสมบัติเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันโดยไปขัดขวางสร้าง IFN type I [15, 17, 18, 20]

IRF-1 เป็นสมาชิกตัวแรกของกลุ่ม IRFs มีหน้าที่เป็น transcription factor ซึ่งจะไปจับกับ IFN- β promoter และควบคุมการ transcription ของจีนที่เกี่ยวกับการต่อต้านการติดเชื้อด้วยไวรัส รวมทั้งมีหน้าที่ใน immunomodulation, antiproliferation and stimulation of cell apoptosis [58] จากการศึกษาที่ผ่านมาทราบว่า HR-HPV E7 สามารถจับกับ IRF-1 และยับยั้งการ transactivation ของ IRF-1 ซึ่งคาดว่า HR-HPV E7 สามารถขัดขวางการกระตุ้น IFN type I signalling [17] IRF-3 และ IRF-7 เป็น transcription factor ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ IFN type I โดย IRF-3 มีการแสดงออกและพบได้ในเซลล์ทุกชนิด?? และจะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกในกรณีการติดเชื้อด้วยไวรัส เมื่อโปรตีน IRF-3 ถูกเติมหมู่ฟอสเฟสทำให้มีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้ IRF-3 จับกันเอง หรือจับกับโปรตีนตัวอื่นได้ หลังจากจับกันแล้วก็จะเกิด complex molecule เคลื่อนที่เข้าไปยังนิวเคลียสแล้วไปจับกับ promoter และกระตุ้นการแสดงออกของ IFN type I ส่วน IRF-7 จะคล้ายกับ IRF-3 มาก มีการแสดงออกในระดับค่อนข้างต่ำในเซลล์ทั่วไป การทำงานของ IRF-7 ก็คล้ายกับ IRF-3 โดยจะกระตุ้นผ่านทาง TLRs เพื่อกระตุ้นให้มีการสร้าง IFN type I [59] นอกจากนี้ยังพบว่า IRF-7 เกี่ยวข้องกับการ switching ของ EBV latency type โดย EBV latent membrane protein 1(LMP-1) สามารถควบคุมการแสดงออกและกระตุ้นการถูกเติมหมู่ฟอสเฟตของ IRF-7 ด้วย [60] และ IRF-7 ยังมีคุณสมบัติในการก่อมะเร็งได้ด้วยโดยร่วมกับ LMP-1 ในขั้นตอนการกระตุ้นให้เซลล์ transformation [61] อย่างไรก็ตามมีการทดลอง knock-out จีน IRF-7 ในหนู mice ออก พบว่า IRF-7 จำเป็นต่อการสร้าง IFN type I ผ่านทางการติดเชื้อด้วยไวรัส และ MyD88-independent signaling pathway เหมือนกับ TLR-activated MyD88-dependent pathway [62, 63] จากผลการทดลองของผู้วิจัยพบว่าระดับ mRNA ของ IRF-1, IRF-3 และ IRF-7 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ control และระดับ mRNA ของ IRF-1 และ IRF-7 ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6Pro แสดงว่า E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant มีผลต่อระดับการแสดงออกของจีนในระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ผลดังกล่าวอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้ไวรัสสามารถอยู่รอดชีวิตภายในร่างกายได้หรืออาจจะช่วยให้ไวรัสมีการติดเชื้อแบบ persistence เกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเกิดมะเร็งต่อไป

miR-21 ถูกพบว่ามีแสดงออกสูงมากในมะเร็งหลายชนิด รวมทั้งมะเร็งปากมดลูกด้วย แต่ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่าง HR-HPV กับ miR-21 นั้นพบน้อย ในการศึกษาจึงต้องการศึกษาผลของโปรตีน E6 ต่อการแสดงออกของ miR-21 จากการทดลองพบว่า E6D25E ของเชื้อ HPV16 As

variant มีผลต่อการกระตุ้นการแสดงออกของ miR-21 ได้สูงกว่าโปรตีน E6Pro จากข้อมูลการเพิ่มสูงขึ้นของ miR-21 นี้สอดคล้องกับการลดระดับการแสดงออกของ PDCD4 ซึ่งเป็นโปรตีนเป้าหมายของ miR-21 และเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ได้ว่า E6 มีผลต่อการกระตุ้นแสดงออกของ miR-21 ทำให้ PDCD4 ลดการแสดงออกลง ซึ่งผลการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเมื่อมีการแสดงออกของ miR-21 ในระดับสูงทำให้การแสดงออกของ PDCD4 ลดลง ส่งผลให้มีการแสดงออกของ interleukin (IL)-10 เพิ่มขึ้นและไปลด activity ของ NF- κ B activity [64] และจากการศึกษาของ Yoa และคณะ (2011) พบว่าการแสดงออกของ miR-21 ไวต่อการกระตุ้นด้วย TGF- β และ complete medium [65] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของผู้วิจัยที่พบว่า miR-21 มีการแสดงออกสูงขึ้น เมื่อเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ทั้ง E6D25E และ E6Pro ถูก treat ด้วย CM-HeLa จากข้อมูลที่ได้นี้ การควบคุมการแสดงออกของ miR-21 ไม่ได้ขึ้นกับ E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant เท่านั้น ยังมีปัจจัยอื่นซึ่งเป็นสารคัดหลั่งบริเวณโดยรอบที่มีการติดเชื้อ HPV ร่วมด้วย

เนื่องจาก HDAC6 เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในหลายๆ ขบวนการของเซลล์ เช่น cell migration, cell proliferation and death, immune response, transcription และ protein degradation [66] ดังนั้นจึงพบการ overexpression ของ HDAC6 ในมะเร็งหลายชนิด เช่น พบการเพิ่มขึ้นของ HDAC6 ในเซลล์ MCF-7 และยังพบว่าเป็นยีนที่ควบคุม estrogen ด้วย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเกิด metastasis ในมะเร็งเต้านม [67] นอกจากนี้ยังพบการ overexpression ของ HDAC6 ใน oral squamous cell lines และมีความสัมพันธ์กับระดับความรุนแรงของมะเร็ง [68] ส่วนใน ovarian cancer cell line และ tissues พบการ overexpression ของ HDAC6 เช่นกันและยังเกี่ยวข้องกับ cell motility and migration [69] แต่บทบาทของ HDAC6 ในมะเร็งปากมดลูก ยังไม่มีการรายงาน แต่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน E7 ของ HPV31 สามารถจับกับ HDACs class I ช่วยเพิ่ม life span ของ keratinocyte และรักษาจีโนมของไวรัสด้วย (121) การศึกษาค้นพบว่าโปรตีน E6Pro ของเชื้อ HPV16 prototype มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มสูงขึ้นของ HDAC6 ซึ่งแตกต่างจากผลของโปรตีน E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant ที่พบการแสดงออกของ HDAC6 ในระดับต่ำๆ จากผลการศึกษานี้อาจส่งผลต่อความรุนแรงในการก่อมะเร็งปากมดลูกที่แตกต่างกันของโปรตีน E6 ได้

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของจีนและโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant นั้นพบว่ามีศึกษาค้นคว้าค่อนข้างน้อยมาก ทำให้มีข้อมูลในจุดนี้น้อยมาก อย่างไรก็ตามมีผลการวิจัยของ Jang และคณะ (2011) ศึกษาแบบการแสดงออกของจีนในเซลล์มะเร็งปากมดลูก C33A (ไม่มีการติดเชื้อ HPV) ที่ถูก transfect ด้วย gene E6As ของเชื้อ HPV16 As variant เข้าไป เปรียบเทียบกับเซลล์ C33A ที่ถูก transfect ด้วย gene E6 ของเชื้อ HPV16 As prototype จากผลการศึกษาพบทั้งหมด 211 จีน ที่มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นและลดลง แตกต่างจากจีนควบคุมอย่างน้อย 1.5 เท่า อย่างมีนัยสำคัญ พบว่าในเซลล์ C33A ที่ถูก transfect ด้วย gene E6As ของเชื้อ HPV16 As variant มีจีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันทั้งหมด 14 จีน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ C33A ที่ถูก transfect ด้วย gene E6 ของเชื้อ HPV16 prototype โดยแบ่ง

ออกเป็น 9 จีน พบว่ามีการแสดงออกลดลง ได้แก่ ZMZ1, RPL23, MAPK4, RPL31, RARS, LAMB3, HSPA14, AIFM2, IFRD1 และ 5 จีน มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ได้แก่ UBC, RPS9, HLA-A,-B, ROCK2 ซึ่ง AIFM2, RPL23 และ ROCK2 ที่ถูกบ่งชี้ว่ามีความเกี่ยวข้องในการก่อมะเร็งของ E6D25E ของเชื้อ HPV16 As variant [41] สำหรับการศึกษาด้านรูปแบบการแสดงออกของโปรตีน พบการศึกษาของ Richard และคณะ (2010) ทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการ immortalization การ transformation และศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 AA variant กับเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของเชื้อ HPV16 prototype การทดลองนี้ พบโปรตีนทั้งหมด 13 ตัว ที่สามารถบ่งชี้ได้แก่ YWHAZ, SET, RAB30, PARK7, PGM2, MDH1, TKT, FUBP1, AKR1C1, IDH2, PKM2, GAPDH [50] จากผลการศึกษาของผู้วิจัยพบจำนวนจุดโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งหมด 9 จุดโปรตีน และมี 4 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกมากกว่า 1.5 เท่า โดยมี โปรตีน 3 ตัว เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวกับการรักษาสภาพของโครงสร้างของเซลล์ และอีกหนึ่งจุดโปรตีนมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

หนังสืออ้างอิง

1. Domingo, E.J., et al., *Epidemiology and prevention of cervical cancer in Indonesia, Malaysia, the Philippines, Thailand and Vietnam*. Vaccine, 2008. 26 **Suppl** 12: p. M71-9.
2. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. 324(1): p. 17-27.
3. Doorbar, J., *The papillomavirus life cycle*. J Clin Virol, 2005. 32 **Suppl** 1: p. S7-15.
4. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. J Pathol, 1999. 189(1): p. 12-9.
5. Smith, J.S., et al., *Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update*. Int J Cancer, 2007. 121(3): p. 621-32.
6. Schiffman, M., et al., *The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution*. Virology, 2005. 337(1): p. 76-84.
7. Sriamporn, S., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer from a prospective study in Khon Kaen, Northeast Thailand*. Int J Gynecol Cancer, 2006. 16(1): p. 266-9.
8. Fujii, T., et al., *Ancillary testing of liquid-based cytology specimens for identification of patients at high risk of cervical cancer*. Virchows Arch, 2008. 453(6): p. 545-55.

9. Kupper, T.S. and R.C. Fuhlbrigge, *Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(3): p. 211-22.
10. Crum, C.P., et al., *In situ hybridization analysis of HPV 16 DNA sequences in early cervical neoplasia*. Am J Pathol, 1986. 123(1): p. 174-82.
11. Greenfield, L.J., J.R. Tauscher, and M.V. Marx, *Evaluation of a new percutaneous stainless steel Greenfield filter by intravascular ultrasonography*. Surgery, 1991. 109(6): p. 722-9.
12. Stoler, M.H., et al., *Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias*. Hum Pathol, 1992. 23(2): p. 117-28.
13. Evans, M., et al., *Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6*. J Immunol, 2001. 167(9): p. 5420-8.
14. Arany, I., A. Goel, and S.K. Tyring, *Interferon response depends on viral transcription in human papillomavirus-containing lesions*. Anticancer Res, 1995. 15(6B): p. 2865-9.
15. Barnard, P. and N.A. McMillan, *The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha*. Virology, 1999. 259(2): p. 305-13.
16. Barnard, P., E. Payne, and N.A. McMillan, *The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha*. Virology, 2000. 277(2): p. 411-9.
17. Park, J.S., et al., *Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis*. J Biol Chem, 2000. 275(10): p. 6764-9.
18. Um, S.J., et al., *Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo*. Cancer Lett, 2002. 179(2): p. 205-12.
19. Perea, S.E., P. Massimi, and L. Banks, *Human papillomavirus type 16 E7 impairs the activation of the interferon regulatory factor-1*. Int J Mol Med, 2000. 5(6): p. 661-6.
20. Ronco, L.V., et al., *Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity*. Genes Dev, 1998. 12(13): p. 2061-72.
21. Li, S., et al., *The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha*. Oncogene, 1999. 18(42): p. 5727-37.

22. Caberg, J.H., et al., *Increased migration of Langerhans cells in response to HPV16 E6 and E7 oncogene silencing: role of CCL20*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. 58(1): p. 39-47.
23. Tang, A., et al., *Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin*. *Nature*, 1993. 361(6407): p. 82-5.
24. Walton, L.J., M.H. Thornhill, and P.M. Farthing, *VCAM-1 and ICAM-1 are expressed by Langerhans cells, macrophages and endothelial cells in oral lichen planus*. *J Oral Pathol Med*, 1994. 23(6): p. 262-8.
25. Griffiths, C.E., et al., *The ICAM-3/LFA-1 interaction is critical for epidermal Langerhans cell alloantigen presentation to CD4+ T cells*. *Br J Dermatol*, 1995. 133(6): p. 823-9.
26. Mota, F., et al., *The antigen-presenting environment in normal and human papillomavirus (HPV)-related premalignant cervical epithelium*. *Clin Exp Immunol*, 1999. 116(1): p. 33-40.
27. Yamada, T., et al., *Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective*. *J Virol*, 1997. 71(3): p. 2463-72.
28. Cornet, I., et al., *HPV16 genetic variation and the development of cervical cancer worldwide*. *Br J Cancer*, 2013. 108(1): p. 240-4.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Tornesello, M.L., et al., *Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix*. *Gynecol Oncol*, 2011. 121(1): p. 32-42.

35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. Jang, M., et al., *Gene expression profiles are altered in human papillomavirus-16 E6 D25E-expressing cell lines*. Virol J, 2011. 8: p. 453.
42. Chang, Y.J., et al., *Intratypic variants of human papillomavirus type 16 and risk of cervical neoplasia in Taiwan*. J Med Virol, 2013. 85(9): p. 1567-76.
43. Pientong, C., et al., *Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer*. Virol J, 2013. 10: p. 30.
44. Sunthamala, N., et al., *E2 proteins of high risk human papillomaviruses down-modulate STING and IFN-kappa transcription in keratinocytes*. PLoS One, 2014. 9(3): p. e91473.
45. Gheit, T., et al., *Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011. 20(7): p. 1315-21.
46. 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.

47. 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.
48. Halbert, C.L., G.W. Demers, and D.A. Galloway, *The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells*. *J Virol*, 1991. 65(1): p. 473-8.
49. Hawley-Nelson, P., et al., *HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes*. *EMBO J*, 1989. 8(12): p. 3905-10.
50. Richard, C., et al., *The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer*. *Oncogene*, 2010. 29(23): p. 3435-45.
51. Sichero, L., J.S. Sobrinho, and L.L. Villa, *Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants*. *Virology*, 2012. 432(1): p. 127-32.
52. Niccoli, S., et al., *The Asian-American E6 variant protein of human papillomavirus 16 alone is sufficient to promote immortalization, transformation, and migration of primary human foreskin keratinocytes*. *J Virol*, 2012. 86(22): p. 12384-96.
53. 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.
54. Asadurian, Y., et al., *Activities of human papillomavirus 16 E6 natural variants in human keratinocytes*. *J Med Virol*, 2007. 79(11): p. 1751-60.
55. Yi, J.W., et al., *Degradation of p53 by natural variants of the E6 protein of human papillomavirus type 16*. *Oncol Rep*, 2013. 29(4): p. 1617-22.
56. Hang, D., et al., *Functional effects of sequence variations in the E6 and E2 genes of human papillomavirus 16 European and Asian variants*. *J Med Virol*, 2014. 86(4): p. 618-26.
57. Sasagawa, T., H. Takagi, and S. Makinoda, *Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer*. *J Infect Chemother*, 2012. 18(6): p. 807-15.
58. Gao, J., et al., *IRF-1 transcriptionally upregulates PUMA, which mediates the mitochondrial apoptotic pathway in IRF-1-induced apoptosis in cancer cells*. *Cell Death Differ*, 2010. 17(4): p. 699-709.
59. Takaoka, A., T. Tamura, and T. Taniguchi, *Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis*. *Cancer Sci*, 2008. 99(3): p. 467-78.

60. Zhang, L. and J.S. Pagano, *IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency*. Mol Cell Biol, 1997. 17(10): p. 5748-57.
61. Zhang, L., et al., *Interferon regulatory factor 7 is associated with Epstein-Barr virus-transformed central nervous system lymphoma and has oncogenic properties*. J Virol, 2004. 78(23): p. 12987-95.
62. Honda, K. and T. Taniguchi, *IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(9): p. 644-58.
63. Honda, K., et al., *IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses*. Nature, 2005. 434(7034): p. 772-7.
64. Sheedy, F.J., et al., *Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21*. Nat Immunol, 2010. 11(2): p. 141-7.
65. Yao, Q., et al., *Micro-RNA-21 regulates TGF-beta-induced myofibroblast differentiation by targeting PDCD4 in tumor-stroma interaction*. Int J Cancer, 2011. 128(8): p. 1783-92.
66. Li, Y., D. Shin, and S.H. Kwon, *Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes*. FEBS J, 2013. 280(3): p. 775-93.
67. Zhang, Z., et al., *HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2004. 10(20): p. 6962-8.
68. Sakuma, T., et al., *Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma*. Int J Oncol, 2006. 29(1): p. 117-24.
69. Bazzaro, M., et al., *Ubiquitin proteasome system stress underlies synergistic killing of ovarian cancer cells by bortezomib and a novel HDAC6 inhibitor*. Clin Cancer Res, 2008. 14(22): p. 7340-7.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

จากผลงานการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำไปเสนอในงานประชุมระดับนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง ระดับชาติ จำนวน 1 เรื่อง และได้ดำเนินการส่ง manuscript เพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง ดังนี้

การนำเสนอผลงาน

1. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมนานาชาติ The 27th International Papillomavirus Conference เรื่อง Up-regulation of miR-21 expression induced by HPV16As E6 is highly correlated with the viral high p53 degrading potential เมื่อวันที่ 17-22 กันยายน พ.ศ. 2554 ณ เมือง Berlin ประเทศ เยอรมันนี

2. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมนานาชาติ 15th International Congress on Infection Diseases เรื่อง E6-D25E of HPV16 Asian variant shows high potential of p53 degradation and miR-21 induction เมื่อวันที่ 13-16 มิถุนายน พ.ศ. 2555 ณ กรุงเทพฯ ประเทศไทย

3. เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ในการประชุมระดับชาติ The 39th Annual Meeting of Infectious Disease Association of Thailand เรื่อง Characteristics of E6D25E of human papillomavirus type 16 Asian variant in cervical cancer development เมื่อวันที่ 23-26 ตุลาคม พ.ศ. 2556 จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

Manuscript 1: เรื่อง “Oncogenic potential of E6D25E protein of human papillomavirus type-16 Asian variant in human cervical keratinocytes”

สถานะของการตีพิมพ์: submitted

Manuscript 2: เรื่อง “E6D25E of HPV16 As variant affects epigenetic modulation and suppresses the expression of interferon regulatory factor 1 and 7”

สถานะของการตีพิมพ์: submitted

ภาคผนวก



**27th INTERNATIONAL
PAPILLOMAVIRUS CONFERENCE
AND CLINICAL WORKSHOP**

September 17-22, 2011

Berlin • Germany

PROGRAMME BOOK

www.hpv2011.org

Content

Structure of the Conference	6
Organizer and Committees	7
General information	13
Social programme	23
City map	27
Programme at a glance	30
Keynote lectures	31
Satellite symposia	33
Satellite workshops	41
Presentations Sunday	59
Oral presentations	61
Presentations Monday	63
Oral presentations	65
Oral poster presentations	71
Poster presentations	74
Presentations Tuesday	91
Oral presentations	93
Oral poster presentations	99
Oral poster presentations Late submission	101
Poster presentations	103
Presentations Wednesday	119
Oral presentations	121
Oral poster presentations	127
Poster presentations	130
Presentations Thursday	141
Oral presentations	143
Abstract reviewing algorithm	144
Exhibition	145
Author index	155

	Wed Sept 21			
	Hall 2	Hall 3	Hall Oslo	Room 7
08:30 - 10:00	Epidemiology/ public health	Applied/clinical science	Basic science	Satellite workshops
	Session 07: Risk factors <i>Chair: Mark Schiffman</i>	Session 17: Cervical screening <i>Chair: Jack Cuzick</i>	Session 28: Transformation and carcinogenesis II <i>Chair: Karl Munger</i>	07:30 - 09:30 HPV vaccine post- licensure monitoring (at RKI) <i>Yvonne Deléré</i> The invisible man in HPV: Now visible? <i>Zeev Rosberger</i>
10:00 - 10:30	Coffee break			
10:30 - 12:00	Session 08: Natural history <i>Chair: Xavier Castellsagué</i>	Session 18: Prophylactic vaccination: clinical studies <i>Chair: John Schiller</i>	Session 29: Viral proteins <i>Chair: Robert Garcea</i>	IFCPC workshop <i>Silvio Tatti</i>
12:00 - 14:00	Lunch/Poster viewing			
12:45 - 14:15	The molecular evolution in cervical cancer screening Satellite symposium Roche *			
14:30 - 15:15	The cancer genome project: background, logistics and expectations Keynote lecture * - Peter Lichter			
15:15 - 15:45	Coffee break			
15:45 - 17:15	Session 09: Low resource <i>Chair: Marc Steben</i>	Session 19: Standard and experimental treatment <i>Chair: Walter Kinney</i>	Session 30: Oral poster presentations 301-336 Poster session	6th Cochrane workshop <i>Marc Arbyn</i>
17:30 - 18:30	Improved Accuracy of Cervical Disease Detection through High-Risk HPV E6/E7 mRNA Testing Satellite symposium Gen-Probe *			
18:30 - 23:00	Conference party at ICC (18.30-23.00)			

Session 30
Oral poster presentations
Poster area North
Poster area South
See programme book

Poster session Wednesday
Basic science, Late submission
P-21.09 – P-29.12, P-32.10 - 53
15.45 - 16.30: Odd numbers
16.30 - 17.15: Even numbers

* Satellite symposia and
keynote lectures are in Hall 2

- P-24.18 INSERTIONAL MUTAGENESIS OF THE C-MYC PROTO-ONCOGENE BY INTEGRATED HPV16 DNA
B Xu, U Klos, M Peter, J Couturier, E Schwarz
- P-24.19 MICRORNA ANALYSIS IN E6/E7 HPV-TRANSFORMED HUMAN KERATINOCYTES
G Romeo, G Mangino, M V Chiantore, M Iuliano, G Fantasia, R Accardi, M Tommasino, Z A Percario, E Affabris, G Fiorucci
- P-24.20 OUTCOME OF HERPES-SIMPLEX VIRUS-TYPE1 INFECTIONS IN HPV16-POSITIVE CELL LINE
A Turunen, M Järvenkylä, V Hukkanen, S Syrjänen
- P-24.21 WATER POLLUTION, HPV AND ESOPHAGEAL CARCINOMA IN HUIHE RIVER BASIN
J Li, L Zhang, L Zhao, R Zhong, Y Zeng
- P-24.22 LOSS OF GENE FUNCTION AS A CONSEQUENCE OF HPV INTEGRATION
M Schmitz, C Driesch, K Beer - Grondke, L Jansen, I B Runnebaum, M Dürst
- P-24.23 EXPRESSION OF TIGHT AND ADHERENS JUNCTION PROTEINS IN CERVICAL NEOPLASIA.
C Cunniffe, P Cummins, H Lambkin, F Fergus, S Horan, B Brankin
- P-24.24 IN VITRO TRANSFORMING CAPACITY OF SEVEN HIGH-RISK HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES
D M Schütze, P J F Snijders, L E Bosch, D Kramer, W Quint, C J L M Meijer, R.D.M. Steenbergen
- P-24.25 HOPX A PUTATIVE TUMOUR SUPPRESSOR GENE INVOLVED IN CERVICAL CARCINOGENESIS
C Backsch, A Schneider, B Rudolph, M Schmidt, L Jansen, N Häfner, I B Runnebaum, M Dürst
- P-24.26 CHARACTERIZATION OF HPV INTEGRATION HOTSPOTS IN CERVICAL CANCER
M Göllitz, C Driesch, M Schmitz, N Häfner, I Runnebaum, M Dürst
- P-24.27 HPV18E7 TARGETED PROTEINS AND THEIR SPATIO-TEMPORAL CHARACTERIZATION IN TRANSFORMATION
X Yan, H Chen, W Shah, X Li, Y Wang
- P-24.28 EPSTEIN-BARR VIRUS IS DETECTED IN HPV+ CERVICAL CANCERS
M Hagensee, A Bedoya, M Gavira, A Zea, G Sanchez, W Nichols
- P-24.29 HPV16 AND HPV58 INTEGRATIONS IN CERVICAL CANCER AND PREMALIGNANT LESIONS
S Liu, K Chan, R Leung, L Jiang, M Luk, S Lo, D Fong, A Cheung, Z Lin, H Ngan
- P-24.30 GENE EXPRESSION AND COPY NUMBER PROFILES IN CERVICAL-CANCER CELL LINES.
V Barrón - Palma, O Vazquez - Mena, I Medina - Martinez, E Juárez - Torres, A Espinosa, N Villegas - Sepulveda, K Nieto- Martinez, L Orozco, S Kofman, J Berumen
- P-24.31 GENERATION OF CANINE KERATINOCYTE CELL LINES HARBOURING CANINE PAPILLOMAVIRUS DNA
C Lange, K Tobler, M Ackermann, F Guscelli, E Müller, E Vetsch, A Laimbacher, C Favrot
- P-24.32 UP-REGULATION OF MIR-21 EXPRESSION INDUCED BY HPV16AS E6
P Chopjitt, S Bumrungrathai, C Pientong, T Ekalaksananan, B Kongyingyoes, N Charoensri

Content

Session 21: HPV in non-cervical sites	3
<i>Sunday Sept 18, 13:00 - 14:30</i>	
<i>Oral presentation abstracts</i>	5
<i>Poster abstracts</i>	10
Session 22: Virus life cycle	15
<i>Monday Sept 19, 8:30 - 10:00</i>	
<i>Oral presentation abstracts</i>	17
<i>Poster abstracts</i>	22
Session 23: Basics of therapeutic vaccines & antivirals	27
<i>Monday Sept 19, 10:30 - 12:00</i>	
<i>Oral presentation abstracts</i>	29
<i>Poster abstracts</i>	34
Session 24: Transformation and carcinogenesis I	35
<i>Monday Sept 19, 15:45 - 17:15</i>	
<i>Oral presentation abstracts</i>	37
<i>Poster abstracts</i>	42
Session 25: Basic immunology	59
<i>Tuesday Sept 20, 8:30 - 10:00</i>	
<i>Oral presentation abstracts</i>	61
<i>Poster abstracts</i>	66
Session 26: Novel diagnostics	73
<i>Tuesday Sept 20, 10:30 - 12:00</i>	
<i>Oral presentation abstracts</i>	75
<i>Poster abstracts</i>	80
Session 27: Basics of prophylactic vaccines	93
<i>Tuesday Sept 20, 15:45 - 17:15</i>	
<i>Oral presentation abstracts</i>	95
<i>Poster abstracts</i>	100
Session 28: Transformation and carcinogenesis II	105
<i>Wednesday Sept 21, 8:30 - 10:00</i>	
<i>Oral presentation abstracts</i>	107
Session 29: Viral proteins	113
<i>Wednesday Sept 21, 10:30 - 12:00</i>	
<i>Oral presentation abstracts</i>	115
<i>Poster abstracts</i>	120
Session 30: Oral poster presentations 301-336	123
<i>Wednesday Sept 21, 15:45 - 17:15</i>	
<i>Oral poster presentation abstracts</i>	125

P-24.31**GENERATION OF CANINE KERATINOCYTE CELL LINES HARBOURING CANINE PAPILLOMAVIRUS DNA***C Lange, University of Zurich, Zurich, SWITZERLAND**K Tobler, University of Zurich, Zurich, Switzerland**M Ackermann, University of Zurich, Zurich, Switzerland**F Guscetti, University of Zurich, Zurich, Switzerland**E Müller, University of Berne, Berne, Switzerland**E Vetsch, University of Zurich, Zurich, Switzerland**A Laimbacher, University of Zurich, Zurich, Switzerland**C Favrot, University of Zurich, Zurich, Switzerland*

Background: Papillomaviruses induce a wide range of clinical changes ranging from asymptomatic infection, benign warts, pigmented plaques to in situ and invasive squamous cell carcinomas. In dogs, eight distinct canine papillomaviruses (CPVs) were described. Some of them such as CPV1, are primarily associated with benign changes, while others, such as CPV3 were also found associated with squamous cell carcinomas.

Objectives: The goal of this study was to generate canine keratinocyte cell lines harbouring the DNA of CPVs to study the effects of the mimicked viral infections in cell culture.

Methods: For this purpose plasmids containing a green fluorescent protein marker gene, a herpesvirus origin of replication, DNA packaging signal, and the late gene deprived genomes of CPV1, CPV3 or CPV5 were constructed. The heterologous DNAs were packaged into herpesvirus virions and administered to canine keratinocyte cultures. Transduced cells were subsequently sorted and cultivated.

Results: PCR and RT-PCR were regularly carried out to check for presence and transcription of viral genes. Transcription could constantly be shown throughout 105 passages. After 43 and 105 passages cells were allowed to differentiate in raft cultures in order to study the morphological features of the epidermis and to carry out immunohistochemistry for cell multiplication (ki67), apoptosis (lamin 1), and cell differentiation (loricrin).

While no changes were observed after 43 passages, lamin 1 and ki67 expression were increased in CPV DNA carrying cells after 105 passages. Furthermore morphological changes such as swollen keratinocytes and clumped keratohyalin granules were observed.

Conclusions: In conclusion, stable keratinocytes cultures were established which can be used to study the transforming potential of CPV1, CPV3, and CPV5.

*Declaration of interest**None declared***P-24.32****UP-REGULATION OF MIR-21 EXPRESSION INDUCED BY HPV16AS E6***P Chopjitt, Khon Kaen University, Khon Kaen, THAILAND**S Bumrungthai, Khon Kaen University, Khon Kaen, THAILAND**C Pientong, Khon Kaen University, Khon Kaen, THAILAND**T Ekalaksananan, Khon Kaen University, Khon Kaen, THAILAND**B Kongyingyoes, Khon Kaen University, Khon Kaen, THAILAND**N Charoensri, Khon Kaen University, Khon Kaen, THAILAND*

Background: Persistent high risk HPV infection and HPV variants are associated with increased risk of cervical cancer. In Asian women, HPV16 Asian variant (HPV16As) exhibits a higher risk than HPV16 European. Nucleotide variations in E6 oncogene of the variants are associated with increasing of viral persistence and disease progression. The variation in HPV16As E6 gene is important for p53 interaction and host immune surveillance. However, there is no information of HPV16As E6 oncogenic function.

Objectives: To investigate the HPV16As E6 oncogenic potential and compare with HPV16European E6.

Methods: HPV16European and HPV16As E6 genes isolated from cervical cancer samples were inserted into pcDNA3.2 expression vector. After transfection of the constructed vectors into C33A cell line, the expressed E6 proteins were evaluated for E6AP protein binding by immunoprecipitation assay. The oncogenic potential such as ability of p53 degradation, induction of telomerase enzyme and miR-21 were investigated by transfection of these vectors into the C33A cells. Western blot and quantitative real time PCR were performed at 24 h, 48 h and 72 h.

Results: All expressed E6 proteins showed E6AP protein binding activity and the HPV16As E6 could induce telomerase activity similar to the HPV16European E6. This result suggested that the HPV16As E6 still maintains carcinogenicity. Interestingly, the HPV16As E6 showed a higher ability to degrade p53 than the HPV16European E6 at different time points. In addition, the HPV16As E6 induced the miR-21 expression higher than the HPV16European E6 with significant difference ($p < 0.001$). This up-regulation of miR-21 may support anti-apoptosis ability.

Conclusion: This study indicates that strong degradation of p53 by HPV16As E6 is correlated with up-regulation of miR-21 expression that may involve the induction of persistent infection and cancer progression. The regulatory mechanism of HPV16As E6 to miR-21 expression and p53 degradation should be further investigated.

*Declaration of interest**None declared*



15th International Congress on Infectious Diseases

BANGKOK, THAILAND • JUNE 13~16, 2012



Organized by the International Society
for Infectious Diseases



In collaboration with the Infectious Disease Association of Thailand

Final Program



Poster Presentations ~ Thursday, June 14, 2012

- 40.016** Clinical presentation and health-seeking behaviour for acute respiratory illness episodes in a cohort of community dwelling adults during the initial wave of pdmH1N1 influenza A from June to September 2009 in Singapore
M. Chen, L. Jiang
Singapore, (Singapore)
- 40.017** Antigenic analysis of enterovirus 71
M.-Y. Chia¹, W.-Y. Chung¹, P.-S. Chiang¹, M.-L. Huang¹, M.-S. Ho², M.-S. Li¹
¹Zhunan (Taiwan, R.O.C.), ²Taipei (Taiwan, R.O.C.)
- 40.018** Establishment of secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter assay for Dengue virus titration
C. Chiu, Y.-C. Chuang, T.-M. Yeh
Tainan (Taiwan, R.O.C.)
- 40.019** Effect of dengue virus infection on insulin pathway
M.-K. Chong, M. L. Ng
Singapore (Singapore)
- 40.020** E6-D25E of HPV16 Asian variant shows high potential of p53 degradation and miR-21 induction
P. Chopjitt, C. Piengtong, T. Ekalaksananan
Khon Kaen (Thailand)
- 40.021** Antiviral Therapy for emerging and re-emerging medically important viral pathogens using highly purified natural product compounds
J. J. H. Chu
Singapore (Singapore)
- 40.022** Dengue virus-induced antibodies against thrombin and inhibit its activity
Y.-C. Chuang, T.-M. Yeh
Tainan (Taiwan, R.O.C.)
- 40.023** Dengue virus nonstructural protein 1 binds to human endothelial cells and induces cytokine and chemokine production
C.-D. Ciou, T.-M. Yeh
Tainan (Taiwan, R.O.C.)
- 40.024** Molecular characterization of dengue virus from Nepal
S. P. Dumre¹, K. Na-Bangchang¹, V. Eursitthichai¹, V. Viyanant¹, R. Grams¹, G. Shakya², C. Klungthong³, A. Nisalak³, S. Fernandez³
¹Pathumthani (Thailand), ²Kathmandu (Nepal), ³Bangkok (Thailand)
- 40.025** Endogenous interferon-gamma response in chronic hepatitis C Egyptian patients treated with peginterferon plus ribavirin
M. El Zowalaty, R. Sadeq, H. Mohtady, N. Al Badawy, S. Ibrahim
Zagazig (Egypt)
- 40.026** Selective isolation of avian influenza virus from cloacal samples containing mixed infection of avian influenza and Newcastle disease viruses
M. El Zowalaty, Y. Chander, P. Redig, S. Goyal
Saint Paul, MN (USA)
- 40.027** Occult hepatitis B markers profile and significance in blood donors in Alexandria, Egypt
E. El-Ghitany, A. Farghaly
Alexandria (Egypt)
- 40.028** Phylogenetic analysis of human respiratory syncytial virus isolated from children with acute lower respiratory tract infections in Malaysia
M. R. Etemadi, F. Yazdani Moghaddam, F. Azizi Jalilian, Z. Sekawi, N. Othman
Serdang, Selangor (Malaysia)
- 40.029** IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza
A. Everitt¹, S. Clare¹, T. Pertel², S. John², R. Wash¹, S. Smith¹, C. Chin², E. Feeley², J. Simms², D. Adams¹, H. Wise¹, L. Kane¹, D. Goulding¹, P. Digard¹, V. Anttila¹, K. Baillie³, T. Walsh³, D. Hume³, A. Palotie¹, Y. Xue¹, V. Colonna¹, C. Tyler-Smith¹, J. Dunning⁴, S. Gordon⁵, R. S. Smyth⁵, P. Openshaw⁴, G. Dougan¹, A. Brass², P. Kellam¹
¹Cambridge (United Kingdom), ²Boston, MA (USA), ³Edinburgh (United Kingdom), ⁴London (United Kingdom), ⁵Liverpool (United Kingdom)
- 40.030** The effect of andrographolide on Human papillomavirus type 16 (HPV16) positive cervical cancer cells (SiHa)
S. Fangkham¹, T. Ekalaksananan¹, C. Aromdee¹, S. Seubsasana², B. Kongyingyoes¹, N. Patarapadungkit¹, C. Pientong¹
¹Khon Kaen (Thailand), ²Ubon Rajathanee (Thailand)
- 40.031** Presence of oncogenic viruses (EBV, HHV-6, BKV and JCV) DNA sequences in renal cell carcinoma
A. Farhadi¹, A. Behzad-Behbahani², B. Geramizadeh², Z. Sekawi¹, M. S. Shiran¹, F. Aboulizadeh²
¹Serdang (Malaysia), ²Shiraz (Iran, Islamic Republic of)
- 40.032** Retinopathy and the association with pegylated interferon and Ribavirin
J. Farley, A. Truong, T. Nguyen, W. Shum
Vancouver, BC (Canada)



15th ICID • Bangkok, Thailand • June 13-16, 2012
Centara Grand & Bangkok Convention Centre at Central World

[Home](#)

[Program](#)

[Search Abstracts](#)

[Author Index](#)

[Sponsors](#)

[About ISID](#)

[Contact ISID](#)

[Citation](#)

[CD Tech Support](#)

Session: [Virology and Viral Infections \(Non-HIV\)](#)

Abstract No.: 40.020

Title: **E6-D25E of HPV16 Asian variant shows high potential of p53 degradation and miR-21 induction**

Author(s): [P. Chopjitt](#), C. Piengtong, T. Ekalaksananan; Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen/TH

Abstract: **Background:** Human papillomavirus type 16 (HPV 16), which is the most prevalent HPV genotype, has well-documented DNA sequence variants that show different geographical distributions and different oncogenic potentials. In Asian women, HPV16 Asian variant (HPV16As) with E6-D25E is the most common risk associated with development of cervical cancer. MicroRNA 21 (miR-21) is identified as an oncomir and over-expressed in a wide variety of cancers including cervical cancer. The oncogenic role of miR-21 in the cellular processes is implied to anti-apoptosis with target network of p53. This study aimed to evaluate the oncogenic potential of E6-D25E HPV16As comparing with E6 of HPV16 prototype by focusing on ability of p53 degradation.

Methods: E6 gene of HPV16 prototype and HPV16As isolated from cervical cancer samples were inserted into pcDNA3.2 expression vector. After transfection of the constructed vectors into HPV negative C33A cell line, the expressed E6 proteins were detected by western blot and the E6 protein function was determined for E6 protein interaction with E6AP protein by immunoprecipitation assay. p53 degradation, induction of miR-21 and mRNA PTEN level were investigated by transfection of these vectors into the C33A cells and determined by western blot and quantitative real time PCR. The ability of p53 degradation was evaluated in cyclohexamide treated C33A cell line.

Results: All expressed E6 proteins showed E6AP protein binding activity. This result suggested that the E6 with D25E of HPV16As variant still maintains carcinogenicity similar with E6 prototype. Interestingly, lower level of p53 was observed in C33A transfected with E6-D25E gene and correlated with the ability of p53 degradation at 2 hr after transfection that showed □ 50% more than E6 prototype. The E6-D25E also induced the miR-21 expression higher than the E6 prototype with significant difference (p

Conclusion: This study demonstrated that E6-D25E of HPV16As can elicit earlier p53 degradation and higher up-regulation of miR-21 gene than E6 prototype and suggested that oncogenic potential of E6-D25E may involve in persistent infection and cervical cancer progression.

International Society for Infectious Diseases

9 Babcock Street, Unit 3, Brookline MA 02446-5903 • USA

Phone: (617) 277-0551 • Fax: (617) 278-9113 • info@isid.org

© 2001-2010 International Society for Infectious Diseases. All Rights Reserved.

CD-ROM Produced by [X-CD Technologies](#)

Journal of **INFECTIOUS DISEASES** and **ANTIMICROBIAL AGENTS**

Volume **30**

Number **3**

September – December 2013

The **39th** Annual Meeting
of Infectious Disease Association of Thailand
23-26 October 2013



Publication of Infectious Disease Association of
Thailand

ISSN 0857-0744



CONTENTS

ABSTRACTS OF THE 39th ANNUAL MEETING OF INFECTIOUS DISEASE ASSOCIATION OF THAILAND

- Infections Following Stem Cell Transplantation in Siriraj Hospital: A 5-Year Experience**
Supitcha Ongkittikul, Ekapun Karopongse, Methee Chayakulkeeree 184
- Effect of Infectious Disease Service Consultations on Appropriateness of Antimicrobial Therapy and Clinical Outcomes among Critically Ill Patients with Septicemia**
Thilima Jongchansittho, Kumthorn Malathum, Nathorn Chaiyakunapuk, Surakit Nathisuwan 185
- Clinical Characteristics of Histoplasmosis in Thai Patients**
Panibud Wongprommek, Methee Chayakulkeeree 186
- Rare Clinical Manifestations of Neurosyphilis: Two Case Reports**
Onwalee Dhissayakamol, Sarawoot Marklon, Kamonwan Jutivorakool, Chusana Suankratay 187
- Predictors of Dengue Hemorrhagic Fever in Adult Patients with Dengue Virus Infection**
Pattaranit Nernsai, Somnuek Sungkanuparph 188
- Characteristics of E6D25E of Human Papillomavirus Type 16 Asian Variant in Cervical Cancer Development**
Peechanika Chopjitt, Chamsai Pientong, Bunkerd Kongyingyoes, Tipaya Ekalaksananan 189
- The p16INK4a Expression in Human Papillomavirus-associated Oral Squamous Cell Carcinoma in Northeastern Thai Population**
Piyawut Swangphon, Chamsai Pientong, Miriam Reuschenbach, Magnus von Knebel Doeberitz, Tipaya Ekalaksananan 190
- Burkholderia pseudomallei* Pyomyositis: A Case Report**
Sureeporn Saelao, Sarawoot Marklon, Kamonwan Jutivorakool, Chusana Suankratay 191
- Invasive Nasal Infection Caused by *Exserohilum*: A Case Report**
Surat Wannalerdsakun, Sunee Medhajirapath, Ariya Chindamporn, Chusana Suankratay 192

INDEX

- Author Index 193-195
- Subject Index 196
- Acknowledgements 197

SCHEDULE OF THE 39th ANNUAL MEETING OF INFECTIOUS DISEASE ASSOCIATION OF THAILAND

199-214

กำหนดการ

การประชุมใหญ่วิชาการประจำปี ครั้งที่ 39



สมาคมโรคติดเชื้อแห่งประเทศไทย

“Infectious Diseases Progress 2013”

วันที่ 23 – 26 ตุลาคม 2556

ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติ เอ็มเพรส

จังหวัดเชียงใหม่

กำหนดการนำเสนอผลงานวิจัย

Poster Presentation

วันพฤหัสบดีที่ 24 ตุลาคม 2556

บริเวณหน้าห้องประชุม Empress Grand Hall (ชั้น 3)

เรื่องที่	ชื่อเรื่อง และ คณะวิจัย	หน้า
3.1	The Probiotic Use and the Duration of Vancomycin Resistant <i>Enterococci</i> Colonization: Prospective Cohort <i>Sivaporn Kukanok, Siriorn Watcharananan, Pitak Santanirand</i>	179
3.2	Predicting Factors of Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> Bacteremia among Hospitalized Patients in a Tertiary-care Hospital: A Case-control Study <i>Tipakorn Chuamuangphan, Piriyaorn Chongtrakool, Somnuek Sungkanuparph</i>	180
3.3	A Retrospective Study of Clinical and Microbiological Data of Invasive Pneumococcal Infection at King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thailand <i>Pailin Mahaparn, Sumanee Nilgate, Chusana Suankratay</i>	181
3.4	Clinical Characteristics of Group D Streptococcal Bacteremia in Siriraj Hospital <i>Papatsakorn Nopjaroonsri, Amornrat Leelaporn, Methee Chayakulkeeree</i>	182
3.5	In Vitro Susceptibility Test of Sitafoxacin against Resistant Gram Negative Bacilli Isolated from Thai Patients by Disk Diffusion Method <i>Visanu Thamlikitkul, Surapee Tiengrim</i>	183
3.6	Infections Following Stem Cell Transplantation in Siriraj Hospital: A 5-Year Experience <i>Supitcha Ongkittikul, Ekapun Karopongse, Methee Chayakulkeeree</i>	184
3.7	Effect of Infectious Disease Service Consultations on Appropriateness of Antimicrobial Therapy and Clinical Outcomes among Critically Ill Patients with Septicemia <i>Thitima Jongchansittho, Kumthorn Malathum, Nathorn Chaiyaprasitkul, Saralit Kachinawan</i>	185
3.8	Clinical Characteristics of Histoplasmosis in Thai Patients <i>Panibud Wongprommek, Methee Chayakulkeeree</i>	186
3.9	Rare Clinical Manifestations of Neurosyphilis: Two Case Reports <i>Onwalee Dhissayakamol, Sarawoot Marklon, Kamonwan Jutiworakul, Chusana Suankratay</i>	187
3.10	Predictors of Dengue Hemorrhagic Fever in Adult Patients with Dengue Virus Infection <i>Pattaranit Nernsai, Somnuek Sungkanuparph</i>	188
3.11	Characteristics of E6D25E of Human Papillomavirus Type 16 Asian Variant in Cervical Cancer Development <i>Peechanika Chopjitt, Chamsai Pientong, Bunkerd Kongyingyoes, Tipaya Ekalaksananan</i>	189
3.12	The p16INK4a Expression in Human Papillomavirus-associated Oral Squamous Cell Carcinoma in Northeastern Thai Population <i>Piyawut Swangphon, Chamsai Pientong, Miriam Reuschenback, Magnus von Knebel Doeberitz, Tipaya Ekalaksananan</i>	190
3.13	<i>Burkholderia pseudomallei</i> Pyomyositis: A Case Report <i>Sureeporn Saelao, Sarawoot Marklon, Kamonwan Jutiworakul, Chusana Suankratay</i>	191
3.14	Invasive Nasal Infection Caused by <i>Exserohilum</i>: A Case Report <i>Surat Wannalerdsakun, Sunee Medhajirapath, Ariya Chindamporn, Chusana Suankratay</i>	192

Abstract 3.11

Characteristics of E6D25E of Human Papillomavirus Type 16 Asian Variant in Cervical Cancer Development

Peechanika Chopjitt¹, Chamsai Pientong¹, Bunkerd Kongyingyoes², Tipaya Ekalaksananan¹

¹Department of Microbiology, ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Background: Human papillomavirus type 16 (HPV16), a high risk HPV (HR-HPV) is the most prevalent genotype that plays a crucial role in the etiology of cervical cancer. HPV16 intratypic variants have been reported to differ in their geographical distributions and biological/biochemical properties. HPV16 Asian variant (HPV16As) with E6D25E is the most common associated with development of cervical cancer in Asian women corresponding with our previous study in Thai women. The ability of HPV16 infection to progress to malignancy is due, to large part, to the expression of E6/E7 oncogenes. The biochemical ability of E6 proteins was able to degrade cellular p53 protein and inhibit p53 growth suppressor functions. Previous studies indicated that E6s from HR-HPV types, HPV16 and HPV18 significantly decreased the half-life of p53, while low-risk type; HPV11 did not. Based on these observations, the ability to degrade p53 is assumed to be uniquely associated with, and a major cause of the oncogenicity by HR-HPV. To investigate the oncogenic potential of E6D25E, this study constructed retrovirus vector containing E6D25E and E6 prototype and investigated their functions relevant to oncogenic potential.

Methods: Retroviruses containing E6 prototype, E6D25E, E6/E7 prototype and E6D25E/E7 vectors were constructed and transduced with high viral titer into human foreskin keratinocyte (HFK) and normal human cervical keratinocyte (HCK1T) contained hTERT. The expressions of E6 proteins in these transduced cells were detected by western blot, subsequently the immortalization potentials were determined by the number of passages, population doubling time and the ability to degrade p53 protein and its downstream protein, p21 using western blot.

Results: All transduced cells could be detected E6 protein and they are induced to be abnormal cells or HFK immortalization, paralleled to HCK1T containing hTERT. The cells containing E6 prototype and E6D25E with or without E7 showed similar pattern of population doubling time. In culture condition, the immortalized cells containing either E6 prototype or E6E25D still alive and passage more than 20, whereas the negative control cells died at passage 9. Moreover, the ability to degrade p53 and p21 proteins which are hallmarks of immortalization showed similar pattern when compared with E6 prototype.

Conclusion; These results provided an oncogenicity of E6E25D similar to E6 prototype and suggested that other biological properties underlying the greater prevalence of the HPV16As variant in cervical cancer should be further evaluated.

Oncogenic potential of E6D25E protein of human papillomavirus type-16 E6 Asian variant in human cervical keratinocytes.

Peechanika Chopjitt¹,

Chamsai Pientong¹,

Bunkerd Kongyingyoes²,

Ornuma Haonon³

Satomi Kikawa⁴

Tomomi Nakahara⁴

Tohru Kiyono^{*4}

Tipaya Ekalaksananana^{*4}

¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

³Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

⁴Division of Virology, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo, 104-0045, Japan

*Corresponding author. Tel.: +66 43 363808; fax: +66 43 348385.

E-mail address: tipeka@kku.ac.th (T. Ekalaksananan) and tkiyono@ncc.go.jp (Tohru Kiyono).

Abstract

Human papillomaviruses 16 (HPV16) is the major risk of cervical carcinogenesis. An HPV16 E6 oncogene sequence variation, E6D25E, is commonly found in cervical cancers among Asian population. This study aimed to compare the oncogenic properties of E6D25E with HPV16 E6 prototype (E6Pro) in human keratinocytes, physiological targets of HPV carcinogenesis. A human cervical keratinocyte cell line, HCK1T, immortalized with the catalytic subunit of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) was transduced with retroviruses containing various E6s. The biological and biochemical properties of E6D25E and those of E6Pro were analyzed in stable HCK1T cell lines expressing these E6s. The ability of E6 to target p53 for degradation as well as some other protein profile of the HCK1T cell lines were investigated using western blot, 2D PAGE, and mass spectrometry. The results showed that the HCK1T cells expressing E6D25E could promote cell proliferation with similar efficiency as E6Pro-expressing HCK1T cells. Both E6D25E and E6Pro showed the ability to target p53 for degradation and suppressed the induction of a p53-target gene, p21. Interestingly, the protein profiles of HCK1T expressing E6D25E in 2D PAGE showed that the intensities of 9 spots were significantly higher than that of HCK1T expressing E6Pro. Keratin 7, a marker for a discrete population of squamocolumnar junction cells was identified among those 9 proteins by mass spectrometry. In conclusion, E6D25E maintains the biological and biochemical properties similar to that of E6Pro, and produced different protein profile from E6Pro that may be associated with potentially higher oncogenic potential of HPV16 As variant.

Keywords; E6Pro, E6D25E, HPV16 As variant, human cervical keratinocyte, protein profile.

Introduction

Persistent infection with high-risk human papillomaviruses (HR-HPVs) is required for development of cervical carcinomas [1]. Among those HR-HPVs, HPV16 is the most prevalent in invasive cervical cancers worldwide [2]. Viral genes E6 and E7 of HR-HPV play vital roles for carcinogenesis. The E6 oncoprotein promotes degradation of tumor suppressor p53, through forming ternary complexes with the E3 ubiquitin-ligase E6-associated protein (E6AP). This complexes lead to the ubiquitination of p53 and degradation

via a proteasome pathway. The E7 oncoprotein interacts with and inactivates the tumor suppressor pRb family proteins, and thus interrupts the interaction of pRb with E2Fs and promotes cell cycle progression [3].

The classification of HPV types is based on the nucleotide sequence of their L1 gene which differ more than 10% from known types. Difference between 2% to 10% is defined as a subtype and less than 2% as a variant [4]. HPV16 variants have been classified into 4 phylogenetic lineages according to different geographic regions such as European-Asian (EAs) including sublineages European (E) and Asian (As), African 1 (AFR1), African 2 (AFR2) and North American/Asian-American (NA/AA) including the sublineages North American, Asian-American 1 and Asian-American 2 [5,6]. Numerous studies reported that HPV16 variants differ in risk of viral persistence, progression to cervical cancers and immunogenicity [7,8,9,10,11,12]. Among them, variation of E6 gene is most frequently reported to associate with the risks. E6 protein can interact with many cellular proteins of signaling pathways involved in apoptosis, cell proliferation, differentiation and transformation. E6 can block apoptosis by inactivating not only p53 but also p300, Bak, FADD and pro-caspase 8. E6 is also known to activate telomerase through interacting with several cellular proteins including NFX1-91, a repressor of hTERT promoter [13], MYC and the telomerase complex itself [14] [15]. In addition, binding of E6 to E6TP1, hADA3, tuberin, CBP/p300, and Gps2 has been shown to hamper the ability of these proteins to negatively regulate cell proliferation. Moreover, E6 can suppress immune system through binding to IRF-3 and TYK2, invading the immune system to recognize and clear viral infection [16].

Some HPV16 E6 variations are reported to alter biological or immunogenic properties [17]. The natural variations on HPV16 E6 genes also has an effect on its abilities to abrogate serum/calcium-dependent differentiation and to induce p53 degradation in vitro [18]. In vitro assays on functions of E6 gene variations from Scandinavian women showed the difference in the ability to induce serum/calcium-differentiated resistant colonies but reduce p53 and Bax proteins, compared with its E6 prototype [19,20]. In HPV16 AA lineages, variations of E6 protein at position: L83V, R10/L83V and Q14H/H78Y/L83V abrogated growth arrest and DNA damage responses equally well as the prototype. On the other hand, they were more prone to undergo cell-detachment-induced apoptosis (anoikis) than E6 prototype in human normal immortalized keratinocytes (NIKS) [21]. E6 gene

variations of HPV16 AA variant are reported to promote faster proliferation in monolayer cultures and to thicken epithelial layers in organotypic raft culture with higher expression of cytokeratin 10 [22]. Moreover, E6 variant of HPV16 AA can promote immortalization, transformation, and migration of primary human foreskin keratinocytes (PHFKs) more efficiently than E6 prototype independent of E7 [23]. Another report suggests higher efficiency in colony formation with E6 gene of AA variant and E350G of European variant than with E6 of HPV16 prototype, though they showed similar activities to target p53 for degradation. Furthermore, several host genes were differentially up and down-regulated in PHFKs expressing those E6 variants, that may account for difference in oncogenic potential among HPV16 variants [24]. No difference of E6 activity was reported in p53 degradation among E6D25E, HPV16 As variant, E6L83VHPV16 AA variant and E6 prototype [25], where the activity of those E6 was compared in HeLa, SiHa and C33A cells with transient transfection. In the present study, we hypothesized that E6D25E HPV16 As variant has more oncogenic potential than E6 prototype, therefore we compared biological and biochemical activities of E6D25E and E6-prototype in normal human cervical keratinocytes. The specific protein profile of E6D25E expressing cells was also investigated with 2D-PAGE and mass spectrometry.

Material and Methods

Cell culture and cell lines

The cervical cancer cell lines, HeLa and SiHa, and 293T cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum. HCK1T cells, a normal diploid human cervical keratinocytes with capacity of normal differentiation established by transducing the catalytic subunit of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) [26] were cultured in keratinocyte serum-free medium (KSFM) supplemented with 5 ng/ml epidermal growth factor (EGF) and 50 µg/ml bovine pituitary extract (BPE) (Invitrogen, USA) .

Viral vectors construction

Construction of retrovirus expression vectors, pCLXSN-16E6 (HPV16 E6 prototype) and pCLXSN-16E6SD were described previously [27]. pCLXSN-16E6D25E and pCLXSN-16E6SD-D25E were similarly constructed by using the Gateway system (Invitrogen, Carlsbad, CA). Briefly, entry vectors containing E6 D25E (HPV16As variant) and E6SD D25E were constructed from pENTR201-16E6 and pENTR201-16E6SD with site-directed mutagenesis (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA). These entry vectors were recombined into the destination vector, pDEST-CLXSN by LR reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to generate pCLXSN-16E6D25E and pCLXSN-16E6SD-D25E.

Production of recombinant retroviruses and titration

The production of recombinant retroviruses was performed. Briefly, the retroviral vectors and packaging vectors pCL-GagPol and pEF6-env (10A1) were co-transfected into 293T cells using TransIT-293 (Mirus Co., Madison, USA) according to the manufacturer's instructions, and the culture fluid was harvested at 60 to 72 h post-transfection. Titers of the recombinant viruses were measured in a G418 resistant colony assay with HeLa cells. 5×10^4 HeLa cells in twelve well plates were infected with serial dilutions of the viral stocks with 8 $\mu\text{g/ml}$ of polybrene. After 48 h, cells were fed with fresh medium containing 800 $\mu\text{g/ml}$ of G418. Colonies were stained with Gimsa's dye and counted after 2 weeks.

Transduction of retrovirus containing various E6 genes

One day before transduction, HCK1T cells were plated at a density of 2×10^5 cells per well in six well plates. The recombinant retroviruses containing various E6 genes inoculated at multiplicity of infection (MOI) xx for 2 hours in the presence of 4 $\mu\text{g/ml}$ polybrene. The medium was then replaced with fresh KSM. After 2 days post-infection, cells were fed with fresh medium supplemented with 50 $\mu\text{g/ml}$ of G418, until mock-infected cells died completely. Cells were fed with fresh medium in every 3 days until cells reached subconfluence.

Comparison of E6 activity on proliferation of HCK1T cells

The various E6 expressing HCK1T cells were seeded at a density of 2×10^5 cells per 100-mm dish with growth medium and subsequently passed when cells reached subconfluence. Population doublings (PDs) was calculated the following formula: $\log_2$ (number of cell at time of subculture/number of cells plated). PD collections were plotted against total time in culture to determine a proliferation rate.

Western blotting analysis

The levels of p53, p21, HPV16 E6 and β -actin in each line of cells were determined using western blotting. Whole-cell lysates of HCK1T cell lines at passage 15 were harvested in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 20% glycerol, 0.1% SDS, 1% DOC) containing a proteinase inhibitor cocktail (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) and phosphatase inhibitors (500 μ M sodium orthovanadate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate) and a protein concentration of cell lysate was measured by using a DC Protein Assay kit (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). The equivalent protein amounts of cell lysate were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis was conducted as described previously [28,29].

Two-dimension gel electrophoresis

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described previously, with some modifications [30]. Briefly, the E6D25E, E6Pro expressing HCK1T cells and control cells were cultured to passage 25 and total proteins were harvested by adding lysis buffer (7M urea, 2 M thiourea 4% (w/v) 3-[(3-chloroamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulphonate (CHAPS), 2%(v/v) IPG buffer (pH 4-7) 40 mM dithiothreitol (DTT), a protease inhibitor cocktail (GE, Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and EDTA), then freeze-thaw in liquid nitrogen 5 times followed by incubation at 4°C for 30 min. After centrifugation at 12,000 rpm for 20 min, protein lysates were collected. 150 μ g of protein was diluted in a rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer (pH 4-7), 18 mM DTT and 0.002% bromophenol blue) and the protein sample was

loaded onto 7 cm immobilized Drystrip pH 4-7 NL, 7 cm (GE Healthcare). The samples were separated at 20°C using Ettan IPG phor II Isoelectric Focusing Unit (GE Healthcare) with the following conditions: 60 V for 12 h, 300 V for 200 volt-hours (Vh), gradient to 1000 V for 300 Vh, gradient to 5000V for 4500 Vh and hold at 5000V for 3000 Vh. Strips were treated with equilibrium buffer solution I (6 M urea, 65 mM DTT, 29.3% glycerol, 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2% SDS and 0.002% bromophenol blue) for 15 min then incubated with solution II (6 M urea, 135 mM iodoacetamide, 29.3% glycerol, 75 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2% SDS and 0.002% bromophenol blue) for 15 min. The strips were placed on 12% SDS-PAGE. Subsequently stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 solution for 1 h and incubated with fixing solution for 1 h. Gels were incubated with destaining solution for 2 h before scanned with ImageScanner (Amersham Biosciences, Cambridge, UK). Image Master 2D Platinum software (Amersham Bioscience) was used for matching and analysis of the protein spots on the 2D gel.

LC-MS/MS mass spectrometry

The gel slices were cut into 1x1 mm pieces, washed with water for 10 min, destained twice with 20 mM AmB (Ammonium bicarbonate) with shaking for 10 min. After removing all liquid, 20mM AmB/ACN (1:1) was added and shaken for 10 min, and removed all liquid. ACN was added and shaken for 10 min, and removed all liquid. The gel slices were dried for 5 min. then, dehydrated with 10 mM DTT/20 mM AmB and incubated at 56 °C for 45 min. After removing all liquid, the gel slices were alkylated with 55 mM IAA/20mM AmB and incubated in dark at room temperature for 30 min, and all liquid was removed. Gel pieces were dehydrated twice with 20mM AmB/ACN (1:1), and dried for 5 min. The dried gel pieces were incubated with enzyme solution (25 ng/μl trypsin and 25 mM AmB) on-ice for 30 min, incubated at 37 °C for overnight (>16 hr) and added with 20 mM AmB for 10 min. To digest the gel slices, the extract buffer 1 (50% ACN, 1% formic acid) were added, shaken vigorously for 10 min, followed with adding the extract buffer 2 (85% ACN, 1% formic acid) and shaking vigorous for 10 min, by speed Vac at 45 °C for 120 min, the solution was dried. The sample was resuspend with 20 μl of Buffer (2% ACN, 0.1% formic acid) and kept at -70° C until used. Before injection to LC-MS, the sample was centrifuged at 10,000 rpm for

10 min., 12 µl of sample t was aliquoted o Limited Volume Inserts 50 µl Glass in vial or 96 well plate.

All samples were analyzed with a nano-liquid chromatography system (EASY-nLC II, Bruker) coupled to an ion trap mass spectrometer (Amazon Speed ETD, Bruker) equipped with an ESI nano-sprayer. Sample volume of 1-3 µl were loaded by the autosampler onto a EASY-Column, 10 cm, ID 75µm, 3 µm, C18-A2 (Thermo Scientific) using a flow rate of 300 nl/min and linear gradient from Solution A (0.1% formic acid) to 35% of Solution B (0.1% formic acid in acetonitrile) in 25 min. Bruker Daltonics software packages, HyStar v.3.2 was used to control the ion trap device. LC–MS/MS spectra were analyzed using Compass Data Analysis v.4.0. The instrument was under the service from Khon Kaen University Research Instrument Center, Thailand.

Statistical Analyses

Data of various functional assays were subjected to a oneway ANOVA. Significance was accepted at $P < 0.05$.

Results

Establishment of HCK1T expressing E6 variants

The recombinant retroviruses expressing 16E6, 16E6D25E, 16E6SD and 16E6SD-D25E as well as empty vector, LXS_N, were transduced into HCK1T cells at passage 14. The transduced cells were selected in the presence of 50 µg/ml of G418 for 2 weeks. To confirm expression of E6 proteins, cell lysates were prepared at passage 15 and subjected to western blotting. As expected, E6 proteins were detected in those cells transduced with E6D25E-, E6Pro-, E6SD-D25E- and E6SD-Pro-expressing retroviruses (Fig. 1). E6 proteins were expressed with comparable levels, no less than those expressed in SiHa cells. Thus we could successfully establish normal cervical keratinocyte cell lines expressing various E6 proteins.

E6D25E protein extends life span of HCK1T

To evaluate the biological activity of E6D25E protein upon proliferation of HCK1T cells, growth curves were plotted. HCK1T cells expressing various E6 proteins or empty vector were serially passaged when they reached subconfluence. The population doublings (PDs) of transduced cells were plotted against cultured time to represent their growth curves (Fig. 2). The results showed all the cells proliferate at a given rate over the observation period more than 130 days though the control cells somewhat slowed down their growth at later passages. A mean doubling time of HCK1T cells expressing either E6D25E, E6Pro, E6SD-D25E or E6SD-Pro proteins was around 106 hours whereas that of control HCK1T cells was 177 hours. The result suggested that the E6D25E variant protein maintains the activity to promote proliferation of natural host cells which is comparable to E6Pro protein.

E6D25E can down-regulate p53 and its downstream target p21

NOTCH1 is a p53 target gene and induces terminal differentiation of keratinocytes [31,32], and it can be inevitably activated by passage of cells with EDTA and trypsin [33]. HPV16 E6 can relieve the detrimental effect of EDTA on HCK1T in both p53-dependent and p53-independent manners [31]. Thus, it is likely that an activity of E6 to promote proliferation of HCK1T largely depends on its ability to target p53 for degradation. Therefore, we compared the expression levels of p53 as well as its downstream target p21 by western blotting. The levels of p53 proteins in those cells expressing either E6D25E, E6Pro, E6SD-D25E or E6SD-Pro proteins were comparable to that expressed in SiHa cells and much lower than that expressed in the control HCK1T cells (Fig. 1). In parallel to the p53 levels, p21 levels were also lower in those cells expressing various E6 proteins than the control HCK1T cells. The observed density of p53 protein in E6D25E expressing HCK1T is lower than E6Pro expressing HCK1T cells. Corresponding with this result, reduction of NOCTH1 level was obverted whereas p63 level was normal expressed (data not show). These results suggested that the activity of E6D25E protein to target p53 for degradation was no less than that of E6Pro protein.

Proteomic profiles and protein identification in E6D25E and E6Pro expressing HCK1T

To investigate specific protein profile in HCK1T cells expressing E6D25E compared to and E6Pro-expressing HCK1T, the culture of E6D25E-expressing HCK1T and E6Pro-expressing HCK1T at passage 25 were harvested. Then, total proteins were extracted and separated by 2D PAGE. The data were acquired from three independent experiments. Results showed that the average protein spot number per gel set ranged from 300 to 320. Both groups were compared using one way ANOVA analysis of two the pair wise comparisons. As shown in figure 3 and table 1, E6D25E-expressing HCK1T show significantly increased levels of 9 protein spots higher than E6Pro-expressing HCK1T. All of them were identified by LC-MS/MS-based proteomic approaches. Four proteins were up-regulated more than 1.5 fold in E6D25E-expressing HCK1T cells, namely, keratin type II, tumor rejection antigen (gp961) 1 variant, actin cytoplasmic 1 and keratin 7.

Up-regulation of keratin 7 expression in E6D25E expressing HCK1T

Since keratin 7 (K7) is one of the markers specific for a discrete population of squamocolumnar junction cells which were recently proposed as cells-of-origin of cervical cancer [34], we are interested in further analyzing whether K7 is up-regulated specifically by E6D25E. K7 was significantly up-regulated in the HCK1T cells expressing E6D25E compared to those expressing E6Pro or control cells in the next passage after transduction of retroviral vectors (Fig 3, lane 1 to 3). Interestingly, the up-regulation of K7 was coincided with down-regulation of involucrin which is a differentiation marker of keratinocytes. These results suggest that HCK1T might be derived from the discrete population of squamocolumnar junction cells and that the phenotype is enhanced by expression of E6D25E but not by E6Pro. However, the up-regulation of K7 was marginal when the cells were further propagated by 11 passages (Fig 3, lane 4 to 6).

Discussion

This study investigated the biological activities of E6D25E of HPV16 As variant that may associate with higher prevalence in cervical cancers. the properties of E6D25E were investigated in a normal human cervical keratinocyte, HCK1T. Both E6D25E and E6Pro proteins promoted faster growth of HCK1T and decreased the p53 protein levels in a similar

fashion. E6D25E and E6Pro also showed the specific protein profile that involves in cell structural functions and immune responses.

Cell immortalization is a hallmark of cancer cells and cooperation of E6 and E7 is required to immortalize primary human keratinocyte via inactivation of p53 and pRb protein, respectively. However, HPV16 E6 alone cannot accomplish this process [35,36]. This study focused on the functions of E6D25E of HPV16As variant in HCK1T cells. Our results showed the analogous patterns of cell growth in E6D25E- and E6Pro-expressing HCK1T cells, suggesting that the properties of E6D25E are similar to those of E6Pro for cell proliferation. Ricard et al. (2010) compared the ability to extend the life span between E6 variants with E7 in primary keratinocytes and showed that the E6 variants (HPV16AA variant) conferred faster growth than E6 prototype and induced different differentiation patterns to keratinocytes [22]. Sichero et al. (2012) compared the properties of HPV16 E6 variants including AA, E-P (European prototype) and E-350G (European variant) and the results showed that E-P expressing keratinocytes displays lowest efficiency on cellular growth [24]. The previous study reported that E6 from AA variant shows higher capacity to immortalize PHFKs than that of E6 prototype [23].

The biological function of HPV16 variants were most studied in European country where HPV16 variant harboring E6 L83V was found predominant. E6 L83V activates MAPK signaling, and deregulates Notch1 and oncogenic Ras pathways more thoroughly than E6 prototype [37]. The inactivation of p53 protein is a well-known function of E6 protein, which contributes to genomic instability and rapid malignant progression [38]. This E6's function was confirmed in both transient transfection and stable transduction assays. Ten of HPV16 E6 variants including E6L83V are commonly found in European population, and the biological activities were investigated in transient transfection experiment [19] [20]. Most of them revealed high ability to target p53 for degradation. Recently, the activity to inactivate p53 protein by E6 D25E or HPV16As variant was examined in comparison to that of E6 L83V. The degradation of p53 protein is commonly observed in these E6 variant-expressing cells, corresponding with the low expression levels of p21 CIP/WAF1 [25]. Hand et al. (2014) showed equivalent efficacy to degrade p53 among HPV16 E6 proteins from E prototype, E variant (EUR E6-L83V), As variant (E6D25E) and As lineage (E6-E113D) in transient transfection assay[39]. Our results demonstrated that E6D25E and E6Pro show similar activity to decrease p53 and p21 levels in the stably transduced HCK1T cells.

Keratin type II or type II cytokeratins is a member of keratins, main structure proteins in epithelial cells. They were found as a cytoplasmic intermediate filaments (IFs) [40]. Keratins comprise of type I keratins, K9-K10, K12-K28, K31-K40 and the type II keratins, K1-K8 and K71-K86. All of these keratins are belong to the family of IFs [41]. Cytoskeleton consists of IFs, microtubules (MTs) and microfilaments (MFs), playing a role in cell migration, cell division and mechanotransduction. Actin or cytoplasmic 1 is a molecular building block of microfilaments (MFs)[42]. In this study we found increased levels of keratin type II, keratin 7 and actin in E6D25E- and E6Pro-expressing HCK1T. The Up-regulation of K7 by E6D25E using western blotting. K7 is generally thought to be a marker for simple columnar epithelial cells but not squamous epithelial cells. Recently, it is reported that K7 was one of the markers specific for a discrete population of squamocolumnar junction cells (SCJ) which were proposed as cells-of-origin of cervical cancer. In normal cervix, K7 was detected in small numbers of cells in SCJ region, named junctional cells, but not in columnar cells in endocervix or squamous cells in ectocervix. Interestingly, K7 was detected from CIN1 in SCJ to cervical cancers including both squamous cell carcinomas and adenocarcinomas but not in CINs in ectocervix [34]. Thus, those cells are thought to be bipotential to differentiate into either squamous epithelial cells or columnar epithelial cells. K7 was significantly up-regulated in the HCK1T cells expressing E6D25E compared to those expressing E6Pro or control cells in the next passage soon after transduction of retroviral vectors (Fig. 3), though the up-regulation of K7 became marginal after several passages. Clearly, further study is required to elucidate the significance of the K7 up-regulation by E6D25E. However, it is possible the up-regulation of K7 by E6D25E is associated with the increased risk for cervical cancer progression in Asia. It will be interesting to examine whether HPV16 Asian variants is more closely associated with cervical adenocarcinoma. In this context, it will be also interesting to examine whether or not E6 of HPV18, which is known to be more closely associated with cervical adenocarcinoma, can up-regulate K7.

Tumor rejection antigen (gp96) 1 variant or HSP gp96, counterpart of a cytosolic HSP90 family in the endoplasmic reticulum has been shown to play a role in activation of innate and adaptive immunity. Antigen peptides bound to gp96 are taken up by APC and presented by MHC class I and II [43]. Previous study showed that HPV16 E6 and E7 can induce a tumor specific rejection response and serve as targets for such response via CD8⁺ CTL [44,45].

In summary, this study provides oncogenic nature of E6D25E of HPV16 As variant. Further research certainly appears warranted to verify the underlying mechanism how E6D25E variant associates with the increased risk for cervical cancer progression in Asia.

Acknowledgements

The authors thank T. Ishiyama for her expert technical assistance and T. Yugawa for critical reading of the manuscript. We would also like to thank research team members in Thailand and Japan for helpful comments, suggestions providing reagents concerning this work. This work was granted by Thailand Research Fund (TRF) Scholars.

References

1. Parkin DM, Bray F (2006) Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 24 Suppl 3: S3/11-25.
2. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, et al. (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-19.
3. Van Doorslaer K, Burk RD (2010) Evolution of human papillomavirus carcinogenicity. *Adv Virus Res* 77: 41-62.
4. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324: 17-27.
5. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, et al. (1997) Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 71: 2463-2472.
6. Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, et al. (2012) Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol* 86: 6855-6861.
7. Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, et al. (2001) Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 93: 1325-1330.
8. Burk RD, Terai M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, et al. (2003) Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res* 63: 7215-7220.
9. Grodzki M, Besson G, Clavel C, Arslan A, Franceschi S, et al. (2006) Increased risk for cervical disease progression of French women infected with the human papillomavirus type 16 E6-350G variant. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 820-822.
10. Lee K, Magalhaes I, Clavel C, Briolat J, Birembaut P, et al. (2008) Human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in cervical lesion progression. *Virus Res* 131: 106-110.
11. Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, Wacholder S, Herrero R, et al. (2010) A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res* 70: 3159-3169.
12. Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, et al. (2001) Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 93: 315-318.
13. Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R (2003) Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8211-8216.

14. Liu X, Dakic A, Zhang Y, Dai Y, Chen R, et al. (2009) HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 18780-18785.
15. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA (2004) Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 18: 2269-2282.
16. Tungteakkhun SS, Duerksen-Hughes PJ (2008) Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. *Arch Virol* 153: 397-408.
17. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M (1998) Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 58: 829-833.
18. Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, et al. (1996) Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 70: 6987-6993.
19. Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, Abadi T, Verbitzky Y, et al. (2006) HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology* 350: 216-227.
20. Asadurian Y, Kurilin H, Lichtig H, Jackman A, Gonen P, et al. (2007) Activities of human papillomavirus 16 E6 natural variants in human keratinocytes. *J Med Virol* 79: 1751-1760.
21. Zehbe I, Richard C, DeCarlo CA, Shai A, Lambert PF, et al. (2009) Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology* 383: 69-77.
22. Richard C, Lanner C, Naryzhny SN, Sherman L, Lee H, et al. (2010) The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer. *Oncogene* 29: 3435-3445.
23. Niccoli S, Abraham S, Richard C, Zehbe I (2012) The Asian-American E6 variant protein of human papillomavirus 16 alone is sufficient to promote immortalization, transformation, and migration of primary human foreskin keratinocytes. *J Virol* 86: 12384-12396.
24. Sichero L, Sobrinho JS, Villa LL (2012) Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology* 432: 127-132.
25. Yi JW, Jang M, Kim SJ, Kim SS, Rhee JE (2013) Degradation of p53 by natural variants of the E6 protein of human papillomavirus type 16. *Oncol Rep* 29: 1617-1622.
26. Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Ohno S, Yugawa T, Egawa N, et al. (2008) An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. *Cancer Research* 68: 5699-5705.
27. Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, et al. (1997) Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 11612-11616.
28. Egawa N, Nakahara T, Ohno SI, Narisawa-Saito M, Yugawa T, et al. (2012) The E1 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Is Dispensable for Maintenance Replication of the Viral Genome. *Journal of Virology*.
29. Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, et al. (2007) Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 27: 3732-3742.
30. Khoontawad J, Wongkham C, Hiraku Y, Yongvanit P, Prakobwong S, et al. (2010) Proteomic identification of peroxiredoxin 6 for host defence against *Opisthorchis viverrini* infection. *Parasite Immunol* 32: 314-323.
31. Yugawa T, Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Haga K, Ohno S, et al. (2010) DeltaNp63alpha repression of the Notch1 gene supports the proliferative capacity of normal human keratinocytes and cervical cancer cells. *Cancer Research* 70: 4034-4044.
32. Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, et al. (2007) Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology* 27: 3732-3742.
33. Yugawa T, Nishino K, Ohno S, Nakahara T, Fujita M, et al. (2013) Noncanonical NOTCH signaling limits self-renewal of human epithelial and induced pluripotent stem cells through ROCK activation. *Molecular and Cellular Biology* 33: 4434-4447.

34. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, et al. (2012) A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10516-10521.
35. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA (1991) The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol* 65: 473-478.
36. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT (1989) HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 8: 3905-3910.
37. Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tergaonkar V, Liu Y, Androphy EJ, et al. (2004) 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* 78: 5934-5945.
38. Lizano M, Berumen J, Garcia-Carranca A (2009) HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res* 40: 428-434.
39. Hang D, Gao L, Sun M, Liu Y, Ke Y (2014) Functional effects of sequence variations in the E6 and E2 genes of human papillomavirus 16 European and Asian variants. *J Med Virol* 86: 618-626.
40. Coulombe PA, Omary MB (2002) 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 14: 110-122.
41. Moll R, Divo M, Langbein L (2008) The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 129: 705-733.
42. Herrmann H, Aebi U (2004) Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* 73: 749-789.
43. Liu Z, Li X, Qiu L, Zhang X, Chen L, et al. (2009) Treg suppress CTL responses upon immunization with HSP gp96. *Eur J Immunol* 39: 3110-3120.
44. Chen LP, Thomas EK, Hu SL, Hellstrom I, Hellstrom KE (1991) Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 110-114.
45. Chen L, Mizuno MT, Singhal MC, Hu SL, Galloway DA, et al. (1992) Induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a syngeneic tumor expressing the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. *J Immunol* 148: 2617-2621.

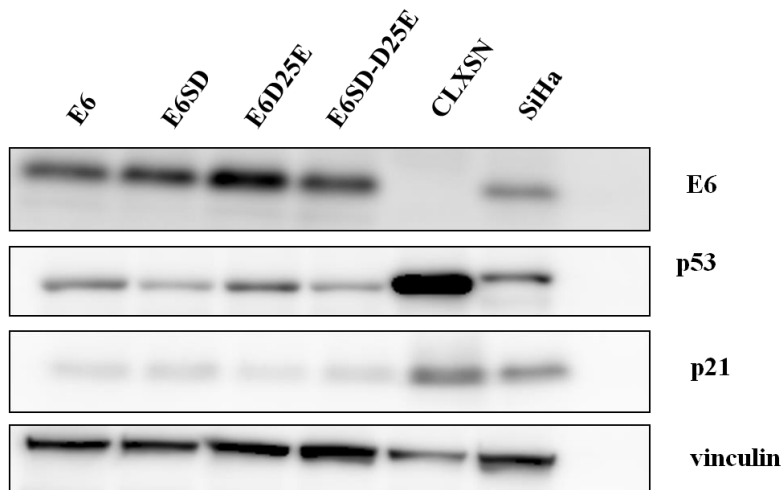


Figure 1. Characterization of HCK1T stably expressing various HPV16E6 variants. HCK1T cells were transduced with the recombinant retroviruses containing various E6 of HPV16 or control vector (CLXSN). The expression of various E6 proteins was detected with the specific anti-HPV16 E6 antibody and the levels of E6 were compared with SiHa cells. Protein levels of p53 and p21 were also determined. Vinculin was included as a loading control.

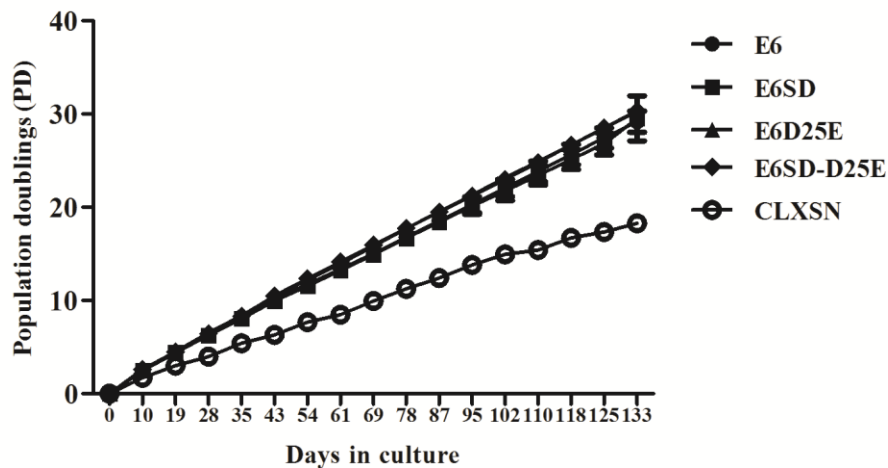


Figure 2. The proliferation rate of various E6 expressing HCK1T cells. After transduction with the recombinant retrovirus containing various E6 or control vector pCLXSN, the cells were cultured and passaged when they reached 90% confluence. Population doublings (PD) were calculated by the formula: $\log_2$ (number of cell at time of subculture/number of cells plated). PD values were plotted against total time in culture to determine rates of cell proliferation.

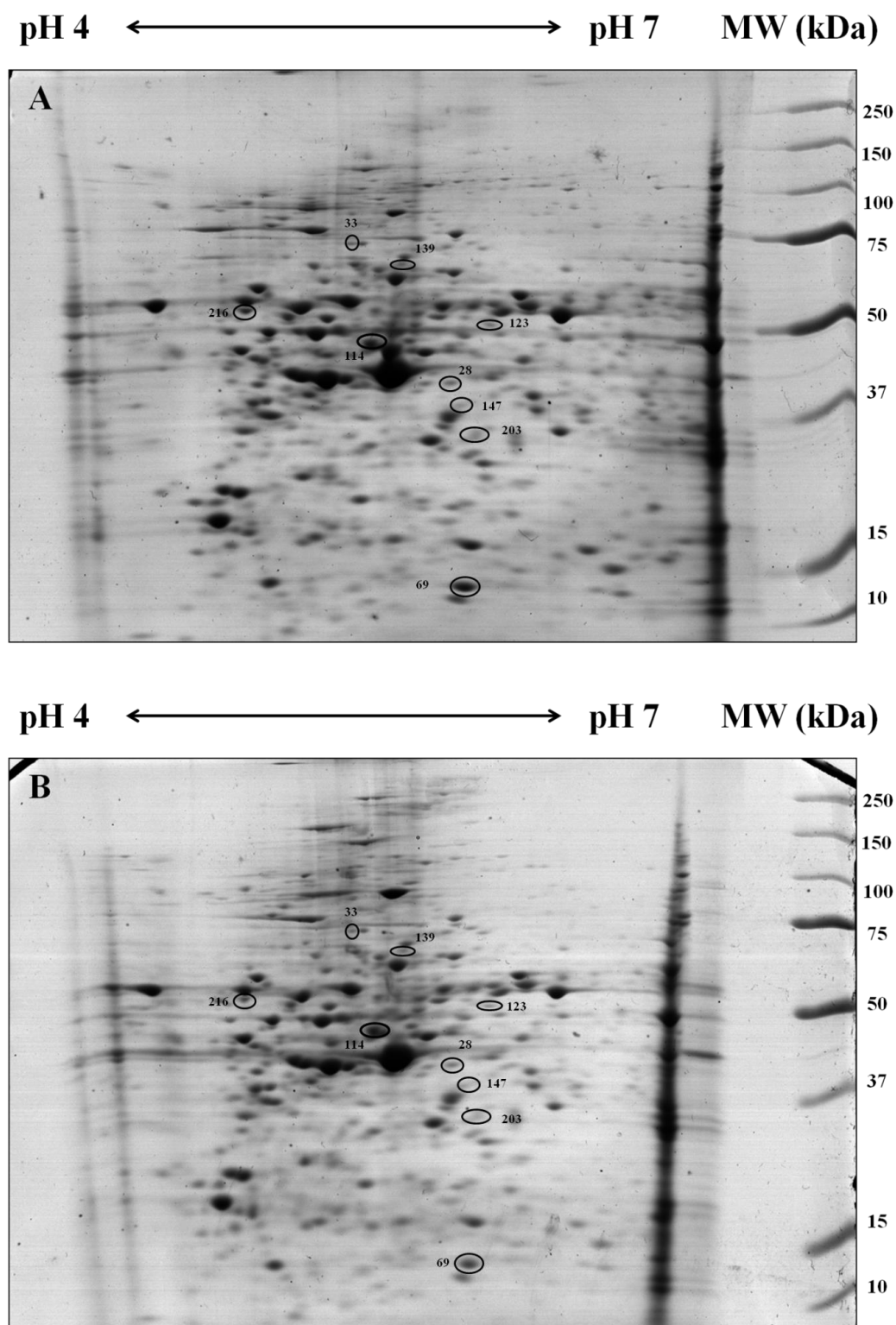


Figure 3. Differential protein expression patterns in E6Pro expressing HCK1T cells (A) and E6D25E expressing HCK1T cells (B) for protein with pI ranged from 4-7. One hundred fifty microgram of protein was loaded into 7-cm IPG strip pH 4-7, separated by molecular weight

on 12%SDS-PAGE, and visualized with Coomassie blue R-250 staining. Molecular mass are indicated on the right. The locations of protein spots with differential expression were highlighted in circle and numbered.

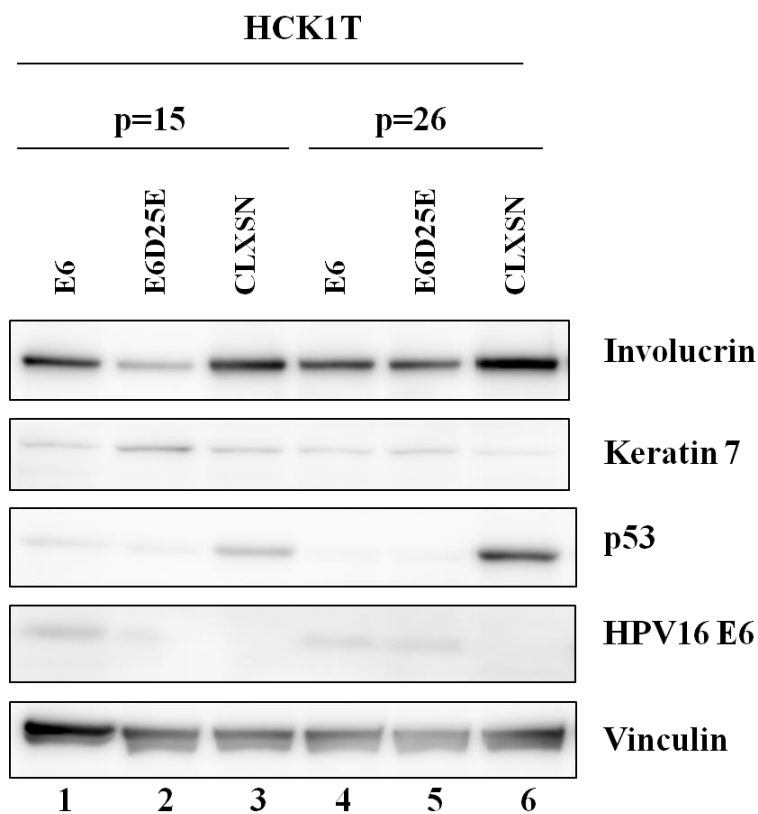


Figure 4. Differential protein expression patterns in E6Pro expressing HCK1T cells (A) and E6D25E expressing HCK1T cells. Twenty micrograms of proteins were separated by molecular weight on 5-15% gradient SDS-PAGE. Expression of keratin 7 (K7) and the keratinocyte differentiation marker, involucrin, as well as p53 and E6 were detected as described in Materials and Method. Vinculin was included as a loading control.

Table 1 Protein identified in E6D25E and E6Pro expressing HCK1T by LC MS/MS and MASCOT software.

Spot No.	Protein name	ID. number	Fold	pI	Score	Match	P-value
123	Keratin type II	gi 908801	1.67	8.09	922	21	0.001
33	Lamin-B1 isoform 1	gi 5031877	1.25	5.11	753	18	0.015
216	Tumor rejection antigen (gp96) 1 variant	gi 62088648	2.13	5.08	772	19	0.026
147	Actin, cytoplasmic1	gi 4501885	1.61	5.29	175	7	0.028
69	Glutathione S-transferase	gi 2204207	1.37	5.43	871	26	0.033
28	Keratin type II	gi 908801	1.16	8.09	897	16	0.040
139	MTHSP75	gi 292059	1.16	5.97	112	3	0.040
203	Annexin A8	gi 49257004	1.33	5.56	284	8	0.041
114	Keratin 7	gi 12803727	1.57	5.42	1705	42	0.047

E6D25E of HPV16 As variant affects epigenetic modulation and suppresses the expression of interferon regulatory factor 1 and 7

Peechanika Chopjitt^a,

Tipaya Ekalaksananan^a,

Sureewan Bumrunghai^a,

Bunkerd Kongyingyoes^b,

Chamsai Pientong^{a*}

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

^bDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

*Corresponding author. Tel.: +66 43 363808; fax: +66 43 348385.

E-mail address: chapie@kku.ac.th (C. Pientong).

Abstract

This study aimed to investigate the effects of E6D25E of human papillomavirus 16 Asian variant (HPV16As) on epigenetic alteration focusing on miRNA-21 and histone deacetylation 6 (HDAC6) and expression of interferon regulatory factor (IRF) 1 and IRF7.

The vectors expressing E6D25E or E6Pro (HPV16 prototype) were constructed and transiently transfected in C33A cell line. The stabilized HCK1T cell lines were performed by transduction of retrovirus containing E6D25E or 16E6Pro. The miR-21 was detected in the transiently transfected as well as in stabilized cells in condition with or without treatment of complete medium (CM) and HeLa medium (HeLa-CM) using real time PCR. HDAC6 as well as IRFs 1, 3 and 7 was determined in the stabilized HCK1T cell lines by real time PCR. HDAC6 level was confirmed in tet-on system of stabilized HCK1T cells expressing E6D25E and 16E6Pro by western blot.

E6D25E showed higher activity of miR-21 induction than E6Pro in transient transfection model, corresponding with in the stable HCK1T cells expressing E6D25E and E6Pro where miR-21 was highly upregulated in both conditions of CM or HeLa-CM treatment. Interestingly, the miR-21 was induced with higher level in HeLa-CM treated cells than in CM-treated cells. Additionally, HDAC6 was also differently moderated and observed with high level in E6-Pro expressing HCK1 cells. Inversely HDAC6 level was reduced in E6-As expressing HCK1 cells. Moreover, down regulation of IRF genes expression showed significantly different in the stable HCK1T with E6D25E or E6Pro. IRFs 1 and 7 were more suppressed by E6D25E than E6Pro.

These data support the different oncogenic role of E6D25E, HPV16 As variant with high potential oncogenicity in cervical cancer progression.

Keyword: HPV16 Asian variant, miR-21, HDAC6, IRF1, IRF 3, IRF 7

Introduction

Cervical cancer is the third most common malignancy affecting women worldwide. In 2008, an estimated 530,000 women developed cervical cancer and 275,000 women died of it [1]. In Thailand, there were 6,243 new cases of cervical cancer with 2,620 deaths in 2003[2]. Therefore, seven women die from cervical cancer each day [2]. Human papillomavirus

(HPV) infection is the most common sexually transmitted infection and high risk HPV (HR-HPV), especially HPV16 is recognized as the major cause of cervical cancer [3,4]. These viruses encode two oncoproteins, E6 and E7 which are consistently over-expressed in human cervical cancer cells. The well-known characterized function of E6 protein is degrading p53 tumor suppressor protein by accelerating ubiquitin-mediated degradation through proteasomal pathway [5]. The E7 protein binds to the retinoblastoma protein family, resulting in their destabilization and the disruption of pRb/E2F complexes [6] and cause of pRb degradation [7]. Loss of p53 and pRb functions affect deregulated cells proliferation, anti-apoptosis as well as increase genetic instability which is cause of abnormal cells.

HPV gene variation is one of risk factors associated with cervical cancer development. The variation of nucleotide on L1 gene was used to classify HPV genotype and differing less than 2% was classified as intratype variants [8]. HPV 16 has been extensively sequenced to characterize subtypes and variants that are described in phylogenetic branches. According to geographic location and ethnic HPV16 has been classified to 4 lineages; 1) European-Asian (EAs) including the sublineage European (E) and Asian (As), 2) African 1 (AFR1), 3) African 2 (AFR2) and 4) North American/Asian-American (NA/AA) including the sublineage North American, Asian-American 1 and Asian-American 2 [9,10].

The epigenetic change was observed in HPV associated cervical cancer and there was reports about the methylation of CpG dinucleotides within the binding site of HPV16 E2 protein in long control region (LCR) that inhibits the binding of transcription factors [11]. E7 protein of HR-HPV modulates DNA methylation process that controls cell proliferation by binding and regulating DNMT1 enzyme activity and also induces epigenetic changes through Rb family to accumulate HDACs [12]. HR-HPV E7 itself can recruit HDACs directly to promoter to induce transcription repression [13]. Other studies reported that HPV16 E7 may displace HDACs from Rb protein and subsequently causes an increase of H3 acetylation in human foreskin keratinocytes [14]. Recently, numerous miRNAs have been identified and are associated with cervical carcinogenesis such as down-regulation of miR-218 leading to promotion of cancer cell migration and invasion [15], up-regulation of miR-205 resulting in enhancement of cell proliferation and migration [16], overexpression of miR-21 leading to reduction of apoptosis pathway [17]. Furthermore, several miRs in cervical cancer including miR-149, miR-203, miR-375, miR-432, miR-1286, miR-641, miR-1290, miR-1287, and miR-95 underwent methylation-mediated transcriptional repression [18,19]. In this study, we investigated the functions of E6 of HPV16 As variant (E6D25E) on epigenetic alteration

focusing on HDAC6 and miRNA-21 involved in cervical cancer development. The downstream signaling effect of HDAC6, an expressions of IRF1, 3 and 7 as well as interferon type I were also investigated.

Material and Methods

Cell culture and treatments

HeLa, HPV18 positive cervical cancer cell line and C33A, HPV negative cervical cancer cell line were cultured in DMEM medium (gibco® , U.S.A) supplied with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. HCK1T cells, a normal diploid human cervical keratinocytes with capacity of normal differentiation established by transducing the catalytic subunit of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) [20] were transduced with the recombinant retroviruses containing 16E6D25E (HPV16 E6 As variant) and 16E6 (HPV16 E6 prototype) or control vector pCLXSN were maintained in keratinocyte serum-free medium (KSFM, gibco®, U.S.A). For treatment condition, all expressing HCK1T at passage 25 were replaced by complete medium (CM) (DMEM with 10%FBS), or culture medium from HeLa cells (HeLa-CM) and incubated for 48 h, then the treated cells were harvested and total RNA was extracted and used for investigation of miR-21 expression.

Plasmids

Plasmid expressing of E6AP was kindly provided by Jon M. Huibregtse, Plasmid HPV16 was kindly provided by Ethel-Michele de Villiers. . It was used for template of HPV16 E6 gene prototype (E6-Pro). HPV16 As variant was isolated from squamous cells carcinomas (SCC) samples as previously described in our study [20]. PCR products of E6 gene were cloned into the pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO® vector using the pcDNA™3.2/GW/D-TOPO® Expression Kit (Invitrogen™ Carlsbad,CA, U.S.A) according to the manufacturer's instruction, and verified by PCR and sequencing. Transfection was performed with lipofectamine 2000 (Invitrogen™ Carlsbad, CA, U.S.A) according to the manufacturers' recommendations. Cells were harvested at 48 h after transfection for real time PCR analysis.

Viral vectors construction

Construction of retrovirus expression vectors, pCLXSN-16E6 (HPV16 E6 prototype) were described previously [21]. pCLXSN-16E6D25E were similarly constructed by using the Gateway system (Invitrogen, Carlsbad, CA). Briefly, entry vectors containing E6 D25E (HPV16As variant) and E6SD D25E were constructed from pENTR201-16E6 and pENTR201-16E6SD with site-directed mutagenesis (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA). These entry vectors were recombined into the destination vector, pDEST-CLXSN and CSII-TRE-Tight-RfA by LR reaction (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to generate pCLXSN-16E6D25E, pCLXSN-16E6SD-D25E, CSII(ins)-TRE-Tight-16E6D25E, CSII(ins)-TRE-Tight-16E6SD-D25E and CSII(ins)-TRE-Tight-16E6D25E/E7

Production of recombinant retroviruses and titration

The production of recombinant retroviruses was performed. Briefly, the retroviral vectors and packaging vectors pCL-GagPol and pEF6-env (10A1) were co-transfected into 293T cells using TransIT-293 (Mirus Co., Madison, USA) according to the manufacturer's instructions, and the culture fluid was harvested at 60 to 72 h post-transfection. Titers of the recombinant viruses were measured in a G418 resistant colony assay with HeLa cells. 5×10^4 HeLa cells in twelve well plates were infected with serial dilutions of the viral stocks with 8 $\mu\text{g/ml}$ of polybrene. After 48 h, cells were fed with fresh medium containing 800 $\mu\text{g/ml}$ of G418. Colonies were stained with Giemsa's dye and counted after 2 weeks.

Transduction of retrovirus containing various E6 genes

One day before transduction, HCK1T cells were plated at a density of 2×10^5 cells per well in six well plates. The recombinant retroviruses containing various E6 genes inoculated at multiplicity of infection (MOI= 0.5) for 2 hours in the presence of 4 $\mu\text{g/ml}$ polybrene. The medium was then replaced with fresh KSFM. After 2 days post-infection, cells were fed with fresh medium supplemented with 50 $\mu\text{g/ml}$ of G418, until mock-infected cells died completely. Cells were fed with fresh medium in every 3 days until cells reached subconfluence.

Real time polymerase chain reaction analysis

Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Ambion, life technology, Carlsbad, CA, U.S.A.), and cDNA was synthesized using the Super Script® III First-Strand Synthesis System according to manufacturer's instruction (Invitrogen , life technology, Carlsbad, CA, U.S.A). The real time PCR was performed by using SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-lad, Hercules, California) to detect mRNA level of HPV16 E6, PDCD4, and actin as internal controls were measured using SYBR qPCR. Primers of mRNA for real-time PCR analysis are listed in Table 1.

For miR-21 detection, Taqman® MicroRNA Reverse transcription reactions and Taqman® MicroRNA quantitative polymerase chain reactions (qPCR) were performed using the MicroRNA TaqMan Reverse Transcription Kit and the TaqMan MicroRNA Assays (Applied BioSystems), respectively to detect miR-21 and RNU6B shRNA as internal control on the same side for each sample. Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) was amplified in triplicates; relative expression of mRNA or miRNA was evaluated by the 2- $\Delta\Delta C_t$ method and normalized to the expression of actin or U6, respectively.

Western blot analysis

Proteins were quantified by Bio-Rad Protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A), resuspended in 30 μ l of sample buffer, separated by 10% SDS-PAGE, and then transferred onto a PVDF membrane. The membrane was incubated with primary antibody, anti-HDAC6 at 1:1,000 dilution (ab56926; Abcam, UK), or anti- β -actin at 1:2,000 dilution (8H10D10; Cell Signaling, Beverly, MA) overnight at 4°C, and then incubated with HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody at 1:10,000 dilution (sc-2005; Santa Cruz) for 1 h at room temperature. The immunodetection was then visualized by a SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo scientific, IL, U.S.A) with ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare).

Immunoprecipitation assay

C33A cells were co-transfected with plasmid containing E6 or E6AP and then total protein was extracted by lysis buffer. Lysate was precleared with 20 μ l Protein G-PLUS-Agarose

and incubated at 4°C for 1 h with rocking, then centrifuged at 2,000 rpm for 5 min at 4°C. The supernatant was transferred to new tube. 500 µg of total protein in microcentrifuge tube was added with 2 µg of primary antibody (anti HPV16/18 E6 antibody) and incubated for 1 h at 4°C. Next, 20 µl of Protein G- PLUS-Agarose was added and incubated at 4°C on rotating device overnight. The immunoprecipitates were collected by centrifugation at 2,500 rpm for 5 min at 4°C, washed twice with RIPA buffer and 2 times with PBS. After supernatant was discarded, pellet was resuspended in 30 µl of sample buffer. To monitor the E6/E6AP interaction, samples were boiled for 5 min and visualized by Western blot assay using anti E6AP at dilution 1:1000 (sc-166689, Santa Cruz, Santa Cruz, CA).

Results

Plasmids construction

pcDNA3.2/V5/GW/D-TOPO containing E6D25E HPV16 As variant (pE6-As) and E6 HPV16 prototype (pE6-Pro) were constructed, and confirmed with two restriction enzymes including *Not* I and *Apa* I. The specific fragments of genes in these clones were sequenced and the difference of specific nucleotide sequences with the amino acid change in E6D25E gene and E6Pro gene are shown in Fig. 1. pE6-As and pE6-Pro vectors were verified by transient transfection of each vector into C33A cell line, total RNA was extracted and detected for E6 expression by qRT-PCR. The result showed that mRNA level of pE6-As and pE6-Pro vectors were similarly expressed as shown in Fig. 2.

Characterization of E6D25E protein from pE6-As

To characterize the function of E6D25E, the interaction between E6 protein and E6AP protein was determined and compared to E6Pro function. In this experiment, each vector of pE6-As and pE6-Pro was co-transfected with E6AP expression vector. The activity of protein-protein interaction was determined by immunoprecipitation method. Fig. 3 showed the immunoprecipitate bands of E6 and E6AP proteins. These results suggested that E6D25E protein of HPV16 As variant still maintains the specific function of E6 that can bind to E6AP for degradation of p53 protein. Therefore, these vectors were used to investigate for E6 function.

Effect of E6D25E on modulation of miR-21

The epigenetic alteration such as over expression of miR-21 was found in various cancers including cervical cancer. This study demonstrated that E6 protein modulated miR-21 expression; firstly, level of miR-21 was up-regulated in the C33A cells that were transiently transfected with plasmid pE6Pro or pE6-As. Interestingly, the up-regulation of miR-21 induced by E6 Pro and E6D25E was significantly different. Fig. 4 demonstrated that E6D25E increased the level of miR-21 to 2.3 fold, higher than E6Pro with 1.6 fold compared to empty vector control. This result is the first report that up-regulation of miR-21 is associated with oncoprotein E6.

To further confirm the ability of E6 on induction of miR-21, HCK1T cells were transduced with the recombinant retroviruses containing pCLXSN16E6D25E and pCLXSN16E6 or control vector pCLXSN. At passage 25, the transduced cells were detected for miR-21 expression that was very low in all transduced cells and control cells without any significant difference (Fig. 5). This result suggested that in the stable cells with low passage, the E6 protein may not directly function on induction of miR-21 expression. This condition may be different from in vivo condition where the infected cells are exposed to several substances in the surrounding environment. Therefore, the transduced HCK1T cells were synchronized by treatment of CM or HeLa-CM for 48 h. In CM condition, miR-21 was higher expressed in both E6Pro and E6D25E expressing HCK1T than control cells. The miR-21 level in E6Pro expressing cells was slightly higher than in E6D25E expressing HCK1T, but no significant difference as shown in Fig. 6. This result suggested that substances in CM may influent to miR-21 expression in the stable cells. Interestingly, in HeLa-CM condition, miR-21 level was significantly higher up-regulated in E6D25E expressing HCK1T cells than E6Pro expressing HCK1T cells (Fig. 7). These results demonstrated that substances secreted from HPV infected cell in environment effect on E6 activity in the stable cells and the modulation of miR-21 expression is different between E6D25E and E6Pro protein. These data imply the different oncogenic potential of HPV16 As variant from its prototype.

To confirm the up-regulation of miR-21 in the stable cells, total RNA extracted from the transduced HCK1T cells were investigated for PDCD4 expression. The results showed down regulation of PDCD4 gene in all transduced HCK1T cultures treated with CM and HeLa-CM as shown in Fig. 8. The PDCD4 protein is a tumor suppressor protein that interacts with translation factors eIF4A and eIF4G and inhibits their translation. This protein is up-regulated

in apoptosis in response to different inducers [22]. The result confirmed the induction of miR-21. Therefore, biological consequences with different patterns of miR-21 expression influenced by E6D25E and E6Pro protein need to be further elucidated.

Many reports showed overexpression of HDAC6 in cancer of the breast [23], liver [24] ovary and pancreas [25] and mRNA expression of HDAC6 was elevated with severity of cancer. The information of HDAC6 expression in cervical cancer is still limited. Recently, the result of microarray data from our group found that HDAC6 expression was suppressed in the transduced cells with HPV16 E2 protein, suggesting that HDAC6 expression was controlled by E2 protein [26]. To investigate the potential role of E6 protein in inducing the expression of HDAC6, the total extracted RNA from the stable E6D25E or E6Pro expressing HCK1T cells at passage 25 were investigated. The expression of HDAC6 was up-regulated in the E6Pro expressing HCK1T cells with statistic significant difference when compared to E6D25E expressing cells. In addition, the expression level of HDAC6 was suppressed in E6D25E expressing cells when compared to cell control (Fig. 9, A). Fig. 9, B demonstrated HDAC6 protein in both transduced cells and cell control. The HDAC6 protein was not detected in E6D25E expressing cells corresponding with mRNA level, whereas high density of HDAC6 protein was observed in E6 Pro expressing cells when compared to HeLa cells, as HDAC6 positive cells control. HCK1T tet/on system was performed to confirm the activity of E6 on modulation of HDAC6 expression. Fig. 10 demonstrated that the level of HDAC6 expression was slightly decreased in E6D25E expressing HCK1T when compared with E6Pro expressing HCK1T. This experiment also confirmed that up regulation of HDAC6 was involved by E6 and E7 oncoproteins, especially E7 may play a major role. This is the first report to link between E6/E7 oncoprotein and up-regulation of HDAC6. These data also imply the different oncogenic potential of HPV16 As variant from prototype.

Effect of E6D25E on innate immune response genes in HCK1T

Previous studies reported that nucleotide sequence variation of HPV16 E6 oncogene altered its immunogenic properties and contributed to HPV16 persistent infection in host and cervical carcinogenesis [27,28,29,30]. Therefore, this experiment investigated the effect of E6D25E and E6Pro proteins on the expression level of innate immune genes including IRF1, 3, and 7. In addition, the downstream signaling pathway, the expressions of IFN- α and IFN- β were also investigated. The total RNA extracted from the stable E6D25E or E6Pro

expressing HCK1T cells at passage 25 were investigated. The results showed that the expression of IRF3 was suppressed in E6Pro expressing HCK1T cells, whereas in E6-As expressing HCK1T cells, IRF3 expression was slightly down-regulated but not different from cell control (Fig. 11B). The expressions of IRF1 and IRF7 genes were down-regulated in E6D25E expressing HCK1T cells with significant difference from that in E6Pro expressing HCK1T cells (Fig. 11A and 11C). The downstream signaling proteins were also confirmed by detection of IFN- α and IFN- β expression. They were suppressed in E6-As expressing HCK1T cells. In E6Pro expressing HCK1T cells, IFN- β was increased significantly while the IFN- α was not different when compared with these in cell control (Fig. 11D and 11E).

Discussion

Numerous oncomiRs (miRNAs with cancer-specific up-regulation) have been found in cervical cancer. Among them, miR-21 is overexpressed in many kinds of cancer. In cervical cancer, up-regulation of miR-21 was detected in cervical cell lines [31] and associated with cervical cancer [32]. The association of HR-HPV and miR-21 up-regulation with cervical cancer development, is still limited. This study demonstrated that the transient transfection of vectors containing E6 induced up-regulation of miR-21. Interestingly, E6D25E of HPV16 As variant showed higher activity of induction than E6Pro, suggesting higher property of E6D25E than E6Pro on cell immune resistance and survival [33]. This result was confirmed by reduction of PDCD4 a direct target of miR-21. Its functions involved apoptosis, blocking of translation and inhibition of tumor growth [17]. Previous report showed that high expression of miR-21 leads to decreased PDCD4 expression, increased expression of interleukin (IL)-10 and decreased NF- κ B activity [34]. Other targets of miR-21 were reported including tumor suppressor phosphatase and tensin homolog (PTEN) [35] and tropomyosin 1 (TPM1) [36], Sprouty2 (SPRY2) [37], RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs), a membrane-anchored inhibitor of matrix metalloproteinases (MMPs) [38], MARCKS (myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate) [39] and CCL20. The decrease of these proteins was involved in tumor differentiation and nodular metastasis [40]. The up-regulation of miR-21 is not only found in cancer cells but also found as common feature in cell stress. Yao et al (2011) showed that miR-21 expression was very sensitive to TGF- β and CM stimulation [41]. Corresponding with these studies, miR-21 was up-regulated in E6 Pro and E6D25E expressing HCK1T treated with HeLa-CM showing higher

level than that treated with CM. Moreover, this study showed that E6D25E up-regulated miR-21 with higher level than E6 prototype under HeLa-CM treatment.

HDAC6 is multi-functional in the cellular pathways and has important role in tumorigenesis such as cell migration, cell proliferation and death, immune response, transcription and protein degradation [42]. The overexpression of HDAC6 has been identified in various cancer cells. In MCF-7 cells, HDAC6 gene was up-regulated and acted as an estrogen regulated gene. This finding might be associated with the metastasis of breast cancer [23]. In oral squamous cell lines, HDAC6 was up-regulated and correlated with tumor stage [43]. Moreover, high level of HDAC6 was found in ovarian cancer cell line and tissues and played a critical role in step of cell motility and migration [44]. However, the expression of HDAC6 in cervical cancer has not been reported. In other studies, HPV31 E7 bound to class I HDACs to facilitate the extending life span of keratinocyte and maintenance of viral genome [45]. Our study revealed that E6Pro protein correlated well with HDAC6 elevation, whereas this activity was not observed with E6D25E. In addition, this study demonstrated that up-regulation of HDAC6 is involved by E7 oncoprotein (Fig. 10). Therefore, the involvement of HDAC6 in cervical cancers may be effected by both E6/E7. The mechanism of different effects of E6D25E and E6Pro protein on HDAC6 expression will be investigated in further study. Recent studies revealed that HDAC6 was a direct target of miR-548m through translation inhibition. The increased expression of miR-548m form ectopic miR-548m expression down-regulated mRNA of HDAC6 and protein level in Jeko-1 cells [46]. c-Myc activation that can be effected by E6/E7 oncoproteins, has been implicated on widespread direct repression of miRNA expression including miR-548m [47]. Therefore, the expression of miR-548m may be silenced by c-Myc, leading to high expression of HDAC6. Moreover, HDAC6 has been identified as an activator of IFN transcription through co-activator of IRF3-dependent transcription [48]. The moderation of HDAC6 might effect on downstream signaling of IRF3.

The innate immunity is a first line defense to viral infection [49]. IFN type I, IFN α and IFN- β production were activated early after virus infection. They act directly on virus infected cell via perturbed viral replication and infected cells proliferation. IRFs play role as upstream molecules regulating IFN type I expression. In HPV infected cell, E6 and E7 oncoproteins have been involved in IFN production [50,51,52,53].

IRF1, the first member of IRF family, was originally identified as transcription factor. It binds IFN- β promoter and controls the transcription of genes involved in antiviral infectivity, immunomodulation, antiproliferation and stimulation of cell apoptosis [54]. Previous evidence showed that HR-HPV E7 interacts with IRF1 and inactivates its transactivation function, therefore, it could be speculated that HR-HPV E6 and E7 oncoprotein interfered IFN signaling leading to viral evasion from host immunity in the progress of cervical disease [51]. This study showed down-regulation of IRF1 mRNA in E6D25E and E6-Pro expressing HCK1T cells when compared with cell control. E6D25E showed higher suppression activity than E6Pro. IRF3 and IRF7 are the key regulators of IFN type I gene expression upon virus infection. IRF3 is expressed constitutively in most cell types and activated in virus infection. After phosphorylation, a conformational change is induced in IRF3 then allowing homo and heterodimerization, nuclear localization and interaction with INF type I promoter. IRF7 is highly homologous to IRF3, but unlike IRF3, IRF7 is expressed at a low level in most cells and is IFN inducible in an IRF9-dependent pathway. Similarly to IRF3, IRF7 is activated downstream of certain PRR including TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, RIG-I, MDA5 and DAI (DLM-1/ZBP1), and undergoes nuclear translocation for type IFN I induction [55]. Moreover, IRF7 may involve in switching EBV latency type. EBV latent membrane protein 1(LMP-1) regulates an expression and activation of IRF7 via phosphorelation of IRF7 [56]. IRF7 has oncogenic properties along with LMP-1 that may mediate the EBV transformation process [57]. However, in IRF7 knock-out mice, it was demonstrated that IRF7 is necessary for the induction of type I IFN through virus mediated and MyD88-independent signaling pathway as well as TLR-activated MyD88-dependent pathway [58,59]. Our data exhibit the abilities of E6 D25E that can suppress the mRNA expression of IRF1, IRF3 and IRF7 leading to decreased mRNA level of IFN- α and β . This result may suggest higher activities of E6D25E to evade immune surveillance than E6Pro.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was granted by Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Thailand (Grant Number No.55112) and Research Grant for Mid-Career University Faculty, RMU (Grant Number No. RMU5380038).

References

- [1] M. Arbyn, X. Castellsague, S. de Sanjose, L. Bruni, M. Saraiya, F. Bray, J. Ferlay, Worldwide burden of cervical cancer in 2008, *Ann Oncol* 22 (2011) 2675-2686.
- [2] S. Wilailak, Epidemiologic report of gynecologic cancer in Thailand, *J Gynecol Oncol* 20 (2009) 81-83.
- [3] F.X. Bosch, M.M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A.M. Jansen, J. Peto, M.H. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman, K.V. Shah, Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group, *J Natl Cancer Inst* 87 (1995) 796-802.
- [4] J.M. Walboomers, M.V. Jacobs, M.M. Manos, F.X. Bosch, J.A. Kummer, K.V. Shah, P.J. Snijders, J. Peto, C.J. Meijer, N. Munoz, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, *J Pathol* 189 (1999) 12-19.
- [5] M. Scheffner, B.A. Werness, J.M. Huibregtse, A.J. Levine, P.M. Howley, The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53, *Cell* 63 (1990) 1129-1136.
- [6] N. Dyson, P.M. Howley, K. Munger, E. Harlow, The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product, *Science* 243 (1989) 934-937.
- [7] S.N. Boyer, D.E. Wazer, V. Band, E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway, *Cancer Res* 56 (1996) 4620-4624.
- [8] E.M. de Villiers, C. Fauquet, T.R. Broker, H.U. Bernard, H. zur Hausen, Classification of papillomaviruses, *Virology* 324 (2004) 17-27.
- [9] T. Yamada, M.M. Manos, J. Peto, C.E. Greer, N. Munoz, F.X. Bosch, C.M. Wheeler, Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective, *J Virol* 71 (1997) 2463-2472.
- [10] I. Cornet, T. Gheit, S. Franceschi, J. Vignat, R.D. Burk, B.S. Sylla, M. Tommasino, G.M. Clifford, Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR, *J Virol* 86 (2012) 6855-6861.
- [11] A. Thain, O. Jenkins, A.R. Clarke, K. Gaston, CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences, *J Virol* 70 (1996) 7233-7235.
- [12] W.A. Burgers, L. Blanchon, S. Pradhan, Y. de Launoit, T. Kouzarides, F. Fuks, Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases, *Oncogene* 26 (2007) 1650-1655.
- [13] M.S. Longworth, R. Wilson, L.A. Laimins, HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs, *EMBO J* 24 (2005) 1821-1830.
- [14] B. Zhang, R.N. Laribee, M.J. Klemsz, A. Roman, Human papillomavirus type 16 E7 protein increases acetylation of histone H3 in human foreskin keratinocytes, *Virology* 329 (2004) 189-198.

- [15] Y. Li, J. Liu, C. Yuan, B. Cui, X. Zou, Y. Qiao, High-risk human papillomavirus reduces the expression of microRNA-218 in women with cervical intraepithelial neoplasia, *J Int Med Res* 38 (2010) 1730-1736.
- [16] H. Xie, Y. Zhao, S. Caramuta, C. Larsson, W.O. Lui, miR-205 expression promotes cell proliferation and migration of human cervical cancer cells, *PLoS One* 7 (2012) e46990.
- [17] Q. Yao, H. Xu, Q.Q. Zhang, H. Zhou, L.H. Qu, MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells, *Biochem Biophys Res Commun* 388 (2009) 539-542.
- [18] T. Yao, Q. Rao, L. Liu, C. Zheng, Q. Xie, J. Liang, Z. Lin, Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cervical cancer, *Virology* 10 (2013) 175.
- [19] S.M. Wilting, W. Verlaet, A. Jaspers, N.A. Makazaji, R. Agami, C.J. Meijer, P.J. Snijders, R.D. Steenbergen, Methylation-mediated transcriptional repression of microRNAs during cervical carcinogenesis, *Epigenetics* 8 (2013) 220-228.
- [20] M. Narisawa-Saito, Y. Yoshimatsu, S. Ohno, T. Yugawa, N. Egawa, M. Fujita, S. Hirohashi, T. Kiyono, An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer, *Cancer Research* 68 (2008) 5699-5705.
- [21] T. Kiyono, A. Hiraiwa, M. Fujita, Y. Hayashi, T. Akiyama, M. Ishibashi, Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997) 11612-11616.
- [22] I.A. Asangani, S.A. Rasheed, D.A. Nikolova, J.H. Leupold, N.H. Colburn, S. Post, H. Allgayer, MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer, *Oncogene* 27 (2008) 2128-2136.
- [23] Z. Zhang, H. Yamashita, T. Toyama, H. Sugiura, Y. Omoto, Y. Ando, K. Mita, M. Hamaguchi, S. Hayashi, H. Iwase, HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer, *Clin Cancer Res* 10 (2004) 6962-6968.
- [24] G. Ding, H.D. Liu, Q. Huang, H.X. Liang, Z.H. Ding, Z.J. Liao, G. Huang, HDAC6 promotes hepatocellular carcinoma progression by inhibiting P53 transcriptional activity, *FEBS Lett* 587 (2013) 880-886.
- [25] D. Li, X. Sun, L. Zhang, B. Yan, S. Xie, R. Liu, M. Liu, J. Zhou, Histone deacetylase 6 and cytoplasmic linker protein 170 function together to regulate the motility of pancreatic cancer cells, *Protein Cell* (2013).
- [26] N. Sunthamala, F. Thierry, S. Teissier, C. Pientong, B. Kongyingyoes, T. Tangsiriwatthana, U. Sangkomkamhang, T. Ekalaksananan, E2 proteins of high risk human papillomaviruses down-modulate STING and IFN-kappa transcription in keratinocytes, *PLoS One* 9 (2014) e91473.
- [27] J.R. Ellis, P.J. Keating, J. Baird, E.F. Hounsell, D.V. Renouf, M. Rowe, D. Hopkins, M.F. Duggan-Keen, J.S. Bartholomew, L.S. Young, et al., The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer, *Nat Med* 1 (1995) 464-470.
- [28] I. Zehbe, J. Mytilineos, I. Wikstrom, R. Henriksen, L. Edler, M. Tommasino, Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women, *Hum Immunol* 64 (2003) 538-542.

- [29] Y. Wu, B. Liu, W. Lin, Y. Xu, L. Li, Y. Zhang, S. Chen, A. Xu, HPV16 E6 variants and HLA class II polymorphism among Chinese women with cervical cancer, *J Med Virol* 79 (2007) 439-446.
- [30] K. Matsumoto, T. Yasugi, S. Nakagawa, M. Okubo, R. Hirata, H. Maeda, H. Yoshikawa, Y. Taketani, Human papillomavirus type 16 E6 variants and HLA class II alleles among Japanese women with cervical cancer, *Int J Cancer* 106 (2003) 919-922.
- [31] X. Wang, S. Tang, S.Y. Le, R. Lu, J.S. Rader, C. Meyers, Z.M. Zheng, Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth, *PLoS One* 3 (2008) e2557.
- [32] W.O. Lui, N. Pourmand, B.K. Patterson, A. Fire, Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer, *Cancer Res* 67 (2007) 6031-6043.
- [33] M.R. Young, A.N. Santhanam, N. Yoshikawa, N.H. Colburn, Have tumor suppressor PDCD4 and its counteragent oncogenic miR-21 gone rogue?, *Mol Interv* 10 (2010) 76-79.
- [34] F.J. Sheedy, E. Palsson-McDermott, E.J. Hennessy, C. Martin, J.J. O'Leary, Q. Ruan, D.S. Johnson, Y. Chen, L.A. O'Neill, Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21, *Nat Immunol* 11 (2010) 141-147.
- [35] F. Meng, R. Henson, H. Wehbe-Janek, K. Ghoshal, S.T. Jacob, T. Patel, MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer, *Gastroenterology* 133 (2007) 647-658.
- [36] S. Zhu, M.L. Si, H. Wu, Y.Y. Mo, MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1), *J Biol Chem* 282 (2007) 14328-14336.
- [37] D. Sayed, S. Rane, J. Lypowy, M. He, I.Y. Chen, H. Vashistha, L. Yan, A. Malhotra, D. Vatner, M. Abdellatif, MicroRNA-21 targets Sprouty2 and promotes cellular outgrowths, *Mol Biol Cell* 19 (2008) 3272-3282.
- [38] G. Gabriely, T. Wurdinger, S. Kesari, C.C. Esau, J. Burchard, P.S. Linsley, A.M. Krichevsky, MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators, *Mol Cell Biol* 28 (2008) 5369-5380.
- [39] T. Li, D. Li, J. Sha, P. Sun, Y. Huang, MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun* 383 (2009) 280-285.
- [40] T. Yao, Z. Lin, MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20, *Biochim Biophys Acta* 1822 (2012) 248-260.
- [41] Q. Yao, S. Cao, C. Li, A. Mengesha, B. Kong, M. Wei, Micro-RNA-21 regulates TGF-beta-induced myofibroblast differentiation by targeting PDCD4 in tumor-stroma interaction, *Int J Cancer* 128 (2011) 1783-1792.
- [42] Y. Li, D. Shin, S.H. Kwon, Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes, *FEBS J* 280 (2013) 775-793.
- [43] T. Sakuma, K. Uzawa, T. Onda, M. Shiiba, H. Yokoe, T. Shibahara, H. Tanzawa, Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma, *Int J Oncol* 29 (2006) 117-124.
- [44] M. Bazzaro, Z. Lin, A. Santillan, M.K. Lee, M.C. Wang, K.C. Chan, R.E. Bristow, R. Mazitschek, J. Bradner, R.B. Roden, Ubiquitin proteasome system stress underlies synergistic killing of ovarian cancer cells by bortezomib and a novel HDAC6 inhibitor, *Clin Cancer Res* 14 (2008) 7340-7347.
- [45] M.S. Longworth, L.A. Laimins, The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31, *J Virol* 78 (2004) 3533-3541.

- [46] T. Lwin, X. Zhao, F. Cheng, X. Zhang, A. Huang, B. Shah, Y. Zhang, L.C. Moscinski, Y.S. Choi, A.P. Kozikowski, J.E. Bradner, W.S. Dalton, E. Sotomayor, J. Tao, A microenvironment-mediated c-Myc/miR-548m/HDAC6 amplification loop in non-Hodgkin B cell lymphomas, *J Clin Invest* 123 (2013) 4612-4626.
- [47] T.C. Chang, D. Yu, Y.S. Lee, E.A. Wentzel, D.E. Arking, K.M. West, C.V. Dang, A. Thomas-Tikhonenko, J.T. Mendell, Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis, *Nat Genet* 40 (2008) 43-50.
- [48] I. Nuszynski, C.M. Horvath, Positive and negative regulation of the innate antiviral response and beta interferon gene expression by deacetylation, *Mol Cell Biol* 26 (2006) 3106-3113.
- [49] T. Sasagawa, H. Takagi, S. Makinoda, Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer, *J Infect Chemother* 18 (2012) 807-815.
- [50] P. Barnard, N.A. McMillan, The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha, *Virology* 259 (1999) 305-313.
- [51] J.S. Park, E.J. Kim, H.J. Kwon, E.S. Hwang, S.E. Namkoong, S.J. Um, Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis, *J Biol Chem* 275 (2000) 6764-6769.
- [52] L.V. Ronco, A.Y. Karpova, M. Vidal, P.M. Howley, Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity, *Genes Dev* 12 (1998) 2061-2072.
- [53] S.J. Um, J.W. Rhyu, E.J. Kim, K.C. Jeon, E.S. Hwang, J.S. Park, Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo, *Cancer Lett* 179 (2002) 205-212.
- [54] J. Gao, M. Senthil, B. Ren, J. Yan, Q. Xing, J. Yu, L. Zhang, J.H. Yim, IRF-1 transcriptionally upregulates PUMA, which mediates the mitochondrial apoptotic pathway in IRF-1-induced apoptosis in cancer cells, *Cell Death Differ* 17 (2010) 699-709.
- [55] A. Takaoka, T. Tamura, T. Taniguchi, Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis, *Cancer Sci* 99 (2008) 467-478.
- [56] L. Zhang, J.S. Pagano, IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency, *Mol Cell Biol* 17 (1997) 5748-5757.
- [57] L. Zhang, J. Zhang, Q. Lambert, C.J. Der, L. Del Valle, J. Miklosy, K. Khalili, Y. Zhou, J.S. Pagano, Interferon regulatory factor 7 is associated with Epstein-Barr virus-transformed central nervous system lymphoma and has oncogenic properties, *J Virol* 78 (2004) 12987-12995.
- [58] K. Honda, T. Taniguchi, IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors, *Nat Rev Immunol* 6 (2006) 644-658.
- [59] K. Honda, H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, T. Taniguchi, IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses, *Nature* 434 (2005) 772-777.

Table 1 Nucleotide sequences of specific primers and their PCR conditions

Genes	Sequence (5'-3')	Conditions
E6	Forward; TTGAACCGAAACCGGTTAGT	95°C for 5 min; 40 cycles, 95°C for 1 min, 55°C for 30s, 72°C for 1 min, final extension, 72°C for 5 min
	Reverse; GCATAAATCCCGAAAAGCAA	
PDCD4	Forward; GATTAAGTGTGCCAACCAGTCCAAAG	98°C for 30s, 98°C for 1s 65°C for 1s
	Reverse; CATCCACCTCCTCCACATCATACAC	Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
HDAC6	Forward; TGGCTATTGCATGTTCAACC	98°C for 30s, 98°C for 1s 65°C for 1s
	Reverse; GTCGAAGGTGAACTGTGTTCTT	Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
Actin	Forward; ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA	98°C for 30s, 98°C for 1s 65°C for 1s
	Reverse; TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA	Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
IRF1	Forward; TCTTAGCATCTCGGCTGGACTTC	98°C for 30s, 98°C for 1s 65°C for 1s
	Reverse; CGATACAAAGCAGGGGAAAAGG	Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
IRF3	Forward; CAGGGCCTTGGTAGAAATGG	98°C for 30s, 98°C for 1s 65°C for 1s
	Reverse; GGGTGGCTGTTGGAAATGTG	Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
IRF7	Forward; GATGTCGTCATAGAGGCT GTTGG	98°C for 30s, 98°C for 1s 65°C for 1s
	Reverse; TGGTCCTGGTGAAGCTGGAA	Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
INFα	Forward; AGGAGGAGTTTGATGGCAACCAGT	98°C for 30s, 98°C for 1s 65°C for 1s
	Reverse; TGCTGGTAGAGTTCGGTGCAGAAT	Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step
INFβ	Forward; TGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAA	98°C for 30s, 98°C for 1s 65°C for 1s
	Reverse; TCTCATAGATGGTCAATGCGGCGT	Melt cure; 65-95°C for 2 sec/step

HPV16 E6 Prototype DNA;	↓	nt change T>G at 178
83...TGCACAGAGCTGCAAACAACACTATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCG		
HPV16 E6 As variant DNA;		
83...TGCACAGAGCTGCAAACAACACTATACATGAGATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCG		
	↓	aa change D (Aspartic acid) > E (Glutamic acid) at 25
HPV16 E6 Prototype amino acid; C T E L Q T T I H D I I L E C V Y C K Q Q L L R		
HPV16 E6 As variant amino acid; C T E L Q T T I H E I I L E C V Y C K Q Q L L R		

Figure 1 Nucleotide and amino acid changes in HPV16 E6 As variant. The As variant was classified when nucleotide at position 178 changed from T to G leading to amino acid change from aspartic acid (D) to glutamic acid (E) at position 25. (nt; nucleotide, aa; amino acid).

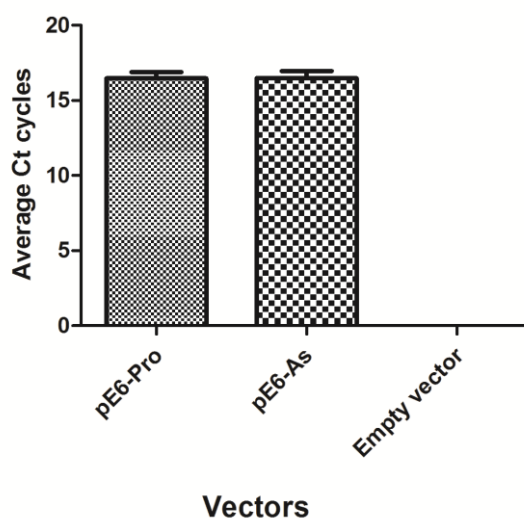


Figure 2 Gene expression of HPV16 E6 As variants and prototype in C33A cell line as defined by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Values represent raw qRT-PCR delta Ct cycles $\pm$ SD. (Three independent experiments were performed.).

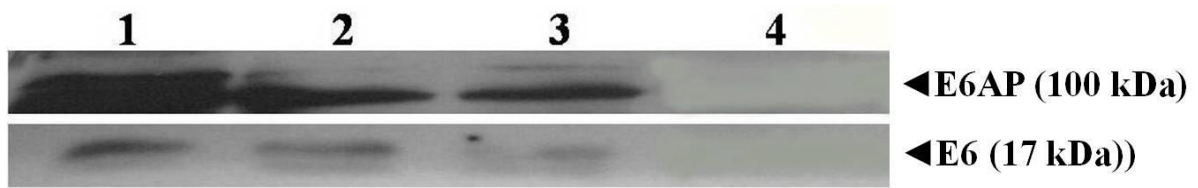


Figure 3 Immunoprecipitation assay; lysates of co-transfected C33A cells were immunoprecipitated with HPV16 E6 monoclonal antibodies. E6AP and HPV16 E6 indicated by arrows. Lane 1 is SiHa cell lysate, 2 is pE6-Pro, 3 is pE6As and 4 is C33A cell lysate.

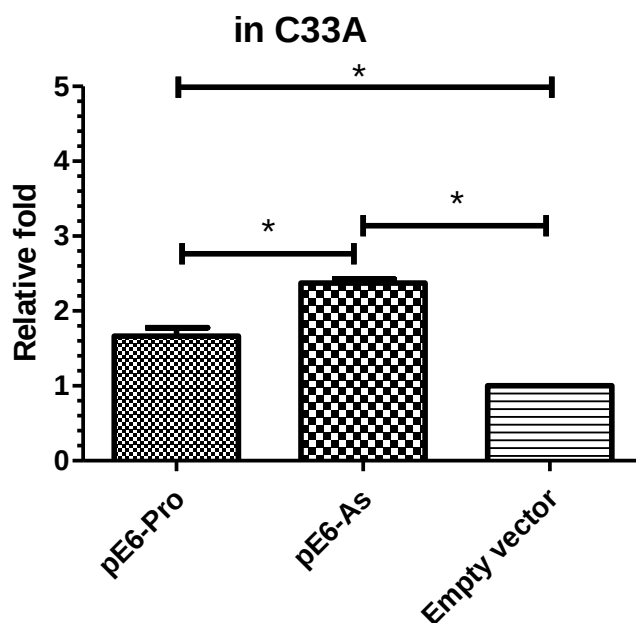


Figure 4 The expression level of miR-21 in transient E6 transfection in C33A cell line. (*; significant difference with $P < 0.05$).

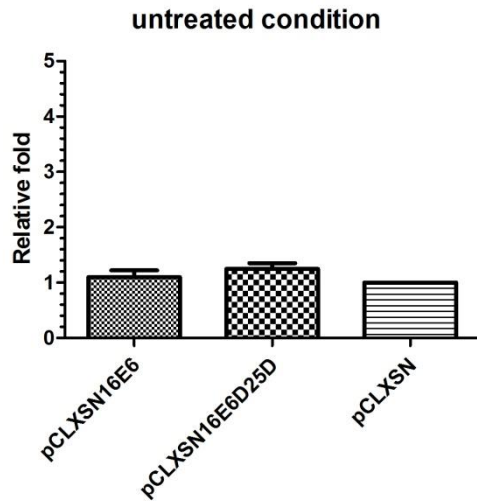


Figure 5 MiR-21 expression level in E6D25E and E6Pro expressing cells with untreated condition.

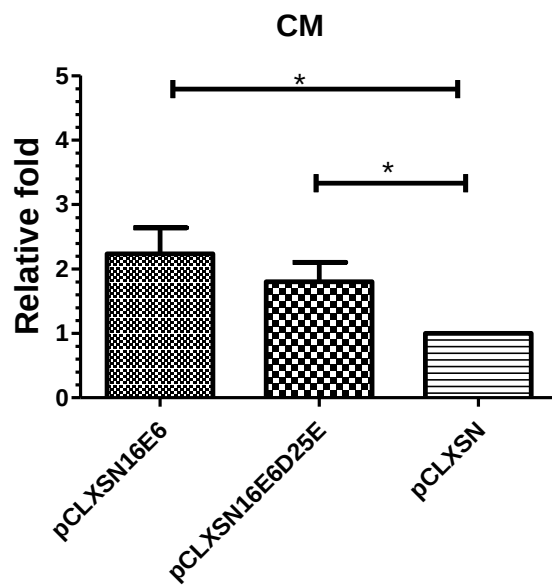


Figure 6 MiR-21 expression level in E6D25E and E6Pro expressing cells treated with condition medium (CM) (CM; 10%FBS in DMEM, *; significant difference with $P<0.05$).

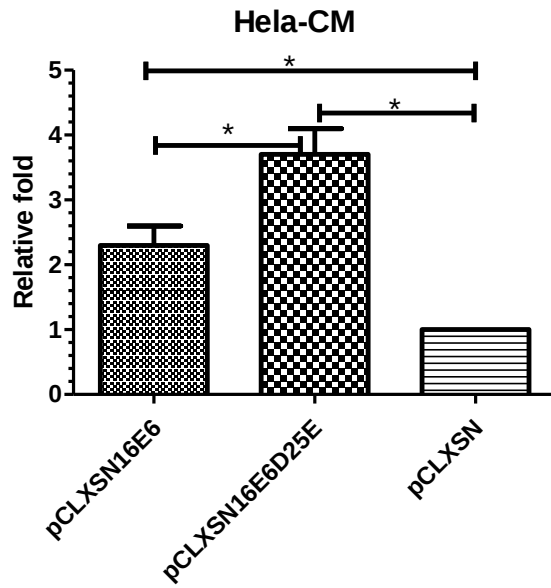


Figure 7 MiR-21 expression level in E6D25E and E6Pro expressing cells treated with condition medium from HeLa (HeLa-CM). *; significant difference with $P < 0.05$).

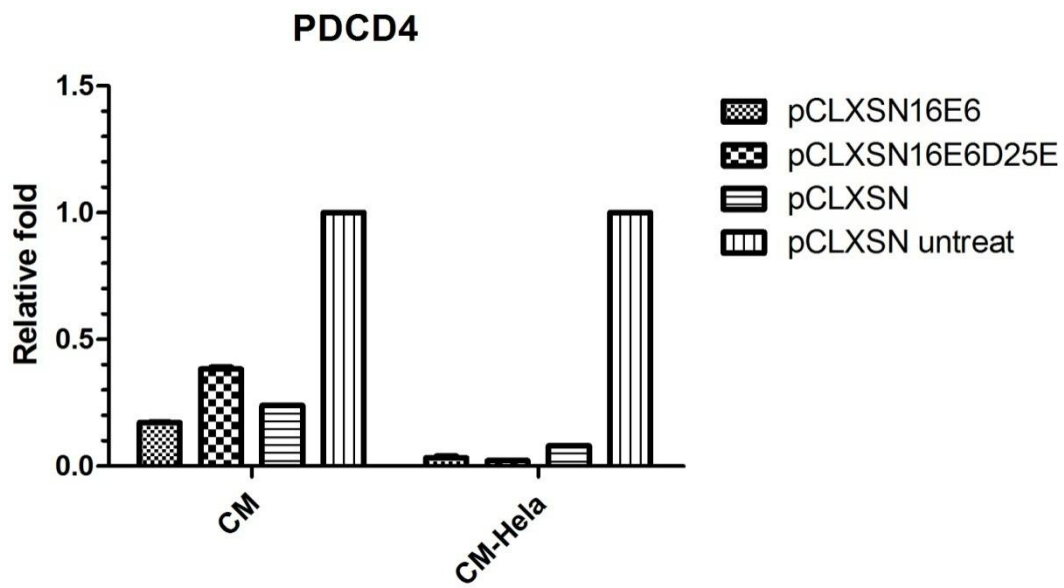


Figure 8 PDCD4 mRNA level in E6D25E and E6Pro expressing cells under different treated conditions.

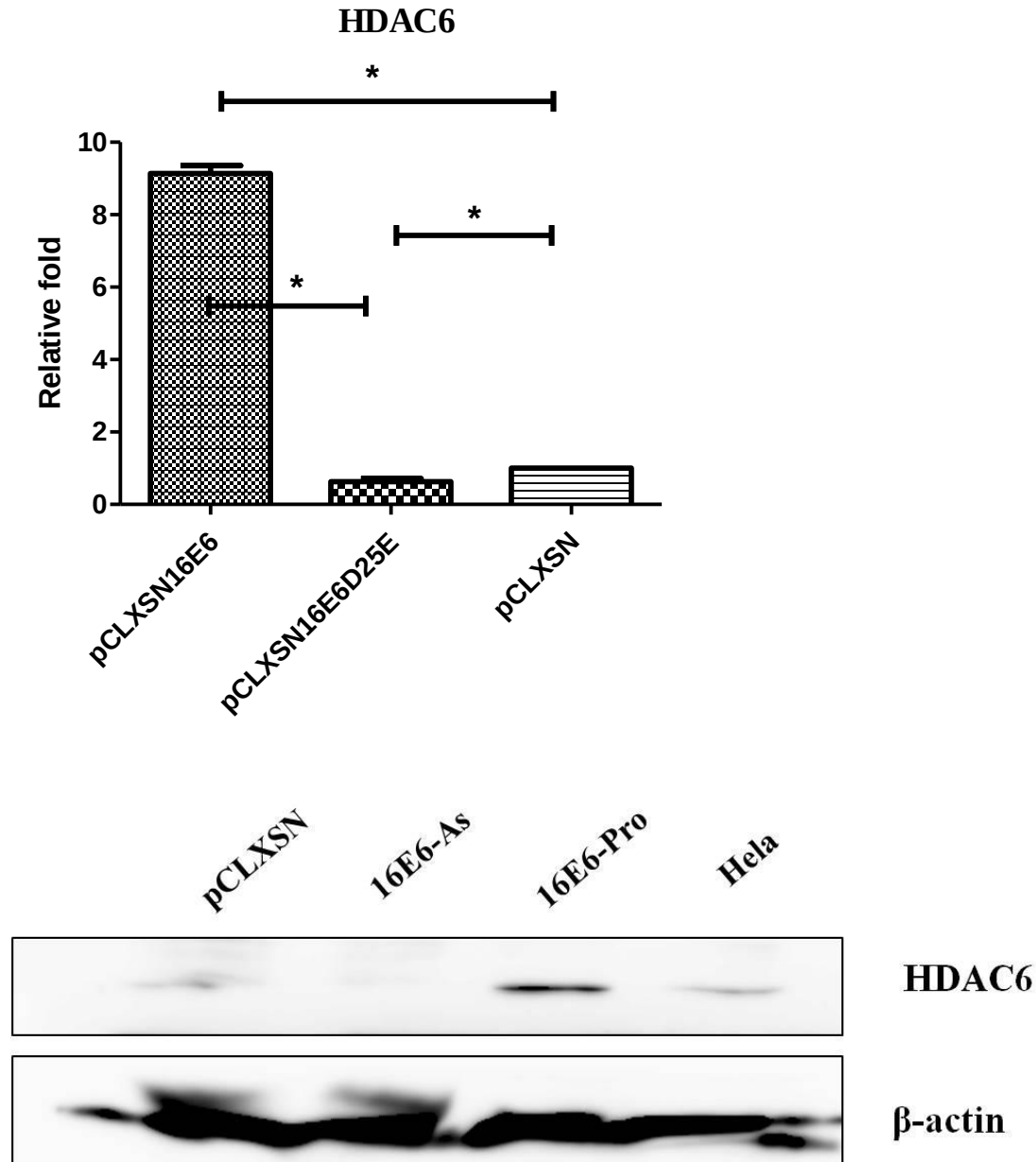


Figure 9 Effect of E6 oncoprotein on HDAC6 expression in E6D25E or E6Pro expressing HCK1T cells. The transduced cells were extracted for total RNA that was used to detect HDAC6 mRNA level by quantitative real time PCR (A). The transduced cells were extracted for protein lysate to detect HDAC6 protein using Western blot (B). (*; significant difference with $P < 0.05$).

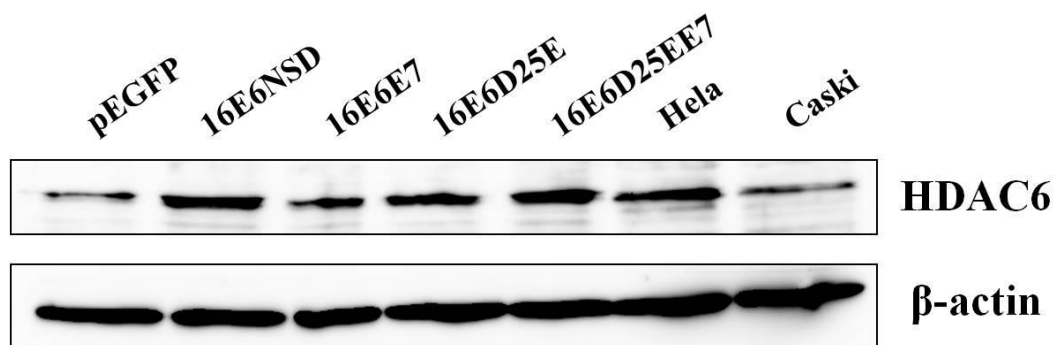


Figure 10 The HDAC6 expression level in the transduced HCK1T tet on cells after treatment with 1 μ g/ml DOX for 1 week.

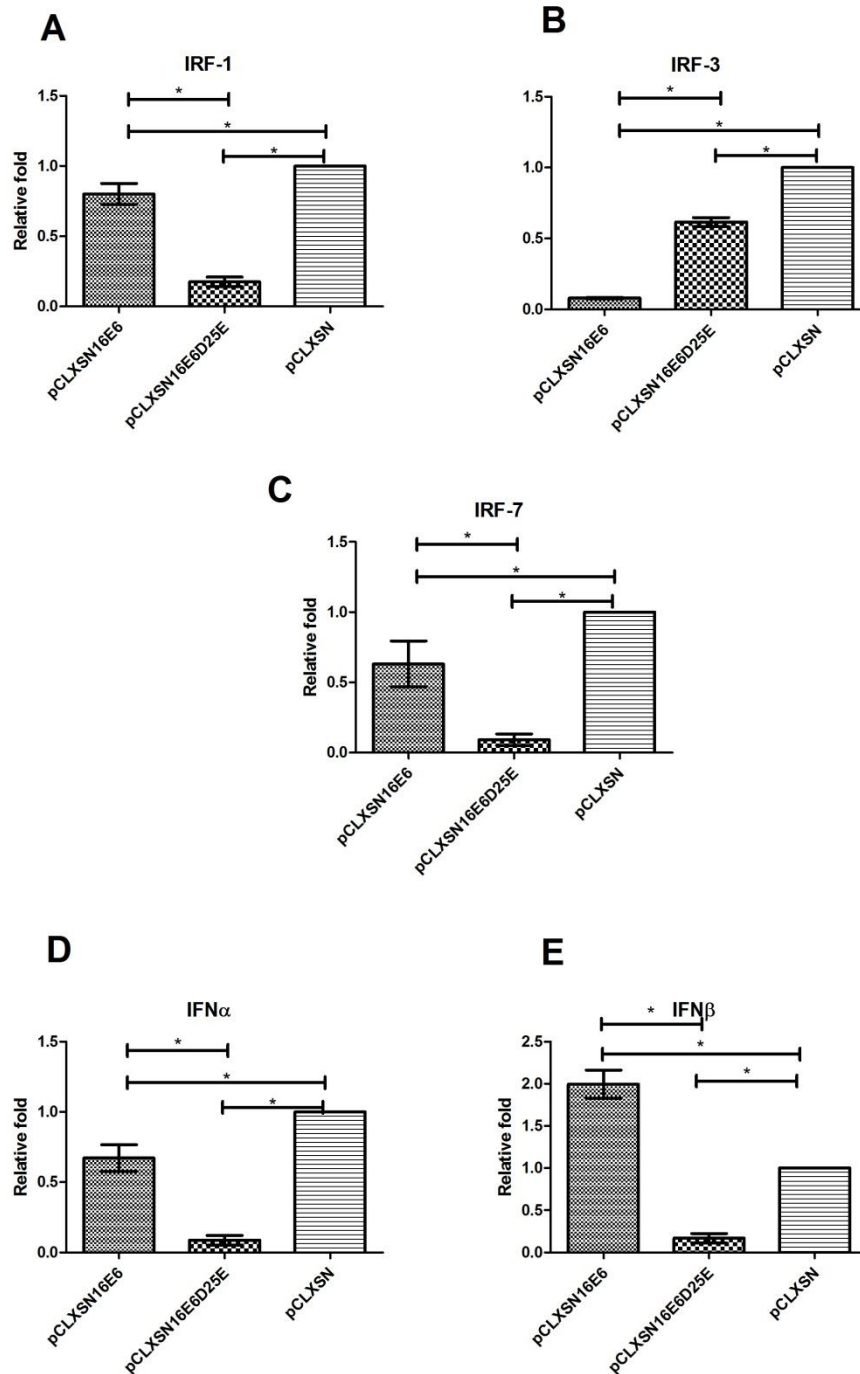


Figure 11 IRFs (1,3,7) and IFN- α/β mRNA level in E6-As and E6Pro expressing HCK1T cells. Total RNA from E6As and E6Pro expressing HCK1T cells were determined by q RT-PCR for evaluation of mRNA levels with β -actin as internal standard. IRF1 mRNA level; A, IRF3 mRNA level; B, IRF7 mRNA level; C, IFN- α mRNA level; D, and IFN- β mRNA level; E.