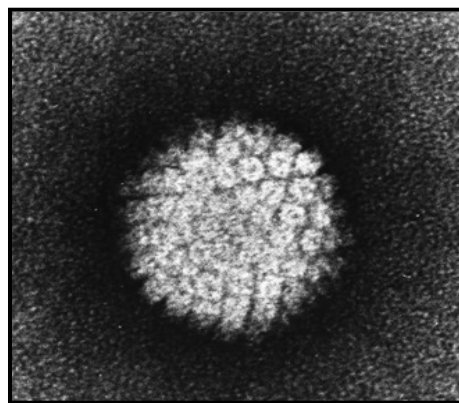
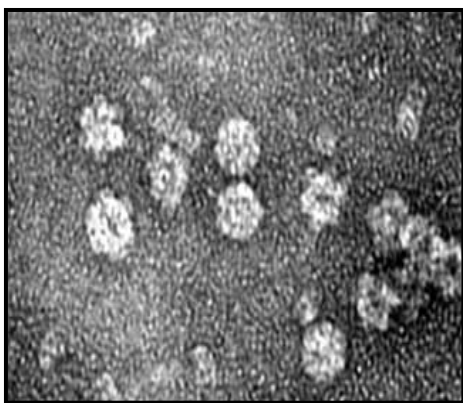


บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คุณสมบัติทั่วไปของ Papillomaviruses

Papillomaviruses ในอดีตถูกจัดอยู่ในแฟมิลี *Papovaviridae* ซึ่งสมาชิกในแฟมิลีนี้มี 3 จินัสคือ polyomaviruses, simian virus 40 และ papillomaviruses (Flint และคณะ, 2000) ปัจจุบันไวรัสชนิดนี้ได้ถูกแยกออกเป็นอีกหนึ่งแฟมิลีชื่อ *Papillomaviridae* (Bernard และคณะ, 2012) อนุภาคไวรัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 45-55 nm ประกอบด้วยแคปซิด 72 capsomers เรียงตัวเป็นรูป icosahedral symmetry และไม่มี envelope (รูปที่ 2.1) ภายในอนุภาคไวรัสบรรจุสารพันธุกรรมชนิด DNA เส้นคู่ ลักษณะบิดเป็นเกลียว (double-stranded circular DNA) มีขนาดยาวประมาณ 5-8 kilobasepairs (kbp) ประกอบไปด้วยส่วนของ regulatory region ซึ่งเป็นส่วนควบคุมการแสดงออกและการเพิ่มจำนวนของไวรัส ส่วน early genes ประกอบด้วยยีน E1-E7 และส่วน late genes ประกอบด้วยยีน L1 และ L2 โดย open reading frames (ORFs) ทั้งหมดอยู่บน DNA สายเดียวกัน สมาชิกในกลุ่ม papillomaviruses ทำให้เกิดเนื้องอกทั้งชนิดไม่ร้ายแรง (benign tumour) และชนิดร้ายแรงจนกลายเป็นมะเร็ง (malignant tumour) ตัวอย่างของไวรัสชนิดนี้เช่น rabbit papillomaviruses ซึ่งติดต่อโดยมีแมลงเป็นพาหะ หลังจากเป็นเนื้องอกหรือ papilloma แล้วอาจกลายเป็นมะเร็งหรือ carcinoma ได้ นอกจากนี้ยังมี bovine papillomaviruses (BPVs) และ canine papillomaviruses (CPVs) ที่ก่อให้เกิดเนื้องอกในวัวและสุนัขตามลำดับ papillomaviruses ที่สำคัญทางการแพทย์ได้แก่ human papillomaviruses (HPVs) ซึ่งทำให้เกิดหูด (warts) และมะเร็งในคน โปรตีนแคปซิดของไวรัสประกอบไปด้วยโปรตีนอย่างน้อย 2 ชนิด คือ major capsid protein ซึ่งสังเคราะห์ได้จากยีน L1 มีน้ำหนักโมเลกุล 54 kDa ซึ่งพบในอัตราส่วนที่มากและ minor capsid protein ที่สังเคราะห์ได้จากยีน L2 มีน้ำหนักโมเลกุล 76 kDa ซึ่งพบในอัตราส่วนที่น้อย (Komly และคณะ, 1986)



รูปที่ 2.1 อนุภาคของ Papillomaviruses

ที่มา : <http://bodyhorrors.wordpress.com/2011/10/17/of-warts-men-meat-handlers>

การจัดกลุ่ม

การจัดกลุ่มของ papillomaviruses ที่ยับยั้งกัน ใช้หลักการแบ่งกลุ่มโดยอาศัยคุณสมบัติทางสารพันธุกรรม (genotyping) มากกว่าคุณสมบัติการทำปฏิกิริยาทางน้ำเหลืองหรือซีรั่มวิทยา (serotyping) ถึงแม้ว่าเทคนิคทาง serology ไม่เป็นที่นิยมในห้องปฏิบัติการแต่จัดว่าเป็นเทคนิคที่เป็นประโยชน์สำหรับการยืนยันยับยั้งของ HPVs เช่น ยับยั้ง 1-5 (Sundberg, 1987) นอกจากนี้ยังมีการใช้คุณสมบัติของสารพันธุกรรมในการศึกษาความใกล้เคียงทางบรรพบุรุษ การศึกษาโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลของไวรัสได้รับการตรวจสอบครั้งแรกโดย Crawford ในปี ค.ศ. 1965 (Crawford, 1965) พบว่า papillomaviruses ที่ก่อโรคในคนและในสัตว์มีความใกล้เคียงกันแต่เมื่อ

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งยีนอม (polynucleotide sequences) พบว่ามีความแตกต่างกันมาก การจัดกลุ่มของ papillomaviruses ยังอาจใช้เทคนิค southern blot hybridisation และการตัดด้วย restriction endonuclease enzyme ได้ด้วย

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้มากในการชี้เฉพาะตัวของ papillomaviruses โดยการใช้ primer ที่ถูกออกแบบให้มีลำดับเบสครอบคลุมในส่วนยีน E6 และ E7 (de Villiers, 1997) หรือยีน L1 เหตุผลสำคัญที่นักวิจัยนิยมเลือกใช้ลำดับเบสของยีน E6 และ E7 เนื่องจากว่าเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดโรค สำหรับยีน L1 ซึ่งถอดรหัสเป็นโปรตีนแคปซิดจัดว่าเป็นส่วนแอนติเจนของไวรัสที่มีความคงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุด กล่าวคือมีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุด (conserved region) ในยีนอมของไวรัส วิธีการจัดกลุ่มทำได้โดยการเปรียบเทียบลำดับ DNA ในยีน E6, E7 และ L1 ของ HPVs ชนิดที่พบใหม่กับของ HPVs ชนิดที่พบมาก่อนเมื่อมีค่า homology น้อยกว่า 90% ถือว่าไวรัสชนิดนั้นเป็นไวรัสชนิดใหม่ แต่ถ้ามีค่า homology มากกว่า 90% แสดงว่าเป็น subtype ของกันและกัน (Bener และ Typing, 1997; Trofatter และ Kenneth, 1997) ในปัจจุบันมีการศึกษาพบ HPVs มากกว่า 130 ทยปีโดยมี HPVs ประมาณ 78 ทยปีที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ครบถ้วนทั้งยีนอมเนื่องจากว่าปัจจุบันมีการพบสมาชิกในกลุ่มหลากหลายสายพันธุ์มาก (Chan และคณะ, 1995) ทำให้มีการศึกษาความสัมพันธ์เพื่อดูความใกล้เคียงทางสายบรรพบุรุษโดยใช้ลำดับเบสในส่วนของยีน L1 โดยวิธี PCR ด้วยไพรเมอร์คู่ MY09/MY11 จากนั้นศึกษาความใกล้เคียงทางสายบรรพบุรุษ (phylogenetic trees) โดยใช้การวิเคราะห์แบบ neighbor-hood ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งแบ่ง papillomaviruses ได้เป็น 5 supergroups ได้แก่ A, B, C, D, และ E ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

Supergroup A เป็นกลุ่มที่มีสมาชิกมากที่สุดแบ่งออกได้เป็น 11 กลุ่มคือ A1-A11 HPVs เกือบทุกทยปีอยู่ในกลุ่มนี้สมาชิกในกลุ่มมักเป็นสาเหตุก่อให้เกิดการติดเชื้อในระบบอวัยวะสืบพันธุ์ (genital tract) และเยื่อเมือก (mucous tissues) เนื่องจาก supergroup นี้มีสมาชิกในกลุ่มเป็นจำนวนมากจึงมีการแบ่งกลุ่มสมาชิกย่อยออกเป็นกลุ่ม high-risk HPVs และ low-risk HPVs

- high risk HPVs คือ HPVs ทยปีที่เมื่อติดเชื้อแล้วมีโอกาสสูงในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นมะเร็งได้แก่ HPV-16, -18, -31, -33, -35, -45, -51, -52 และ -56 เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสมาชิกในกลุ่ม A6, A7 และ A9

- low risk HPVs คือ HPVs ทยปีที่ก่อให้เกิดโรคร้ายแล้วมีโอกาสเปลี่ยนไปเป็นเนื้อมะเร็งได้น้อยมากได้แก่ HPV-6 และ -11 เป็นต้น

Supergroup B แบ่งสมาชิกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ B1 และ B2 สำหรับสมาชิกในกลุ่ม B1 มีประมาณ 17 ชนิด ส่วนใหญ่แยกได้จากผู้ป่วย epidermodysplasia verruciformis (EV) ซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมโดยผู้ป่วย EV นี้มีความบกพร่องของ T-cell ทำให้มีการติดเชื้อ HPVs ได้บ่อยและติดเชื้อได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน ส่วนกลุ่ม B2 เป็นกลุ่มไวรัสที่เป็นสาเหตุของหูดทั้งชนิดเม็ดแบน (flat warts) และเม็ดนูน (warts) ซึ่งพบได้ทั่วไปที่ใบหน้า มือ เท้า

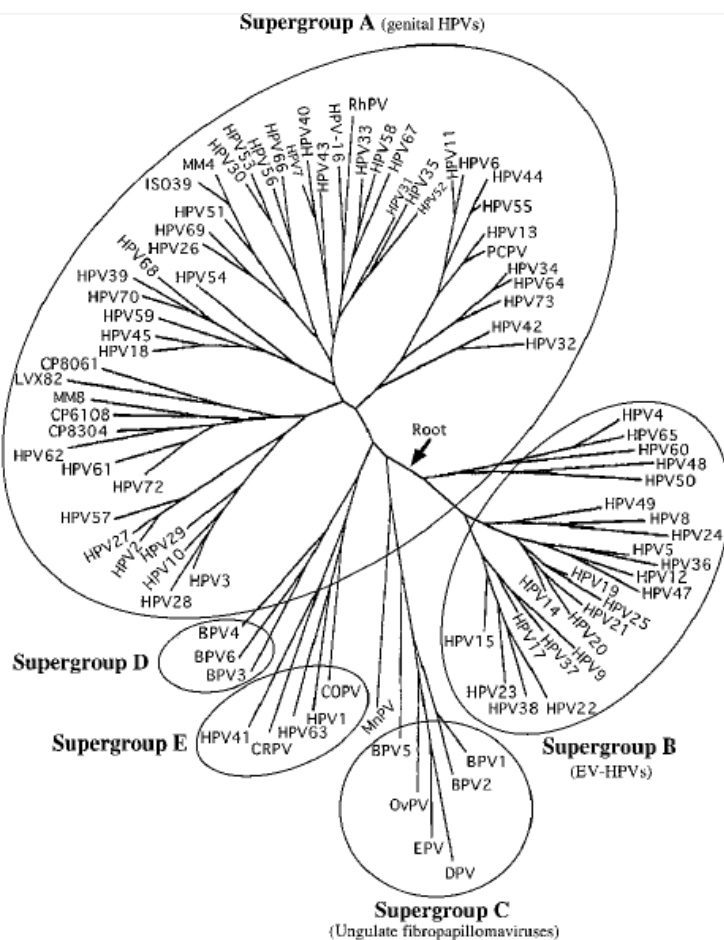
Supergroup C สมาชิกในกลุ่มเกี่ยวข้องกับ fibropapillomas เช่น BPV-1 และ -2

Supergroup D สมาชิกในกลุ่มเป็นไวรัสสาเหตุของ papillomas เช่น BPV-3, -4 และ -6

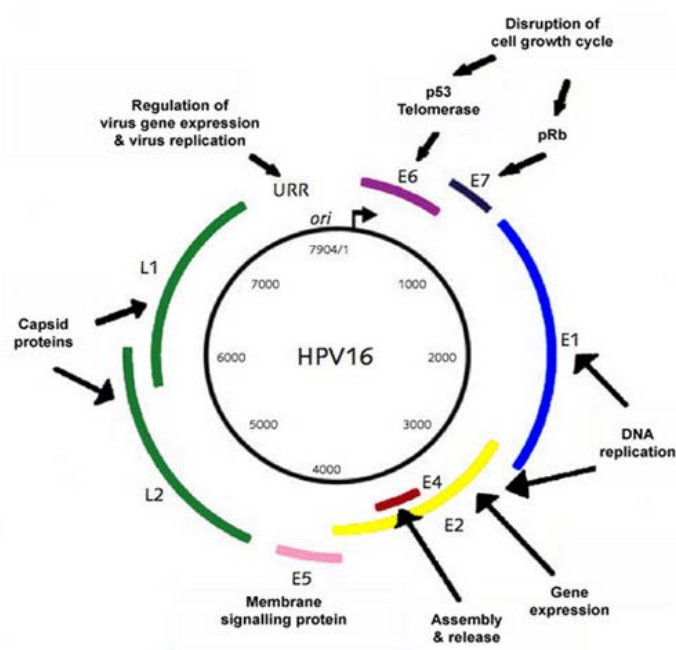
Supergroup E สมาชิกในกลุ่มพบว่าเกี่ยวข้องกับ human cutaneous PVs เช่น HPV-1, -41 และ -63 รวมทั้ง canine oral PVs และ cottontail rabbit PVs ก็ถูกจัดอยู่ใน supergroup นี้

โครงสร้างและหน้าที่ของ papillomavirus

ยีนอมของ papillomaviruses (PVs) มีขนาดอยู่ในช่วง 5,000 – 8,000 bp มียีนอยู่ทั้งหมด 8 ยีน แบ่งเป็นกลุ่ม early genes และกลุ่ม late genes จัดแบ่งโครงสร้างของยีนอม ออกได้เป็น 3 ส่วน ดังแสดงในรูปที่ 2.3 และรูปที่ 2.4 ได้แก่

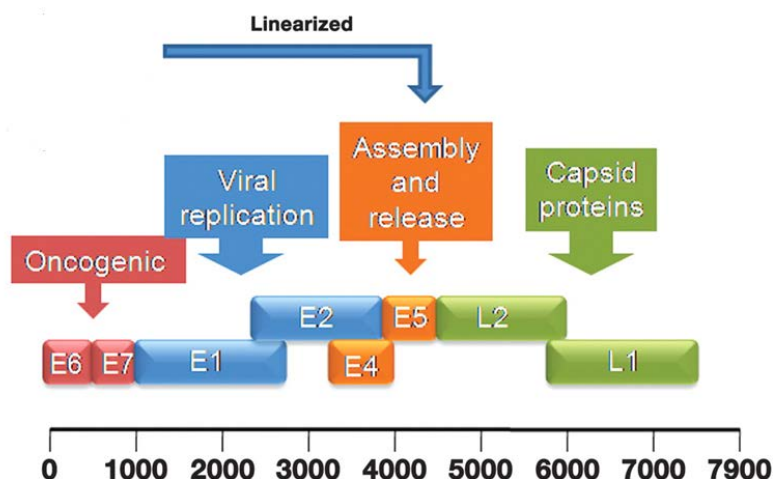


รูปที่ 2.2 phylogenetic tree ของ papillomaviruses 92 ชนิดโดยใช้ 291 bp ของยีน L1 ในการวิเคราะห์ (Chan และคณะ, 1995)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างและ coding region ของ papillomavirus DNA

ที่มา : <http://www.microbiologybytes.com/virology/3035pics/papova5.jpg>



รูปที่ 2.4 โครงสร้างและcoding region ของ papillomavirus DNA (ในรูปแบบ linear)

ที่มา : <http://labmed.ascpjournals.org/content/41/9/523/F1.large.jpg>

1. **Early (E) region** ประกอบด้วย 6 ORFs ได้แก่ E1, E2, E4, E5, E6 และ E7 ยีนในกลุ่มนี้ทำหน้าที่สร้างโปรตีนหลายชนิดซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการ replication, transcription และ translation ซึ่งยีนในกลุ่มนี้มีการแสดงออกในช่วงแรกของวงจรชีวิต (Pfister และ Fuchs, 1987)

E1 โปรตีน E1 มีขนาด 68 kDa พบอยู่ในนิวเคลียส มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ phosphorylation และการจำลองยีนของไวรัส

E2 โปรตีน E2 มีขนาด 42 kDa มีส่วนของ N- และ C- terminal ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิด replication และ transcription

E4 ในการแสดงออกของยีน E4 จะใช้โปรโมเตอร์ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ภายในยีน E1 ดังนั้นจึงเรียกโปรตีน E4 ว่า E1^{E4} ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีหลายรูปแบบและหลายขนาด สามารถพบได้ทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม หน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ในวงจรชีวิตไวรัสยังไม่ชัดเจนแต่สันนิษฐานว่าเป็นตัวช่วยในการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสออกจากเซลล์ (Bryan และคณะ, 1998)

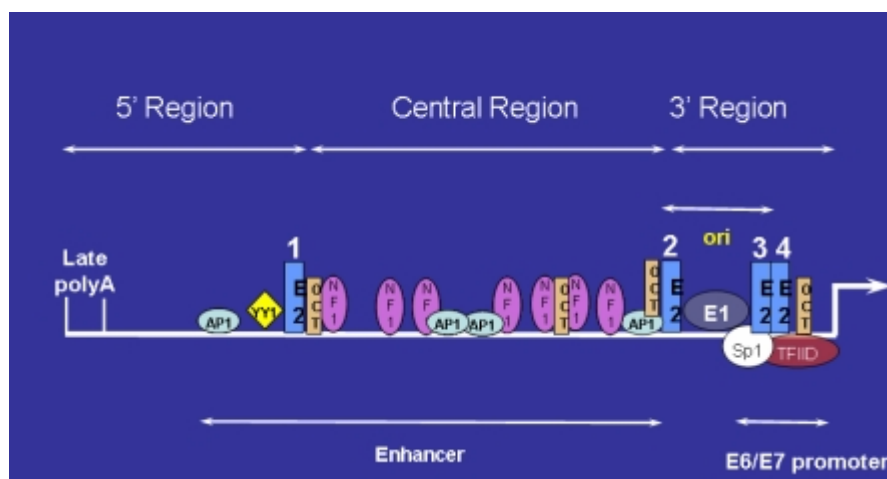
E5 โปรตีน E5 ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 84 ชนิด มีการแสดงออกค่อนข้างน้อยใน HPVs หน้าที่ของโปรตีนตัวนี้ยังไม่ชัดเจนแต่มีการรายงานพบว่าโปรตีน E5 เกี่ยวข้องกับการยับยั้งโปรแกรมการตายของเซลล์ (apoptosis) (Zhang และคณะ, 2002) สำหรับใน BPVs พบว่าโปรตีน E5 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ (transformation) ของเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัส

E6 โปรตีน E6 ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 150 ชนิด มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนของเซลล์หลายชนิดและที่สำคัญโปรตีน E6 จับตัวกับโปรตีน p53 ซึ่งเป็น tumour suppressor มีผลให้ p53 ถูกทำลายและหมดไป

E7 โปรตีน E7 มีขนาดแตกต่างกันใน HPVs แต่ละชนิดแต่มีขนาดเล็กกว่าโปรตีน E6 โปรตีนชนิดนี้มีกรดอะมิโนประมาณ 93-127 ชนิด แบ่งเป็น 3 domain คือ CR1, CR2 และ CR3 แต่ละ domain มีหน้าที่และมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนของเซลล์ที่ต่างกัน (McMurray และคณะ, 2001) CR1 และ CR3 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความคงอยู่ของเซลล์ (cell immortalization) ส่วน CR 2 มีหน้าที่จับตัวกับโปรตีน pRb (retinoblastoma protein) ซึ่งเป็น tumour suppressor เมื่อจับกันแล้วทำให้ pRb ไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งทั้งโปรตีน p53 และ pRb นั้นมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์และโปรแกรมการตายของเซลล์ ดังนั้นโปรตีน E6 และ E7 น่าจะมีหน้าที่ยับยั้งการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและมีอิทธิพลต่อการเกิดมะเร็งในผู้ติดเชื้อ

2. **Long control region (LCR)** หรือเรียกอีกชื่อว่า untranslated region (UTR) หรือ non-coding region (NCR) มีขนาดประมาณ 800-1,000 bp มีตำแหน่งอยู่ระหว่างปลายด้าน 3' ของ late region กับปลายด้าน 5' ของ early region ส่วนนี้ไม่มีการแปลรหัสเป็นโปรตีนแต่จัดว่าเป็นบริเวณที่สำคัญเนื่องจากมีชิ้นส่วนที่เกี่ยวข้องกับ

การควบคุมการแสดงออกของยีนและเป็นจุดเริ่มต้นของการจำลองดีเอ็นเอ นอกจากนั้น LCR ยังมีตำแหน่งการเกิด ปฏิสัมพันธ์ (interaction) กับโปรตีนของโฮสต์ที่เกี่ยวข้องกับ transcription ของไวรัส เช่น บริเวณลำดับเบส (elements) ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน L1 (Kennedy และคณะ, 1990) และตำแหน่งการจับตัวของโปรตีน E2 ของไวรัส ซึ่งสำหรับตำแหน่งนี้ในกรณีของ HPVs กลุ่ม high-risk จะมีความคงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูง ในบริเวณ LCR นี้มีตำแหน่งการจับตัวของโปรตีน E2 4 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งที่ 1 และ 2 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ ควบคุมการทำงานของ E6/E7 oncogene ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม สำหรับตำแหน่งที่ 3 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ replication ของไวรัส ส่วนตำแหน่งที่ 4 เกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของ early genes (Hegde, 2002)



รูปที่ 2.5 Long control region (LCR) ของยีน papillomaviruses

ที่มา : <http://wenliang.myweb.uga.edu/mystudy/virology/ScienceOfVirology/DNAvirus> accessed March 4, 2011

3. Late (L) region ประกอบด้วย 2 ORFs ได้แก่ L1 และ L2 ซึ่งในส่วนของ late region จะมีการแสดงออกในช่วงสุดท้ายของวงจรชีวิต

L1 สร้าง major capsid protein มีขนาดประมาณ 54 kDa ยีน L1 เป็นส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลง ลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุดในระหว่างสมาชิกกลุ่ม papillomaviruses ทั้งนี้โปรตีนแคปซิดไวรัสจัดว่าเป็นโปรตีน แอนติเจนส่วนแรกที่ถูกคุกคามของร่างกายพบหลังจากที่ไวรัสมีการติดเชื้อเข้าสู่ร่างกายและมีการจดจำเพื่อสร้าง antibody ที่จำเพาะต่อโปรตีน (Li และคณะ, 1987)

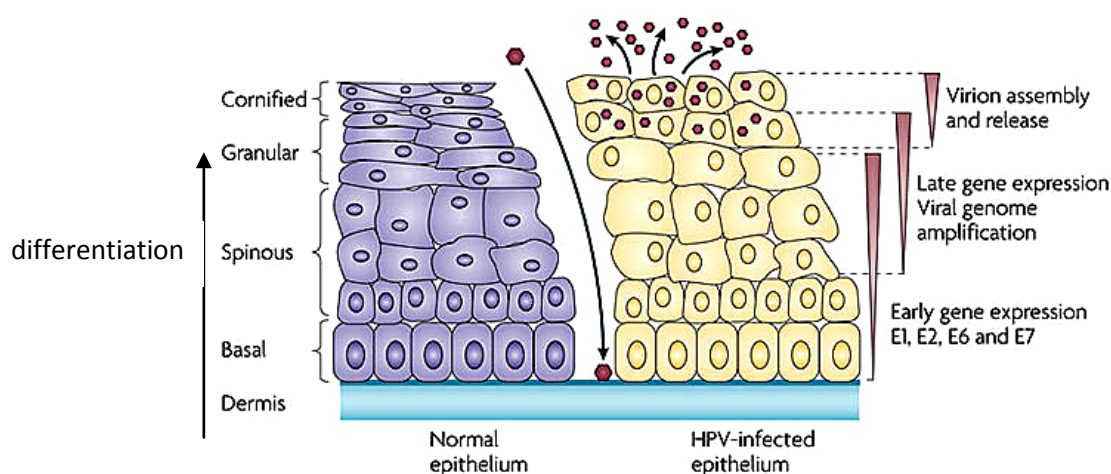
L2 สร้าง minor capsid protein มีขนาดประมาณ 78 kDa (Doorbar และ Gallimore, 1987) เมื่อเปรียบเทียบกับยีน L1 แล้วยีน L2 จะมีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าดังนั้นจึงมีการใช้ลำดับเบสในส่วนของยีน L2 ในการจัดจำแนก subgroups ด้วย (Pfister และ Fuchs, 1987) สำหรับหน้าที่ของ L2 ยังไม่ชัดเจนทราบ แต่เพียงว่าเป็นส่วนหนึ่งของแคปซิดของไวรัส

ยีนของไวรัสประกอบไปด้วย promoter อย่างน้อย 2 ตำแหน่งและ polyadenylation signal ซึ่งพบในส่วน early region 1 signal และในส่วนของ late region 2 signals สำหรับใน papillomaviruses นั้นมีการ

ถอดรหัสยีนออกเป็นสายอาร์เอ็นเอ 1 สายยาว (polycistronic RNAs) เมื่อเข้าสู่กระบวนการ alternative splicing เพื่อผลิต messenger RNAs (mRNAs) จะสามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนหลายชนิด (Pfister และ Funch, 1987)

วงจรชีวิตของไวรัส

เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยง HPVs โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ ดังนั้นข้อมูลของการเพิ่มจำนวนหรือวงจรชีวิตของไวรัสส่วนใหญ่จึงได้มาจากการศึกษาใน BPV-1 ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงได้ในเซลล์ bovine fibroblast การศึกษานี้ทำให้ทราบหน้าที่ของยีนต่างๆ การศึกษาวงจรชีวิตของ HPVs เริ่มจากความพยายามศึกษาเซลล์เนื้อเยื่อของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HPVs และพบว่าการเพิ่มจำนวน HPV-DNA มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนเซลล์ในแต่ละรอบโดยเฉพาะเซลล์ผิวหนัง keratinocyte (Jenson, 1980) เนื่องจาก papillomaviruses มีโฮสต์ที่จำเพาะสำหรับไวรัสแต่ละชนิดโดยไวรัสกลุ่มที่ติดเชื้อในมนุษย์เรียกว่า human papillomaviruses หรือ HPVs ซึ่งวงจรชีวิตของไวรัสขึ้นตรงกับการพัฒนาของ stem cells ไปเป็นเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell differentiation) การติดเชื้อเกิดโดยไวรัสเข้าสู่บาดแผลที่เยื่อบุผิว (รูปที่ 2.6) จากนั้นวงจรชีวิตของไวรัสเริ่มต้นเมื่อมีการติดเชื้อของ HPVs เกิดขึ้นที่บริเวณเซลล์ฐานของเยื่อบุผิว (basal epithelial cell) ซึ่งเซลล์ที่บริเวณนี้ยังมีคุณลักษณะของ basal cells คือเป็นเซลล์ที่ยังไม่ผ่านกระบวนการกำหนดหน้าที่ (differentiation) และยังคงมีคุณสมบัติในการแบ่งตัวอยู่หรือที่รู้จักกันในชื่อ stem cells ดังนั้นภายในเซลล์หลังจากมีการติดเชื้อแล้ว ไวรัสจะหลบซ่อน (latency period) อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ในรูปของ extrachromosomal plasmids หรือ episome และเมื่อโฮสต์เข้าสู่ช่วง replication ยีนของไวรัสก็จะถูกจำลองไปด้วยซึ่งในช่วงนี้ยังไม่ถึงระยะของการเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัส ดังนั้นจำนวนยีนของไวรัสที่ผลิตขึ้นจะมีจำนวนไม่มากนักประมาณ 50-100 ยีนต่อเซลล์เท่านั้น (McMurray และคณะ, 2001) ต่อมาเมื่อวงจรชีวิตไวรัสเข้าสู่ช่วงของการเพิ่มจำนวนไวรัสการจำลองยีนจะเพิ่มปริมาณมากขึ้น 10-100 เท่า (Stoler และคณะ, 1989)



รูปที่ 2.6 วงจรชีวิตของ papillomaviruses หลังจากที่มีการติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ฐาน (basal cells) ของเยื่อบุผิว (epithelium)

ที่มา : http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n8/fig_tab/nrc2886_F1.html

จากผลการทดลองด้วยเทคนิค *in situ* hybridization เพื่อตรวจสอบ mRNA ของยีน HPV ในเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อไวรัสพบว่าเมื่อไวรัสติดเชื้อเข้าสู่ชั้น basal cells ยีน E1 และ E2 จะแสดงออกเป็นอันดับแรก (zur Hausen, 2002) โดยยีนทั้งสองมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ replication และ transcription ของไวรัสยีน นอกจากนี้โปรตีน E2 ยังมีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน E6 และ E7 หลังจาก that basal cells มีการแบ่งตัวเป็น daughter cells จำนวน 2 เซลล์ซึ่งภายในเซลล์ทั้งสองนี้ยีนของไวรัสจะมีการจำลองยีนไปพร้อมกับโฮสต์ยีน

ทำให้ทั้งสองเซลล์มีอีโนมของ HPV ปรากฏอยู่ด้วยเสมอ เหตุการณ์ต่อมาคือการที่ daughter cell หนึ่งเซลล์เคลื่อนที่ขึ้นสู่ชั้นถัดไปพร้อมๆ กับการพัฒนาเซลล์ไปเป็นเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell differentiation) เริ่มต้นขึ้น ส่วน daughter cell อีกหนึ่งเซลล์จะยังคงอยู่ที่ basal layer และทำหน้าที่เป็น stem cell สำหรับการแบ่งตัวต่อไปซึ่งเซลล์ที่มีการติดเชื้อเหล่านี้จะทำหน้าที่เหมือนแหล่งเก็บอีโนมของไวรัสในการถ่ายทอดให้แก่เซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่โดยอีโนมของไวรัสจะถูกจำลองขึ้นและติดไปกับเซลล์ใหม่ทุกเซลล์ทำให้ HPV สามารถติดเชื้อในร่างกายของผู้ป่วยได้นานหลายปี (persistent infection) ในที่สุดจะพัฒนากลายเป็นเซลล์มะเร็ง (Zheng และคณะ, 2006)

สำหรับเซลล์ที่มีอีโนมของไวรัสเมื่อพัฒนาไปเป็นเซลล์เยื่อบุผิวนั้นโปรตีนของไวรัส 2 ชนิดคือ E6 และ E7 จะทำหน้าที่ควบคุมให้อายุของเซลล์ยืดขยายออกไปอีกระยะหนึ่ง จากการศึกษาของ Hengstermann และคณะ (2001) และ Giarre และคณะ (2001) พบว่าโปรตีน E6 และ E7 มีการจับตัวกับโปรตีนของเซลล์สองชนิดคือ E6 จับตัวกับโปรตีน p53 ส่วนโปรตีน E7 จับตัวกับโปรตีน pRb ทำให้โปรตีนทั้งสองไม่สามารถทำงานได้ตามปกติเนื่องจากโปรตีน p53 และ pRb นั้นมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle) และโปรแกรมการตายของเซลล์ (programme cell death) แบบ apoptosis ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่าทั้ง E6 และ E7 เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการตายของเซลล์หรือเป็นการยืดอายุของเซลล์เพื่อให้ไวรัสมีเวลานานพอในการผลิต progeny virus นอกจากนี้ปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่ผู้ติดเชื้อ HPVs มีการพัฒนาของมะเร็งหรือเนื้องอกชนิดร้ายแรง (malignant tissue) นั้นมีสาเหตุมาจากการแสดงออกของยีน E6 และ E7 มากเกินไปส่งผลให้กลไกการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ผิดปกติไปแล้วเกิดเป็นมะเร็งในที่สุด

HPV กับการเกิดโรคน

การติดเชื้อของ HPV แต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อซึ่งกลไกการควบคุมของเซลล์ เมื่อได้รับเชื้อ ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด หลังจากไวรัสเข้าสู่ร่างกายทางบาดแผลจะมีการติดเชื้อเข้าสู่ basal cells ในชั้นฐานของเยื่อบุผิว โดย Zur Hausen (1991) ได้สรุปรูปแบบของการติดเชื้อของไวรัสไว้ดังนี้

1. เมื่อไวรัสติดเชื้อเข้าสู่เซลล์แล้วอีโนมของไวรัสจะเข้าไปอยู่ในนิวเคลียสในรูปของ episomal form หรือ extrachromosomal DNA จนกระทั่งเซลล์ที่มีไวรัสอยู่ภายในมีการจำลองตัวเองส่งผลให้อีโนมของไวรัสถูกเพิ่มจำนวนไปด้วยและจะหลบซ่อนอยู่ภายในเซลล์แล้วกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ (epithelial cell proliferation) ซึ่งในกรณีเช่นนี้ทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อเกิดเป็นก้อนเนื้อนูนขึ้นมาที่เรียกว่า หูด (wart) (Durst และคณะ, 1985)

2. เมื่อไวรัสมีการติดเชื้ออยู่ในเซลล์ระยะเวลาหนึ่งอีโนมของไวรัสอาจมีการสอดแทรกเข้าไปอยู่ในอีโนมของโฮสต์ส่งผลให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนจนกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (malignant cells หรือ carcinomas) อยู่ใน cellular genome

3. เมื่อไวรัสติดเชื้อเข้าสู่เซลล์แล้วเซลล์เกิดการแบ่งตัวเป็น daughter cells ในระหว่างที่ daughter cell นี้มีการพัฒนาเพื่อทำหน้าที่เซลล์บุผิวไวรัสจะเข้าสู่ระยะ productive เพิ่มปริมาณอีโนม ผลิตโปรตีนแคปซิดและประกอบเป็นอนุภาคไวรัสต่อไป

ดังที่ได้กล่าวไปในข้างต้นว่าไวรัสแต่ละตัวย่อมมีตำแหน่งการติดเชื้อที่จำเพาะในเนื้อเยื่อแต่ละตำแหน่งซึ่งพบในผิวหนัง (cutaneous epithelium) และเยื่อเมือก (mucosal squamous) ทำให้มีการแบ่งชนิดของไวรัสตามชนิดของเนื้อเยื่อที่พบการติดเชื้อออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. **cutaneous types** เป็นกลุ่มไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคบริเวณผิวหนังทั่วไปได้แก่ HPV-1 ถึง -10, HPV-12, HPV-14 ถึง -15, HPV-17, HPV-19 ถึง -22, HPV-29, HPV-34, HPV-36 ถึง -38, HPV-41, HPV-46 ถึง -50, HPV-57 และ HPV-60 ไวรัสกลุ่มนี้มักก่อให้เกิดหูด (wart) และติ่งเนื้องอก (papilloma) ซึ่งพบได้ตามบริเวณต่างๆ ของร่างกายแต่ละตำแหน่งมักเกิดจาก HPV types ที่แตกต่างกันและมีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน เช่น

- Common warts ลักษณะเป็นเม็ดนูน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มม. ผิวหน้าขรุขระ พบที่ผิวหนังส่วนใดก็ได้ มักขึ้นเป็นกลุ่ม พบบ่อยบริเวณที่มีการเสียดสีเกิดรอยถลอกเช่น มือและเท้า เกิดจาก HPV-2 หรือ -4 นอกจากนี้คนขายเนื้อ มักพบหูดที่ฝ่ามือเรียกว่า butcher's wart เกิดจาก HPV-7

- Flat warts หรือ plane warts มีขนาดเล็กเม็ดแบนและผิวเรียบกว่า common wart มักพบขึ้นมากมายหลายเม็ด เป็นที่บริเวณใบหน้า แขนและเท้า พบบ่อยในเด็ก ส่วนใหญ่เกิดจาก HPV-3 และ -10

- Plantar warts เป็นหูดที่มักเกิดตรงบริเวณที่ถูกน้ำหนักรีดกดเช่น ส้นเท้า และฝ่าเท้า หูดที่พบที่ฝ่ามือเรียก palmar warts จะเป็นก้อนเล็กเข้าไปในผิวหนังทำให้เจ็บปวดและรำคาญ มักเกิดจาก HPV-1

- Epidermodysplasia verruciformis (EV) เป็นหูดที่พบในผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันผ่านเซลล์บกพร่อง พบได้ไม่บ่อย มีลักษณะเป็นหูดแบนๆ กระจายตามผิวหนังหรือเป็นผื่นตุ่มสีน้ำตาลแดง ถ้าผิวหนังบริเวณนั้นโดนแสงแดดบ่อยๆ จะมีโอกาสเปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งชนิด squamous cell carcinoma ในหูดชนิดนี้สามารถแยกเชื้อได้หลายสายพันธุ์จากคนไข้คนเดียวกัน

2. mucosal types เป็นกลุ่มของไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อบริเวณเซลล์เยื่อเมือก ซึ่งแบ่ง HPVs ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

2.1 Genital mucosotropic HPV ได้แก่ HPV-6, -11, -16, -18, -30, -31, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -57, -58 และ -59 มักพบมากบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น

- cervical intraepithelial neoplasia เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสในเซลล์บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ ยีนอมของ HPV จะอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ในรูปของ episome นานเป็นปี ถ้าชุดเซลล์มาย่อม Papanicolaou (Pap) smear จะเห็นว่านิวเคลียสของเซลล์มีลักษณะผิดปกติ ในกรณีนี้เซลล์ที่ติดเชื้ออาจมีการเปลี่ยนแปลงแล้วพัฒนาเป็นมะเร็งปากมดลูก (invasive squamous carcinoma) (Pfister, 1987 : 113-147) ทั้งนี้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง HPV type กับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มดลูกในระยะต่างๆ กันผลปรากฏว่าเนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูกจะมี HPV-DNA อยู่ประมาณ 90% (4, 37, 38) โดยพบเป็นยีนอมของ HPV-16 และ -18 เป็นส่วนใหญ่โดยพบประมาณ 70-95% (30, 39, 40)

- Anogenital warts หรือ Condyloma acuminata หรือ exophytic warts หรือหูดหงอนไก่ ติดต่อกันทางเพศสัมพันธ์ ลักษณะเป็นก้อนเนื้อออกขนาดใหญ่ ผิวหน้าขรุขระ อาจรวมกันเป็นก้อนใหญ่ก้อนเดียวหรือเป็นก้อนเล็กๆ เป็นติ่งเนื้อที่มีก้านสั้นๆ ลักษณะขึ้น พบได้บริเวณอวัยวะเพศภายนอก องคขชาติหรือทวาร จากการศึกษโดยใช้ nucleic acid hybridization พบว่าส่วนมากมีสาเหตุการติดเชื้อจาก HPV-6 และ -11 (Koutsky, 1997; Reid และคณะ, 1987) การกลายเป็นมะเร็งของโรคหูดหงอนไก่นี้มีโอกาสน้อยมาก นอกจากในกรณีที่มีการติดเชื้อ HPV-16 และ -18 ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดมะเร็งปากมดลูกได้ในบางราย

- Laryngeal papillomas เป็นก้อนเนื้อออกบริเวณกล่องเสียง พบในเด็กเล็กอายุ 1-4 ปี ทำให้หายใจไม่ได้ จำเป็นต้องเจาะคอ ในบางรายหูดอาจงอกเล็กลงไปถึงหลอดลมทำให้ถึงแก่ชีวิตได้ ส่วนมากมักหายเองเมื่อเด็กโตขึ้น อาจมีบางรายที่กลายเป็นมะเร็งในเวลาหลายปีต่อมา แต่พบไม่บ่อยนัก เชื้อต้นเหตุคือ HPV-6 และ -11 เด็กอาจจะได้รับเชื้อที่อยู่ในทางคลอดของมารดาในระยะคลอด

2.2 Oral mucosotropic HPV เป็นก้อนเนื้อออกบริเวณภายในช่องปากและเป็นสาเหตุของโรค focal epithelial hyperplasia ได้แก่ HPV-13, -30, -32, -57

บทบาทของ HPVs กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก

จากการศึกษาในเซลล์มะเร็งปากมดลูกในระดับโมเลกุลพบว่ายีนอมของเซลล์ส่วนใหญ่มักมี E6 และ E7 ของ HPV-16 หรือ -18 สอดแทรกอยู่ซึ่งดังที่ทราบกันว่าโปรตีน E6 และ E7 ทำหน้าที่ยัดอายุเซลล์ที่มีการติดเชื้อขยายออกไปอีกระยะหนึ่งเพื่อให้ไวรัสมีเวลานานพอในการผลิต progeny viruses โดยโปรตีน E6 ทำหน้าที่จับตัวกับโปรตีน p53 มีผลให้ p53 ถูกทำลายและหมดไป (Hengstermann และคณะ, 2001; Giarre และคณะ, 2001) ในทำนองเดียวกันโปรตีน E7 จะจับตัวกับโปรตีน pRb แล้วทำให้ pRb ทำงานไม่ได้ซึ่งทั้งโปรตีน p53 และ pRb มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์และโปรแกรมการตายของเซลล์ (programme cell death) แบบ apoptosis นอกจากนี้ p53 นั้นยังมีหน้าที่เป็น cellular tumor suppressor ดังนั้นกรณีของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเมื่อ p53 และ pRb ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติจึงส่งผลให้เซลล์นั้นพัฒนาไปเป็นมะเร็งในที่สุด (Giarre และคณะ, 2001)

ตารางที่ 2.1 การจัดแบ่งกลุ่มของ HPV types กับการเกิดเนื้องอกชนิดต่าง ๆ ในคน (Pfister. 1984)

Group I - Skin 1, 4 2, 26, 28, 29 3, 10, 27 7	Plantar warts (benign) Common warts (benign) Flat warts (benign) Butcher ' s warts (benign)
Group II - Epidermodysplasia verruciformis 5, 8 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36, 46-50	Macular lesions (frequently malignant) Macular or flat lesions (benign-rarely malignant)
Group III - Mucosa 6, 11, 34, 41-44, 51-55 13, 32 16, 18 30, 31, 33, 35, 45, 56	Condyloma/CIN* (rarely malignant) Fecal epithelial Hyperplasia (benign) Condyloma/CIN (frequently malignant) Bowenoid papulosis Condyloma/CIN (occasionally malignant)

* CIN : Cervical Intraepithelial Neoplasia

นอกจากนี้ยังพบในกรณีที่ HPV-DNA แทรกเข้าไปในยีนโนมของโฮสต์ที่ตำแหน่งซึ่งมีการส่งเสริมการแสดงออก (expression) ของยีน ดังนั้นหากมีการแทรกตัวของยีนไวรัสเข้าไปที่บริเวณดังกล่าวผลที่เกิดขึ้นคือจะมีการสร้างโปรตีนของไวรัสออกมาอย่างมากมายรวมทั้งการแสดงออกของยีน E6 และ E7 ที่มากเกินไปทำให้กลไกการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ผิดปกติจนเกิดการพัฒนาลเซลล์ไปเป็นมะเร็งหรือเนื้องอกชนิดร้ายแรง (malignant tissue) ในที่สุด (Kenneth และ Campo, 1985)

กลไกการก่อให้เกิดมะเร็งโดย HPVs นั้นนอกจากเกิดจากการสอดแทรกของ HPV-DNA ในส่วนยีน E6 และ E7 แล้วยังมีกรณีการสอดแทรกขึ้นส่วนยีน E2 จาก E-region ด้วยเนื่องจากโปรตีน E2 ของ HPVs มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ transcriptional regulation ดังนั้นหากมีการสอดแทรกยีนอยู่หน้า cellular oncogene เช่น myc gene ก็จะทำให้มีการเพิ่มจำนวนของยีนชนิดนี้อย่างมากมาย ซึ่งอาจมีผลทำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นเซลล์มะเร็งได้ (Riou และคณะ, 1987)

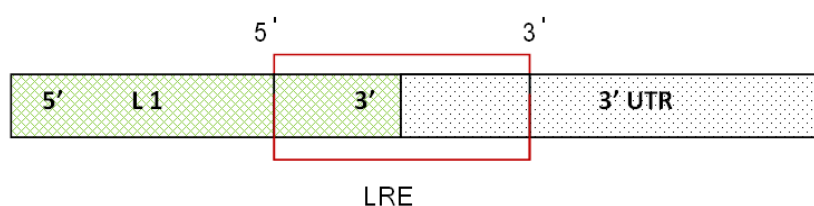
การแสดงออกของแคปซิดยีน (L1 gene) ของ PVs ถูกควบคุมในระดับ post-transcription

จากการศึกษาของ Stoler และคณะ (1992) ทำการตรวจสอบลักษณะการแสดงออกของ HPV-16 และ -18 ในเนื้อเยื่อมดลูกที่มีการติดเชื้อไวรัสพบว่าการสังเคราะห์ late protein หรือ แคปซิดโปรตีนจะเกิดขึ้นในช่วงระยะสุดท้ายของโปรแกรม epithelial cell differentiation ในขณะที่การถอดรหัสของยีนเกิดขึ้นในช่วงระยะกลางของโปรแกรมซึ่งบ่งบอกว่าการควบคุมการแสดงออกของ late gene เกิดขึ้นหลังขั้นการถอดรหัส ในเวลาต่อมาได้มีการศึกษาพบชิ้นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง (inhibitory elements) การแสดงออกของแคปซิดยีนใน papillomavirus บางชนิดเช่น HPV-16, HPV-1, HPV-31 และ BPV-1

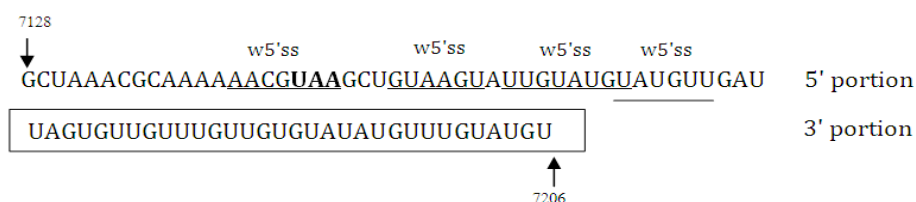
- **HPV-16** เรียกชิ้นส่วนที่มีลำดับเบสควบคุมการแสดงออกของยีน L1 ที่ตั้งอยู่ใน late 3' UTR ว่า late regulatory element (LRE) ชิ้นส่วนนี้มีความยาว 79 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 2.7) ด้านปลาย 5' ของ LRE มีตำแหน่งทับซ้อนกับส่วนปลาย 3' ของยีน L1 และด้านปลาย 3' ของ LRE จะยื่นยาวไปในส่วน 3' UTR ของไวรัสยีนโนม (Kennedy และคณะ, 1990) LRE ของ HPV-16 แบ่งได้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนทางด้าน 5' มีลำดับเบสที่ไม่จำเพาะมาก

(weak site) ของการ splice 4 ตำแหน่ง (four weak 5' splice sites) (รูปที่ 2.8) (Furth และคณะ, 1994) สำหรับส่วนทางด้าน 3' พบเบส U เป็นจำนวนมาก (Dietrich-Goetz และคณะ, 1997)

จากงานวิจัยของ Cumming และคณะ (2008) พบว่าการแสดงออกของยีน L1 ใน HPV-16 ถูกควบคุมในช่วง post-transcription โดย element ที่อยู่ใน late 3' UTR ของยีนโนมไวรัสซึ่งขึ้นส่วนนี้จะควบคุมการแสดงออกของยีน L1 ให้มีการสังเคราะห์โปรตีน L1 ในเซลล์ชั้นบนของเยื่อผิวที่ซึ่งเซลล์เข้าสู่ระยะสุดท้ายของการพัฒนาเซลล์ไปเป็นผิวหนังและจากการศึกษา LRE ในยีนโนมของ HPV-16 อย่างละเอียดพบว่าขึ้นส่วนนี้มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนหลายชนิด (ตารางที่ 2) เช่น hnRNP A1 (Cheunim และคณะ, 2008) ซึ่งเป็น shuttling protein ที่มีการเดินทางเข้าออกระหว่างนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม (Pinol-Roma และคณะ, 1997) และเป็น alternative splicing factor (Eperon และคณะ, 2000) U1 snRNP (Cumming และคณะ, 2003) ซึ่งเป็นคอมเพล็กซ์ที่ทำหน้าที่ใน splicing โดยจะจับตัวเข้ากับตำแหน่ง splice ทางด้าน 5' (5' splice site) U2AF⁶⁵ (Dietrich-Goetz และคณะ, 1997) ซึ่งเป็น splicing factor ที่จับตัวกับตำแหน่ง splice ทางด้าน 3' ในกระบวนการ splicing (3' splice site) CstF-64 (Koffa และคณะ, 2000) มีหน้าที่กระตุ้นการ cleavage และเติม poly A ของสาย pre-mRNA (Moreira และคณะ, 1998) และ HuR (Koffa และคณะ, 2000) ซึ่งเป็น shuttling protein (Fan และ Steitz, 1998) ที่เกี่ยวข้องกับการนำ mRNA ออกไปสู่ไซโตพลาสซึมและทำให้ mRNA มีความเสถียรในไซโตพลาสซึม (Peng และคณะ, 1998; Keene, 1999) ส่วนโปรตีนตัวสุดท้ายคือ SF2/ASF (McPhillips และคณะ, 2004) เป็น splicing factor เช่นเดียวกับโปรตีนข้างต้น จากการศึกษากลไกการควบคุม LRE ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสเปรียบเทียบกับเซลล์ที่อยู่ในระยะกำลังพัฒนาไปเป็นเซลล์เยื่อผิวกับเซลล์ในระยะสุดท้ายพบว่าในขณะที่โปรตีนชนิดอื่นมีระดับลดลงหรือคงที่แต่ระดับของ SF2/ASF กลับเพิ่มขึ้นมาก แสดงว่า SF2/ASF น่าจะถูกควบคุมโดยไวรัสและมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของอนุภาคไวรัส



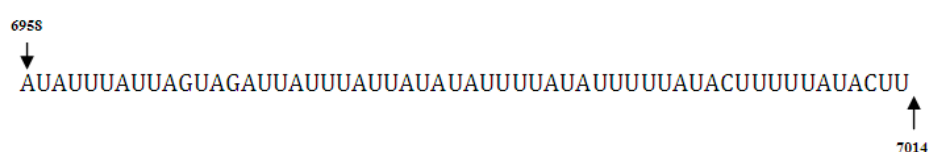
รูปที่ 2.7 ตำแหน่ง 79 nucleotide late regulatory element (LRE) บนยีนโนมของ HPV-16



รูปที่ 2.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของขึ้นส่วน 79-nt LRE ของ HPV 16, ตัวอักษรทึบหนาแสดง stop codon ของยีน L1, ส่วนที่ขีดเส้นใต้ แสดง 5' splice site 4 ตำแหน่งในส่วน 5' portion, กล้องสี่เหลี่ยมแสดงเบส GU จำนวนมากในส่วน 3' portion

ตารางที่ 2.2 ชนิดและหน้าที่ของโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับ LRE ของ HPV-16

โปรตีน	หน้าที่
hnRNP A1	shuttling protein , alternative splicing factor
U1 snRNP	splicing factor
U2AF ⁶⁵	splicing factor
CstF-64	cleavage and stimulating factor
HuR	shuttling protein, export nuclear protein
SF2/ASF	splicing factor

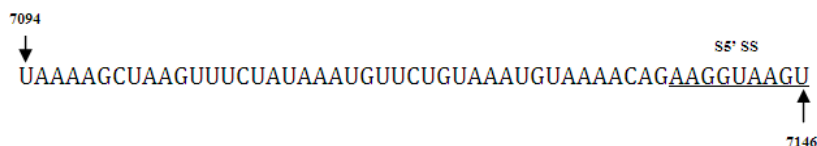


รูปที่ 2.9 ชิ้นส่วน inhibitory element ของ HPV-1 ขนาด 57 นิวคลีโอไทด์ มีตำแหน่งอยู่ระหว่างลำดับเบสที่ 6958 ถึงเบสที่ 7014

- **HPV-1** ชิ้นส่วนที่มีลำดับเบสควบคุมการแสดงออกของยีน L1 (inhibitory element) มีความยาว 57 นิวคลีโอไทด์ มีตำแหน่งอยู่ในส่วน 3' UTR ซึ่งพบกลุ่มเบส AU เป็นจำนวนมาก AUUUA (AU-rich) 2 ตำแหน่ง (รูปที่ 2.9) จากการศึกษาชิ้นส่วนนี้พบว่าปฏิสัมพันธ์กับ HuR ซึ่งปรากฏทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม นอกจากนี้ ชิ้นส่วน 53 นิวคลีโอไทด์นี้ยังมีกลุ่มเบส U เป็นจำนวนมาก UUUUU (U-rich) อยู่ 3 ตำแหน่ง ซึ่งมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน 2 ชนิด คือ HuR และ hnRNP C1/C2 (Sokolowski และคณะ, 1997; Tan และ Schwartz, 1995)
- **HPV-31** element ชิ้นส่วนนี้อยู่ในส่วนของ 3' UTR เช่นเดียวกันและมีความยาว 240 นิวคลีโอไทด์ ถูกจัดแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ major และ minor inhibitory elements (รูปที่ 2.10) จากงานวิจัยพบว่าในส่วน major inhibitory element มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนชนิดเดียวกับที่มีปฏิสัมพันธ์กับ LRE ของ HPV-16 คือ CstF-64, U2AF⁶⁵ และ HuR (Cumming และคณะ, 2002) เมื่อพิจารณาชนิดของโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับชิ้นส่วน 240 นิวคลีโอไทด์ซึ่งคล้ายคลึงกับ HPV-16 จึงสันนิษฐานได้ว่าทางฝั่ง 5' ของ inhibitory elements ใน HPV-31 น่าจะมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ LRE ของ HPV-16
- **BPV-1** inhibitory element มีความยาว 53 นิวคลีโอไทด์ มีตำแหน่งอยู่ในส่วนของ 3' UTR เช่นเดียวกับ HPV-16 ในกรณีของ BPV-1 นั้น (Furth และคณะ, 1991; 1994) ตัว element จะยับยั้งการสร้างโปรตีนแคปซิดของไวรัส (รูปที่ 2.11) โดยการทำปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนที่ชื่อว่า U1 70K ซึ่งเป็นโปรตีนสมาชิกของ U1snRNP คอมเพล็กซ์นี้เป็นคอมเพล็กซ์แรกในกระบวนการ splicing เมื่อคอมเพล็กซ์จับตัวเข้ากับตำแหน่ง 5' splice site บน element ของ BPV-1 ส่งผลให้โปรตีน U1 70K ใน U1snRNP เข้าทำปฏิกิริยากับ PAP (poly (A) polymerase) โดยตรงเกิดการยับยั้งกระบวนการ polyadenylation (Gunderson และคณะ, 1998) ทำให้ mRNA ถูกย่อยสลายอยู่ภายในนิวเคลียสไม่สามารถออกไปสู่ไซโตพลาสซึมเพื่อสังเคราะห์โปรตีนได้

6931	GATCAGTTTCCACTGGGTCGCAAATTTTATTACAGGCAG
6971	GATATAGGGCACGTCCTAAATTTAAAGCAGGTAACGTAG
7011	TGCACCCTCAGCATCTACCACTACACCAGCAAAACGTAAA
7051	AAACTAAAAAGTAATGGATGTGTATGTAAACATGTGTC
7091	TGTATGTGTATGTGCTTGTGCTGTATTGTATATGTGTGTG
	MIE
7131	TTTGTGTGTTATATATGGTATATGTATGTTTATGTATGCG
7171	TGTGTACTTGTATATATGTATAGTATGTTATGTGTGTATG
7211	TATGCTATGTATGTTAATAAATATGTGTATACCTGTGTGT
	poly(A)
7251	GTTGTGTATGTTGTCCTTATATACACCCATTAGTAACAT
	GU/U
7291	ACTATTACTATTTTATAAACTATTGTTCTTCTTGTTCCT
	SIE
7341	ACTTGTTCCTGCTCCTCCCAATAGTCATGTACTTATTTCT
7381	GCCTATAATTTAGGTGTCACGCC
	7393

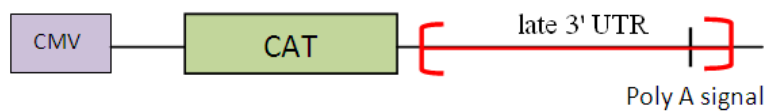
รูปที่ 2.10 ชิ้นส่วน inhibitory element ของ HPV31 ขนาด 240 นิวคลีโอไทด์ โดยที่ MIE (major inhibitory elements) มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเบสที่ 7081 ถึงเบสที่ 7210 สำหรับ SIE (minor inhibitory elements) มีตำแหน่งอยู่ระหว่างลำดับเบสที่ 7284 ถึงเบสที่ 7393 และ GU/U เป็นตำแหน่งสำหรับโปรตีน CstF (Cumming และคณะ, 2002)



รูปที่ 2.11 ชิ้นส่วน inhibitory element ของ BPV-1 ขนาด 53 นิวคลีโอไทด์โดยส่วนที่ขีดเส้นใต้ แสดง 5' splice site 1 ตำแหน่งซึ่งมีตำแหน่งอยู่ระหว่างลำดับเบสที่ 7094 ถึงเบสที่ 7146

นอกจากนี้มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ inhibitory RNA element ใน HPVs ทั้ง 8 ชนิด ที่อยู่ในส่วน late 3' untranslated region (UTR) ของ human papillomavirus 8 ชนิด คือ HPV-1, HPV-2, HPV-6b, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-41 และ HPV-61 (Zhao และคณะ, 2007) การทดลองดำเนินการโดยเชื่อมต่อชิ้น late polyA signal ที่มี late 3'UTR อยู่ทาง upstream เข้าทาง downstream ของ chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene ใน CAT reporter plasmid ซึ่งมี CMV เป็น promoter (รูป 2.12) ก่อนถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ HeLa cells จากนั้นนำมาทดสอบการแสดงออกของ CAT reporter gene โดยวิเคราะห์หาระดับของ CAT mRNA ด้วยเทคนิค northern blot analysis และวิเคราะห์หาโปรตีน CAT โดยใช้ CAT-ELISA เปรียบเทียบกับ CAT plasmid control ที่ไม่มีการเติมชิ้นส่วน 3'UTR ผลการทดลองที่ได้พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งของ late 3' UTR ของ HPV แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันโดย พลาสมิดที่มีส่วน late 3' UTR ของ HPV-16 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดมะเร็งในมดลูกให้ผลยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA และโปรตีนมากที่สุด ในขณะที่พลาสมิดที่มี late 3' UTR ของ HPV-2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดเนื้องอกที่บริเวณริมฝีปากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA และโปรตีนน้อยที่สุดจากการศึกษาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า

ประสิทธิภาพในการยับยั้งของ inhibitory element ที่ตั้งอยู่ในส่วน late 3' UTR ในการสังเคราะห์ mRNA และ โปรตีนของ HPV แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันออกไป



รูป 2.12 CAT reporter plasmid ที่มี insert ของ late 3' UTR