

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

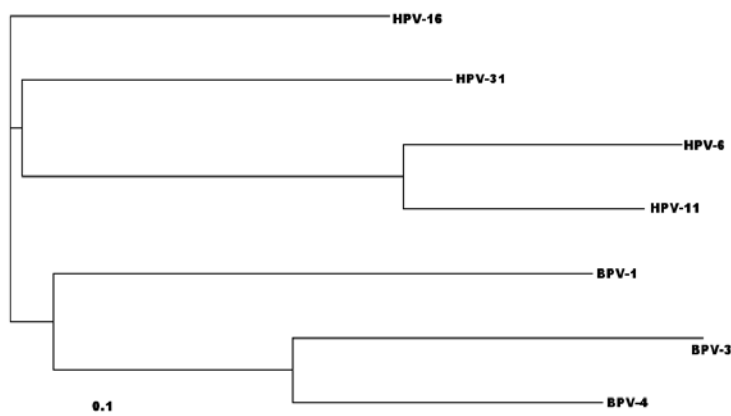
งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนในบริเวณ late 3'UTR ของไวรัสฮิวแมน ที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนได้โดยใช้ยีน *β-galactosidase* เป็น reporter system ในไวรัส 7 ทั่วยประกอบด้วย HPV-6, -11, -16, -31, BPV-1, -3, และ -4 ซึ่งมีโฮสต์ 2 ชนิดได้แก่ มนุษย์ (human) และวัว (bovine) ดำเนินการทดลองโดยการเตรียมชิ้นส่วน 3'UTR แล้วเชื่อมต่อเข้ากับ pSV ที่บริเวณปลายด้าน 3' ของ report gene ก่อน transfect พลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ HeLa cells ตรวจสอบการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR และการสังเคราะห์โปรตีนโดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ *β-galactosidase* ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของยีนของชิ้นส่วน 3'UTR ของไวรัสทั้ง 7 ทั่วยพบว่าบริเวณ late 3'UTR ของไวรัสที่ตรวจสอบทุกทั่วยทั้งในกลุ่ม human และ bovine มีชิ้นส่วนที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ซึ่งในที่นี้จะขอเรียกว่า late regulatory element (LRE) จากรายงานของ Zhao และคณะ (2007) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการแสดงออกของยีนของชิ้นส่วนบริเวณ late 3'UTR ของ HPV 9 ชนิดประกอบด้วยไวรัสในกลุ่ม low risk types และ high risk types โดยใช้ CAT เป็น reporter gene และให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันคือในบริเวณ late 3'UTR ของ HPV ทั้ง 9 ชนิดมีลำดับเบส LRE ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนอยู่ อย่างไรก็ตามในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมในกลุ่มของ bovine papillomavirus และพบว่านอกจาก late 3'UTR ของ BPV-1 ที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว (Furth และ Baker, 1991) ในส่วนของ BPV-3 และ -4 ก็มีชิ้นส่วน LRE ดังกล่าวด้วยดังนั้นมีความเป็นไปได้มากกว่าใน papillomavirus ชนิดอื่นก็จะมีชิ้นส่วน LRE ในลักษณะนี้เช่นเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชิ้นส่วน LRE ในยีนโนมของไวรัสทั้ง 7 ทั่วย (ตารางที่ 4.13; รูปที่ 4.8) แสดงให้เห็นว่าโฮสต์ในการติดเชื้อของไวรัสนั้นไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของชิ้นส่วน 3'UTR และสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ทั้งในระดับการถอดรหัสและการแปลรหัสแต่มีประสิทธิผลการยับยั้งในระดับการถอดรหัสหรือการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอดีกว่า โดยชิ้นส่วน LRE จากยีนโนมของ HPV-16 และ -31 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม high risk types สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ดีทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนโดยพบการสังเคราะห์ของผลิตภัณฑ์เพียงแค่อ้อยละ 10 ถึง 20 เท่านั้น ทั้งนี้ตรงกันข้ามกับกรณีของ HPV-6, -11, BPV-3 และ -4 ที่มีระดับการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอค่อนข้างสูงและมีการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในระดับที่ต่ำ สำหรับ BPV-1 ให้ผลที่แตกต่างกับทั่วยอื่นกล่าวคือ ชิ้นส่วนไวรัสมีประสิทธิผลการยับยั้งการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอที่ต่ำแต่มีระดับการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนในระดับค่อนข้างสูง ทั้งนี้ประสิทธิภาพของ LRE ในการยับยั้งการแสดงออกน่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งต่อการผลิตอนุภาคไวรัสที่สอดคล้องกับความรุนแรงของการก่อโรคโดยไวรัสในกลุ่ม low risk types จะมีการผลิตอนุภาคไวรัสจำนวนมากกว่ากลุ่ม high risk types (Middleton และคณะ, 2003) จึงมีชิ้นส่วน LRE ที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชิ้นส่วนของ high risk types เช่น HPV-16 และ -31

ปัจจุบันการศึกษาคุณสมบัติด้านต่างๆในโปรตีนและยีนของไวรัสที่เปรียบเทียบระหว่าง high risk และ low risk types มักเกี่ยวข้องกับยีน E6 และ E7 เป็นส่วนใหญ่ เช่น ตำแหน่งของโปรตีน E6 และ E7 ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อระหว่าง high risk และ low risk types มีความแตกต่างกันโดยในกรณีของ high risk HPV นั้น โปรตีนจะมีการกระจายตัวไปทั่วนิวเคลียสในขณะที่โปรตีนจาก low risk types จะมีตำแหน่งเป็นกระจุกอยู่ภายในนิวเคลียส (Guccione และคณะ, 2002) หรือมีการรายงานถึงความแตกต่างของจำนวนโปรตีนของโฮสต์ที่มีการปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน E6 ระหว่าง high risk และ low risk types (Mantovani และ Banks, 2001) เป็นต้น สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของยีน L1 โดย LRE นั้นมีจำนวนน้อยมากทั้งนี้จากรายงานของ Zhao และคณะ (2007) แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของลำดับเบสในบริเวณ 3'UTR ในการควบคุมการแสดงออกในระดับโปรตีนมีความแตกต่างกันในระหว่าง HPV ทั่วยต่างๆที่สอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ สำหรับในระดับอาร์เอ็นเอนั้น Zhao และคณะ ไม่พบความแตกต่างของประสิทธิภาพของชิ้นส่วนในการควบคุมการแสดงออกซึ่งแตกต่างกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ทั้งนี้วิธีการทดลองที่ใช้ในงานวิจัยนี้ซึ่งใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งมีความไวมากกว่าเทคนิค Northern blot (Dean และคณะ, 2002) ที่ Zhao และคณะ ใช้ ดังนั้นจึงอาจต้องทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง เป็นที่น่าเสียดายที่ผู้วิจัยได้พยายามสืบหาข้อมูลเกี่ยวกับกลไกในการควบคุมการแสดงออกของยีนของลำดับเบสในบริเวณ 3'UTR ของไวรัสทั่วยอื่นที่จัดเป็น low risk type แต่ไม่พบการรายงานแต่อย่างใด อย่างไรก็ตามก็ตามจากข้อเท็จจริงที่ว่าไม่เคยมีการรายงานถึงการตรวจพบการแสดงออกของยีน L1 และ L2 ทั้งระดับอาร์เอ็นเอหรือโปรตีน

ในเซลล์มะเร็งมดลูกทำให้สันนิษฐานได้ว่าภายในเซลล์มะเร็งเหล่านี้ทั้งยีน L1 และ L2 ถูกยับยั้งการแสดงออกโดยการยับยั้งการแสดงออกนี้ส่งผลต่อเนื่องให้ไวรัสมีการติดเชื้อแบบเรื้อรัง (persistence) และการพัฒนาเซลล์ให้เป็นมะเร็งในที่สุด ทั้งนี้ยังต้องมีการทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันข้อสันนิษฐานนี้ต่อไป

ข้อมูลประสิทธิภาพของชิ้นส่วน LRE นี้อาจสามารถประยุกต์ใช้ประกอบกับข้อมูลอื่นเช่น phylogenetic tree ในการทำนายลักษณะและความรุนแรงของโรคของไวรัสได้ในกรณีที่ไม่มีข้อมูลเช่นไวรัสที่ยังใหม่ที่ยังมีการค้นพบ ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ phylogram ด้วยโปรแกรม ClustalW2 จากเว็บไซต์ EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) ของชิ้นส่วนบริเวณ late 3'UTR ระหว่าง papillomaviruses 6 ชนิดได้แก่ HPV-6, -11, -16, -31, BPV-3 และ -4 เปรียบเทียบกับ BPV-1 ที่มีผู้ศึกษาไว้แล้ว (สรรทธิพิทย์ กองจร และคณะ, 2555) โดยนำลำดับเบสจากเว็บไซต์ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ผลการศึกษาสามารถแบ่งกลุ่มไวรัสออกได้เป็น 2 กลุ่มตามลักษณะโฮสต์ (รูปที่ 5.1) คือไวรัสกลุ่ม BPVs และ HPVs ในกลุ่ม BPVs ซึ่งมีสมาชิกทั้งหมด 3 ชนิดพบว่า BPV-3 และ -4 มีความคล้ายกันทางสายบรรพบุรุษ (phylogeny) มากที่สุดและมีประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของชิ้นส่วน LRE ที่ใกล้เคียงกันด้วย ในขณะที่ BPV-1 มีความสัมพันธ์ห่างจากไวรัสทั้งสองชนิด สำหรับกลุ่ม HPVs ซึ่งมีสมาชิก 4 ชนิดนั้น HPV-11 มีความคล้ายกันทางสายบรรพบุรุษกับ HPV-6 มากที่สุดรวมทั้งมีประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของชิ้นส่วน LRE ที่ใกล้เคียงกันเช่นกันทั้งนี้ไวรัสทั้งสองชนิดจัดเป็นสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง ในขณะที่ HPV-31 และ HPV-16 มีความสัมพันธ์กันทางสายบรรพบุรุษห่างจากไวรัสชนิดอื่นในกลุ่มมากที่สุดและมีประสิทธิภาพการยับยั้งการแสดงออกของชิ้นส่วน LRE ที่มากที่สุด



รูปที่ 5.1 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางบรรพบุรุษระหว่าง PVs 6 ชนิด สเกลด้านล่างแสดงถึงระยะทางของวิวัฒนาการระหว่างไวรัสแต่ละชนิด

ผลการวิเคราะห์หา inhibitory RNA element ของ BPV-3 ในเบื้องต้นพบว่าไพรเมอร์คู่ BPV-3/7 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า full length (ไพรเมอร์คู่ BPV-3; ตารางที่ 4.15) บ่งบอกว่าชิ้นส่วน LRE ของ BPV-3 นั้นอาจจะอยู่ในส่วน upstream ของตำแหน่งการจับตัวของไพรเมอร์ BPV-3/7 ซึ่งจัดว่าจุดเริ่มต้นสำหรับการศึกษาลำดับเบสของ LRE ที่ถูกต้องต่อไป เมื่อพิจารณาลำดับเบส 3'UTR ของ BPV-3 จะเห็นว่ามี late poly A signal (AAUAAA) อยู่ทั้งหมด 3 ตำแหน่งโดยผลการวัดกิจกรรมของชิ้นส่วนที่เตรียมโดยไพรเมอร์คู่ BPV3/12 ซึ่งมีตำแหน่งการจับตัวอยู่เหนือ poly A signal ตำแหน่งที่ 3 (รูปที่ 4.9) มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดต่ำลงมากถึงร้อยละ 82.55 ดังนั้นในชิ้นส่วนที่เตรียมขึ้นจากไพรเมอร์คู่นี้จะมี poly A signal ตำแหน่งที่ 3 อยู่เท่านั้นซึ่งจากการทดลองบ่งบอกว่าไวรัสใช้ poly A signal สำหรับ late gene หรือ L1 gene ที่ตำแหน่งที่ 1 หรือ 2 แต่ไม่ใช่ตำแหน่งที่ 3

จากรายงานที่มีก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าชิ้นส่วน LRE ของ HPV-16, -31 และ BPV-1 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ post-transcription ทั้งสิ้น (Dietrich-Goetz และคณะ, 1997; Koffa และคณะ, 2000; Cumming และคณะ, 2003; McPhillips และคณะ, 2004; Cumming และคณะ, 2008; Cheunim และคณะ, 2008) ในบรรดาโปรตีนเหล่านี้มี HuR และ hnRNP A1 ที่เป็น shuttling protein กล่าวคือมีการเดินทางเข้าออกระหว่างนิวเคลียสและไซโทพลาสมตลอดเวลา โดยหน้าที่หนึ่งของโปรตีนทั้งสองคือการขนส่งสาย mRNA ที่สมบูรณ์ไปยังไรโบโซมเพื่อการแปลรหัสเป็นสายโปรตีน (Pinol-Roma และคณะ, 1997; Fan และคณะ, 1998; Peng และคณะ, 1998; Keene และคณะ, 1999) ผลการวิเคราะห์โปรตีนจาก cytoplasmic extract ที่สามารถจับตัวกับ LRE โดยวิธี affinity chromatography แสดงให้เห็นแถบแบนโปรตีนเป็นจำนวนมากตั้งแต่ขนาดประมาณ 95-25 kDa (รูปที่ 4.13) ทั้ง HuR และ hnRNP A1 มีขนาด 36 kDa และ 39 kDa ตามลำดับ ดังนั้นแถบแบนโปรตีนที่เหลือคือโปรตีนที่จะต้องมีการศึกษาต่อไป ทั้งนี้ผู้วิจัยได้พยายามศึกษาหาข้อมูลของโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ได้แต่ยังไม่พบซึ่งผู้วิจัยจะทำการศึกษาต่อไปโดยจะเน้นในส่วนของการแปลรหัสซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในไซโทพลาสมเท่านั้น ผลการวัดกิจกรรมเอนไซม์ของพลาสมิดที่มีชิ้นส่วน 3'UTR ของไวรัสแต่ละตัวยังแสดงให้เห็นว่า HPVs ในกลุ่ม high risk types มีการควบคุมเชิงลบในระดับการสังเคราะห์โปรตีนด้วยทำให้มีการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนที่ต่ำแตกต่างกับไวรัสในกลุ่ม low risk types ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูง (รูปที่ 4.8) บ่งบอกถึงการสังเคราะห์โปรตีนออกมาในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชิ้นส่วน LRE และการควบคุมการแสดงออกของ late gene ใน papillomavirus เป็นการศึกษาถึงการควบคุมการแสดงออกของยีนในนิวเคลียสเท่านั้นยังไม่มีทีี่มีผู้วิจัยใดทำการศึกษาในส่วนของไซโทพลาสมจึงนับว่าเป็นประเด็นที่น่าจะทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์มากขึ้น