

โครงการ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ inhibitory RNA element ในบริเวณ late 3'untranslated region (3'UTR) ของ bovine papillomavirus ไทป์ 3 (BPV-3) และปฏิสัมพันธ์ระหว่าง element กับโปรตีนของ HeLa cell

ผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาพร ชื่นอิม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

อีเมลล์ suy85@hotmail.co.uk

ทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2560 สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ 2562 **ประเภทการวิจัย** การวิจัยพื้นฐาน

สาขาวิชา (อ้างอิงตามวช.) สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

บทคัดย่อ

งานวิจัยก่อนหน้าพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน late 3'UTR ของ BPV-3 genome มีอิทธิพลต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน (ทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555-2556) งานวิจัยนี้ทำการศึกษาต่อยอดจากงานวิจัยที่แล้ว มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาช่วงนิวคลีโอไทด์ใน late 3'UTR ของ BPV-3 ที่มีอิทธิพลในการควบคุมการแสดงออกของยีนโดยใช้ pSV ซึ่งมียีน *beta-galactosidase* หรือ *lac Z* เป็น reporter gene และทำการแทรกชิ้นส่วน late 3'UTR ของไวรัสขนาดต่างๆ ที่มีการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลายด้าน 5' ที่ละช่วง ส่วนปลายด้าน 3' สิ้นสุดที่ตำแหน่ง poly A signal ตำแหน่งสุดท้าย พลาสมิดลูกผสมที่เตรียมได้ถูกถ่ายโอนเข้าสู่ HeLa cell (co-transfection) พร้อมกับ pEGFP ซึ่งใช้เป็น internal control สำหรับ transfection efficiency ตรวจสอบการควบคุมการแสดงออกในระดับ mRNA โดยเทคนิค reverse transcription PCR และในระดับโปรตีนโดย beta-galactosidase activity assay ผลการทดลองพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน *lac Z* สามช่วงดังนี้ 1) ขนาด 163 เบส มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 6668 – 6830 ยับยั้งการแสดงออกทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน 2) ขนาด 75 เบส มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 6851 – 6925 ยับยั้งการแสดงออกเพียงในระดับโปรตีน และ 3) ขนาด 94 เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 6926 – 7019 ยับยั้งการแสดงออกเพียงในระดับ mRNA เมื่อวิเคราะห์ binding sites ของ RNA-binding protein ที่ปรากฏบน late 3'UTR ของไวรัส พบ binding sites ของโปรตีนหนาแน่นในนิวคลีโอไทด์ทั้งสามช่วง โดยในช่วงที่ 1 พบ binding sites ของโปรตีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับ mRNA 3' processing เช่น splicing factor, polyadenylation และ mRNA translation ในช่วงที่ 2 พบโปรตีนจำนวนมากเกี่ยวข้องกับ mRNA export, mRNA translation, และ mRNA stability ในช่วงที่ 3 พบโปรตีนจำนวนมากเกี่ยวข้องกับ mRNA splicing และ mRNA degradation โดยผู้วิจัยสันนิษฐานว่า splicing factor เหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อ mRNA 3' processing ดังที่พบในกรณีของ BPV-1 และ HPV-16 จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าใน late 3'UTR ของ BPV-3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าที่เป็น

controlling element อยู่ 3 ช่วง ซึ่งในแต่ละช่วงทำหน้าที่ร่วมกันในการยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน

คำสำคัญ : Bovine papillomavirus type 3, 3'UTR, *cis*-acting element, การควบคุมการแสดงออกในระดับ post-transcription

Research Title: Sequences of inhibitory RNA element in 3'untranslated region (3'UTR) of bovine papillomavirus type 3 (BPV-3) and interaction between the element and HeLa cell proteins

Researcher: Assist Prof Dr Thanaporn Chuen-Im, Faculty of Science, Silpakorn University

Research Grants: Fiscal Budget of Year 2017, Silpakorn University Research, Innovation and Creativity Administration Office, Silpakorn University

Year of completion: 2019 **E-mail:** suy85@hotmail.co.uk

Type of research basic research, Subjects (based on NRCT): Agriculture and Biology, Biological Science

Abstract

Previously, we reported that nucleotide sequences in late 3'UTR of BPV-3 can inhibit gene expression in both mRNA and protein levels (the Fiscal Budget of Year 2012-2013). This research was conducted in continuing the previous research using pSV containing *beta-galactosidase* or *lac Z* gene as reporter gene. The recombinant plasmids were constructed by inserting PCR-generated fragment of BPV-3 late 3'UTR downstream *lac Z* open reading frame, in which each truncated fragment was synthesized using designed primers to delete out desired nucleotide sequences from 5' end towards 3' end of the late 3'UTR. The recombinant plasmids were then co-transfected to HeLa cells with pEGFP (used as an internal control for transfection efficiency). Regulation of gene expression by late 3'UTR of BPV-3 in mRNA and protein levels were examined by reverse transcription PCR and beta-galactosidase activity assay, respectively. From the results, three regions of Inhibitory nucleotide sequences were observed in viral late 3'UTR. The first region was 163 bases, nucleotides positioned between 6668 – 6830, exerting inhibitory effect at both mRNA and protein level. The second region was 74 bases, nucleotide positioned between 6851 – 6925, exerting inhibitory effect at only protein level. The third region was 94 bases, nucleotide positioned between 6926 – 7019, exerting inhibitory effect only at mRNA level. We further analyzed binding motifs of RNA-binding proteins on viral late 3'UTR using Bioinformatics approach. Interestingly, clusters of protein-binding motifs were observed in these three regions. Most of proteins that found binding sites in the 1st region function involved in mRNA 3' processing, such as splicing factor and polyadenylation, and mRNA translation. The 2nd region found binding motifs of proteins

functioning in mRNA export, mRNA translation, and mRNA stability. Binding motifs of proteins found in the 3rd region were involved with mRNA splicing and mRNA degradation. We hypothesized that these splicing factors may play a role in mRNA 3' processing of *lac Z* gene similar to what reported in BPV-1 and HPV-16. Conclusively, late 3'UTR of BPV-3 possesses controlling elements in 3 regions, where each region is co-working to inhibit gene expression in both mRNA and protein levels.

Keywords: Bovine Papillomavirus type 3, 3'UTR, *cis*-acting elements, gene expression at post-transcriptional levels