



รายงานวิจัย เรื่อง

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

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

ชื่อผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนาพร ชื่นอิม

Assistant Professor Dr. Thanaporn Chuen-Im

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่ดำเนินการเสร็จ 2563

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

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา	5
สมมุติฐานของการศึกษา	5
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	6
บทที่ 3 ผลการทดลอง	13
บทที่ 4 อภิปรายผลการทดลอง	27
สรุปผลการทดลอง	29
Output	30
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	34

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างจีโนมและวงจรชีวิตของ Papillomavirus ในเยื่อหุ้มเซลล์ (epithelial cell)	3
รูปที่ 2 แผนที่ของ pSV beta-galactosidase	8
รูปที่ 3 แผนที่ของ pEGFP ซึ่งมียีน green fluorescence protein (GFP)	9
รูปที่ 4 แผนที่แสดงตำแหน่งของ forward primers และ reverse primer บน late 3'UTR ของ BPV-3 ที่ออกแบบในการศึกษานี้	13
รูปที่ 5 ชิ้นส่วน late 3'UTR ของ BPV-3 ขนาดต่างๆ จากการใช้ไพรเมอร์ ที่ออกแบบในการศึกษานี้บน 1% agarose gel ด้วยเทคนิค electrophoresis	14
รูปที่ 6 การเรืองแสงของ GFP ของ HeLa cell หลังจาก co-transfection ด้วย pSV positive control และ pEGFP ที่อัตราส่วน 3.0 μ g : 1.0 μ g	16
รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน <i>lac Z</i> ที่แสดงออกภายใต้การควบคุมของ ชิ้นส่วน late 3'UTR ขนาดต่างๆ ของ BPV-3 เปรียบเทียบกับยีน GFP	17
รูปที่ 8 Inhibition fold ในการแสดงออกของ <i>lac Z</i> mRNA จาก pSV ที่มี insert ชิ้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ pSV positive control	18
รูปที่ 9 สารละลายสีเหลืองของ cell lysate จากการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ หลังถ่ายโอน pSV ที่มี 3'UTR ของไวรัสขนาดต่างๆ	19
รูปที่ 10 Inhibition fold ของการแสดงออกของยีน <i>lac Z</i> ระดับโปรตีนของ pSV ที่มี late 3'UTR ของ HPV-16, BPV-1, และชิ้นส่วนขนาดต่างๆ ของ late 3'UTR จาก BPV-3 เปรียบเทียบกับ pSV positive control	21

รูปที่ 11 Inhibition fold ของ late 3'UTR จากไวรัส 3 ไทป์ และชิ้นส่วนขนาดต่างๆ ของ late 3'UTR จาก BPV-3 เปรียบเทียบกับ pSV positive control ในระดับ mRNA และโปรตีน	21
รูปที่ 12 ร้อยละของโปรตีนที่พบ binding site บน late 3'UTR ของ BPV-3 จำแนก ตามหน้าที่ของโปรตีนใน mRNA metabolic pathway	25
รูปที่ 13 ตำแหน่ง binding site ของโปรตีน 33 ชนิดที่บน late 3'UTR ของ BPV-3 และตำแหน่งของ forward primers ที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 3'UTR เพื่อสอดแทรกเข้าสู่ pSV และใช้ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน <i>lac Z</i>	26

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบและใช้ในการศึกษานี้	14
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR จากการใช้ โปรแกรม GelQuantNET	17
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 420 nm ของ cell lysate ที่รับถ่ายโอน pSV ที่มีชิ้นส่วน 3'UTR ของไวรัสขนาดต่างๆ	20
ตารางที่ 4 RNA-binding protein และหน้าที่ของโปรตีนที่พบ binding motif บน late 3'UTR ของ BPV-3 โดยใช้โปรแกรม RBPmap version 1.1	23

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มะเร็งปากมดลูกเป็นมะเร็งอวัยวะสืบพันธุ์สตรีที่พบได้บ่อยที่สุด ในประเทศไทยมะเร็งปากมดลูกเป็นอันดับหนึ่งที่มีรายงานการตรวจพบในผู้หญิงและยังเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขอย่างมาก พบมากในผู้หญิงช่วงอายุ 35-60 ปี สาเหตุการเกิดมะเร็งปากมดลูกยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนแต่มีปัจจัยหลายอย่างที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค เช่น การมีเพศสัมพันธ์ตั้งแต่อายุยังน้อย มีบุตรมาก มีประวัติเป็นกามโรค การสูบบุหรี่ การมีคู่นอนหลายคน การมีระบบภูมิคุ้มกันที่อ่อนแอ พันธุกรรม การขาดสารอาหารบางชนิด เป็นต้น มะเร็งปากมดลูกเป็นโรคติดต่อทางเพศสัมพันธ์ (sexually transmitted cancer) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าสาเหตุอันหนึ่งของมะเร็งปากมดลูกในผู้หญิงเกิดจากเชื้อ human papilloma viruses (HPVs) ชนิดที่ 16 และ 18 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม papillomaviruses ที่มีมากกว่าร้อยสายพันธุ์ การติดเชื้อของไวรัสแต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะต่อชนิดของโฮสต์ เช่น HPVs ก่อโรคในคน bovine papilloma viruses (BPVs) ก่อโรคในวัว ควายและ canine papilloma viruses (CPVs) ก่อโรคในสุนัข โดยไวรัสจะก่อให้เกิดเนื้องอกทั้งชนิดไม่ร้ายแรง (benign) เช่น หูด (wart หรือ papillomas) และชนิดร้ายแรง (carcinoma) เช่น มะเร็ง (cancer) (de Villiers และคณะ, 2004)

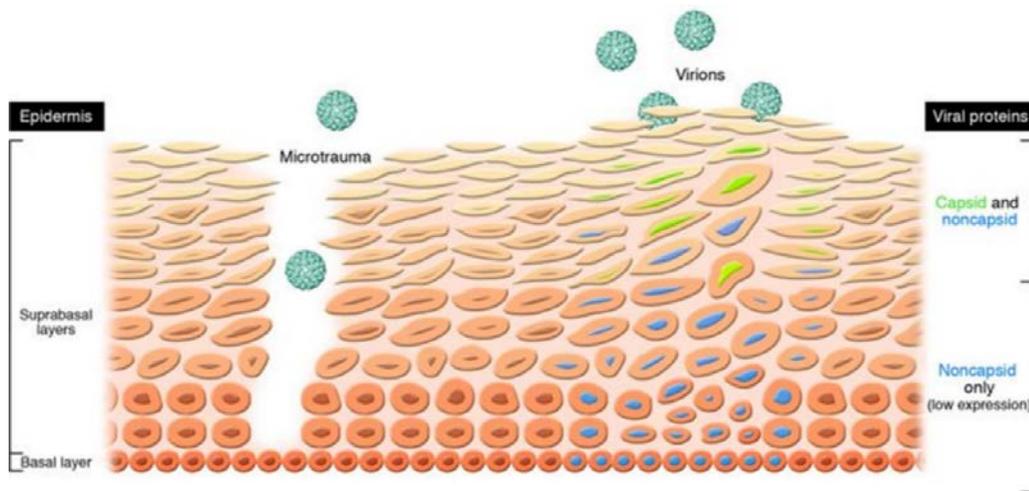
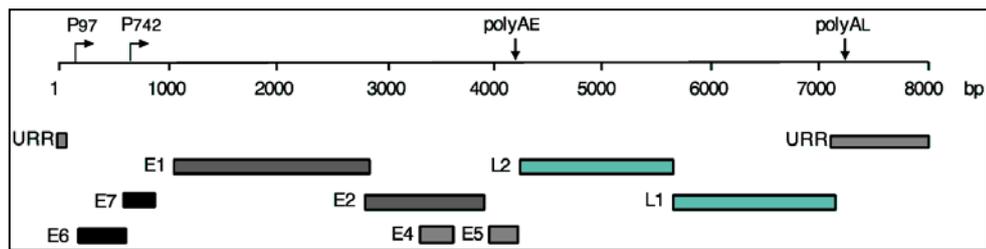
HPVs เป็นไวรัสในแฟมิลี *Papovaviridae* มีสารพันธุกรรมชนิด DNA สายคู่ มีการจัดตัวเรียงเป็นวงกลม เป็นสาเหตุทำให้เกิดรอยโรคบนเยื่อบุชนิด squamous โดยทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น (proliferation) การตรวจวินิจฉัยใน ห้องปฏิบัติการทั่วไป ใช้วิธีทาง immunohistochemistry คือ การตรวจสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์และเนื้อเยื่อโดยการย้อมสีเฉพาะและการตรวจหาเชื้อไวรัสในเซลล์เนื้อเยื่อโดยตรงผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพราะเชื้อ HPV ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง แม้ว่าจะมีความพยายามนำไวรัสฉีดเข้าสู่สัตว์ทดลองแต่ก็พบลักษณะการติดเชื้อและการเกิดโรคมียลักษณะที่แตกต่างจากคน เนื่องจาก HPV ไม่สามารถทำการเพาะแยกเชื้อได้ในห้องปฏิบัติการดังนั้นการศึกษาในระยะแรกจึงใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและวิธีทาง immunohistochemistry แต่ปัจจุบันมีการพัฒนาทางเทคโนโลยีมีเครื่องมืออุปกรณ์และวิธีการที่มีความไวและความแม่นยำสูงได้แก่ ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

สำหรับในต่างประเทศมีรายงานการตรวจวิเคราะห์และศึกษาความสัมพันธ์ของ HPVs กับการก่อโรคในคนอย่างต่อเนื่องแต่ในประเทศไทยการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับความสำคัญของ HPVs ยังมีน้อย จากการศึกษาวงจรชีวิตและกลไกในการก่อโรคของ papillomavirus พบว่าไวรัสจะเลือกติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ฐาน (basal cell) ของเยื่อบุผิว (epithelium) เท่านั้น ซึ่งเซลล์ที่บริเวณนี้ยังมีคุณสมบัติใน

การแบ่งตัวอยู่ เมื่อเซลล์แบ่งตัวก็จะมี การจำลองจีโนมของไวรัสไปพร้อมกับเซลล์และจีโนมของไวรัสจะติดไปกับเซลล์ใหม่ทุกเซลล์ทำให้ไวรัสสามารถติดเชื้อในร่างกายได้นานหลายปีในที่สุดจะพัฒนา กลายเป็นเซลล์มะเร็ง (Zheng และ Baker, 2006)

ยีนของ papillomavirus แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (รูปที่ 1) ตามระยะการแสดงออก ในช่วงวงจรชีวิตคือ early genes (E1, E2, E4, E5, E6 และ E7) และ late genes (L1 และ L2) เมื่อไวรัสติดเชื้อเข้าสู่เซลล์ฐานของเยื่อบุผิว เซลล์ฐานจะมีการแบ่งตัวเป็นสองเซลล์ ในขณะที่เดียวกันไวรัสจะจำลองจีโนมไปพร้อมๆ กับโฮสต์จีโนมทำให้ทั้งสองเซลล์มีจีโนมของไวรัสติดอยู่โดยที่หนึ่งเซลล์จะเป็นเหมือนแหล่งเก็บจีโนมของไวรัสสำหรับการแบ่งตัวครั้งต่อไปซึ่งจะทำให้ จีโนมของไวรัสมีการจำลองและติดไปกับเซลล์ใหม่ทุกเซลล์ ส่วนเซลล์อีกหนึ่งเซลล์ที่ได้จากการแบ่งเซลล์จะเคลื่อนที่สู่ชั้นบนพร้อมๆ กับการพัฒนาเซลล์ไปเป็นเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell differentiation) จากนั้นยีน E1 และ E2 ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ replication และ transcription (zur Hausen, 2002) ของไวรัสจีโนมจะมีการแสดงออกเป็นอันดับแรก ต่อมา ยีน E6 และ E7 จะมีการแสดงออกเพื่อทำหน้าที่จับตัวกับโปรตีนของเซลล์ที่ควบคุมวงจรชีวิตของเซลล์และโปรแกรมการตายของเซลล์ (Munger และ Howley, 2002) ซึ่งเป็นการยืดอายุของเซลล์เพื่อให้ไวรัสมีเวลานานพอในการผลิตอนุภาคไวรัสรุ่นลูกหลานและเมื่อเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเคลื่อนที่สู่เซลล์ชั้นกลางๆ ของเนื้อเยื่อจะมีการถอดรหัสของยีน L1 ก่อนที่จะสังเคราะห์โปรตีนแคปซิดแล้วใช้ในการประกอบเป็นอนุภาคไวรัสต่อไป

ในส่วนของจีโนมไวรัสนั้นนอกจากจะมีบริเวณที่ทำหน้าที่เป็นยีนแล้วยังมีบริเวณของ untranslated region (UTR) ที่ไม่มีการบรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมใดๆ แต่มี elements ต่างๆ อยู่มากมายที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมวงจรชีวิตของไวรัส ดังเช่นการแสดงออกของ late gene หรือยีน L1 ที่ถูกควบคุมโดย elements หลายชิ้นด้วยกันซึ่งปรากฏอยู่ใน L1 ORF และ 3'UTR ของไวรัสจีโนม (Tan และคณะ, 1995) ทั้งนี้มีหนึ่ง element สำคัญที่ควบคุมการแสดงออกของ L1 คือ late regulatory element (LRE) โดยมีการรายงานเกี่ยวกับ LRE ในจีโนมของ HPV-16 ว่าเป็นตัวการสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของแคปซิดโปรตีน (Cumming และคณะ, 2003) จากการศึกษาของ Cumming และคณะ พบการสังเคราะห์โปรตีน L1 ในเซลล์ชั้นที่อยู่ในระยะสุดท้ายของการพัฒนาไปเป็นเยื่อบุผิว (epithelial cell differentiation) แต่จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค northern blot hybridisation กลับพบ RNA ของยีน L1 ในเซลล์ชั้นกลางๆ ของเนื้อเยื่อ (Stoler และคณะ, 1989) จากผลการทดลองนี้แสดงว่ามีการถอดรหัสของยีน L1 เกิดขึ้นตั้งแต่ในชั้นเซลล์กลางแต่มีการควบคุมไม่ให้มีการแปลรหัสเป็นแคปซิดโปรตีนจนเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะสุดท้ายของการพัฒนาเซลล์ไปเป็นเยื่อบุผิว จึงจะมีการแปลรหัสเกิดขึ้น ดังนั้นการควบคุมการแสดงออกของยีน L1 น่าจะถูกควบคุมในระดับ post-transcription หรือในระดับ translation ซึ่งกลไกการยับยั้งและการกระตุ้นของ LRE ในการควบคุมการแสดงออกของยีน L1 ยังไม่ทราบแน่ชัด



ที่มา : Spriggs และ Laimins (2017) และ Lowy และ Schiller (2006)

รูปที่ 1 โครงสร้างจีโนม (บน) และวงจรชีวิตของ Papillomavirus ในเยื่อหุ้มเซลล์ (epithelial cell) (ล่าง) โดย E คือ early gene, L คือ late gene, URR คือ upstream regulatory region, P97 คือ early promoter, P742 คือ late promoter, และ poly A คือ polyadenylation site

งานวิจัยที่มีการดำเนินทั่วโลกเพื่อค้นหาวิธีในการรักษาและป้องกันผู้ติดเชื้อ papillomaviruses เพื่อไม่ให้เกิดการพัฒนาของเซลล์มะเร็งส่วนมากมุ่งเน้นที่ยีน E6 และ E7 ใน high risk types ซึ่งเป็นไวรัสที่พบการพัฒนาของโรคมะเร็งในผู้ติดเชื้อ (Hengstermann และคณะ, 2001; Mantovani และ Banks, 2001; Giarre และคณะ, 2001) เนื่องจากโปรตีนทั้งสองมีปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับโปรตีนของเซลล์ p53 และ pRB ตามลำดับ ทั้ง p53 และ pRb มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการดำเนินของวัฏจักรของเซลล์ (cell cycle) และโปรแกรมการตายของเซลล์ในภาวะไม่ปกติ (cell death programme) (Wu และ Levine, 1994; Harrington และคณะ, 1998) ในขณะที่มีวิจัยจำนวนมากดำเนินงานอย่างต่อเนื่องเป็นเวลายาวนานแต่ยังไม่มีวิวัฒนาการพัฒนาทางด้านไวรัสและรักษาขึ้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าการพัฒนาของเซลล์ไปเป็นมะเร็งนั้นอาจเกี่ยวข้องกับกลไกอื่นด้วยนอกเหนือจากปฏิสัมพันธ์ระหว่าง E6 และ E7 กับโปรตีนของโฮสต์ จากความจริงที่ว่ายังไม่เคยมีรายงานตรวจพบอนุภาคไวรัสในเซลล์มะเร็งที่มีการติดเชื้อ HPV หรืออีกนัยหนึ่งคือในเซลล์มะเร็งที่มีการติดเชื้อไวรัสจะหยุดการแสดงออกของแคปซิดยีนหรือยีน L1 ทั้งที่ยีน L1 ยังสมบูรณ์อยู่และจุดแทรกตัวของจีโนมไวรัสเข้าสู่จีโนมโฮสต์มักเกิดขึ้นในบริเวณยีน E2 เป็นส่วนใหญ่ (Pater และ Pater, 1985; Jeon และคณะ,

1995) ทำให้มีการตั้งสมมุติฐานว่าการพัฒนาของเซลล์ติดเชื้อ HPV ไปเป็นมะเร็งนั้นอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีน L1

งานวิจัยเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของ L1 gene โดย late UTR element นั้นมีมากใน HPV-16 (element ขนาด 79 bp) ที่พบ interaction กับโปรตีนของโฮสต์คือ U1 snRNP, U1 70K, U1A, hnRNP A1, HuR, CstF64, U2AF65, และ SF2/ASF (Koffa และคณะ, 2000; McPhillips และคณะ, 2004; Cumming และคณะ, 2008; Cheunim และคณะ, 2008) โดยโปรตีน SF2/ASF ซึ่งทำหน้าที่เป็น splicing factors ถูกสันนิษฐานว่าจะเป็นหนึ่งใน key protein ที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อการควบคุมการแสดงออกของ inhibitory RNA element นอกจาก HPV-16 แล้วยังมีการศึกษาใน high risk type อีกชนิดคือ HPV-31 (Cumming และคณะ, 2002) โดยพบว่า inhibitory RNA element มีขนาดยาวกว่าของ HPV-16 คือมีขนาด 101 bp และมีโปรตีนของโฮสต์บางส่วนที่ interact กับ element คล้ายกับของ HPV-16

สำหรับการศึกษถึงการควบคุมการแสดงออกของ late gene ใน PVs ชนิดอื่นนั้นที่รู้จักกันมากคือใน bovine papillomaviruse type 1 (BPV-1) โดย Gunderson และคณะ (1998) พบว่า U1 70K ซึ่งเป็น subunit ของ U1 snRNP ซึ่งเป็น splicing factor มีส่วนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของ late gene ของไวรัสโดยโปรตีนชนิดนี้จะ interact กับ inhibitory RNA element ที่อยู่ก่อนหน้า polyadenylation site แล้วส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ poly (A) polymerase (PAP) ทำให้เกิดการยับยั้งขั้นตอนการเติม poly A tail ให้แก่สายอาร์เอ็นเอส่งผลให้เกิดการย่อยสลายสายอาร์เอ็นเอเนื่องมาจากสาย mRNA นี้ผ่านกระบวนการตัดแปลงสายที่ยังไม่สมบูรณ์ จึงไม่มีการสังเคราะห์โปรตีนในที่สุด

จากการศึกษาของผู้วิจัยก่อนหน้าซึ่งได้รับทุนอุดหนุนวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2556 โครงการวิจัยต่อเนื่อง 2 ปี ร่วมกับทีมวิจัยของ Professor Dr. Sheila Graham ใน University of Glasgow ประเทศสหราชอาณาจักร ที่ผู้วิจัยดำเนินงานร่วมตั้งตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 เป็นต้นมา ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมการแสดงออกของ late 3'UTR ในจีโนมของ PVs 7 ไทป์ได้แก่ HPV-6, -11, -16, -31, BPV-1, -3, และ -4 ผลการทดลองพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าวของจีโนมทั้ง 7 ไทป์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *beta-galactosidase* หรือ *lac Z* ซึ่งเป็น reporter gene บน pSV ได้ทั้งระดับอาร์เอ็นเอและระดับโปรตีนในระดับที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาผลในภาพรวมผู้วิจัยพบว่าไวรัสแต่ละไทป์มีลักษณะการควบคุมการแสดงออกในระดับย่อยที่แตกต่างกันกล่าวคือ HPV-16 และ -31 ซึ่งเป็น high-risk types มีการควบคุมการแสดงออกในระดับสูงทั้งส่วนของอาร์เอ็นเอและโปรตีน สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 3'UTR ของไวรัสไทป์อื่นมีการควบคุมการแสดงออกในสองระดับที่ไม่สอดคล้องกัน เช่น BPV-1 มีการควบคุมการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอที่สูงแต่มีการควบคุมต่ำในระดับโปรตีน ในขณะที่ไทป์ที่เหลือมีการควบคุมการแสดงออกของยีนในลักษณะตรงกันข้ามกับของ BPV-1 บรรดาไวรัสทั้ง 7 ไทป์นี้ มี HPV-16, และ BPV-1 ที่มีผู้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนหลักที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ L1 gene หรือที่เรียกกันว่า late

regulatory element (LRE) เป็นอย่างดี (Kennedy และคณะ, 1990; Furth และ Baker, 1991) และพบว่าโปรตีนที่มีอิทธิพลหลักต่อการทำงานในของ LRE ของทั้งสองไทป์เป็นโปรตีนคนละชนิดกัน (U1 A สำหรับ BPV-1 และ SF2/ASF สำหรับ HPV-16) แต่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอน splicing เหมือนกัน จากข้อเท็จจริงนี้ทำให้สันนิษฐานว่ากลไกการทำงานของ element ในไวรัสแต่ละไทป์มีความแตกต่างกันในรายละเอียดจึงจำเป็นต้องรวบรวมข้อมูลให้มากขึ้นเพื่อใช้ประกอบการสร้างโมเดลของกลไกการควบคุมการแสดงออกของแคปซิดไวรัส นอกจากนี้การศึกษา LRE ที่ผ่านมามักเป็นการศึกษาใน HPV โดยเฉพาะ high risk types เพื่อให้ได้ข้อมูลที่หลากหลายงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ใน BPV-3 ที่จัดว่ามีโฮสต์เป็นวัวซึ่งแตกต่างกับ HPV และจัดว่าเป็น low risk types หรือไวรัสไทป์ที่ก่อให้เกิดหูดหรือเนื้องอกโดยงานวิจัยนี้เป็นการต่อยอดจากงานวิจัยที่ได้รับทุนงบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2555-2556 (โครงการวิจัย 2 ปี) ซึ่งผู้วิจัยทราบช่วงของจีโนมที่คาดว่ามีส่วน element อยู่ในงานวิจัยนี้จะเป็นการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แน่นอนของชิ้นส่วน element นี้ เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจะทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง element ของ BPV-3 กับโปรตีนของโฮสต์ว่ามีโปรตีนชนิดใดบ้าง ก่อนที่จะนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลจาก HPVs ในกลุ่ม high risk types ที่มีการศึกษามาก่อนหน้าผลที่ได้จะนำไปสู่บทสรุปถึงกลไกหลักที่กระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของเซลล์มะเร็งในที่สุด

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน (element) ในบริเวณ late 3'untranslated region ของจีโนม bovine papillomavirus ไทป์ 3 (BPV-3)
2. เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง cellular proteins ของ HeLa cell กับชิ้นส่วน element ของ BPV-3

สมมติฐานของการศึกษา

เนื่องจากว่าชิ้นส่วน element ในไวรัสแต่ละสายพันธุ์มีลำดับเบสที่ต่างกันซึ่งน่าจะส่งผลต่อกลไกและประสิทธิภาพของการทำงานที่ต่างกันด้วย

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Agarose	Gibco
Ampicillin	Gibco
Absolute ethanol	Merck
Bacteriological Agar	Himedia
Bromophenol blue	Fluka
Calcium Chloride (CaCl ₂)	Fluka
Chloroform (CHCl ₃)	Lab Scan
Deoxynucleotide-5'-triphosphate (dNTP)	Fermentas
Ethidium bromide	Invitrogen
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	BDH, UK
Glacial acetic acid (CH ₃ COOH)	Anala R
Glycerol	Invitrogen
Hydrochloric acid (HCl)	Merck
Isoamyl alcohol	Merck
Isopropyl thiogalactosidase (IPTG)	Invitrogen
Lipofectamine®2000	Invitrogen
Magnesium Chloride	Criterion
N,N-Dimethylformamide (DMSO)	Fluka
O-nitrophenyl- β-D-galactopyranoside (ONPG)	Invitrogen
Phenol	AMRESCO
Potassium chloride (KCl)	Lab Scan
Sodium acetate	Lab Scan
Sodium chloride (NaCl)	Lab Scan
Sodium dodecyl sulfate (SDS, C ₁₂ H ₂₅ NaSO ₄)	Invitrogen
Sodium hydroxide (NaOH)	Lab Scan
Tryptone	Himedia
Tris base	Lab Scan
Tris-HCl	Lab Scan
Yeast extract	Himedia

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal)

Invitrogen

เอนไซม์

DNase I

RNase A

Taq DNA Polymerase

T4 DNA ligase

BamHI

Sall

PstI

บริษัทผู้ผลิต

Promega

Invitrogen

Vivantis

BioLab

BioLab

BioLab

BioLab

เครื่องมือ/อุปกรณ์

ตู้บเพาะเชื้อ

ตู้เลี้ยงเซลล์แบบใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

เครื่องนึ่งทำลายเชื้อ

ตู้แช่แข็ง รุ่น SF 991

ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 5415

ตู้ปราศจากเชื้อลามิनाโพลีว รุ่น BCM-841w

เครื่องชั่งละเอียดแบบดิจิตอล รุ่น AC-210s

เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส รุ่น 410A

กล้องจุลทรรศน์แบบอินเวอร์ท รุ่น TMS

กล้องจุลทรรศน์อินเวอร์ทแบบฟลูออเรสเซนส์ รุ่น FLoid™ Cell

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

Mastercycler รุ่น nexus gradient

ชุดถ่ายภาพเจลภายใต้แสง UV

ปิเปต

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Nano Drop 2000

Heat block

ยี่ห้อ/บริษัทผู้ผลิต

Memmert, Germany

Thermo scientific

Hirayama, Japan

Sanyo

Thermo scientific

Eppendorf, Germany

Air Tech, Japan

Sartorius, Germany

Orion, Germany

Nikon, Japan

Thermo scientific

Eppendorf

Eppendorf

BIO-RAD, USA

GILSON, USA

Eppendorf

Labnet, USA

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง (สรรทิพย์ กองจร, 2555; สังเคราะห์โดยบริษัท ยูทูไบโอ จำกัด)

lac Z primer Forward primer: 5' GTT GCA GTG CAC GGC AGA TAC ACT TGC TGA 3'

Reverse primer: 5' GCC ACT GGT GTG GGC CAT AAT TCA ATT CGC 3'

GFP primer Forward primer: 5' GCC CAT CCT GGT CGA GCT GG 3'
Reverse primer: 5' GTG CCC CAG GAT GTT GCC GTC 3'

ชุดทดสอบสำเร็จรูป

ชุดสกัดพลาสมิด DNA GF-1 Plasmid DNA Extraction kit (Vivantis, Malaysia)
ชุดสกัด DNA ออกจากเจล GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel) (Vivantis, Malaysia)
ชุดสังเคราะห์ iScript™ cDNA Synthesis kit (BioRad, USA)
ชุดวัดสมรรถนะเอนไซม์ β -Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer (Promega, USA)

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ

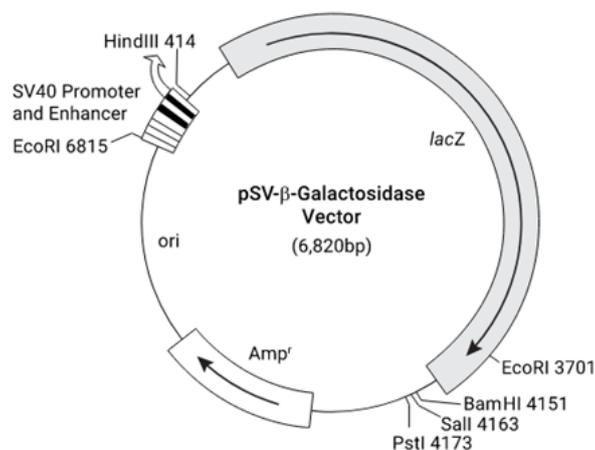
HeLa continuous cell line เป็นเซลล์มะเร็งเรื้องรังปากมดลูก (aggressive cervical cancer) มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เนื้องอกมะเร็งเรื้องรังปากมดลูกของ Henrietta Lacks ซึ่งเสียชีวิตด้วยโรคมะเร็งในปี ค.ศ. 1951

เชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด

พลาสมิด

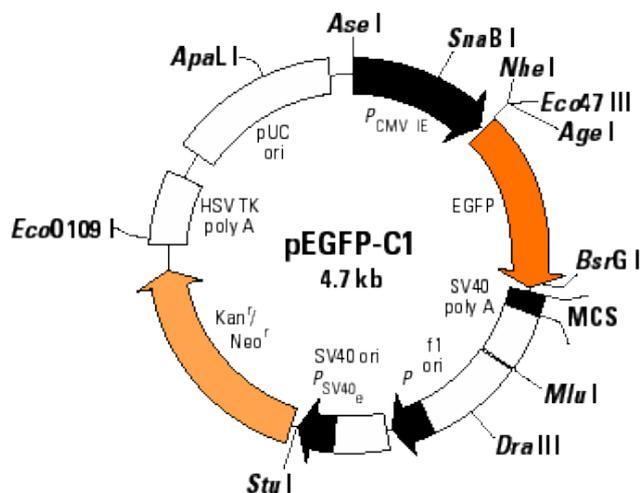
- pSV ซึ่งมีข้อมูลลำดับเบสของยีน *beta-galactosidase* (*lac Z*) และโปรโมเตอร์ SV40 ควบคุมการแสดงออกของยีน *lac Z* และต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แผนที่ของ pSV beta-galactosidase

ที่มา: <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Promega/tb094.pdf>

- pEGFP ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ SV40 ควบคุมการแสดงออกของยีน *green fluorescence protein* และยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกานาไมซิน (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แผนที่ของ pEGFP ซึ่งมียีน *green fluorescence protein* (GFP)

ที่มา : http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pEGFP_C1_map.pdf

การออกแบบไพรเมอร์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน late 3' UTR ของ BPV-3

ทำการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Bovine papillomavirus type 3 ใน Genbank เว็บไซต์ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Accession no. AF486184.1) และใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดย forward primer แต่ละอันจะถูกออกแบบให้มีการเลื่อนลำดับเบสเข้าไปทาง 3' ส่งผลให้ลำดับเบสด้าน 5' จะถูก delete ออกทีละส่วนตามที่ต้องการ เมื่อใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดชิ้นเล็กลงตามลำดับ ในไพรเมอร์แต่ละสายมีการเติม restriction site ของเอนไซม์ *Bam*HI (GGATCC) ในด้าน 5' ของ forward primer และของเอนไซม์ *Pst*I (CTGCAG) ในส่วน reverse primer (ตารางที่ 1)

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ทำโดยเตรียม reaction mixture ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ 2.5 μ l ของ 10X Buffer (NH₄)₂SO₄, 0.5 μ l ของ 10mM dNTP mix, 0.5 μ l ของ forward Primer (10 μ M), 0.5 μ l ของ reverse Primer (10 μ M), 0.4 μ l ของ *Taq* DNA polymerase, 1.5 μ l ของ 25 mM MgCl₂ และ DNA template ปรับปริมาณด้วย DNase-RNase free water ให้ครบ 25 ไมโครลิตร

ทำการผสมสารแล้วเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง DNA thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรมที่ 1 (initial denaturation)	ที่ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที	1 รอบ
โปรแกรมที่ 2 (denaturation)	ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(annealing)	ที่ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
(extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
	30 รอบ	
โปรแกรมที่ 3 (extension)	ที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที	
	รักษาที่ 4 องศาเซลเซียส	

ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรสเจล เปรียบเทียบขนาดของ DNA กับ 100 bp DNA ladder marker

การเตรียมพลาสมิดเพื่อใช้ในการศึกษาโดยการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย (transformation)

การเชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์โดยใช้อัตราส่วน 1 : 3 (vector : insert) โดยคำนวณตามคู่มือของ NEB (NEB, สหราชอาณาจักร)

$$50 \text{ ng vector} \times 0.5 \text{ kb insert} \times 3 = 25 \text{ ng of the PCR product}$$

พลาสมิดที่ใช้ในการเชื่อมต่อชิ้นส่วน 3'UTR ของ BPV-3 คือ pSV-beta-galactosidase ที่ไม่มีส่วนของ 3'untranslated region ซึ่งเป็นบริเวณที่ประกอบด้วย poly A signal และ poly A site

ทำการเตรียมปฏิกิริยาในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ซึ่งประกอบไปด้วย 25 ng ของชิ้น insert, 10x T4 DNA Ligase Buffer (containing ATP, BSA) 1 μ l, 50 ng ของ pSV-beta-galactosidase, 0.5 μ l T4 DNA ligase ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 ไมโครลิตร บ่มข้ามคืนที่ 16°C ก่อนนำไปถ่ายโอนเข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 α โดยใช้วิธี heat shock เพื่อเตรียมปริมาณพลาสมิดให้ได้จำนวนมากก่อนใช้ในขั้นตอนการถ่ายโอนเข้าสู่ HeLa cells ต่อไป

การถ่ายโอน recombinant plasmid เข้าสู่ HeLa cell (co-transfection)

การถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ HeLa cell โดยใช้ Lipofectamine®2000 (Invitrogen, USA) ดำเนินตามคู่มือที่แนะนำ โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง pEGFP : recombinant plasmid เป็น 1.0 : 3.0 μ g/ μ l ด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, USA) หรือ DMEM ที่ไม่เติม serum ผสมให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นเติม Lipofectamine®2000 8 μ l ตั้งทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ DNA และ Lipofectamine®2000 จับตัวกันเป็น complexes เติม DNA-Lipofectamine®2000 complexes ลงในเซลล์ HeLa ปริมาณ 5×10^5 cell/ml ใน 6-well plate เขย่าเบา ๆ ให้ DNA-Lipofectamine®2000 complexes เคลือบเซลล์ทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ หลังครบ 6 ชั่วโมงดูด complex ออกแล้วเติม medium ที่มี 10% fetal bovine serum บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ทำการตรวจสอบผลโดยสังเกตการเรืองแสงของ green fluorescent protein (GFP) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์

การวัดสมรรถนะเอนไซม์ beta-galactosidase

หลังจากถ่ายโอนพลาสมิดแล้วเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย PBS 2-3 ครั้ง ก่อนเติมสารละลาย 1x Reporter Lysis Buffer (Promega, USA) แกว่งซ้ำๆ ให้สารละลายเคลือบเซลล์ทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เมื่อเซลล์ส่วนใหญ่หลุดออกจากพื้นผิวจึงถ่ายสารละลายเซลล์ใส่ในหลอดใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูง 2 นาที เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียสจนกว่าต้องการใช้

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ดำเนินการโดยเจือจางส่วนของสารละลายเซลล์ด้วย 1x Reporter Lysis Buffer ที่อัตราส่วน 2:1 (cell lysate : 1x Reporter Lysis Buffer) เติม assay 2x buffer (Promega, USA) บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืนหรือจนกว่าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม 1M sodium carbonate (Promega, USA) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร บันทึกผลที่ได้แล้วนำค่าไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์

การเพิ่มขึ้นส่วนดีเอ็นเอจากสาย mRNA ด้วยวิธี reverse transcription PCR (RT-PCR)

นำ HeLa cell ที่ผ่านการเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด มาสกัด total RNA โดยใช้ TRIzol reagent (Invitrogen, USA) แล้วย่อยสลาย DNA ด้วย RQ1 RNase-free DNase (Promega, USA) โดยผสมส่วนประกอบดังนี้ RNA template (1 µg), 1 µl 10X RQ DNase buffer, 1 µl RQ DNase (1U/µl) ปรับปริมาตรด้วย Nuclease-free water เป็น 10 µl บ่มที่ 37°C 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย RQ DNase stop solution 1 µl บ่มที่ 65°C 10 นาที ก่อนนำไปสังเคราะห์ cDNA โดย reverse transcription

การสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ iScript™ cDNA synthesis kit (BioRad, USA) ทำโดยผสมสารใน microcentrifuge ดังนี้ 4 µl 5xiScript reaction mix, 1 µl iScript reverse transcriptase, 1 µl RNA template (1 µg), Nuclease-free water 14 µl มีปริมาตรรวม 20 µl ก่อนใส่ในเครื่อง DNA thermal cycle ตั้งโปรแกรมดังนี้ priming 1 รอบ ที่ 25°C 5 นาที และ Reverse transcription 1 รอบที่ 46°C 20 นาที ตามด้วย RT inactivation 1 รอบ ที่ 95°C 1 นาที นำผลิตภัณฑ์ใช้เป็น template สำหรับเทคนิค PCR

การทำ PCR โดยใช้ LacZ primer และ GFP primer โดยผสมสารดังนี้ 2.5 µl 10x PCR buffer+MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTP mix, 0.5 µl forward primer (10µM), 0.5 µl reverse primer (10 µM), 0.4 µl Taq DNA polymerase (5U/µl), 1 µl DNA template (100 ng/µl), DNase-RNase free water 19.6 µl มีปริมาตรรวม 25 µl ใช้โปรแกรมในการทำ PCR ดังนี้ Initiation denaturation 1 รอบ ที่ 95°C 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ denaturation ที่ 95°C 30 วินาที,

annealing ที่ 60°C 30 วินาที, extension ที่ 72°C 1 นาที และ Final extension 1 รอบที่ 72°C 7 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบน 1 % อะกาโรสเจล เปรียบเทียบขนาดของ DNA กับ DNA ladder marker

การคำนวณประสิทธิภาพของชิ้นส่วน 3' UTR ของ BPV-3

ทำการวัดความเข้มของแบนผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการแยกขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis โดยโปรแกรม GelQuantNET จาก <http://biochemlabsolutions.com/GelQuantNET.html> (free programme) คำนวณหาประสิทธิภาพของชิ้นส่วน 3' UTR ใน papillomavirus ดังนี้

Control (ความเข้มของแบนของยีน *lac Z* / ความเข้มของแบนของยีน GFP)
= X (ค่าที่ได้ เทียบเป็น 100)

BPV-3 (ความเข้มของแบนของยีน *lac Z* / ความเข้มของแบนของยีน GFP)
= Y

ดังนั้น ประสิทธิภาพของชิ้นส่วน 3' UTR ใน BPV-3 = $(Y*100) / X$

การวิเคราะห์ binding sites ของ cellular protein บนชิ้นส่วน 3' UTR ของ BPV-3

การวิเคราะห์ binding sites ของ cellular proteins บนชิ้นส่วน 3' UTR ของ BPV-3 โดยใช้โปรแกรม RBPmap version 1.1 (<http://rbpmap.technion.ac.il/>) ตั้งค่าในโปรแกรมโดยเลือกค่าตั้งต้นที่ High stringency

บทที่ 3

ผลการทดลอง

การเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ late 3'UTR ของ BPV-3 ขนาดต่างๆ

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BPV-3 จากฐานข้อมูล Genbank (Accession no. AF486184.1) ทั้งนี้ late 3'UTR ของ BPV-3 มี stop codon คือ TAG และมี poly A signal ทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ในการศึกษาทำการออกแบบ forward primers ทั้งหมด 8 สาย มีตำแหน่งครอบคลุมในส่วน 3' ของ L1 open reading frame (อยู่เหนือ stop codon 207 เบส) และสิ้นสุดที่ลำดับเบสหลัง poly A signal ตำแหน่งสุดท้ายอยู่ 121 เบส ซึ่งมีรายละเอียดของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 1 ทั้งนี้ forward primer แต่ละสายถูกออกแบบให้มีการเลื่อนลำดับเบสเข้าไปทาง 3' โดยมีลำดับเบสส่วน 5' ถูกลบออกไปตามที่ต้องการ (รูปที่ 4) เมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ไปเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่มีขนาดขึ้นตามที่กำหนดไว้ ดังแสดงในรูปที่ 5

Forward Primer 3'UTR BPV-3

```

6661 tgcaactgaagacccttatgcaaaagtacagatatttgggatgtggacctta cagaacgatt
6721 ttctatgaattagatcagttatccttaggtagaaagttcttatttcaaa taggaaagaa
6781 aagcagaggaatcaaacggtctgcaccgaaagcggtcacttttgaagtaacagccgcaag
6841 caaaaaggccccaagcgtaagcgtaagaa tgtctagagc caaaactatg agcaatatgt
6901 acatcaacaacaagcattgacaagaataaattcatgtaa gcctttgtga atcttgcaaa
6961 caaatgctgatctgagcca ccttcttatcttccttgatattgttacc cctcccaaa
7021 tattctatgcaaacggtatccctgattgaa cacctgcatgcttaataaaccttaaagtat
7081 gcagaggcacacctaagtaa acacctttaagggtatttgctccaaaaaa gctgcaagct
7141 gccaaagccaa gctataaaaa agtactcaaa acacatactggcagtacgccccggcaagc

```

Reverse Primer 3'UTR BPV-3

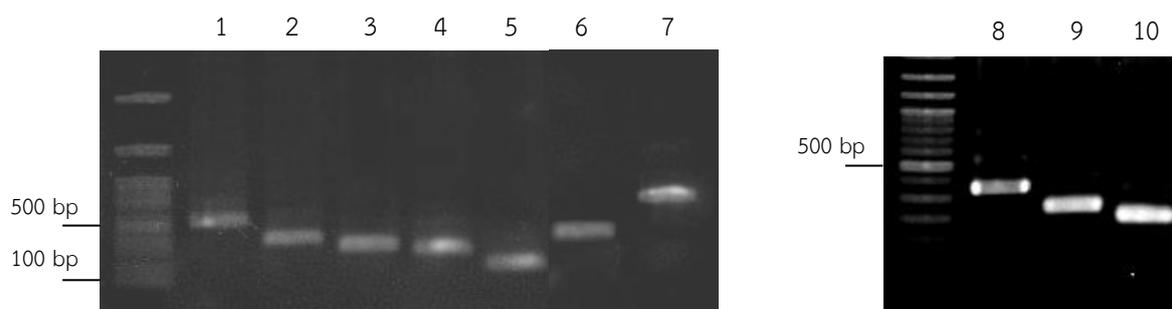
* Poly(A) signal

รูปที่ 4 แผนผังแสดงตำแหน่งของ forward primers และ reverse primer บน late 3'UTR ของ BPV-3 ที่ออกแบบในการศึกษา

ตารางที่ 1 รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบและใช้ในการศึกษานี้

Primer Name	ขนาดของ PCR product	Restriction site	Genomic location	Sequence
BPV-3 (forward)	533 bp	<i>Bam</i> HI	6668-6690	TAT <u>GGATCC</u> GCAGCCGCAGCAAAAAGGCG
B3/5 (forward)	370 bp	<i>Bam</i> HI	6831-6850	TAT <u>GGATCC</u> GCAGCCGCAGCAAAAAGGCG
B3/7 (forward)	313 bp	<i>Bam</i> HI	6856-6874	TAT <u>GGATCC</u> ATGAGCAATATGTACATCAACAA
B3/9 (forward)	264 bp	<i>Bam</i> HI	6926-6958	TAT <u>GGATCC</u> AATAAATTCATGTAAGCCTTTGTGAATCTTGCC
B3/12 (forward)	160 bp	<i>Bam</i> HI	7005-7021	TAT <u>GGATCC</u> CCTGGTTGAACACCTGCATGCTT
B3F/1 (forward)	340 bp	<i>Bam</i> HI	6851-6871	TAT <u>GGATCC</u> CCAAAGCGTAGGCGTAAGAAT
B3F/2 (forward)	227 bp	<i>Bam</i> HI	6964-6983	TAT <u>GGATCC</u> AATGCTGATCTGAGCCACCC
B3F/3 (forward)	171 bp	<i>Bam</i> HI	7020-7039	TAT <u>GGATCC</u> ATATTCGTGCAAAGCGGTGC
BPV-3 (reverse)	-	<i>Pst</i> I	7172-7190	<u>CTGCAG</u> GCAGCCGCAGCAAAAAGGCG

หมายเหตุ ลำดับเบสที่ขีดเส้นใต้คือลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ



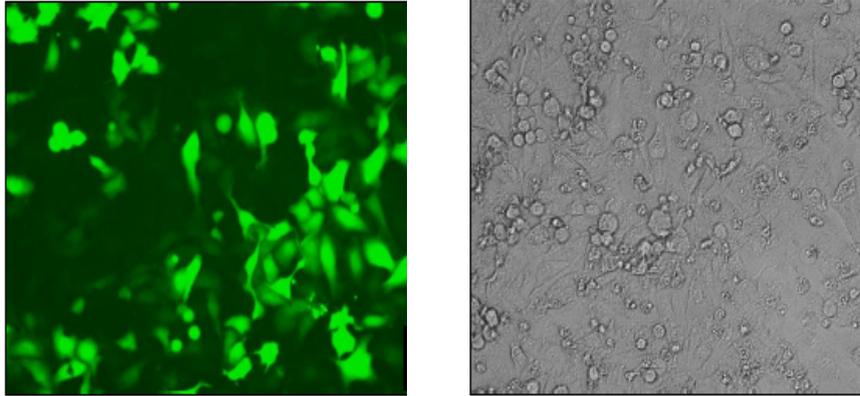
รูปที่ 5 ชิ้นส่วน late 3'UTR ของ BPV-3 ขนาดต่างๆ จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในการศึกษานี้บน 1% agarose gel ด้วยเทคนิค electrophoresis โดย lane 1 : forward primer BPV-3 3'UTR (533 bp), lane 2 : primer B3/5 (370 bp), lane 3 : primer B3/7 (313 bp), lane 4 : primer B3/9 (264 bp), lane 5 : primer B3/12 (160 bp), lane 6 : late 3'UTR ของ BPV-1 (440 bp), lane 7 : late 3'UTR ของ HPV-16 (656 bp), lane 8 : primer B3F/1 (340 bp), lane 9 : primer B3F/2 (227 bp), lane 10 : primer B3F/3 (171 bp)

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมได้ถูกส่งรับบริการเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบส (ภาคผนวก) ก่อนนำไปใช้ในการแทรกชิ้นส่วนเข้าสู่ pSV แทนที่บริเวณ 3'UTR ของยีน *beta-galactosidase* (รูปที่ 2 หน้า 8)

อิทธิพลของ late 3'UTR ของ BPV-3 ขนาดต่างๆ ต่อการแสดงออกของยีน *lac Z* ในระดับ mRNA

การศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *lac Z* ด้วย late 3'UTR ของ BPV-3 ทำโดยการถ่ายโอน pSV + late 3'UTR ของ BPV-3 ชิ้นต่างๆ เข้าสู่ HeLa cell (co-transfection) พร้อมกับ pEGFP ทั้งนี้ pEGFP มี poly A signal และ poly A site อยู่ภายใน 3'UTR ของตัวมันเองจึงมีการแสดงออกของยีนที่เป็นอิสระจากอิทธิพลของ late 3'UTR ของไวรัส เมื่อมีการแสดงออกของยีนจะได้ green fluorescence protein (GFP) ที่เรืองแสงสีเขียวภายใต้ช่วงความยาวคลื่น 488/510 nm จาก การปรับสภาพที่เหมาะสมของ transfection พบว่าที่อัตราส่วนระหว่าง pSV + insert หรือ pSV positive control : pEGFP เป็น 3.0 μ g : 1.0 μ g (รูปที่ 6) จึงใช้เป็นตัวควบคุมสำหรับประสิทธิภาพของ transfection ในขณะที่ pSV positive control เป็นพลาสมิดที่มี 3'UTR ต่อจากยีน *lac Z* ซึ่งไม่มี controlling element ใดๆ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงถูกใช้เป็น positive control ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการแสดงออกยีน *lac Z* กับ pSV + late 3'UTR ของ BPV-3 หลังจากถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ HeLa cell และทำการบ่มเซลล์ที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์ถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดย 1 ส่วนนำมาสกัด total RNA เพื่อใช้ตรวจสอบปริมาณ mRNA ของยีน *lac Z* โดยเทคนิค reverse transcription PCR (RT-PCR) ก่อนทำการแยกขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis และย้อมด้วย Ethidium Bromide เพื่อศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้ เซลล์ส่วนที่เหลือถูกนำไปเตรียม cell lysate

ผลการตรวจสอบปริมาณ mRNA ของยีน *lac Z* ใน pSV ที่มีชิ้นส่วน 3'UTR ของไวรัสขนาดต่างๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR ดังแสดงในรูปที่ 7 เมื่อวิเคราะห์ความเข้มแบน (band intensity) ด้วยโปรแกรม GelQuantNET (http://biochemlab_solutions.com/GelQuantNET.html) พบว่าความเข้มแบนผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน GFP มีค่าใกล้เคียงกันในทุกการทดลอง จึงสรุปได้ว่าประสิทธิภาพของ transfection หรือพลาสมิดที่มีการถ่ายโอนเข้าสู่ HeLa cell มีปริมาณใกล้เคียงกันในทุกการทดลอง เมื่อพิจารณาความเข้มแบนของผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากยีน *lac Z* พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่าง pSV ที่มี insert ชิ้นต่างๆ จึงสรุปได้ว่าชิ้นส่วน 3'UTR ที่มีการสอดแทรกในพลาสมิดมีอิทธิพลในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lac Z* ทำให้มีการแสดงออกในระดับต่างกัน (ตารางที่ 2)



รูปที่ 6 การเรืองแสงของ GFP ของ HeLa cell หลังจาก co-transfection ด้วย pSV positive control และ pEGFP ที่อัตราส่วน 3.0 μg : 1.0 μg และบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยแสดงการเรืองแสงจาก GFP ภายในเซลล์ภายใต้แสงยูวี (ซ้าย) และ phase contrast (ขวา)

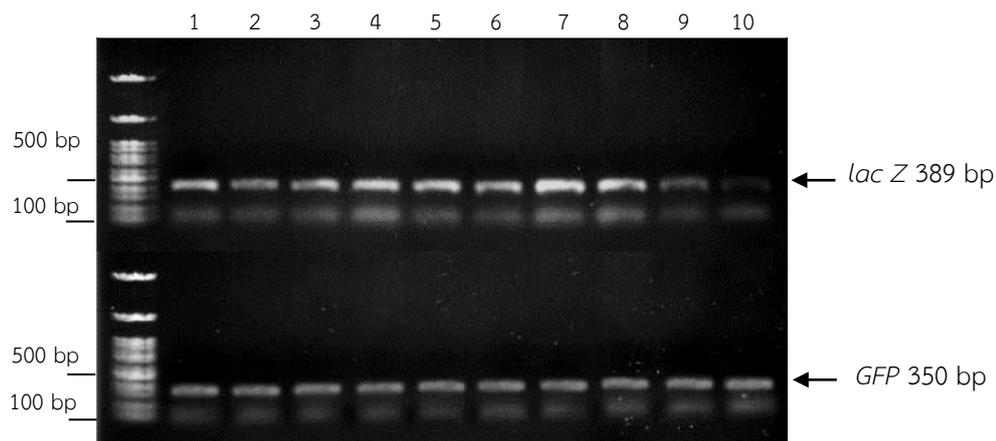
เมื่อเปรียบเทียบ relative intensity band ของ *lac Z* จากพลาสมิดที่มีชิ้นส่วน 3'UTR จากไวรัสกับ pSV positive control (ตารางที่ 2 และรูปที่ 8) พบว่า pSV+HPV-16 late 3'UTR มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *lac Z* ในระดับ RNA มากที่สุดมีค่า inhibition fold ของ *lac Z* mRNA expression เปรียบเทียบกับ pSV positive control เป็น 0.95 เท่า รองลงมาคือ pSV+BPV-1 3'UTR มีค่า inhibition fold เป็น 0.76 เท่าของ pSV control สำหรับ late 3'UTR ของ BPV-3 มีการแสดงออกของ *lac Z* mRNA เป็น 3 ช่วง (ตำแหน่งและรายละเอียดของไพรเมอร์ดังแสดงในรูปที่ 3 และตารางที่ 1) ดังนี้

- ช่วงนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 6668 – 7180 เป็นช่วง late 3'UTR ของ BPV-3 มีขนาด 522 เบส มีการแสดงออกของ *lac Z* mRNA **น้อยกว่า** pSV control 0.23 เท่า

- ช่วงนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 6668 - 6830 มีขนาด 163 เบส เป็นช่วง inhibitory sequences เนื่องจากเมื่อมีการลบลำดับเบสช่วงนี้ออก พบว่าการแสดงออกของ *lac Z* mRNA เพิ่มขึ้น โดยมีการแสดงออกมากกว่า pSV control เป็น 0.06 เท่า

- ช่วงลำดับเบสที่ 6831 – 6910 มีขนาด 169 เบส ซึ่งเป็นชิ้นส่วนใน pSV+B3/5, pSV+B3F/1 และ pSV+B3/7 พบว่ามีการแสดงออกของ *lac Z* mRNA ลดลง โดยมีการแสดงออกน้อยกว่า pSV control เป็น 0.06, 0.21, และ 0.37 เท่า ตามลำดับ

- ช่วงลำดับเบสที่ 6911 – 7019 มีขนาด 108 เบส เป็นชิ้นส่วนใน pSV+B3/9 และ pSV+B3F/2 เมื่อตัดลำดับเบสช่วงนี้ออกมีผลให้การแสดงออกของ *lac Z* mRNA **เพิ่มขึ้น** โดยมากกว่า pSV positive control เป็น 0.04 และ 0.10 เท่า ของ ตามลำดับ



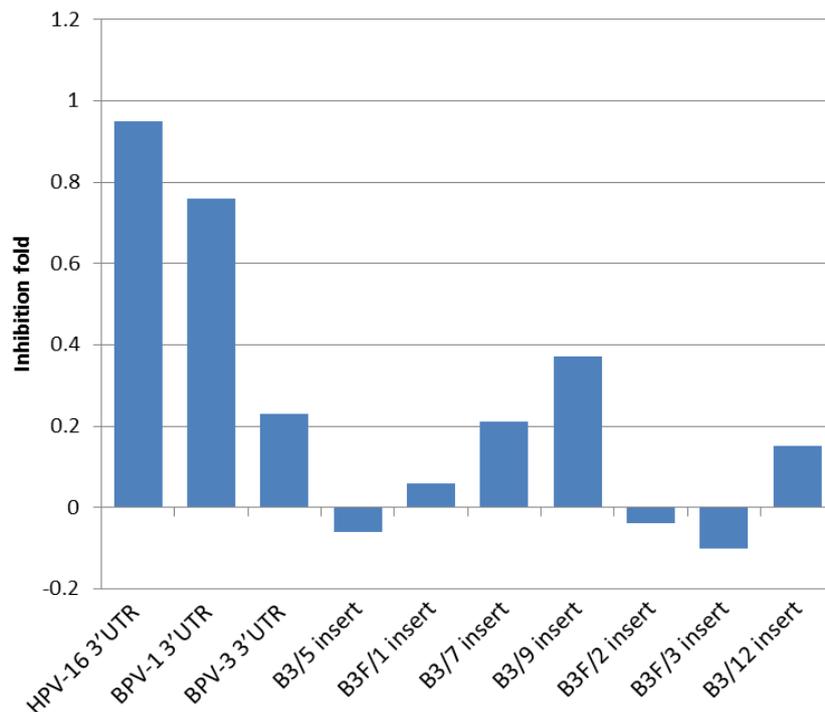
รูปที่ 7 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน lac Z ที่แสดงออกภายใต้การควบคุมของชิ้นส่วน late 3'UTR ขนาดต่างๆ ของ BPV-3 เปรียบเทียบกับยีน GFP ซึ่งเป็นตัวควบคุมประสิทธิภาพของ transfection โดย lane 1 : pSV positive control, lane 2 : pSV + BPV-3 3'UTR insert, lane 3 : pSV+B3/5 insert, lane 4 : pSV+B3F/1 insert, lane 5 : pSV+B3/7 insert, lane 6 : pSV+B3/9 insert, lane 7 : pSV B3F/2 insert, lane 8 : pSV B3F/3 insert, lane 9 pSV + late 3'UTR ของ BPV-1, lane 10 : pSV+ late 3'UTR ของ HPV-16

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความเข้มแบนผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR จากการใช้โปรแกรม GelQuantNET

พลาสมิด	Relative intensity band lac Z/GFP \pm SD	จำนวนซ้ำของ transfection (n)
pSV positive control	1.09 \pm 0.14	8
pSV+BPV-3 3'UTR	0.86 \pm 0.28	8
pSV+B3/5 insert	1.15 \pm 0.07	5
pSV+B3F/1 insert	1.03 \pm 0.18	8
pSV+B3/7 insert	0.88 \pm 0.32	8
pSV+B3/9 insert	0.72 \pm 0.28	5
pSV+B3F/2 insert	1.13 \pm 0.28	8
pSV+B3F/3 insert	1.19 \pm 0.28	5
pSV+B3/12 insert	0.94 \pm 0.22	3
pSV+BPV-1 3'UTR	0.33 \pm 0.02	2
pSV+HPV-16 3'UTR	0.14 \pm 0.03	2

- ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 7020 – 7041 มีขนาด 21 เบส เป็นชิ้นส่วนใน pSV+B3F/3 มีการแสดงออกของ *lac Z* mRNA ลดลง เป็น 0.15 เท่า เทียบกับ pSV control

จากการทดลองพบว่าการยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA จาก late 3'UTR ของ BPV-3 มีอยู่สองช่วงด้วยกันคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 6668 – 6830 และ นิวคลีโอไทด์ระหว่าง 6911 – 7019



รูปที่ 8 Inhibition fold ในการแสดงออกของ *lac Z* mRNA จาก pSV ที่มี insert ชิ้นต่างๆ เปรียบเทียบกับ pSV positive control

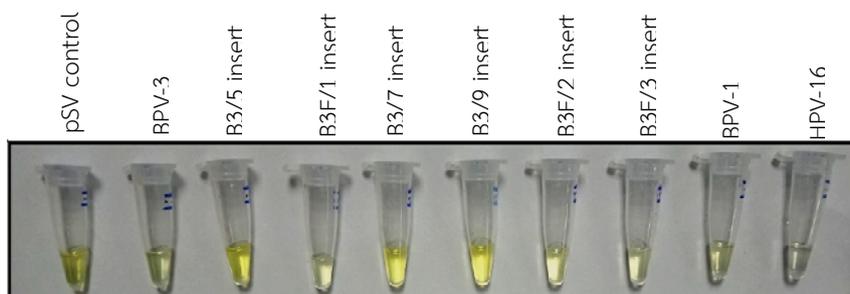
อิทธิพลของ late 3'UTR ของ BPV-3 ขนาดต่างๆ ต่อการแสดงออกของยีน *lac Z* ในระดับโปรตีน

อิทธิพลของ late 3'UTR จาก BPV-3 ต่อการแสดงออกของยีน *lac Z* ในระดับโปรตีน ดำเนินการทดลองโดยการถ่ายโอน pSV ที่มีชิ้นส่วน late 3'UTR ขนาดต่างๆ เข้าสู่ HeLa cell และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำ cell lysate มาวัดกิจกรรมเอนไซม์ beta-galactosidase ทั้งนี้กรณีที่ cell lysate มีการแสดงออกของโปรตีนมาก ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์มาก เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลืองมากส่งผลให้สารละลายมีสีเหลืองเข้ม ในทางตรงกันข้ามหากใน cell lysate ไม่มีการแสดงออกของโปรตีนต่ำส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ต่ำทำให้สารละลายเป็นสีเหลืองอ่อน

จากรูปที่ 9 พบว่าสารละลายมีความเข้มสีเหลืองที่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง cell lysate ที่มีการถ่ายโอนพลาสมิดต่างๆ เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm เพื่อวัดผลิตภัณฑ์

ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ beta-galactosidase (ตารางที่ 3) จากการเปรียบเทียบ Inhibition fold ของ late 3'UTR ระหว่างไวรัส 3 ไทป์ ได้แก่ HPV-16, BPV-1, และ BPV-3 (รูปที่ 10) พบว่า late 3'UTR ของ HPV-16 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด น้อยกว่า pSV positive control คิดเป็น 0.033 เท่า รองลงมาคือ late 3'UTR ของ BPV-1 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์น้อยกว่า pSV control คิดเป็น 0.013 เท่า และสุดท้ายคือ late 3'UTR ของ BPV-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์น้อยกว่า pSV control เป็น 0.008 เท่า เมื่อพิจารณาผลการยับยั้งการแสดงออกของ late 3'UTR ของ BPV-3 ขนาดต่างๆ สามารถแบ่งออกได้ ดังนี้

- ช่วงลำดับเบสที่ 6668 – 6830 จาก pSV BPV-3 3'UTR มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ น้อยกว่า pSV control 0.008 เท่า
- ช่วงลำดับเบสที่ 6831 – 6850 จาก pSV + B3/5 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ มากกว่า pSV control 0.008 เท่า
- ช่วงลำดับเบสที่ 6851-6887 จาก pSV + B3F/1 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ น้อยกว่า pSV control 0.014 เท่า
- ช่วงลำดับเบสที่ 6888- 6963 จาก pSV + B3/7 และ pSV + B3/9 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ มากกว่า pSV control 0.024 และ 0.033 เท่า
- ช่วงลำดับเบสที่ 6964-7040 จาก pSV + B3F/2, pSV+B3F/3, และ pSV + B3/12 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์น้อยกว่า pSV control 0.013, 0.006, และ 0.032 เท่า ตามลำดับ

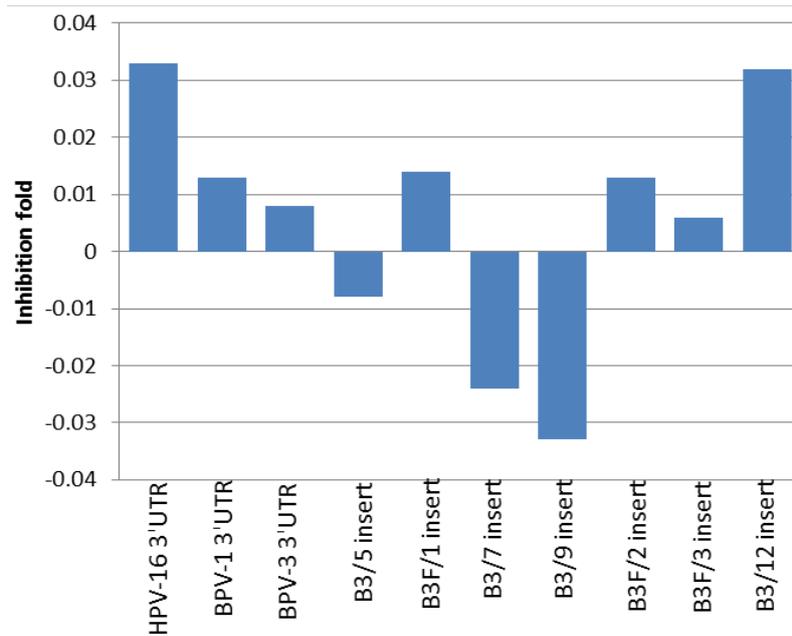


รูปที่ 9 สารละลายสีเหลืองของ cell lysate จากการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ หลังถ่ายโอน pSV ที่มี 3'UTR ของไวรัสขนาดต่างๆ

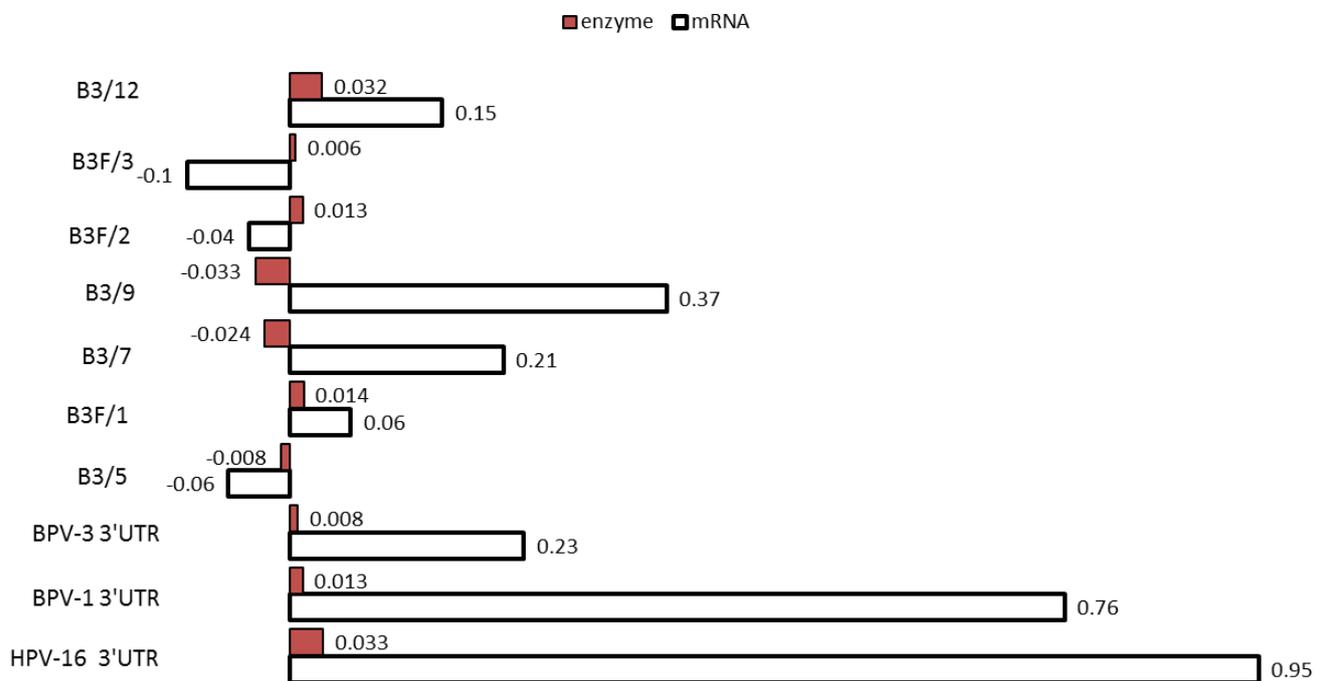
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 420 nm ของ cell lysate ที่รับถ่ายโอน pSV ที่มีชิ้นส่วน 3'UTR ของไวรัสขนาดต่างๆ ซึ่งมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ beta-galactosidase ส่งผลต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ในหลอดทดลองเมื่อมีการเติมน้ำยาจากชุดตรวจกิจกรรมเอนไซม์

พลาสมิด	Absorbance at 420 nm \pm SD	จำนวนซ้ำของ transfection (n)
pSV positive control	0.063 \pm 0.048	8
pSV+BPV-3 3'UTR	0.055 \pm 0.037	8
pSV+B3/5 insert	0.071 \pm 0.055	5
pSV+B3F/1 insert	0.049 \pm 0.032	8
pSV+B3/7 insert	0.087 \pm 0.056	8
pSV+B3/9 insert	0.096 \pm 0.047	5
pSV+B3F/2 insert	0.050 \pm 0.035	8
pSV+B3F/3 insert	0.057 \pm 0.047	5
pSV+B3/12 insert	0.031 \pm 0.047	3
pSV+BPV-1 3'UTR	0.050 \pm 0.010	2
pSV+HPV-16 3'UTR	0.030 \pm 0.024	2

เมื่อเปรียบเทียบ inhibition fold ของ late 3'UTR ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน lac Z ระหว่าง mRNA และโปรตีน (รูปที่ 11) พบว่า late 3'UTR ของไวรัสทั้งสามไทป์ มีการยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA มากกว่าระดับโปรตีน หากพิจารณา inhibition fold ของ late 3'UTR ของ BPV-3 ช่วงต่างๆ พบว่า pSV + B3/5 ซึ่งมีการแสดงออกของยีนทั้งระดับ mRNA และโปรตีน สอดคล้องกันคือมีค่าเพิ่มขึ้น เปรียบเทียบกับ pSV control คิดเป็น 0.06 และ 0.008 เท่า ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม pSV + B3/7 และ pSV + B3/9 มีการแสดงออกในระดับ mRNA ลดต่ำมาก (0.21 และ 0.37 เท่า) แต่การแสดงออกของโปรตีนมีการเพิ่มขึ้นสูงมาก (0.024 และ 0.033 เท่า) ในขณะที่ pSV + B3F/2 และ pSV + B3F/3 มีการแสดงออกในระดับ mRNA เพิ่มขึ้น (0.04 และ 0.10 เท่า) แต่กลับมีการแสดงออกระดับโปรตีนลดลง (0.013 และ 0.006 เท่า)



รูปที่ 10 Inhibition fold ของการแสดงออกของยีน *lac Z* ระดับโปรตีน ของ pSV ที่มี late 3'UTR ของ HPV-16, BPV-1, และชิ้นส่วนขนาดต่างๆ ของ late 3'UTR จาก BPV-3 เปรียบเทียบกับ pSV positive control



รูปที่ 11 Inhibition fold ของ late 3'UTR จากไวรัส 3 ไทป์ และชิ้นส่วนขนาดต่างๆ ของ late 3'UTR จาก BPV-3 เปรียบเทียบกับ pSV positive control ในระดับ mRNA และโปรตีน

การศึกษา RNA-binding protein motifs โดยการศึกษาด้าน Bioinformatics

จากการเปรียบเทียบ inhibition fold ของ late 3'UTR ส่วนต่างๆ จาก BPV-3 ในการแสดงออกของยีน *lac Z* พบว่ามีช่วงลำดับเบสที่การแสดงออกตรงกันข้ามกันระหว่าง mRNA และ โปรตีน กล่าวคือ pSV + B3/7, pSV + B3/9, pSV + B3F/2, และ pSV + B3F/3 ผู้วิจัยสันนิษฐานว่า อาจจะเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์กับโฮสต์โปรตีน เพื่อตอบคำถามนี้ผู้วิจัย ทำการศึกษา binding sites ของ RNA-binding proteins โดยใช้โปรแกรม RBPmap ที่ high stringency ผลการศึกษาพบ binding motifs ของโปรตีนทั้งหมด 33 ชนิด (ตารางที่ 4) หน้าที่ของ โปรตีนเกี่ยวข้องกับ mRNA metabolic pathway ทั้งหมด 7 ด้าน ได้แก่ 3'polyadenylation processing, mRNA translation, mRNA splicing, mRNA degradation, mRNA export, mRNA stability, และ nuclear retention โดยโปรตีนบางชนิดอาจมีหน้าที่ได้มากกว่า 1 pathway จาก โปรตีนทั้งหมด 33 ชนิด มีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ mRNA splicing มากที่สุด จำนวน 19 โปรตีน คิดเป็น 29% (รูปที่ 12) รองลงมาคือ โปรตีนทำหน้าที่ใน mRNA translation จำนวน 13 โปรตีน คิดเป็น 20% อันดับที่สาม คือโปรตีนเกี่ยวข้องกับ mRNA stability จำนวน 12 โปรตีน คิดเป็น 18% อันดับที่สี่ คือโปรตีนเกี่ยวข้องกับ mRNA export จำนวน 8 โปรตีน คิดเป็น 12% อันดับที่ยี่ห้า คือโปรตีนเกี่ยวข้องกับ mRNA degradation จำนวน 7 โปรตีน คิดเป็น 11% อันดับที่ยี่หก คือโปรตีนเกี่ยวข้องกับ 3'polyadenylation processing จำนวน 6 โปรตีน คิดเป็น 9% และ สุดท้ายคือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ nuclear retention มีจำนวน 1 โปรตีน คิดเป็น 1%

ตำแหน่ง binding site ของโปรตีนทั้ง 33 ชนิด บน late 3'UTR ของไวรัสตั้งแสดงในรูปที่ 13 จากภาพพบ binding motif ของโปรตีนจำนวนมากปรากฏอยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ช่วง ดังนี้

ช่วงที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 6740 – 6785 เป็นขึ้นส่วนจาก pSV + BPV3 3'UTR ถึง pSV + B3/5 พบ binding site ของโปรตีนจำนวน 12 ชนิด เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ mRNA splicing สูงที่สุด จำนวน 12 ชนิด และ mRNA translation รองลงมา จำนวน 8 ชนิด mRNA pathway อื่นที่พบ ได้แก่ mRNA export (5 ชนิด), mRNA stability (5 ชนิด), 3'polyadenylation processing (3 ชนิด), และ degradation (3 ชนิด)

ช่วงที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 6800 – 6935 เป็นขึ้นส่วนระหว่าง pSV + B3/7 ถึง pSV + B3/9 พบ binding site ของโปรตีนทั้งหมด 14 ชนิด โปรตีนส่วนมากเกี่ยวข้องกับ mRNA splicing และ mRNA stability พบจำนวนเท่ากันคือ 4 ชนิด รองลงมาคือโปรตีนเกี่ยวข้องกับ mRNA translation และ mRNA export จำนวนเท่ากันคือ 3 ชนิด นอกจากนี้พบ binding sites ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ 3' polyadenylation processing (2 ชนิด) และ degradation (1 ชนิด)

ตารางที่ 4 RNA-binding protein และหน้าที่ของโปรตีนที่พบ binding motif บน late 3'UTR ของ BPV-3 โดยใช้โปรแกรม RBPmap version 1.1

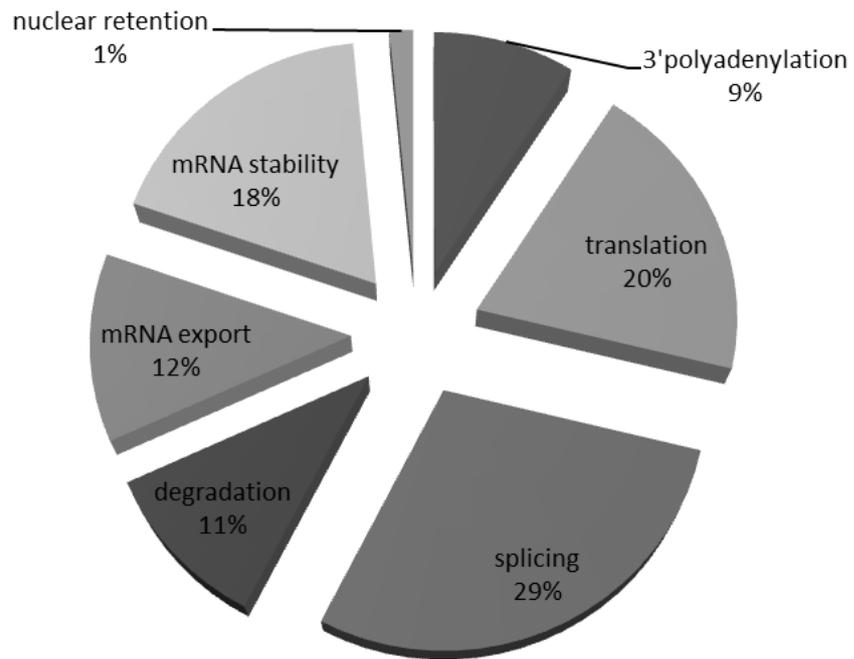
ชื่อโปรตีน	3' poly-adenylation	Translation	mRNA splicing	Degradation	mRNA export	mRNA stability	Nuclear retention
CPEB2	✓	+,-	✓				
CUG-BP			✓				
DAZAP1		+	✓		✓	✓	
hnRNPA1, A1L2, A2B1		+,-	✓		✓	✓	
hnRNPC, CL1		+	✓			✓	
hnRNPE2 (PCBP2)		✓		✓			
hnRNPI (PTBP1)		✓	+,-	✓			
hnRNP K					✓		
IGF2BP2		+			✓	✓	
KHDRBS1, 2, 3			✓				
MATR3			✓		✓	✓	✓
MBNL1			✓	✓			
MSI1		-	✓				
PABPN1	✓						
PABPC1, 3, 4, 5		+	✓	✓		✓	
RBFOX1		+	✓			✓	
RBM42			✓			✓	
RBM46				✓		✓	
RBMS3						✓	
SART3			✓				
snRPA	✓						
SRSF2			✓	✓			
SRSF3, SRSF5	✓	+	✓		✓		

ตารางที่ 5 (ต่อ)

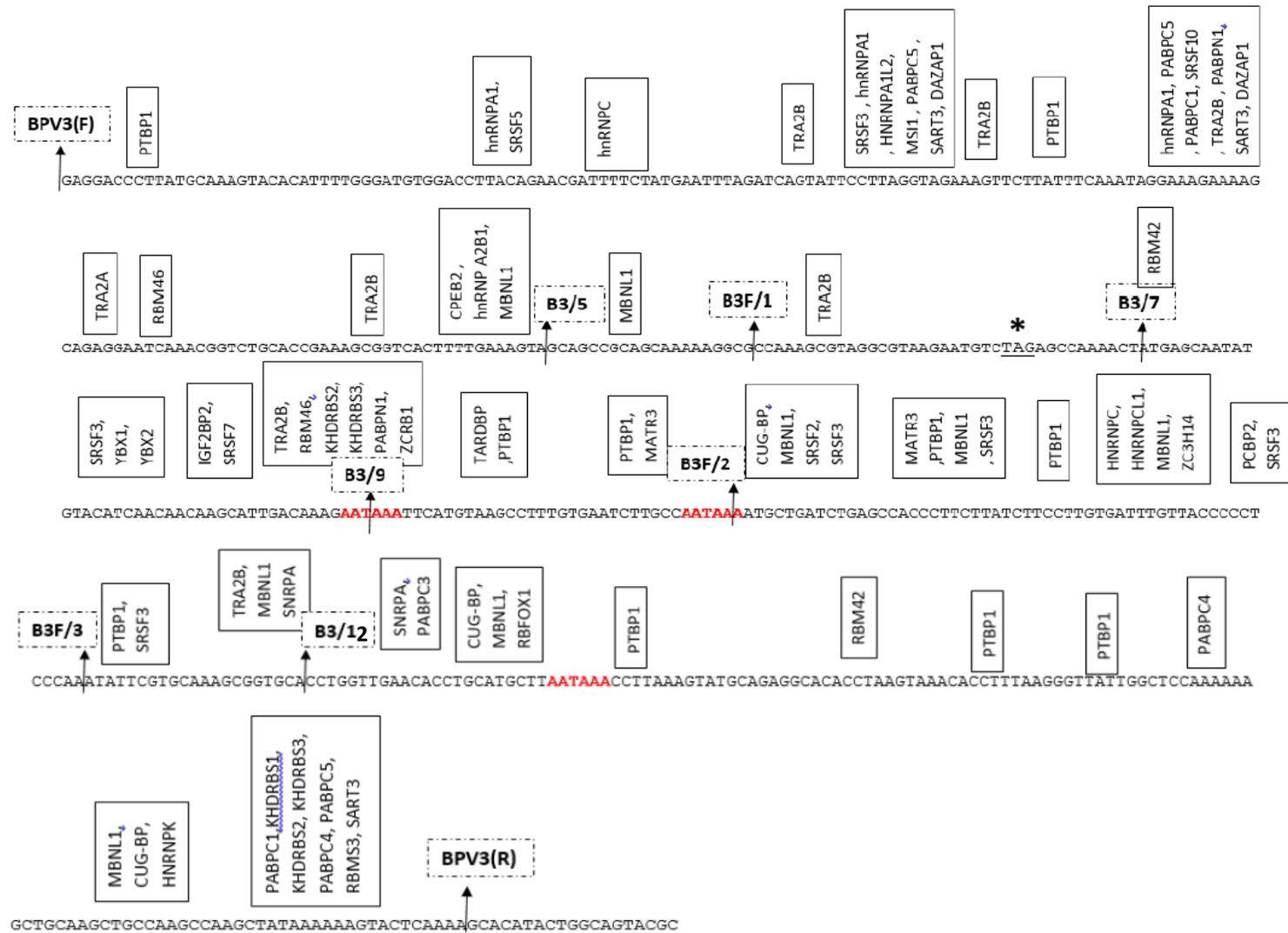
ชื่อโปรตีน	3' poly-adenylation	Transla-tion	mRNA splicing	Degrada-tion	mRNA export	mRNA stability	Nuclear retention
SRSF7, SRSF10	✓		✓		✓		
TARDBP						✓	
TRA2A, TRA2B			✓				
YBX1		+			✓		
YBX2		-				✓	
ZC3H14	✓			✓			
ZCRB1			✓				
รวม (ชนิด)	6	13	19	7	8	12	1

หมายเหตุ: ✓ หมายถึง binding site, + หมายถึง ปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนส่งผลเชิงบวกต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน (positive regulation), - หมายถึง ปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนส่งผลเชิงลบต่อการควบคุมการแสดงออก (negative regulation)

ช่วงที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 6960 – 7010 เป็นชิ้นส่วนระหว่าง pSV + B3F/2 ถึง pSV + B3F/3 พบ binding site ของโปรตีนทั้งหมด 10 ชนิด ปรากฏหนาแน่นในช่วง เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ mRNA splicing มากที่สุด จำนวน 4 ชนิด รองลงมาคือ binding sites ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ degradation จำนวน 3 ชนิด และพบ binding site ของโปรตีนเกี่ยวข้องกับ 3'polyadenylation processing (2 ชนิด) และ mRNA stability (1 ชนิด)



รูปที่ 12 ร้อยละของโปรตีนที่พบ binding site บน late 3'UTR ของ BPV-3 จำแนกตามหน้าที่ของโปรตีนใน mRNA metabolic pathway โดยโปรตีนบางชนิดอาจมีหน้าที่มากกว่า 1 ด้าน



รูปที่ 13 ตำแหน่ง binding site ของโปรตีน 33 ชนิดที่บน late 3'UTR ของ BPV-3 และตำแหน่งของ forward primers ที่ใช้ในการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ 3'UTR เพื่อสอดแทรกเข้าสู่ pSV และใช้ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *lac Z*

บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาอิทธิพลของลำดับนิวคลีโอไทด์บนจีโนมของ BPV-3 ในช่วงนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 6668 - 7190 ซึ่งส่วนปลายด้าน 5' มีตำแหน่ง 207 เบส upstream จาก stop codon ของ L1 ORF และปลายด้าน 3' ครอบคลุม late 3'UTR ของ BPV-3 และสิ้นสุดที่ 121 เบส จาก poly A signal ตำแหน่งสุดท้าย (รูปที่ 4 หน้า 13) จากผลการทดลองพบว่า late 3'UTR ของ BPV-3 มี regulatory element ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน โดยพบการยับยั้งการแสดงออกในระดับ mRNA จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ช่วง (รูปที่ 13 หน้า 26) ได้แก่

- ช่วงระหว่าง 6668 – 6830 (ขึ้นส่วนระหว่าง pSV + BPV-3 late 3'UTR ถึง pSV + B3/5) จำนวน 163 เบส

- ช่วงระหว่าง 6926 – 7019 (ขึ้นส่วนระหว่าง pSV + B3/9 ถึง pSV + B3F/3) จำนวน 94 เบส

เนื่องจากเมื่อมีการตัดชิ้นส่วนที่ลำดับเบสบริเวณดังกล่าวออกไปส่งผลให้มี band intensity จากการวิเคราะห์แบบ RT-PCR เพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการแสดงออกของยีนใน pSV positive control และในทำนองเดียวกันพบการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ช่วง ได้แก่

- ช่วงระหว่าง 6668 – 6830 (ขึ้นส่วนระหว่าง pSV + BPV-3 late 3'UTR ถึง pSV + B3/5) จำนวน 163 เบส

- ช่วงระหว่าง 6851 – 6925 (ขึ้นส่วนระหว่าง pSV + B3F/1 ถึง pSV + B3/9) จำนวน 75 เบส

เมื่อมีการตัดชิ้นส่วนบริเวณดังกล่าวออกแล้วมีผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น เปรียบเทียบกับ pSV control จากผลการทดลองดังกล่าวมีความเป็นไปได้มากกว่า regulatory element สำหรับ late genes ของ BPV-3 อาจอยู่ในช่วงนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 6668 – 6830 นี้ ซึ่งมีการยับยั้งการแสดงออกทั้งระดับ mRNA และโปรตีน อย่างไรก็ตามการออกแบบไพรเมอร์ในช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ทำได้ยาก จึงอาจต้องใช้วิธีอื่นในการเตรียมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เช่น การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอช่วงสั้นๆ เพื่อใช้ศึกษาลำดับเบสของ element ที่แน่นอน แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้มีงบประมาณไม่เพียงพอจึงจะขอทุนวิจัยเพื่อศึกษาต่อไป

เมื่อตัดช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 6668 – 6830 ออกแล้วส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA และโปรตีนเพิ่มขึ้นมากกว่า pSV control เมื่อพิจารณาตำแหน่ง binding site ของโปรตีนที่ปรากฏบนช่วงนี้ พบโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ mRNA ทุก pathway แต่ในจำนวนที่แตกต่างกัน ดังนี้ mRNA splicing พบ 12 ชนิด mRNA translation พบ 8 ชนิด mRNA export และ mRNA stability พบในจำนวนที่เท่ากันคือ 5 ชนิด และสุดท้ายคือแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับ mRNA

degradation และ 3' polyadenylation จำนวนเท่ากันคือ 3 ชนิด ทำให้สันนิษฐานได้ว่าเมื่อมีการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงนี้ออกไป ทำให้โปรตีนไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ late 3'UTR ได้ จึงไม่เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน ทั้งนี้ binding sites ของโปรตีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน จึงส่งผลให้มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นทั้งใน RT-PCR และ beta-galactosidase activity assay

ช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 6926 – 7019 ที่มีผลให้การแสดงออกของยีนในระดับ mRNA เพิ่มขึ้นมากกว่า pSV control นั้น ผู้วิจัยสันนิษฐานว่าอาจเป็นผลจากการขาดหายไปของ binding sites ของโปรตีนในบริเวณดังกล่าวหลังจากตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ออกไป ผลการวิเคราะห์ตำแหน่ง binding sites ของ RNA-binding protein (รูปที่ 13) พบว่าเป็นบริเวณที่มี binding site ของโปรตีนหนาแน่นในช่วงที่ 3 (นิวคลีโอไทด์ที่ 6960-7010) มีความยาวอยู่ที่ 135 เบส เป็น binding site ของโปรตีน แฟคเตอร์ในกระบวนการ mRNA splicing และ mRNA degradation เป็นส่วนใหญ่ เมื่อพิจารณากลไกการยับยั้งการแสดงออกของ late regulatory element ใน BPV-1 พบว่าเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่าง U1 snRNP (splicing factor complex) กับ 53-nt element ใน late 3'UTR ของจีโนมไวรัส โดยโปรตีน snRPA หรือ U1A ซึ่งเป็นสมาชิกใน splicing complex ทำการยับยั้งการทำงานของ poly A polymerase (PAP) ทำให้ชะลอ 3' processing หรือกระบวนการ polyadenylation ส่งผลให้ไม่เกิดการสังเคราะห์โปรตีนขึ้น (Furth และ Baker, 1991; Gunderson et al., 1998) จึงมีความเป็นไปได้ว่าการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์เหล่านี้จาก late 3'UTR ของ BPV-3 ออกไปทำให้ splicing factor ต่างๆ ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ได้ จึงไม่เกิดการยับยั้ง polyadenylation ของสาย mRNA ส่งผลให้มีผลิตภัณฑ์เกิดเพิ่มขึ้น

สำหรับช่วงนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 6851 – 6925 เมื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ออกไปแล้วส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงกว่า pSV control เนื่องจากมีการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น ในลักษณะเดียวกันกับข้างต้นคือ เมื่อพิจารณาตำแหน่ง binding sites ของโปรตีนพบว่ามีความหนาแน่นของ binding sites ในช่วงที่ 2 (ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 6800 – 6935) เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนทั้งสิ้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อตัดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้ซึ่งเป็น binding sites ของโปรตีนออกไป ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำการยับยั้งการกระบวนการเหล่านี้ได้ส่งผลให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ beta-galactosidase เพิ่มมากขึ้น การยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนมีการรายงานโดย Koffa และคณะ (2000) พบการยับยั้งการสังเคราะห์ late proteins ของ HPV-16 ใน undifferentiated epithelial cells โดยกระบวนการ nuclear retention ทำให้ไม่มีการขนส่งสาย mRNA ออกจากนิวเคลียสไปสู่ไรโบโซมในไซโตพลาสซึม และ/หรือ ความไม่เสถียรของสาย mRNA (mRNA instability) มีผลให้เกิดการย่อยสลายขึ้น

ผลการวิเคราะห์ binding sites ของโปรตีนใน late 3'UTR ของ BPV-3 นั้น พบ binding sites ของโปรตีน 4 ชนิด ที่มีการรายงานพบปฏิสัมพันธ์กับ late 3'UTR ของ PV ไทป์อื่นๆ ได้แก่ CUG-

BP, hnRNP A1, และ snRPA พบปฏิสัมพันธ์กับ late regulatory element ใน late 3'UTR ของ HPV-16 และ poly(A) binding protein (PABP) ใน HPV-1 (Sokolowski et al., 1998; Cumming et al., 2003; Cheunim et al., 2008; Goracznik และ Gunderson, 2008) ในขณะที่มีโปรตีนหลายตัวที่มีการรายงานถึงปฏิสัมพันธ์กับ late 3'UTR ของ PV หลายไทป์แต่ไม่พบ binding site บน late 3'UTR ของ BPV-3 เช่น HuR protein พบปฏิสัมพันธ์ใน HPV-1 และ HPV-16, U2AF2 และ CstF-64 พบปฏิสัมพันธ์ใน HPV-16 และ HPV-31 (Sokolowski et al., 1998; Koffa et al., 2000; Cumming et al., 2002) ซึ่งการที่ไม่พบ binding sites ของโปรตีนเหล่านี้ อาจเป็นไปได้ว่าการวิเคราะห์ binding motifs ของ RNA-binding protein นี้ตั้งค่าไว้ที่ high stringency ดังนั้น หากปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนกับลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแบบอ่อน (weak interaction) จะไม่สามารถตรวจพบ binding sites ได้ ซึ่งปฏิสัมพันธ์แบบอ่อน (weak interaction) ระหว่างโฮสต์โปรตีนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ late 3'UTR ใน PVs สามารถพบได้ในไวรัสบางไทป์ เช่น ในกรณีของ HPV-16 และ U1 snRNP ซึ่งพบการยับยั้งการแสดงออกของยีนจากปฏิสัมพันธ์นี้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และมีความเป็นไปได้ว่าจะเกิดในธรรมชาติจริง (*in vivo*) (Cumming et al., 2003) หรือประการที่สอง มีความเป็นไปได้ว่าไม่มี binding sites ของโปรตีนเหล่านี้ปรากฏบน late 3'UTR ของไวรัสจริง เนื่องจากเป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่าแล้วไวรัสบางไทป์มีกลไกในการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่างกัน ดังเช่น ใน BPV-1 ที่มีการยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA โดยโปรตีนใน mRNA splicing ควบคุมขั้นตอน 3' polyadenylation ในขณะที่ HPV-1 มีการควบคุมในระดับโปรตีน โดย PABP และ HuR protein ที่มีผลต่อความเสถียรของ mRNA และขั้นตอน mRNA translation จึงมีความเป็นไปได้ว่า BPV-3 อาจมีกลไกการควบคุม ที่ต่างจากไวรัสไทป์อื่นด้วยโปรตีนชนิดอื่น จึงมี binding sites ที่ต่างกับไวรัสไทป์อื่น

สรุปผลการทดลอง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน late 3'UTR ของ BPV-3 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีนประกอบไปด้วยสามช่วงดังนี้

- 1) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 6668 – 6830 มีขนาด 163 เบส ยับยั้งการแสดงออกทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน
- 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 6851 – 6925 มีขนาด 75 เบส ยับยั้งการแสดงออกเพียงในระดับโปรตีน
- 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 6926 – 7019 มีขนาด 94 เบส ยับยั้งการแสดงออกเพียงในระดับ mRNA

ทั้งนี้พบ RNA-binding protein ปรากฏหนาแน่นในทั้งสามช่วงนิวคลีโอไทด์ โดย

ในช่วงที่ 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 จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่าใน late 3'UTR ของ BPV-3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำหน้าที่เป็น controlling elements อยู่ 3 ช่วง ซึ่งในแต่ละช่วงทำหน้าที่ร่วมกันในการยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้งในระดับ mRNA และโปรตีน

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยทุนงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2560 ผ่านสำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นครินทร์ กิตกัธร คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ ดร. รัฐกร ศรีสุทธิ คณะแพทยศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับคำแนะนำ แก้ไขปัญหาต่างๆ ในการดำเนินงานวิจัย ให้สำเร็จลุล่วง

Output จากงานวิจัย

- ผลิตบัณฑิตระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต 1 คน คือ นางสาว ณิชฎวารณ เอี่ยมบวรกุล
- ผลิตบัณฑิตระดับปริญญาบัณฑิต 2 คน คือ นางสาว ศศิธร แสงสี และ นางสาว ปิยธิดา แสงสว่างส์
- เผยแพร่ผลงานทางวิชาการแบบ Oral presentation เรื่อง "Controlling of gene expression by regulatory element in late 3' untranslated region (3'UTR) of human papillomaviruses and Bovine papillomaviruses" ใน "The 10th Walailak Research National Conference", 28 March, 2018.
- เผยแพร่ผลงานวิชาการแบบ Poster เรื่อง "Bioinformatics analysis of RNA-binding proteins that bind to the bovine papillomavirus types 1 and 3 3'untranslated regions" ใน "The 14th International Symposium of the Protein Society of Thailand", 22-23 July, 2019.
- เผยแพร่ผลงานวิชาการในวารสารวิชาการ เรื่อง "Inhibitory activity on gene expression and RNA-binding protein motifs of late 3'untranslated region in non- and cancer-related HPVs and BPVs" Submitted to Journal "Gene", IF = 2.638

เอกสารอ้างอิง

- สรรทิพย์ กองจร. 2555. การโคลนและการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของชิ้นส่วนใน Late 3' Untranslated Region ของ Papillomavirus 6 ทัยป์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยศิลปากร, 107 หน้า.
- Afshar, M., Prescott, C.D., Varani, G. 1999. Structure-based and combinatorial search for new RNA-binding drugs. *Curr. Op. Biotech.* 10: 59-53.
- Cheunim, T., Zhang, J., Milligan, S., McPhillips, M., Graham, S. 2008. The alternative splicing factor hnRNP A1 is up-regulated during virus-infected epithelial cell differentiation and binds the human papillomavirus type 16 late regulatory element. *Virus Res.* 131: 189-198.
- Cumming, S., Cheun-Im, T., Milligan, S., Graham, S. 2008. Human papillomavirus type 16 late gene expression is regulated by cellular RNA processing factors in response to epithelial differentiation. *Biochem Soc Trans.* 26: 522- 524.
- Cumming, S.A., McPhillips M.G., Veerapraditsin, T., Milligan S.G., Graham S.V. 2003. Activity of the human papillomavirus type 16 late negative regulatory element is partly due to four weak consensus 5' splice sites that bind a U1 snRNP-Like complex. *J. Virol.* 77: 5167-5177.
- Cumming, S.A., Repellin, C.E., McPhillips, M., Redford, J.C., Clements, J.B., Graham, S.V. 2002. The human papillomavirus type 31 3'untranslated region contains a complex bipartite negative regulatory element. *J. Virol.* 76: 5993-6003.
- Davidson, A., Leeper, T., Athanassiou, Z., et al. 2009. Simultaneous recognition of HIV-1 TAR RNA bulge and loop sequences by cyclic peptide mimics of Tat protein. *PNAS.* 106: 11931-11936.
- Dimitrova, M., Imbert, I., Kieny, M.P., Schuster, C. 2003. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 77: 5401-5414.
- Furth, P.A., Baker, C.C. 1991. An element in the bovine papillomavirus late 3' untranslated region reduces polyadenylated cytoplasmic RNA levels. *J. Virol.* 65: 5806-5812.
- Giarre, M., Cladeira, S., Malanchi, I., Ciccolini, F., Leao, M., and Tommasino, M. 2001. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle arrest. *J. Virol.* 75: 4705-4712.

- Goracznik, R., Gunderson, S.I. 2008. The regulatory element in the 3' untranslated region of human papillomavirus 16 inhibits expression by binding CUG-binding protein 1. *J. Bio. Chem.* 283: 2286-2296.
- Graham, S. 2008. Papillomavirus 3' UTR regulatory elements. *Front. Biosci.* 13: 5646-5663.
- Gunderson, S.I., Polycarpou-Schwarz, M., Mattaj, I.W. 1998. U1 snRNP inhibits pre-mRNA polyadenylation through a direct interaction between U1 70K and poly(A) polymerase. *Mol. Cell* 1: 255-264.
- Harrington, E., Bruce, J., Harlow, E., and Dyson, N. 1998. pRb plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95: 11945-11950.
- Hengstermann, A., Linares, L., Ciechanover, A., Whitaker, N., and Scheffner, M. 2001. Complete Switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1218-1223.
- Jeon, S., Allen-Hoffmann, B.L., Lambert, P.F. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol.* 69: 2989-2997.
- Kennedy, I.M., Haddow, J.K., Clements, J.B. 1990. Analysis of the human papillomavirus type 16 late mRNA 3' processing signals *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* 64: 1825-1829.
- Koffa, M.D., Graham, S.V., Takagaki, Y., Manley, J.L., Clements, J.B. 2000. The human papillomavirus type 16 negative regulatory element interacts with three proteins that act at different posttranscriptional levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 4677-4682.
- Lowy, D.R., Schiller J.T. 2006. Papillomaviridae: the viruses and their replication. *J Clin. Invest.* 116: 1167-1173.
- Mantovani, R., Banks, L. 2001. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 20: 7874-7887.
- McPhillips, M.G., Veerapraditsin, T., Cumming, S.A., Karali, D., Milligan, S.G., Boner, W., Morgan, I.M., Graham, S.V. 2004. SF2/ASF binds the human papillomavirus type 16 late RNA control element and is regulated during epithelial differentiation. *J. Virol.* 78: 10598-10605.
- Pater, M.M., Pater, A. 1985. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145: 313-318.

- Richter, S., Parolin, C., Gatto, B., et al., 2004. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Tat-trans-activation-responsive region interaction by an antiviral quinolone derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1895-1899.
- Spriggs, C.C. and Laimins, L.A. 2017. Human papillomavirus and DNA damage response: exploiting host repair pathways for viral replication. *Viruses*, 8 : 232.
- Solowski, M, Tan, W., Jellne, M., Schwartz, S. 1998. mRNA instability elements in the human papillomavirus type 16 L2 coding region. *J. Virol.* 72: 1504-1515.
- Wu, X., and Levine, A.J. 1994. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3602-3606.

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Bovine papillomavirus type 3, complete genome	628	628	100%	4e-176	100.00%	AF486184.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bovine papillomavirus (type 3) L1, E6, E7 and E1 ORF DNA	621	621	100%	6e-174	99.71%	X59062.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bovine papillomavirus type 3 complete genome	374	622	100%	2e-99	99.51%	AB20207.1

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ก่อนใช้เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (insert) แทรกเข้าสู่ pSV โดยแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3'UTR ของ BPV-3 ในพลาสมิด B3F/2 โดย (ก) ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3'UTR ของ BPV-3 ในพลาสมิด B3F/1 (ข) และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3'UTR ของ BPV-3 ในพลาสมิด B3F/3 (ค) และผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย blastn ในฐานข้อมูล Genbank (ง)