ROLES OF HPV ONCOPROTEINS IN ANTI-APOPTOSIS AND TRANSCRIPTIONAL REGULATION

SAHARAT AUNGSUMART

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005

ISBN 974-04-6207-3
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

บทบาทของโปรตีนที่ก่อมะเร็งจาก HPV ในการต่อต้านการตายและควบคุมการแสดงออกของยีน (ROLES OF HPV ONCOPROTEINS IN ANTI-APOPTOSIS AND TRANSCRIPTIONAL REGULATION)

สหรัฐ อังศุมาศ 4437258 SCBC/D
ปร.ด. (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : มธุรส พงษ์ลิขิตมงคล Ph.D., ประพนธ์ วิไลรัตน์ Ph.D., ศราวุฒิ จิตรภักดี, Ph.D., วิฑูรย์ ถิระโสภณ, Ph.D.

บทคัดย่อ

Human papillomavirus (HPV) เป็นไวรัสที่เป็นสาเหตุหลักของมะเร็งปากมดลูก ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ขึ้นกับการพัฒนาของมะเร็งในบริเวณที่ติดเชื้อและตามลักษณะความรุนแรงและการดำเนินของรอยโรค ได้แก่กลุ่มความเสี่ยงสูง เช่น HPV16 กลุ่มความเสี่ยงปานกลาง เช่น HPV59 กลุ่มความเสี่ยงต่ำ เช่น HPV6 ยีนที่สร้างขึ้นในช่วงแรกสองชนิดของไวรัส HPV ได้แก่ E6 และ E7 มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดมะเร็ง ด้วยการรบกวนการทำงานของโปรตีนยับยั้งมะเร็งหรือจับกับโปรตีนควบคุมการถอดรหัสและโปรตีนควบคุมวงจรของเซลล์ จึงทำให้ไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ได้ และนำมาซึ่งการเกิดมะเร็ง

ในส่วนแรกของการศึกษานี้ เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ต่อต้านการตายของโปรตีนก่อมะเร็งของ HPV ในมะเร็งปากมดลูกที่ดื้อยาชื่อว่า SiHaR ผลการศึกษาพบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของยีนต่อต้านการตาย Bcl-X_L และ ยีนE6/E7 ใน SiHaR เมื่อเปรียบเทียบกับ SiHa ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิด อีกทั้ง SiHaR ยังแสดงคุณสมบัติที่ดื้อต่อสิ่งที่กระตุ้นการตายแบบอะพอพโทซิสอย่างอื่นด้วยเช่น รังสีแกมมารวมทั้งมีการทำงานของเอนไซม์ Caspase-3 ลดลงด้วย การศึกษาเพิ่มเติมผลของ E6 และ E7 ต่อการแสดงออกของ ยีน Bcl-X_L ในเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่ไม่มี HPV คือC33a แสดงให้เห็นว่า E7 สามารถกระตุ้นการทำงานของของยีนได้แต่ไม่พบใน E6 ผลการทดลองนี้เสนอว่าการเพิ่มขึ้นของ E7 ใน SiHaR เป็นปัยจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มการแสดงแสดงออกของ ยีน Bcl-X_L อันจะนำมาซึ่งการต่อต้านการตายต่อทั้งต่อเคมีบำบัดและสารรังสี

ในส่วนที่สองเรามุ่งเน้นไปที่การทดสอบผลของโปรตีนที่ก่อมะเร็งของไวรัสชนิด E6 และ E7 ที่ได้จากกลุ่มความเสี่ยงต่างๆของ HPV ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน MIC ผลการทดลองแสดงให้เห็นอีกว่า E7 ของกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน MICA และ MICB ซึ่งความสามารถนี้ไม่พบใน E6 ด้วยวิธี RT-PCR และเมื่อเปรียบเทียบผลของโปรตีน E7 จากไวรัสกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่างๆกัน พบว่าทั้งกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่ำ (HPV6) และความเสี่ยงปานกลาง (HPV59) สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน MICA และ MICB ได้มากกว่า E7 กลุ่มที่มีความเสี่ยงสูง (HPV16) โดยเฉพาะการทำงานของ E7 HPV6 และ HPV59แสดงการเปลี่ยนแปลงตามปริมาณ นอกจากนี้เรายังได้ติดตามส่วนของลำดับเบส บน Promoter ของ MICB ที่จำเป็นต่อการทำงานของ E7 โดยการนำชิ้นส่วนของ 1 กิโลเบสของ MICB Promoter ใส่เข้าไปใน pGL-3 luciferase reporter plasmid ผลจากการ transfection แบบชั่วคราวของ HPV-E7 หลายชนิดพบว่า AP-1 โปรตีนนั้นสำคัญต่อการแสดงออกของยีน MICB การทำงานนี้จะไม่เกิดขึ้นถ้ามีการเปลี่ยนลำดับเบสที่ตำแหน่ง AP-1 เราจึงสรุปว่า โปรตีนที่ทำให้เกิดมะเร็งของ HPV จากกลุ่มที่มีความเสี่ยงต่างกัน มีความสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน MIC ต่างกันซึ่งการทำงานนี้จะถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน AP-1 ซึ่งบ่งชี้ว่ามีการทำงานร่วมกันของ HPV-E7 และ โปรตีน AP-1 บน MICB Promoter

162 หน้า ISBN 974-04-6207-3

ROLES OF HPV ONCOPROTEINS IN ANTI-APOPTOSIS AND TRANSCRIPTIONAL REGULATION

SAHARAT AUNGSUMART 4437258 SCBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: MATHUROSE PONGLIKITMONGKOL, Ph.D., PRAPON WILAIRAT, Ph.D., SARAWUT JITTRAPAKDEE, Ph.D.,WITOON TIRASOPHON, Ph.D.

ABSTRACT

Human papillomaviruses (HPVs), the main etiological factor of cervical cancer, can be divided into 3 groups based on malignant progression of the infected lesions, i.e. the high-risk group, such as HPV16, the intermediate-risk group, such as HPV59 and the low-risk group, such as HPV6. The two early HPV proteins, E6 and E7, play important roles in tumor formation by inactivating tumor suppressor proteins, interacting with transcription factors and cell cycle regulatory proteins thereby deregulating cell proliferation leading to oncogenesis.

The first part of this work involved the study of anti-apoptotic activity of HPV oncoproteins in drug resistant cervical cancer cell line, SiHaR. The results showed significant increase in the expression levels of anti-apoptotic, *Bcl-*X_L gene and E6/E7 oncoproteins in SiHaR when compared to those of SiHa parental cell line. SiHaR also showed the characteristics of cross resistance to other apoptosis-inducing agents including radiation as well as exhibiting decreased caspase-3 activity. The effects of HPV16 E6 and E7 on *Bcl-*X_L expression were further investigated in HPV-free C33a cervical cancer cell line and results demonstrated transcriptional activity of E7 but not E6. Our findings suggested that an increased expression of E7 in SiHaR might be a crucial factor contributing to elevated expression of *Bcl-*X_L leading to apoptosis resistance to both chemotherapeutic drugs and radiation.

The second part focused on the examination of the effects of viral oncoproteins, E6 and E7, from different risk groups of HPV on *MIC* (MHC class I related chain) gene regulation. The results revealed that again E7 but not E6 oncoprotein from the high risk HPV16 could up-regulate *MICA* and *MICB* gene expression as assessed by RT-PCR. When the effects of E7 from different risk groups of HPV were compared, E7 from both low risk (HPV6) and intermediate risk (HPV59) HPVs demonstrated higher transcriptional activation on *MICA* and *MICB* genes than that of the high risk (HPV16) E7. Only the transcriptional activities of HPV6 and HPV59 E7 showed dose-dependent effects. We further investigated the putative transcription factor binding site on *MICB* promoter required for E7 function. One kilobase region of *MICB* promoter was subcloned into pGL3 luciferase reporter plasmid. Results from transient co-transfection of various HPV E7 using this construct indicated that AP-1 protein was necessary for transcriptional activation of *MICB* gene. This activity was abolished when the AP-1 binding site was mutated. We concluded that HPV oncoproteins from different risk groups exhibited differential transcriptional activities on *MIC* gene. This activity was partly stimulated by AP-1 protein suggesting the interaction between HPV E7 and AP-1 protein on *MICB* promoter.

KEY WORDS: HPV/ E6 / E7 / ANTI-APOPTOSIS/ Bcl-X_L/ MIC TRANSCRIPTION
162 P. ISBN 974-04-6207-3