



วันที่รับบทความ : 02/07/2564

วันแก้ไขบทความ : 05/07/2564

วันที่ตอบรับบทความ : 06/07/2564

วารสารสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

Journal of Allied Health Sciences Suan Sunandha Rajabhat University

บทบาทของเอ็นไกลโคซิเลชั่นของโปรตีนบนผิวเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในการเกิดกระบวนการออโตฟาจี

สกลรัตน์ บุญรวบ¹, พุจฉิยามา คาชูชิโตะ², มิซึกิ เรียว², อิงอร กิมกง^{1*}

ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์¹

International Center for Biotechnology (ICBiotech), มหาวิทยาลัยโอซากา²

E-mail: fsciiok@ku.ac.th*

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคไวรัสตับอักเสบบแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง และยังมีความเสี่ยงในการพัฒนาเป็นตับแข็งและมะเร็งตับ ออโตฟาจีเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในการทำลายไวรัส ซึ่งเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสามารถใช้ประโยชน์จากกระบวนการออโตฟาจีในการเพิ่มจำนวนตัวเอง นอกจากนี้พบว่าการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่นในส่วนโปรตีนบนผิวของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของไวรัสตับอักเสบบี โดยไวรัสสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันที่จะมาทำลายได้ แต่ปัจจุบันยังไม่มีรายงานความเกี่ยวข้องระหว่างเอ็นไกลโคซิเลชั่นในไวรัสตับอักเสบบีกับการเกิดกระบวนการออโตฟาจี ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งที่จะอธิบายบทบาทของการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่นในบริเวณโปรตีนบนผิวเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อการเกิดกระบวนการออโตฟาจี โดยโคลนยีน LHB และเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งที่ 4, 112 และ 309 ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis จากนั้นถ่ายพลาสมิดที่มียีน LHB เข้าสู่เซลล์มะเร็งตับ Huh7 ผลการศึกษาด้วยวิธี Western blot พบว่าโปรตีน LHB ที่แสดงออก มีขนาด 39 kDa (Non-glycosylated) และ 42 kDa (Glycosylated) และเมื่อตรวจสอบการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่นด้วยเอนไซม์ PNGaseF พบว่าในตำแหน่ง N309Q ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง จึงกล่าวได้ว่าในตำแหน่งนี้อาจเป็นตำแหน่งที่สำคัญในการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่น ผลการศึกษากการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการออโตฟาจี ด้วยวิธี Immunoblotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ATG9A, ATG12, ATG16L1 และ LC3 พบว่า ในตำแหน่ง N4Q, N112Q, และ N309Q ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ wild type จากการวิจัยเบื้องต้น จึงสรุปได้ว่าการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่นของโปรตีนบนผิวของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีอาจไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการออโตฟาจี

คำสำคัญ : ไวรัสตับอักเสบบี, เอ็นไกลโคซิเลชั่น, ออโตฟาจี

* ผู้ประพันธ์บรรณกิจ



The Role of N-glycosylation of Hepatitis B Surface Protein in Autophagy

Sakulrat Boonruab¹, Fujiyama Kazuhito², Misaki Ryo², Ingorn Kimkong^{1*}

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University¹

International Center for Biotechnology (ICBiotech), Osaka University²

E-mail: fsciiok@ku.ac.th*

ABSTRACT

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major cause of acute and chronic hepatitis. In addition, chronic HBV infection is associated with the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Autophagy has been implicated in innate and adaptive immune responses to viral infection. HBV has been reported to enhance the autophagic process to benefit its replication. A recent study has found that the large surface protein of HBV (LHB) is modified by N-glycosylation. This modification affects not only virus survival but also immune escape. Currently, there are no reports involving the role of N-glycosylation in HBV proteins and autophagy. Therefore, we aim to explore the role of N-glycosylation of hepatitis B surface protein in autophagy. In this study, we constructed the LHB gene wild type and mutants of N-glycosylation at amino acid positions 4, 112, and 309 by site-directed mutagenesis technique. These constructs were transfected into Huh7 cells. The results analyzed by Western blot showed that the size of expressed LHB protein was 39 kDa (Non-glycosylated) and 42 kDa (Glycosylated). The detection of N-glycosylation by PNGase F found that the profile of N309Q was not converted, therefore N309Q might be an important position in N-glycosylation. The expression of autophagy protein was studied by Immunoblotting using specific antibodies to ATG9A, ATG12, ATG16L1, and LC3 proteins. The results showed that there were no significant differences in N4Q, N112Q, and N309Q positions when compared to the wild type. This preliminary study summarized that N-glycosylation of LHB might not be involved in autophagy.

Keywords: Hepatitis B Virus, N-glycosylation, Autophagy

* Corresponding Author



บทนำ

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus; HBV) เป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญของการเกิดโรคตับอักเสบเฉียบพลัน (acute hepatitis) และโรคตับอักเสบริื้อรัง (chronic hepatitis) ประชากรทั่วโลกมากกว่า 2000 ล้านคนมีการติดเชื้อหรือมีประวัติการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ประมาณ 90% ของผู้ที่ติดเชื้อหายขาดจากโรค ส่วนอีกประมาณ 10% ไม่สามารถกำจัดไวรัสได้และมีการพัฒนาไปเป็นโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง นอกจากนี้ยังพบว่าโรคไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรังมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคตับแข็ง (cirrhosis) และโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma)¹ ซึ่งนำไปสู่การเสียชีวิตของผู้ป่วยประมาณ 1 ล้านคนต่อปี แม้ว่าปัจจุบันจะมีวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีแล้วก็ตาม

ออโตฟาจี (autophagy) จัดเป็นภูมิคุ้มกันด่านแรก (innate immunity) ที่โฮสต์ใช้ในการกำจัดเชื้อพวก intracellular pathogens และช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันด่านที่สอง (adaptive immunity) ในกระบวนการ antigen processing เพื่อนำเสนอแอนติเจนต่อ CD4⁺ T cells² ไวรัสหลายชนิดได้มีการพัฒนากลไกเพื่อที่จะทำลายระบบการทำงานของ autophagy และใช้กระบวนการนี้เพื่อส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของตัวไวรัสเอง (viral replication) ตัวอย่างเช่น herpes simplex virus-1 (HSV-1), cytomegalovirus (CMV) และ Kaposi's sarcoma herpes virus (KSHV) อย่างไรก็ตามไวรัสบางชนิดไม่ได้ทำลายกระบวนการดังกล่าว ในทางตรงกันข้ามกลับกระตุ้นกระบวนการ autophagy และอาศัย

autophagic vacuoles ในการเพิ่มจำนวน เช่น poliovirus, coronavirus, dengue virus และ hepatitis C virus (HCV) สำหรับ HBV³ เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาพบว่า HBV สามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ autophagy ในเซลล์เพาะเลี้ยง รวมถึงในตับของหนูทดลอง และผู้ป่วยที่ติดเชื้อ โดย HBV จะชักนำ autophagy ผ่านทาง HBx protein โดยการจับกับ PI3KC3 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการเริ่มต้นของกระบวนการ จากนั้น HBx จะกระตุ้นการทำงานของ PI3KC3 การกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ autophagy ของ HBV มีความสำคัญในการเพิ่มจำนวนของตัวไวรัสเอง⁴ นอกจากนี้ในการศึกษาของ Tang H (2009) และคณะ พบว่า HBx protein ของ HBV ชักนำกระบวนการ autophagy โดยเพิ่มการแสดงออกของยีน Beclin1⁵ นอกจากนี้ HBV อาศัย HBx ในการเพิ่มจำนวนแล้ว การศึกษาของ Li J (2011) พบว่า small HBV surface proteins (SHBs) มีส่วนในการกระตุ้นกระบวนการออโตฟาจี และยังช่วยในการเพิ่มจำนวนของ HBV ด้วยเช่นกัน⁶

เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานการศึกษาของ Lambert C (2007) และคณะ พบการเกิด N-Glycosylation ในส่วน large surface proteins ของ HBV (LHBs)⁷ การศึกษาเพิ่มเติมของ Yu D และคณะ (2014) เกี่ยวกับบทบาทของ N-Glycosylation ใน HBV พบว่าเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของ HBV โดย HBV สามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันที่จะมาทำลายได้ เนื่องจากการเติม N-glycan ซึ่งอาจไปรบกวนการจับของแอนติบอดี⁸ สำหรับกระบวนการออโตฟาจี ซึ่งจัดเป็นภูมิคุ้มกันชนิดหนึ่งที่จะช่วยในการทำลาย



เชื้อไวรัส ปัจจุบันยังไม่มีรายงานความเกี่ยวข้องระหว่าง N-glycosylation ในเชื้อ HBV กับการเกิดกระบวนการ autophagy ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งที่จะอธิบายบทบาทของการเกิด N-glycosylation ในเชื้อไวรัสตับอักเสบบีบริเวณ large surface protein ต่อการเกิดกระบวนการออโตฟาจี ผลการศึกษาจะทำให้ทราบและเข้าใจถึงกลไกของไวรัสในการหลบหลีกการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันมากยิ่งขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่แนวทางในการรักษาใหม่ๆ หรือพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาบทบาทของการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชันบริเวณโปรตีนบนผิวของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อการเกิดกระบวนการออโตฟาจีในเซลล์มะเร็งตับ Huh7

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การโคลนยีน LHB

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain reaction; PCR) ด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีน LHB และเชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR กับเวกเตอร์ pGEM-T เพื่อถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เชื้อ *Escherichia coli* DH5 α ตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธี colony PCR เอนไซม์ตัดจำเพาะ และวิธี sequencing

2. Site-directed mutagenesis

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR โดยดีเอ็นเอต้นแบบอยู่ในรูปพลาสมิด pGEM-T ที่มียีน LHB และใช้ mutagenic primers ที่เปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งที่ต้องการเพื่อศึกษาการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชันในส่วน large surface proteins ของ HBV (LHBs) ซึ่งการทดลองครั้งนี้ ได้เปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่งคือ ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 4 (N4), 112 (N112) และ 309 (N309) จากนั้นนำเข้าสู่เชื้อ *Escherichia coli* DH5 α และตรวจสอบ mutants ที่ได้ด้วยวิธี sequencing

3. การย้ายชิ้นส่วนยีน

นำพลาสมิด pGEM-T ที่มียีน LHB มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pcDNA3.1 และทำการถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เชื้อ *Escherichia coli* DH5 α และตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธี colony PCR เอนไซม์ตัดจำเพาะ และวิธี sequencing

4. Transfection

นำพลาสมิด pcDNA3.1 ที่มียีน LHB เข้าสู่เซลล์มะเร็งตับ Huh-7 cells โดย Lipofectamine 2000 และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน LHB โดยวิธี Western blotting



5. การตรวจสอบการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่น

ตรวจสอบการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่น ด้วยเอนไซม์ peptide-N4-(N-acetyl- α -D-glucosaminyl) asparagine amidase (PNGase F) และ polyacrylamide gel electrophoresis ที่มี sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) และวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Immunoblotting

6. การตรวจสอบอโตฟาจี

ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนในวิถีอโตฟาจีด้วยวิธี Western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ATG9A, ATG12, ATG16L1 และ LC3

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตัวแปรเชิงปริมาณจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ทางสถิติได้ดำเนินการโดยใช้การทดสอบที่สำหรับข้อมูลเชิงปริมาณ (Student's t-test) และการทดสอบไคสแควร์สำหรับตัวแปรเชิงคุณภาพ (Chi-square test) พิจารณาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติที่ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

ผลการโคลนยีน LHB จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และเชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ PCR กับเวกเตอร์ pGEM-T เพื่อถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เชื้อ *Escherichia coli* DH5 α พบว่าผลของการคัดเลือกโคโลนีบนอาหารคัดเลือก 2xYT โดยวิธีการ spread plate เกิดโคโลนีสีขาวบนอาหารคัดเลือก 2xYT ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิซิลิน และ

ตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธี colony PCR โดยตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยวิธี electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel และหยอดผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 3 μ l/lane การทดลองนี้ใช้ marker Quick-Load[®] Purple 2-Log DNA Ladder (0.1 - 10.0 kb) ผลการศึกษาพบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ของตัวอย่าง P2 PGEM-T มีขนาดประมาณ 4 kb แสดงดังภาพที่ 1

ผลการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งกรตอะมีโนที่ 4 (N4), 112 (N112) และ 309 (N309) โดยใช้เทคนิค Site-directed mutagenesis แล้วนำเข้าสู่เชื้อ *Escherichia coli* DH5 α และเมื่อตรวจสอบพบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ของเวกเตอร์ pGEM-T ที่มี mutants พบว่ามีขนาดประมาณ 4 kb (ภาพที่ 1) หลังจากนั้น ย้ายชิ้นส่วนยีนเข้าสู่ mammalian expression vector โดยนำพลาสมิด pGEM-T ที่มียีน LHB หรือ mutants ของยีน LHB มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NheI และ HindIII เพื่อเปลี่ยน vector จาก PGEM-T vector ไปเป็น mammalian expression vector ซึ่งในที่นี้จะใช้ pcDNA3.1 พบว่า จะได้แถบของพลาสมิด pGEM-T ที่มียีน LHB หรือ mutants ของยีน LHB 2 แถบ ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนของชิ้น DNA insert มีขนาดประมาณ 1200 bp และขนาดของ PGEM-T vector มีขนาดประมาณ 3000 bp จากนั้นนำชิ้น insert มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pcDNA3.1 และทำการถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เชื้อ *Escherichia coli* DH5 α โดยคัดเลือกโคโลนีบนอาหารคัดเลือก 2xYT ด้วยวิธีการ spread plate ให้ผลโคโลนีสีขาวบนอาหาร (ภาพที่ 2) เมื่อได้โคโลนีของรีคอมบิแนนท์



ดีเอ็นดีของยีน LHB แล้ว ทำการตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธี colony PCR พบว่า แถบผลิตภัณฑ์ PCR ของเวกเตอร์ pcDNA3.1 ที่มี wild type หรือ mutants ของยีน LHB มีขนาดประมาณ 5-6 kb (ภาพที่ 3) จากนั้นตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และวิธี sequencing เพื่อยืนยันผลการทดลอง

ผลการนำพลาสมิด pcDNA3.1 ที่มียีน LHB มาถ่ายไปยังเซลล์มะเร็งตับ Huh-7 cells โดย Lipofectamine 2000 โดยมีกลุ่มควบคุมคือ GFP ATG16L1 (reporter genes) วิเคราะห์โดยใช้กล้องสโตริโอฟลูออเรสเซนซ์ หลังจาก transfection 72 ชั่วโมง ทำการเก็บ cell lysate และ supernatant เพื่อนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน พบว่าประสิทธิภาพการส่งถ่ายไปยังเซลล์มะเร็ง Huh7 มีประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4) จากนั้นเก็บเซลล์เพื่อตรวจสอบโปรตีน LHB ด้วยวิธี Western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน PreS1 พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน LHB ขนาด 39 kDa (Non-glycosylated) และ 42 kDa (Glycosylated) (ภาพที่ 5a)

ผลการศึกษาการเกิดเอ็นโกลโคซิเลชัน หลังจากทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน LHB ด้วยเอนไซม์ peptide-N4-(N-acetyl- α -D-glucosaminyl) asparagine amidase (PNGase F) โดย run polyacrylamide gel electrophoresis ที่มี sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) และทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนอีกครั้งโดยวิธีการ western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน PreS1 ในการตรวจสอบ พบว่า

การแสดงออกของโปรตีน LHB ขนาด 39 kDa (Non-glycosylated) และ 42 kDa (Glycosylated) มีการเปลี่ยนแปลงของเอ็นโกลโคซิเลชัน ในพลาสมิดที่เป็น wild type (P2), mutants ตำแหน่ง N4 และ N112 มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบจากการแสดงออกของโปรตีนขนาด 42 kDa (Glycosylated) ไปเป็นรูปแบบการแสดงออกของโปรตีน LHB ขนาด 39 kDa (Non-glycosylated) และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของเอ็นโกลโคซิเลชันใน mutant ตำแหน่ง N309 (ภาพที่ 5b) จึงกล่าวได้ว่า ในตำแหน่งนี้อาจเป็นตำแหน่งที่สำคัญในการเกิดเอ็นโกลโคซิเลชัน

ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน ในวิธีอิมมูโนโบลอตติงตรวจสอบโดยวิธี Western blotting ซึ่งทำการเก็บโปรตีนใส่ใน RIPA buffer และทำให้เซลล์แตกเพื่อได้โปรตีนออกมาโดยใช้ Sonicator ประมาณ 5-10 นาที และวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยชุด Pierce™ BCA protein assay kit จากนั้นนำมารันบนเจล SDS-PAGE ที่มีความเข้มข้น 10% 100V เวลา 90 นาที และย้ายไปยัง polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane 100 V เวลา 60 นาที หลังจากนั้นทำการ blocking ด้วย 5% skim milk เป็นเวลา 60 นาที และล้างด้วย TBS-T buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาทีและใช้ First antibody ต่อโปรตีนที่ต้องการศึกษา คือ LC3, ATG9A, ATG12, ATG16L1 (Cell signaling) และ PreS1 (AP2) (Santa cruz) ด้วยความเจือจาง 1:1000 และทำการบ่มข้ามคืน ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการล้างด้วย TBS-T buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาทีในวันถัดไป และทำการบ่มต่อด้วย Second Antibody (Mouse monoclonal antibodies against GAPDH, Goat anti-mouse



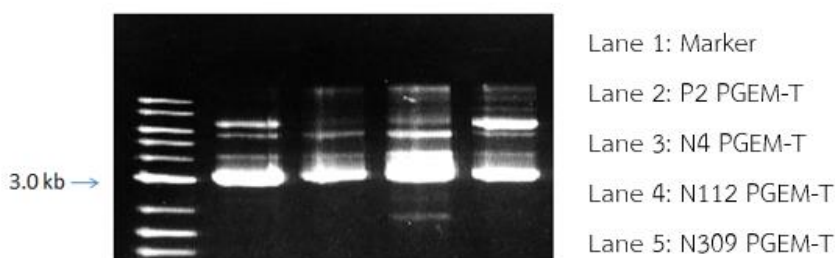
horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP) (Santa cruz)) ด้วยความเจือจาง 1:5000 เป็นเวลา 60 นาที และล้างด้วย TBS-T buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที หลังจากนั้นทำการ develop ผลด้วย SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate โดยใช้เครื่อง Image Quant™ LAS 4000 พบว่า ในตำแหน่ง N4Q, N112Q และ N309Q การแสดงออกของโปรตีนในวิถีออตฟาจี ATG9A, ATG12, ATG16L1 และ LC3 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ wild type ($p > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 6

สรุปและอภิปรายผล

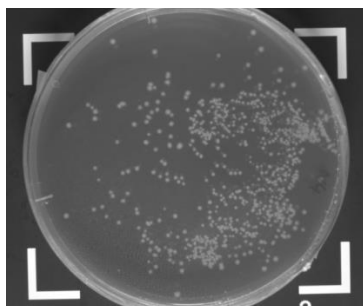
งานวิจัยนี้ได้โคลนยีน LHB โดยเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งที่ 4, 112 และ 309 ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis และถ่ายพลาสมิดที่มียีน LHB เข้าสู่เซลล์มะเร็งตับ Huh7 ผลการทดลอง พบว่าการแสดงออกของโปรตีน LHB

มีขนาด 39 kDa (Non-glycosylated) และ 42 kDa (Glycosylated) และเมื่อตรวจสอบการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชันด้วยเอนไซม์ PNGaseF พบว่า ในตำแหน่ง N309Q ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง จึงกล่าวได้ว่า ในตำแหน่งนี้อาจเป็นตำแหน่งที่สำคัญในการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชัน นอกจากนี้ในการศึกษาบทบาทของการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชันต่อกระบวนการออตฟาจี ด้วยวิธี Immunoblotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ATG9A, ATG12, ATG16L1 และ LC3 พบว่า ในตำแหน่ง N4Q, N112Q และ N309Q การแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ wild type

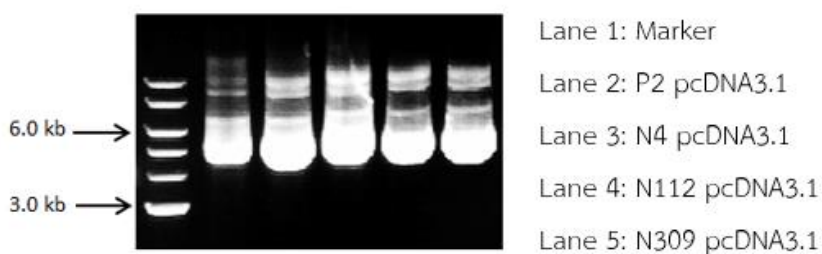
จากการวิจัยเบื้องต้น จึงสรุปได้ว่า การเกิดเอ็นไกลโคซิเลชันของโปรตีน LHB ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งที่ 4, 112 และ 309 ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis ในเซลล์มะเร็งตับ Huh7 อาจไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการออตฟาจี



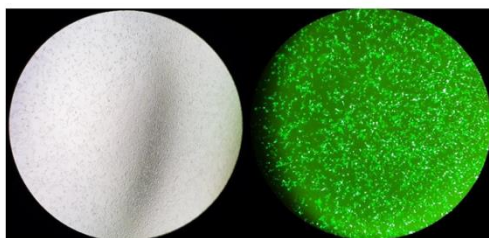
ภาพที่ 1 แถบผลิตภัณฑ์ PCR ของเวกเตอร์ pGEM-T ที่มี wild type หรือ mutants ของยีน LHB ที่ได้จากการ run gel electrophoresis



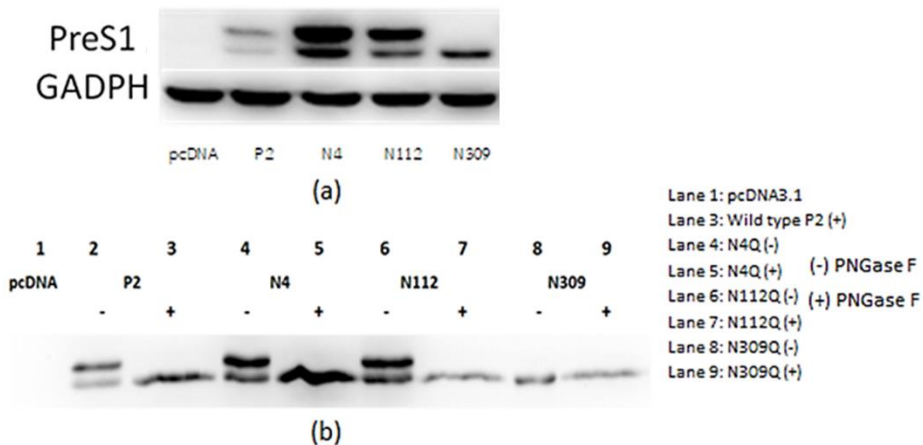
ภาพที่ 2 โคโลนีของรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอของยีน LHB
ที่อยู่ในเวกเตอร์ pcDNA3.1 บนอาหารคัดเลือก 2xYT



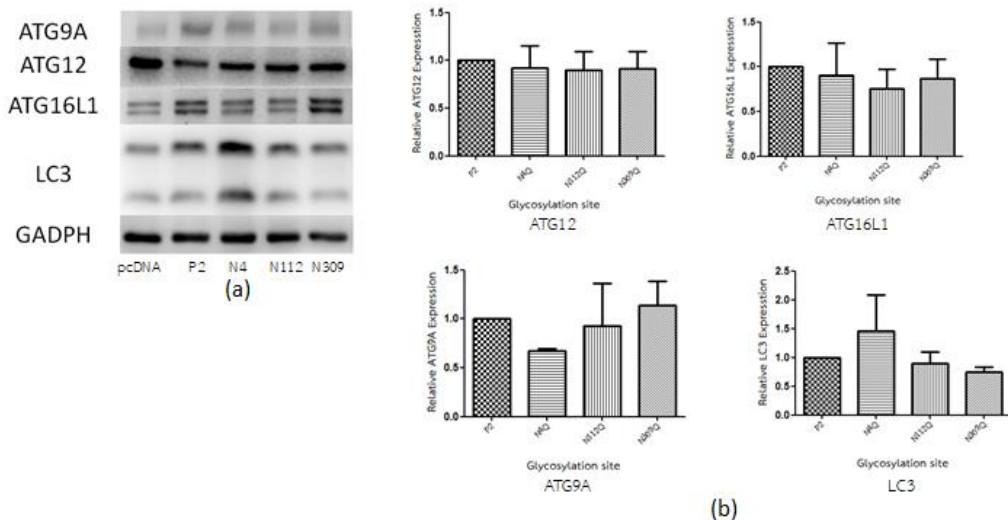
ภาพที่ 3 แลปผลิตภัณฑ์ PCR ของเวกเตอร์ pcDNA3.1 ที่มี wild type หรือ mutants ของยีน LHB
ที่ได้จากการ run gel electrophoresis



ภาพที่ 4 Transfection ของ Huh7 cell line
โดยใช้ Plasmid ATG16L1 ที่มี GFP เป็นยีนรายงานผล (reporter genes)



ภาพที่ 5 (a) การแสดงออกของโปรตีน LHB ที่ตรวจสอบโดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน PreS1 ในเซลล์มะเร็งตับ Huh7 ที่ส่งถ่ายด้วย plasmid pcDNA3.1 ที่มี wild type หรือ mutants ของยีน LHB (b) การตรวจสอบการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชัน ด้วยเอนไซม์ PNGase F และแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน PreS1 ในเซลล์มะเร็งตับ Huh7 ที่ส่งถ่ายด้วย plasmid pcDNA3.1 ที่มี wild type หรือ mutants ของยีน LHB



ภาพที่ 6 การแสดงออกของโปรตีนในวิถีออโตฟาจีในเซลล์มะเร็งตับ Huh7 ตรวจสอบโดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ATG9A, ATG12, ATG16L1 และ LC3



ข้อเสนอแนะ

เนื่องด้วยประสิทธิภาพของการถ่ายพลาสมิตเข้าสู่เซลล์มะเร็งตับ Huh7 อยู่ที่ประมาณ 70% จึงอาจทำให้ยังไม่ได้ผลการทดลองที่ชัดเจนมากนัก ในการวิจัยครั้งต่อไป ผู้วิจัยควรศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ ที่มีผลของการถ่ายพลาสมิตเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เพื่อจะได้ทราบและเข้าใจถึงบทบาทของเอ็นไกลโคซิเลชั่นของโปรตีนบนผิวเชื้อไวรัสตับอักเสบบีในการเกิดกระบวนการออโตฟาจีมากขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่แนวทางในการรักษาใหม่ๆ หรือพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet*. 1981; 2:1129-33.
2. Schmid D, Dengjel J, Schoor O, Stevanovic S, Münz C. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J Mol Med*. 2006; 84: 194-202.
3. Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe*. 2009; 5: 527-49.
4. Sir D, Tian Y, Chen WL, Ann DK, Yen TS, Ou JH. The early autophagic pathway is activated by hepatitis B virus and required for viral DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 4383-88.
5. Tang H, Da L, Mao Y, et al. Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of Beclin 1 expression. *Hepatology*. 2009; 49: 60-71.
6. Li J, Liu Y, Wang Z, et al. Subversion of cellular autophagy machinery by hepatitis B virus for viral envelopment. *J Virol*. 2011; 85: 6319-33.
7. Lambert C and Prange R. Posttranslational N-glycosylation of the hepatitis B virus large envelope protein. *Virol J*. 2007; 4: 45.
8. Yu DM, Li XH, Mom V, et al. N-glycosylation mutations within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape. *J Hepatol*. 2014; 60: 515-22.