แบบประเมินบทความ/งานวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

ชื่อบทความ (ภาษาไทย) : บทบาทของเอ็นไกลโคซิเลชันของโปรตีนบนผิวเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในการเกิดกระบวนการออโตฟาจ

(ภาษาอังกฤษ) : The Role of N-glycosylation of Hepatitis B Surface Protein in Autophagy

หัวข้อการพิจารณา

หัวข้อ	คะแนนประเมิน					ข้อแก้ไข / ข้อเสนอแนะ
	1	2	3	4	5	
1. บทคัดย่อ					✓	
2. Abstract					✓	
3. บทนำ					✓	
4. วัตถุประสงค์การวิจัย/การศึกษา					✓	เป็นงานวิจัยที่น่าสนใจ เทคนิคที่ใช้ทันสมัย
5. วิธีการวิจัย/วิธีการศึกษา					✓	ในการศึกษาด้วยกลไกการเกิดโรคไวรัสตับอักเสบ บี ทางด้านการปรับปรุงแก้ไขเพิ่มเติม เป็นตัวแทนที่ดีในการศึกษาทางสรีรวิทยา และสามารถนำไปใช้ในการสอนระดับปริญญาตรีได้
6. ผลการวิจัย/ผลการศึกษา					✓	
7. สรุปผลการวิจัย/สรุปผลการศึกษา					✓	
8. อภิปรายผล/ข้อเสนอแนะ					✓	
9. เอกสารอ้างอิง					✓	
10. ความใหม่และคุณค่าทางวิชาการ					✓	

บทบาทของเอ็นไกลโคซิเลชั่นของโปรตีนบนผิวเชื้อไวรัสตับอักเสบบี ในการเกิดกระบวนการออโตฟาจี

สกุลรัตน์ บุญรวบ อิงอร กิมกง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
email: sakulrat.b@ku.th

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคไวรัสตับอักเสบแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง และยังมีความเสี่ยงในการพัฒนาเป็นตับแข็งและมะเร็งตับ ออโตฟาจีเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในการทำลายไวรัส ซึ่งเชื้อไวรัสตับอักเสบบีสามารถใช้ประโยชน์จากกระบวนการออโตฟาจีในการเพิ่มจำนวนตัวเอง นอกจากนี้พบว่าการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่นในส่วนโปรตีนบนผิวของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของไวรัสตับอักเสบบี โดยไวรัสสามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันที่จะมาทำลายได้ แต่ปัจจุบันยังไม่มีรายงานความเกี่ยวข้องระหว่างเอ็นไกลโคซิเลชั่นในไวรัสตับอักเสบบีกับการเกิดกระบวนการออโตฟาจี ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งที่จะอธิบายบทบาทของการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่นในบริเวณโปรตีนบนผิวเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อการเกิดกระบวนการออโตฟาจี โดยโคลนยีน LHB และเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งที่ 4, 112 และ 309 ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis ถ่ายพลาสมิดที่มียีน LHB เข้าสู่เซลล์มะเร็งตับ Huh7 พบว่าการแสดงออกของโปรตีน LHB มีขนาด 39 kDa (Non-glycosylated) และ 42 kDa (Glycosylated) และเมื่อตรวจสอบการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่นด้วยเอนไซม์ PNGaseF พบว่า ในตำแหน่ง N309Q ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง จึงกล่าวได้ว่า ในตำแหน่งนี้อาจเป็นตำแหน่งที่สำคัญ ผลการศึกษาด้วยวิธี Immunoblotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ATG9A, ATG12, ATG16L1 และ LC3 พบว่า ในตำแหน่ง N4Q, N112Q, และ N309Q ไม่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ wild type จากการวิจัยเบื้องต้น จึงสรุปได้ว่า การเกิด N-glycosylation ของ L protein ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งที่ 4, 112 และ 309 ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis ในเซลล์ มะเร็งตับ Huh7 ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการเกิดออโตฟาจี

คำสำคัญ: ไวรัสตับอีกเสบบี, เอ็นไกลโคซิเลชั่น, ออโตฟาจี

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

Sakulrat Boonruab Ingorn Kimkong

Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University
email: sakulrat.b@ku.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 found that large surface protein of HBV (LHB) is modified by N-glycosylation. This modification of the HBV glycosylation pattern affects not only virion assembly and infectivity, but also immune escape. Currently, there are no any reports involving with the role of N-glycosylation in HBV proteins and autophagy, which is a process in HBV immune responses. 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 position 4, 112 and 309 by site-directed mutagenesis technique. These constructs were transfected into Huh7 cells. Western blot analysis was used to detect the LHB protein with specific antibody showed 39KDa and 42 KDa size. After N-glycosylation detection by PNGsase F found N309 not converted the profile, therefore N309Q maybe plays an important position in N-glycosylation. ATG9A, ATG12, ATG16L1 and LC3 protein expression at N4Q, N112Q and N309Q were no significant value when comparing with wildtype in autophagy detection. This preliminary study were summarized that N-glycosylation of L protein mutants at amino acid position 4, 112 and 309 by site-directed mutagenesis technique into Huh7 cells is not involved in autophagy process.

Keywords: Hepatitis B Virus; N-glycosylation; Autophagy

บทนำ

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

ออโตฟาจี (autophagy) จัดเป็นภูมิต้านทานด่านแรก (innate immunity) ที่โฮสท์ใช้ในการกำจัดเชื้อพวก intracellular pathogens และช่วยกระตุ้นภูมิต้านทานด่านที่สอง (adaptive immunity) ในกระบวนการ antigen processing เพื่อนำเสนอแอนติเจนต่อ CD4+ T cells 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 HBV 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 มีความสำคัญในการเพิ่มจำนวนของตัวไวรัสเอง นอกจากนี้ในการศึกษาของ Tang H (2009) และคณะ พบว่า HBx protein ของ HBV ชักนำกระบวนการ autophagy โดยเพิ่มการแสดงออกของยีน Beclin 1 นอกจาก HBV อาศัย HBx ในการเพิ่มจำนวนแล้ว การศึกษาของ Li J (2011) พบว่า small HBV surface proteins (SHBs) มีส่วนในการกระตุ้นกระบวนการออโตฟาจี และยังช่วยในการเพิ่มจำนวนของ HBV ด้วยเช่นกัน

เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานการศึกษาของ Lambert C (2007) และคณะ พบการเกิด N-Glycosylation ในส่วน large surface proteins ของ HBV (LHBs) การศึกษาเพิ่มเติมของ Yu D และคณะ (2014) เกี่ยวกับบทบาทของ N-Glycosylation ใน HBV พบว่าเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของ HBV โดย HBV สามารถหลบหลีกภูมิคุ้มกันที่จะมาทำลายได้เนื่องจากมีการเติม N-glycan ซึ่งอาจไปรบกวนการจับของแอนติบอดี สำหรับกระบวนการออโตฟาจีซึ่งจัดเป็นภูมิคุ้มกันชนิดหนึ่งที่ช่วยในการทำลายเชื้อไวรัส ปัจจุบันยังไม่มีรายงานความเกี่ยวข้องระหว่าง N-glycosylation ในเชื้อ HBV กับการเกิดกระบวนการ autophagy ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งที่จะอธิบายบทบาทของการเกิด N-glycosylation ในเชื้อไวรัสตับอักเสบบี บริเวณ large surface protein ต่อการเกิดกระบวนการออโตฟาจี ผลการศึกษาจะทำให้ทราบและเข้าใจถึงกลไกของไวรัสในการหลบหลีกการทำลายของระบบภูมิคุ้มกันมากยิ่งขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่แนวทางในการรักษาใหม่ๆ หรือพัฒนาวัคซีนที่มีประสิทธิภาพได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.เพื่อศึกษาบทบาทของการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่นบริเวณโปรตีนบนผิวของเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อการเกิดกระบวนการออโตฟาจีในเซลล์มะเร็งตับ

ระเบียบวิธีวิจัย

1. Cloning LHB gene

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain reaction;PCR) ด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีน LHB และเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pGEM-T เพื่อถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เชื้อ Escherichia coli DH5α ซึ่งเป็นการโคลนยีน PreS1, Pre S2 และ S ที่สร้างโปรตีนบนผิวของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี (large HBsAg; LHB) และตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธี colony PCR เอนไซม์ตัดจำเพาะ และวิธี sequencing

2. Site-directed mutagenesis

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR โดยดีเอ็นเอต้นแบบอยู่ในรูปพลาสมิด (pGEM-T) ที่มียีน LHB และใช้ mutagenic primers ที่เปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งที่ต้องการ เพื่อศึกษาการเกิด N-glycosylation ในส่วน large surface proteins ของ HBV (LHBs) ซึ่งการทดลองครั้งนี้ ได้เปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่ง คือในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 4 (N4), 112 (N112) และ 309 (N309) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ DpnI เพื่อย่อยดีเอ็นเอต้นแบบ และ transform เข้าสู่เชื้อ Escherichia coli DH5α และตรวจสอบ mutants ที่ได้ด้วยวิธี sequencing

3. Sub-cloning into mammalian expression vector

นำพลาสมิด (pGEM-T) ที่มียีน LHB มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pcDNA3.1 และทำการถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เชื้อ Escherichia coli DH5α และตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธี colony PCR เอนไซม์ตัดจำเพาะ และวิธี sequencing

4. Transfection of constructs to mammalian cell lines

นำพลาสมิด pcDNA3.1 ที่มียีน LHB มาถ่ายไปยังเซลล์มะเร็งตับ HuH-7 cells โดย Lipofectamine 2000 และตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน LHB โดยวิธี western blotting

5. Detection of Glycosylation

ตรวจสอบการเกิด N-glycosylationด้วยเอนไซม์ peptide-N4-(N-acetyl-ú-D-glucosaminyl) asparagine amidase (PNGase F) จากนั้น run polyacrylamide gel electrophoresis ที่มี sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) และ immunoblotting

6. Autophagy detection

ประเมินโดยตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนในวิถีออโตฟาจีด้วยวิธี western blotting ใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน LC3 และโปรตีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

7. Statistical analysis

ตัวแปรเชิงปริมาณจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์ทางสถิติได้ดำเนินการโดยใช้การทดสอบที สำหรับข้อมูลเชิงปริมาณ (Student's t-test) และการทดสอบไคสแควร์ สำหรับตัวแปรเชิงคุณภาพ (Chi-square test) พิจารณาความแตกต่างของค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

ผลการโคลนยีน PreS1, PreS2 และ S โดยเทคนิค PCR ด้วย primers ที่จำเพาะต่อยีน LHB และเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pGEM-T เพื่อถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เชื้อ Escherichia coli DH5α พบว่า ผลของการคัดเลือกโคโลนีบนอาหารคัดเลือก 2xYT โดยวิธีการ spread plate เกิดโคโลนีสีขาวบนอาหารคัดเลือก 2xYT ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน และผลตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธี colony PCR โดยเช็คขนาดของ PCR product ที่ได้โดยวิธี electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel โดย Load PCR product 3 µl/lane และใช้ marker Quick-Load® Purple 2-Log DNA Ladder (0.1 - 10.0 kb) พบว่า PCR product พบว่า P2PGEM มีขนาดประมาณ 4 kb

ผลการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 4 (N4), 112 (N112) และ 309 (N309) โดยใช้เทคนิค Site-directed mutagenesis แล้ว transform เข้าสู่เชื้อ Escherichia coli DH5α ให้ผลการคัดเลือกโคโลนีบนอาหารคัดเลือก 2xYT เกิดโคโลนีสีขาว และผลตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธี colony PCR พบว่า PCR product กับเวคเตอร์ pGEM-T ของ mutants ของยีน LHB มีขนาดประมาณ 4 kb หลังจากนั้นตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และวิธี sequencing เพื่อเป็นการยืนยันผล

ผลการ Sub-cloning เข้าสู่เวคเตอร์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian expression vector) โดยนำพลาสมิด (pGEM-T)ที่มียีน LHB หรือ mutants ของยีน LHB ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้า มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NheI และ HindIII เพื่อทำการเปลี่ยน 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 มาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pcDNA3.1 โดยทำการ ligation และทำการถ่ายรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เชื้อ Escherichia coli DH5α โดยคัดเลือกโคโลนีบนอาหารคัดเลือก 2xYT ด้วยวิธีการ spread plate ให้ผลโคโลนีสีขาวบนอาหาร เมื่อได้โคโลนีของรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นดีของยีน LHB แล้ว ก็ทำการตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธี colony ของยีน LHB กับเวคเตอร์ pcDNA3.1 ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า แถบผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pcDNA3.1 ของ mutants ของยีน LHB มีขนาดประมาณ 5-6 kb จากนั้นตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และวิธี sequencing เพื่อยืนยันผลการทดลอง

ผลการนำพลาสมิด pcDNA3.1 ที่มียีน LHB มาถ่ายไปยังเซลล์มะเร็งตับ Huh-7 cells โดย Lipofectamine 2000 โดยมีกลุ่มการทดลองควบคุมคือ GFP ATG16L1 (reporter genes) โดยใช้กล้องสเตอริโอฟลูออเรสเซนต์ หลังจาก transfection 72 ชั่วโมง ทำการเก็บ cell lysate และ supernate เพื่อนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน พบว่าเปอร์เซนต์การถ่ายไปยังเซลล์ Huh7 มี 70 เปอร์เซนต์ จากนั้นเก็บเซลล์ เพื่อตรวจสอบ L protein (โปรตีนของไวรัสตับอักเสบบี) ด้วยวิธี western blotting โดยใช้แอนติบอดี PreS1 พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน LHB ขนาด 39 kDa (Non-glycosylated) และ 42 kDa (Glycosylated) เมื่อทำการถ่ายใน 12-well plate

ผลการศึกษาการเกิด N-glycosylation หลังจากทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน LHB ด้วยเอนไซม์ peptide-N4-(N-acetyl-ú-D-glucosaminyl) asparagine amidase (PNGase F) โดย run polyacrylamide gel electrophoresis ที่มี sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) และทำการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนอีกครั้ง โดยวิธีการ western blotting โดยใช้แอนติบอดี PreS1 (AP2) ในการตรวจสอบ พบว่า การแสดงออกของโปรตีน LHB ขนาด 39 kDa (Non-glycosylated) และ 42 kDa (Glycosylated) มีการเกิดเปลี่ยนแปลงของ N-glycosylation ใน plasmid ที่เป็น wild type (P2) , Mutants ตำแหน่ง N4 และ N112 มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบจากการแสดงออกของโปรตีนขนาด 42 kDa (Glycosylated) ไปเป็นรูปแบบการแสดงออกของโปรตีน LHB ขนาด 39 kDa (Non-glycosylated) และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของ N-glycosylation ใน Mutants ตำแหน่ง N309 จึงกล่าวได้ว่า ในตำแหน่งนี้อาจเป็นตำแหน่งที่สำคัญ

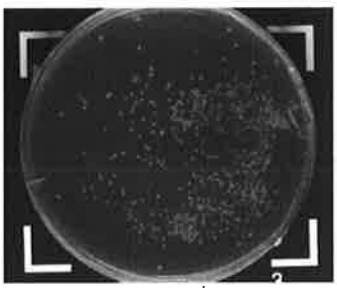
ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนในวิถีออโตฟาจีจะใช้วิธี Western blotting ซึ่งทำการเก็บโปรตีนใส่ใน RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) + protease inhibitor เพื่อปลดปล่อยเอนไซม์ protease และทำให้เซลล์แตกเพื่อได้โปรตีนออกมาโดยใช้ Sonicator ประมาณ 5-10 นาที และวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยชุด PierceTM BCA protein assay kit และจากนั้นนำมารันบนเจล SDS-PAGE ที่มีความเข้มข้น 10% 100V เวลา 90 นาที และย้ายไปยัง polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane 100 V เวลา 60 นาที หลังจากนั้นทำการ blocking ด้วย 5% skimmilk 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) ด้วยความเจืองจาง 1:1000 และทำการบ่มข้ามคืน ณ อุณหภูมิ 4 ^{O}C 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)) ด้วยความเจืองจาง 1:5000 เป็นเวลา 60 นาที และล้างด้วย TBS-T buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที หลังจากนั้นทำการ develope ผลด้วย SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate โดยใช้เครื่อง Image Quant™ LAS 4000 พบว่า ในตำแหน่ง N4Q, N112Q, และ N309Q ไม่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ wild type จากการวิจัยเบื้องต้น

สรุปและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาและวิจัยทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า บทบาทของการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่นในบริเวณโปรตีนบนผิวเชื้อไวรัสตับอักเสบบีต่อการเกิดกระบวนการออโตฟาจี โดยโคลนยีน LHB และเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งที่ 4, 112 และ 309 ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis ถ่ายพลาสมิดที่มียีน LHB เข้าสู่เซลล์มะเร็งตับ Huh7 พบว่าการ

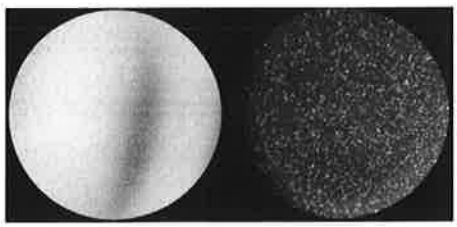
แสดงออกของโปรตีน LHB มีขนาด 39 kDa (Non-glycosylated) และ 42 kDa (Glycosylated) และเมื่อตรวจสอบการเกิดเอ็นไกลโคซิเลชั่นด้วยเอนไซม์ PNGaseF พบว่า ในตำแหน่ง N309Q ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง จึงกล่าวได้ว่า ในตำแหน่งนี้อาจเป็นตำแหน่งที่สำคัญ ผลการศึกษาด้วยวิธี Immunoblotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน ATG9A, ATG12, ATG16L1 และ LC3 พบว่า ในตำแหน่ง N4Q, N112Q, และ N309Q ไม่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับ wild type จากการวิจัยเบื้องต้น จึงสรุปได้ว่า การเกิด N-glycosylation ของ L protein ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่งที่ 4, 112 และ 309 ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis ในเซลล์ มะเร็งตับ Huh7 ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการเกิดออโตฟาจี

ภาพที่ 1 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pGEM-T ของ mutants ของยีน LHB ที่ได้จากการ run gel electrophoresis

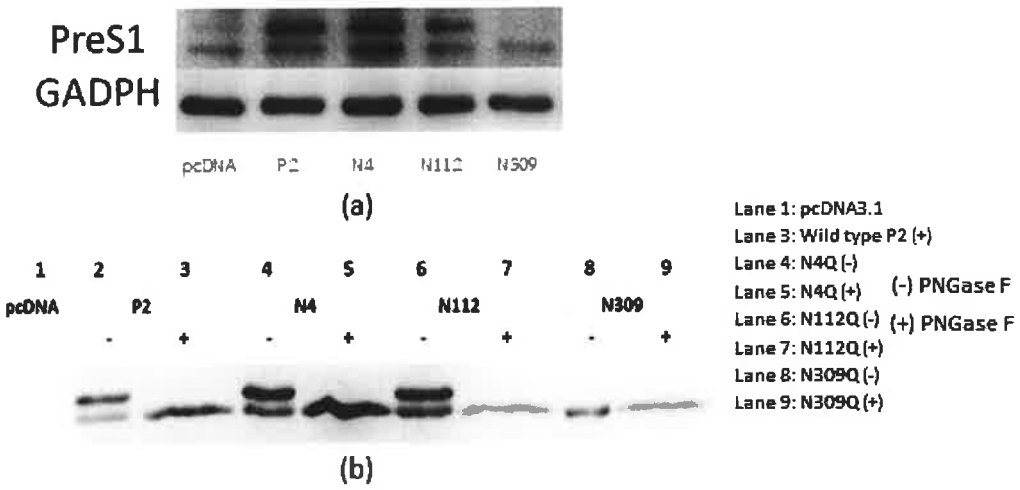


ภาพที่ 2 แสดงโคโลนีของรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นดีของยีน LHB ที่อยู่ในเวคเตอร์ pcDNA3.1 บนอาหารคัดเลือก 2xYT

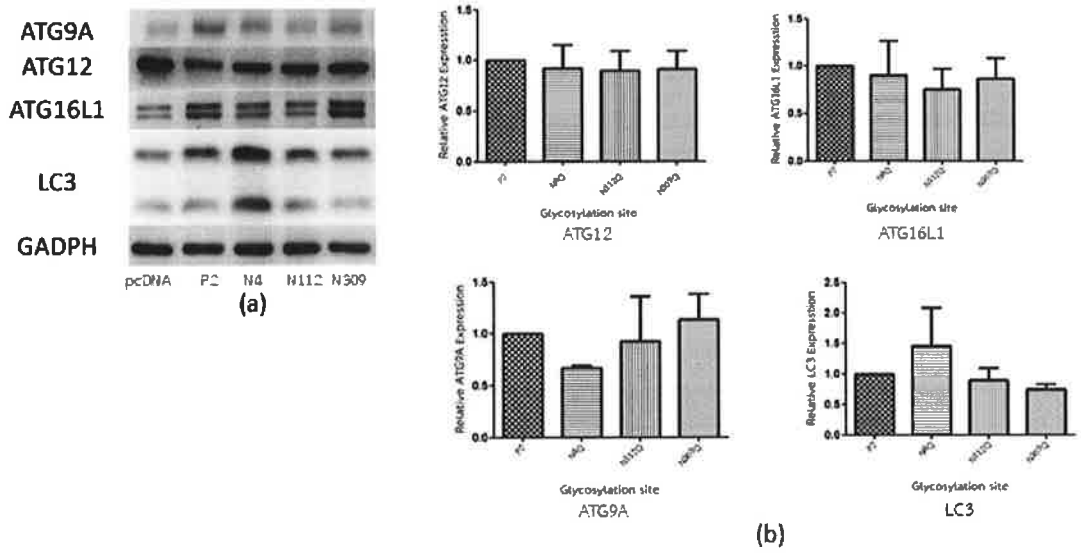
ภาพที่ 3 แสดงผลิตภัณฑ์ PCR กับเวคเตอร์ pcDNA3.1 ของ mutants ของยีน LHB ที่ได้จากการ run gel electrophoresis



ภาพที่ 4 การสังเกตดูเปอร์เซนต์ของการ transfection ของ Huh7 cell line โดยใช้ plasmid ATG16L1 ที่มี GFP เป็นยีนรายงานผล (reporter genes)



ภาพที่ 5 (a) การแสดงออกของโปรตีน LHB โดยใช้ แอนติบอดี PreS1 (AP2) ซึ่งผ่านการถ่ายไป Huh7 cells ด้วย plasmid (pcDNA3.1) ที่มียีน LHB (Wildtype) และ mutants ของยีน LHB (b) แสดงการตรวจสอบการเกิด N-glycosylation ด้วยเอนไซม์ PNGase F โดยใช้แอนติบอดี PreS1 Ap2 ในเซลล์มะเร็งตับ Huh7 ด้วย plasmid (pcDNA3.1) ที่มียีน LHB (Wildtype) และ mutants ของยีน LHB



ภาพที่ 6 ผลของการแสดงออกของผลของการแสดงออกของโปรตีนในวิถีออโตฟาจีโดยใช้แอนติบอดีต่อ โปรตีน ATG9A ATG12 ATG16L1 และLC3 ในเซลล์มะเร็งตับ Huh7

เอกสารอ้างอิง

Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. (1981, Nov). **Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan**. Lancet. 1981 Nov 21;2(8256):1129-33.

Lambert C and Prange R. (2007, May). **Posttranslational N-glycosylation of the hepatitis B virus large envelope protein**. Virol J.2007 May 30;4:45.

Li L, Oropeza CE, Kaestner KH, McLachlan A. (2009, Feb). **Limited effects of fasting on hepatitis B**

virus (HBV) biosynthesis in HBV transgenic mice. J Virol. 2009 Feb;83(4): 1682-8.

Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, Raimondo G. (2014 , August). **Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications.** 2014 August 61;2: 408–417.

Saitoh T and Akira S. (2010 , June). **Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins.** J. Cell Biol. 2010 June189;6:925–935.

Tang H, McLachlan A. (2001). **Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1841-1846.

Yu DM, Li XH, Mom V, Lu ZH, Liao XW, Han Y. (2014, Mar). **N-glycosylation mutations within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape**. J Hepatol. 2014 Mar;60(3):515-22.

Saitoh T and Akira S. (2010, June**). Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins.** J. Cell Biol. 2010 June189;6:925–935.

Saitoh T, Fujita N, Yoshimori T et al. (2010) **Regulation of nucleic acid-induced innate immune responses by membrane trafficking.** Oxford Journals 22: v30 (abstract in ICI2010 conference).