

ฉบับแปลไทย (Thai Translations)

The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I

<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2024202118>

โปรตีน ORF8 ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 เป็นสื่อกลางชักนำให้ เกิดการหลบหลีกภูมิคุ้มกัน (immune evasion) โดยลดการ ทำงานของ MHC- I ลง

ความสำคัญ (Significance)

เราได้รายงานว่าการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ใช้โปรตีน ORF8 ของมันเป็นกลไกที่มีลักษณะเฉพาะตัว ในการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ MHC-I บนผิวเซลล์ เพื่อที่จะหลบหลีกการเฝ้าระวังของภูมิคุ้มกัน (immune surveillance) การศึกษาวิจัยของเรามีความสำคัญสำหรับการทำให้เกิดความเข้าใจใน พยาธิกำเนิดหรือกระบวนการเกิดโรค (pathogenesis) ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 และจะให้มุมมอง เพิ่มเติมต่อการศึกษาระดับโมเลกุลที่กำลังดำเนินไปเกี่ยวกับกลไกและการทำงานของภูมิคุ้มกันด้านไวรัสชนิด T cells ในการเกิดโรคโควิด-19

บทคัดย่อ (Abstract)

โรคโควิด-19 ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์กลุ่มอาการทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (ไวรัสซาร์ส-โควี-2) ได้กลายเป็นการระบาดใหญ่ทั่วโลก และคร่าชีวิตผู้คนไปแล้วมากกว่า 2 ล้านคนทั่วโลก ถึงแม้ว่า ลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี และของไวรัสซาร์ส-โควี-2 จะมีความเหมือนกันสูง (high homology) แต่ลักษณะเฉพาะทางคลินิกและลักษณะเฉพาะทางพยาธิวิทยาของโรคโควิด-19 ก็มีความแตกต่างจากของโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรงหรือซาร์สอย่างมีนัยสำคัญ การที่ไวรัสซาร์ส-โควี-2 สามารถหลบหลีกการเฝ้าระวังของภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ (cellular immunity) ได้หรือไม่อย่างไรนั้น จำเป็นจะต้องมีการชี้แจงอธิบายให้กระจ่างชัดเพิ่มเติม ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อ

ไวรัสซาร์ส-โควิ-2 ได้นำไปสู่การลดลงของ major histocompatibility complex class I (MHC-I) ทั้งในหลอดทดลอง (in vitro) และในสัตว์ทดลอง (in vivo) โปรตีนของไวรัสที่ถูกสร้างโดยโปรตีน open reading frame 8 (ORF8) ของไวรัสซาร์ส-โควิ-2 ซึ่งมีส่วนเหมือนกันน้อยที่สุด (least homology) กับไวรัสซาร์ส-โควิในบรรดาโปรตีนไวรัสทั้งหมด ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับโมเลกุล MHC-I และเป็นสื่อกลางชักนำให้การทำงานของ MHC-I ลดลง ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน โมเลกุล MHC-I ถูกกำหนดเป็นเป้าหมายอย่างเฉพาะเจาะจง (selectively targeted) สำหรับการย่อยสลายโดยเอนไซม์ไลโซโซม (lysosomal degradation) ผ่านทางกลไกการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) ดังนั้น เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 จึงมีความไวต่อผลกระทบต่อการแตกสลาย (lysis) โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (cytotoxic T lymphocytes) เนื่องจากว่าโปรตีน ORF8 ทำให้ระบบการนำเสนอแอนติเจน (antigen presentation system) สูญเสียไป ดังนั้นการยับยั้งขัดขวางโปรตีน ORF8 จึงอาจจะเป็นแนวทางหรือวิธีการในการปรับปรุงการเฝ้าระวังของภูมิคุ้มกัน (immune surveillance) นับตั้งแต่มีการระบาดของโรคโควิด-19 เป็นต้นมา โรคนี้ก็ได้มีการแพร่กระจายออกไปทั่วโลกอย่างรวดเร็ว (1–4) ถึงแม้ว่าทั้งโรคโควิด-19 และซาร์ส (Severe Acute Respiratory Syndrome) ต่างก็เป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยทางระบบทางเดินหายใจอย่างรุนแรง แต่ข้อมูลทางระบาดวิทยาและทางคลินิกก็ทำให้น่าเชื่อได้ว่าความถี่ (สเปกตรัม) ของโรคของโควิด-19 มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดจากโรคซาร์ส โรคโควิด-19 มีการแสดงช่วงระยะฟักตัวที่ยาวนานกว่าโรคซาร์ส (คือราว ๆ 6.4 วัน, ช่วงตั้งแต่ 0 – 24 วัน) การแพร่กระจายจากคนสู่คนอาจจะสามารถเกิดขึ้นได้จากผู้ป่วยในระยะก่อนหน้าที่จะมีการแสดงอาการ (presymptomatic) (5, 6) การติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ (asymptomatic infection) มีการรายงานอย่างกว้างขวาง และทำให้ระบบการป้องกันโรคในชุมชนตกอยู่ในอันตรายอย่างรุนแรง (5) ส่วนหนึ่ง (ส่วนที่สำคัญ) ของผู้ป่วยที่หายแล้วยังคงมีซากของไวรัสอยู่ในทางเดินระบบหายใจส่วนบนและในทางเดินอาหาร ซึ่งนำไปสู่การที่ต้องเข้าพักรักษาตัวในโรงพยาบาลเป็นเวลานานมากขึ้นเป็นอย่างมาก (7–9) และผู้ป่วยที่หายแล้วบางรายก็ยังคงมีอาร์เอ็นเอของไวรัสซึ่งสามารถตรวจพบได้อีก (redetectable) ภายหลังจากที่ออกจากโรงพยาบาลแล้ว (7) จากการที่ปริมาณของไวรัส (viral titer) และอาการทางคลินิก (clinical symptom) มีการพัฒนาไม่พร้อมกัน (desynchronization) ทำให้น่าเชื่อได้ว่าเชื้อซาร์สโคโรนาไวรัส 2 (ซาร์ส-โควิ-2) อาจจะสามารถจำลองตัวเองได้อย่างกว้างขวางในเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) ที่เกิดการติดเชื้อ โดยที่ไม่ถูกตรวจพบได้อย่างมีประสิทธิภาพจากระบบภูมิคุ้มกันต้านไวรัสของเซลล์เจ้าบ้าน (10)

เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (cytotoxic T lymphocytes หรือ CTLs) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อไวรัส โดยเข้าทำลายเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสโดยตรง (11) ในเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสโมเลกุล major histocompatibility complex class I (MHC-I) มีการแสดงเปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนต่าง ๆ ของไวรัส ทันทีที่ตัวรับของ T cell (T cell receptor) บน CD8⁺ T cells จดจำสัญญาณพิเศษที่นำเสนอโดย MHC-I-peptide complex ได้ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) ก็จะปลดปล่อยสารพิษต่าง ๆ (ได้แก่ perforins, granzyme, และ FasL) ซึ่งจะเหนี่ยวนำโดยตรงให้เกิดการตายของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส ตลอดจนหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ต่าง ๆ เช่น interferon- γ , TNF- α , และ IL-2 (11) ด้วยเหตุนี้เซลล์ที่สนับสนุนการเพิ่มจำนวนของไวรัสก็จะถูกกำจัดไป และการแพร่กระจายของไวรัสก็จะได้รับการป้องกันอย่างมีประสิทธิภาพ (12) เชื้อไวรัสบางชนิดที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อเรื้อรัง เช่น เชื้อไวรัสโรคมะเร็งกัมมันตภาพรังสีหรือเอดส์สายพันธุ์หลักดั้งเดิม (HIV-1) และเชื้อเฮอร์ปีส์ไวรัสที่สัมพันธ์กับโรคมะเร็งคาโปซิซาร์โคมา (Kaposi's sarcoma-associated herpes virus หรือ KSHV) สามารถรบกวนขัดขวางการนำเสนอแอนติเจนสำหรับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการลดการแสดงออกของ MHC-I บนผิวเซลล์และหลบหลีกการเฝ้าระวังของภูมิคุ้มกัน (immune surveillance) (13–15) ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้ศึกษาว่าเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 สามารถมีผลกระทบต่อระบบการนำเสนอแอนติเจนและช่วยให้ไวรัสหลบหลีกการตรวจจับจากการเฝ้าระวังของระบบภูมิคุ้มกันได้หรือไม่ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้รายงานว่าการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 นำไปสู่การลดการควบคุม (down regulation) ของ MHC-I ลงทั้งในเซลล์ HEK293T ที่มีการแสดงออกของ human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) (HEK293T/Hace2) ที่ติดเชื้อ และในเซลล์เยื่อของปอด (lung epithelial cells) ที่ติดเชื้อของหนูทดลองชนิด hACE2 transgene mice เราได้คัดกรองโปรตีนทั้งหมดที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง (structural proteins) ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 และ unidentify โปรตีน open reading frames (ORFs) และพบว่าโปรตีน ORF8 ซึ่งมีความเหมือนกันน้อยที่สุดกับไวรัสซาร์ส-โควี ในบรรดาโปรตีนไวรัสทั้งหมด สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับโมเลกุล MHC-I และเป็นสื่อกลางชักนำให้ MHC-I มีการทำงานลดลง โดยผ่านทางวิถีการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy pathway) นอกจากนี้เรายังได้รับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) ที่ได้จากผู้บริจาคที่เป็นผู้ที่มีสุขภาพดี ซึ่งมีความไว (sensitized) ต่อเปปไทด์ SARS-CoV-2 epitope SARS-CoV spike protein-derived peptide-1 (SSp-1, RLNEVAKNL) และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) ที่แยก (isolate) ได้จากผู้ป่วยที่หายจากโรคโควิด-19 ที่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อส่วนผสม (mixture) ของเปปไทด์ต่าง ๆ ของเชื้อ

ไวรัสซาร์ส-โควี-2 เราพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน ORF8 และเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีความต้านทานมากขึ้นต่อการแตกสลายของเซลล์โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTL lysis) การ knockdown (การยับยั้งทำให้ลดลงหรือหมดไป) การแสดงออกของโปรตีน ORF8 ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ทำให้การแสดงออกของ MHC-I ได้รับการฟื้นฟูคืนสภาพ (restored) และเพราะเหตุนี้จึงทำให้เกิดความไวของเซลล์ (cell sensitivity) ต่อการแตกสลายของเซลล์โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTL lysis) โดยรวมแล้วผลที่ได้จากการศึกษาวิจัยของเราทำให้น่าเชื่อถืออย่างมากว่าโปรตีน ORF8 เป็นตัวเหนี่ยวนำให้กลไกของ MHC-I ลดลง และมอบการป้องกันต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) ในเซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัย (Results)

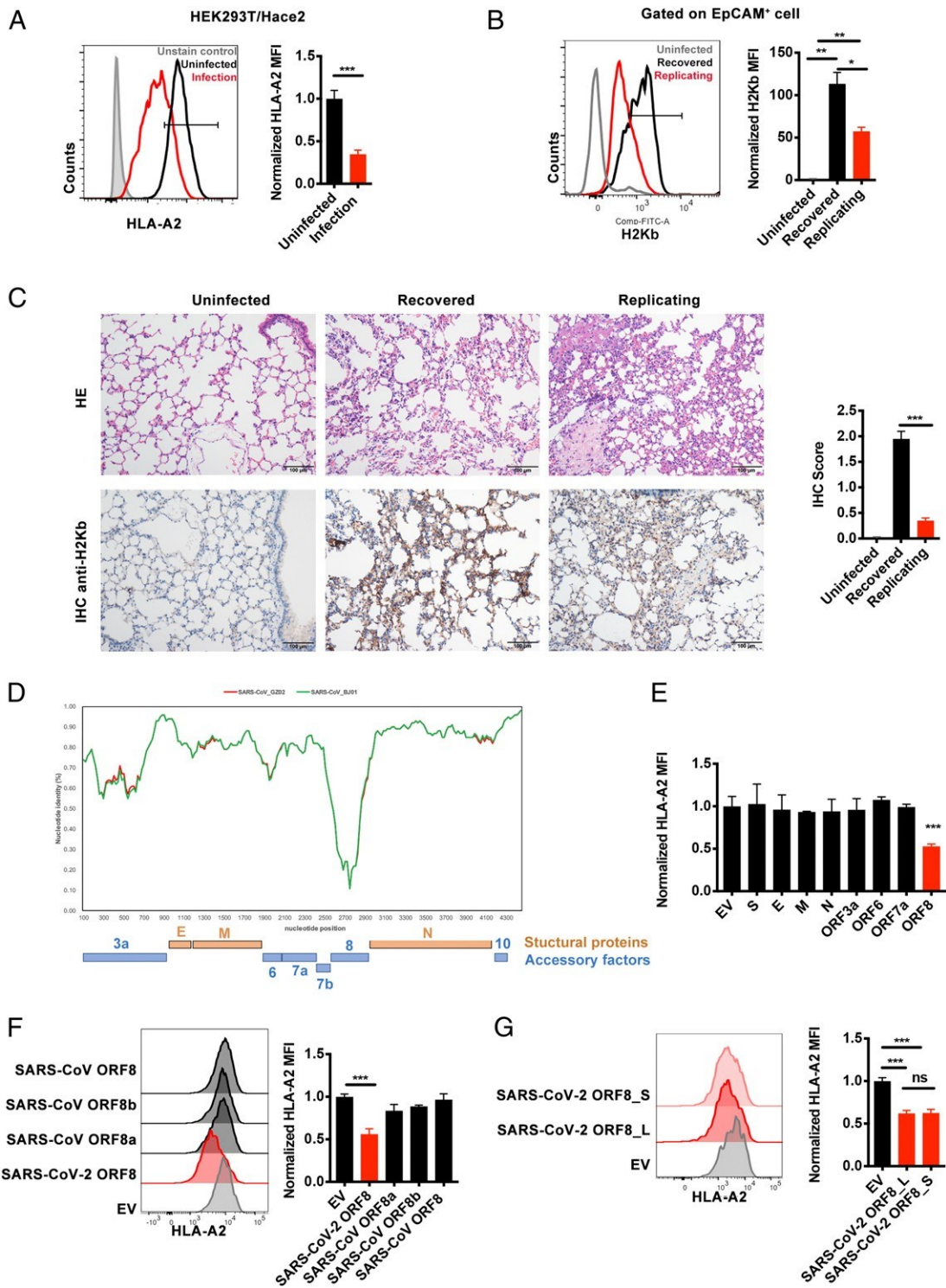
การติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 นำไปสู่การลดลงของกลไกการทำงานของ MHC-I โดยผ่านโปรตีน ORF8.

บ่อยครั้งที่เหตุการณ์ทางชีววิทยาที่ก่อโรค (pathogenic biological events) เช่น การติดเชื้อไวรัส และการเกิดเนื้องอก (tumorigenesis) มักจะมีการใช้ประโยชน์จากความสามารถของมันในการเข้าควบคุมจัดการ (manipulate) ระบบการนำเสนอแอนติเจน (antigen presentation system) เพื่อที่จะหลบหลีกการเฝ้าระวังของภูมิคุ้มกัน (12) ดังนั้นเราจึงได้ทดสอบสมมติฐานที่ว่าเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 อาจจะทำให้ระบบการนำเสนอแอนติเจนได้รับความสูญเสีย สายพันธุ์แท้ดั้งเดิมของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ซึ่งได้รับการแยก (isolate) ภายในองค์กร (in-house) จากผู้ป่วยโรคโควิด-19 ที่มีชื่อว่า hCoV-19/CHN/SYSU-IHV/2020 (16, 17) ถูกใช้เพื่อให้เกิดการติดเชื้อกับเซลล์ HEK293T/Hace2 ที่ปริมาณไวรัสอยู่ที่ 1.0 MOI ตามที่ได้แสดงไว้ใน [ภาพประกอบที่ 1A](#) การแสดงออกของ MHC-1 บนผิวเซลล์ในเซลล์ที่ติดเชื้อมีการลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ เพื่อที่จะศึกษาพยาธิวิทยาของปรากฏการณ์นี้ภายในร่างกายสิ่งมีชีวิตเพิ่มเติมต่อไป เราจึงได้ทำให้นุทคลองชนิด hACE2 mice เกิดการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ตามที่ได้อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้ (16) นุทคลองชนิด hACE2 mice ซึ่งมีการดัดแต่งพันธุกรรมถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มควบคุม หรือ control group (ไม่มีการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2)
2. กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่ได้รับการฉีดไวรัสปริมาณ 4×10^3 PFU ผ่านทางจมูก (intranasally) (หรือกลุ่ม recovered group - กลุ่มที่มีการฟื้นตัว)
3. กลุ่มที่มีการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่ได้รับการฉีดไวรัสปริมาณ 4×10^4 PFU ผ่านทางจมูก (intranasally) (หรือกลุ่ม replicating group - กลุ่มที่มีการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส)

ในวันที่ 6 หลังจากการติดเชื้อ อาร์เอ็นเอของไวรัสได้รับการตรวจหาโดยวิธี quantitative RT-PCR เราพบว่า ไวรัสมีการเพิ่มจำนวนอย่างเข้มข้นในกลุ่มที่ได้รับการฉีดไวรัสในปริมาณ 4×10^4 PFU (กลุ่มที่มีการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส) ซึ่งบ่งบอกจากการที่มีอาร์เอ็นเอของไวรัสอยู่มากกว่า 10,000 copies ในเวลาเดียวกันหนูทดลองจากกลุ่มที่ได้รับการฉีดไวรัสในปริมาณ 4×10^3 PFU มีการฟื้นตัวหายจากการติดเชื้อไวรัส (กลุ่มที่มีการฟื้นตัว) ซึ่งบ่งบอกจากการที่ไม่มีอาร์เอ็นเอของไวรัสอยู่ ต่อจากนั้นเนื้อเยื่อปอดก็ได้รับจากหนูทดลองเหล่านั้น และการแสดงออกของ MHC-I ของเซลล์เยื่อปอด ซึ่งเป็นหนึ่งในบรรดาเซลล์ต่างๆ ของหนูทดลองที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ก็ได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี flow cytometry ต่อไป ([ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S1A](#)) ([18, 19](#)) สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าการแสดงออกของ MHC-I อยู่ในระดับที่ต่ำอย่างยิ่งยวดบนเซลล์เยื่อปอดและมีการเพิ่มขึ้นของ MHC-I หลังจากมีการติดเชื้อไวรัส ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เราก็ได้สังเกตพบว่าการเพิ่มขึ้นของ MHC-I หลังจากมีการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ด้วยเช่นกัน ([ภาพประกอบที่ 1B](#)) ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าเป็นผลที่ตามมาของปฏิกิริยาการตอบสนองต่อไวรัสของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดซึ่งทำให้เกิด การอักเสบของเซลล์ (innate antiviral inflammatory response) ([20, 21](#)) อย่างไรก็ตามการแสดงออกของ MHC-I บนเซลล์เยื่อปอดของหนูทดลองกลุ่มที่มีการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส (กลุ่มที่ 3) ก็อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าในหนูทดลองกลุ่มที่มีการฟื้นตัว (กลุ่มที่ 2) อย่างมีนัยสำคัญ ([ภาพประกอบที่ 1B](#)) การทดสอบทางด้านอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemical assays) เพิ่มเติมต่อมาได้ยืนยันว่าปอดของหนูทดลองกลุ่มที่มีการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส (กลุ่มที่ 3) มีการกระจายตัวของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน nucleocapsid (N) ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 อย่างหนาแน่น ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบกรดนิวคลีอิก (nucleic acid test) ของเรา อันเป็นการบ่งชี้ถึงการเพิ่มจำนวนอย่างเข้มข้นของไวรัสซาร์ส-โควี-2 รวมทั้งการแสดงออกของ MHC-I ที่ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ([ภาพประกอบที่ 1C](#) และ [ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S1B](#)) เมื่อนำมาเชื่อมโยงกันแล้ว เราพบว่าการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 นำไปสู่การลดลงของ MHC-I ทั้งการทดลองในหลอดทดลอง (in vitro) และการทดลองในสัตว์ทดลอง (in vivo)

ภาพประกอบที่ 1.



ภาพประกอบที่ 1. แสดงการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 นำไปสู่การลดลงของ MHC-I โดยผ่านทางโปรตีน ORF8. (A) เซลล์ HEK293T ที่มีการแสดงออกของ ACE2 (HEK293T/Hace2) ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 (hCoV-19/CHN/SYSU-IHV/2020) (ที่ MOI = 1). หลังจากการติดเชื้อผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry ($n = 6$). ความเข้มของการเรืองแสงเฉลี่ย (MFI) ได้รับการ normalized สู่กลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ. (B) หนูทดลองชนิด hACE2 mice ถูกทำให้ติดเชื้อผ่านทางจมูกด้วยไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในปริมาณเท่ากับ 4×10^3 PFU (กลุ่มที่มีการฟื้นตัว) และในปริมาณเท่ากับ 4×10^4 PFU (กลุ่มที่มีการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส) หรือไม่มีการติดเชื้อซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (control). หลังจากการติดเชื้อผ่านไป 6 วัน suspended cells ทั้งหมดของเนื้อเยื่อปอดได้รับการเก็บรวบรวมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry. ความเข้มของการเรืองแสงเฉลี่ย (MFI) ของ H2Kb⁺ cells (gated บน EpCAM⁺ cells) ได้รับการแสดงในภาพนี้ ($n = 3$). MFI ได้รับการ normalized สู่กลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ. (C) การย้อมสีด้วย Hematoxylin และ eosin และ immunohistochemistry ต่อ H2Kb ได้รับการประเมินในปอดของหนูทดลองที่ติดเชื้อใน B. (D) Similarity plot ซึ่งอิงตามลำดับจีโนมของ SARS-CoV-2_WHU01 (accession no. MN988668) และลำดับจีโนมของ SARS-CoV_BJ01 (AY278488) รวมทั้ง SARS-CoV_GZ02 (AY390556) ถูกใช้เป็น reference sequences. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มจากยีน orf3a ของไวรัสซาร์ส-โควี-2. (E-G) ผลของโปรตีนต่าง ๆ ของไวรัสต่อการแสดงออกของ HLA-A2. พลาสมิดที่มีการแสดงออกของโปรตีนไวรัสได้รับการถ่ายโอน (transfect) เข้าสู่ HEK293T cell line และเซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมหลังจากการถ่ายโอน (transfection) ผ่านไป 48 ชั่วโมงสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry เพื่อที่จะวิเคราะห์ความเข้มของการเรืองแสงเฉลี่ย (MFI) ของ HLA-A2⁺ cells ($n = 5$) ที่ได้รับการ normalized สู่กลุ่ม empty vector (EV). พลาสมิดที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของไวรัสซาร์ส-โควี-2 และโปรตีน ORFs (E), โปรตีน ORF8, ORF8b และ ORF8a ของไวรัสซาร์ส-โควี (F), และหน่วยย่อย (subtype) L และ S ของโปรตีน ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 หรือ EV (G) ถูกใช้. ข้อมูลแสดงเป็น mean \pm SD (error bars). การทดสอบทำโดยใช้วิธี Student's *t* test และ one-way ANOVA. ค่า $P < 0.05$ แสดงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

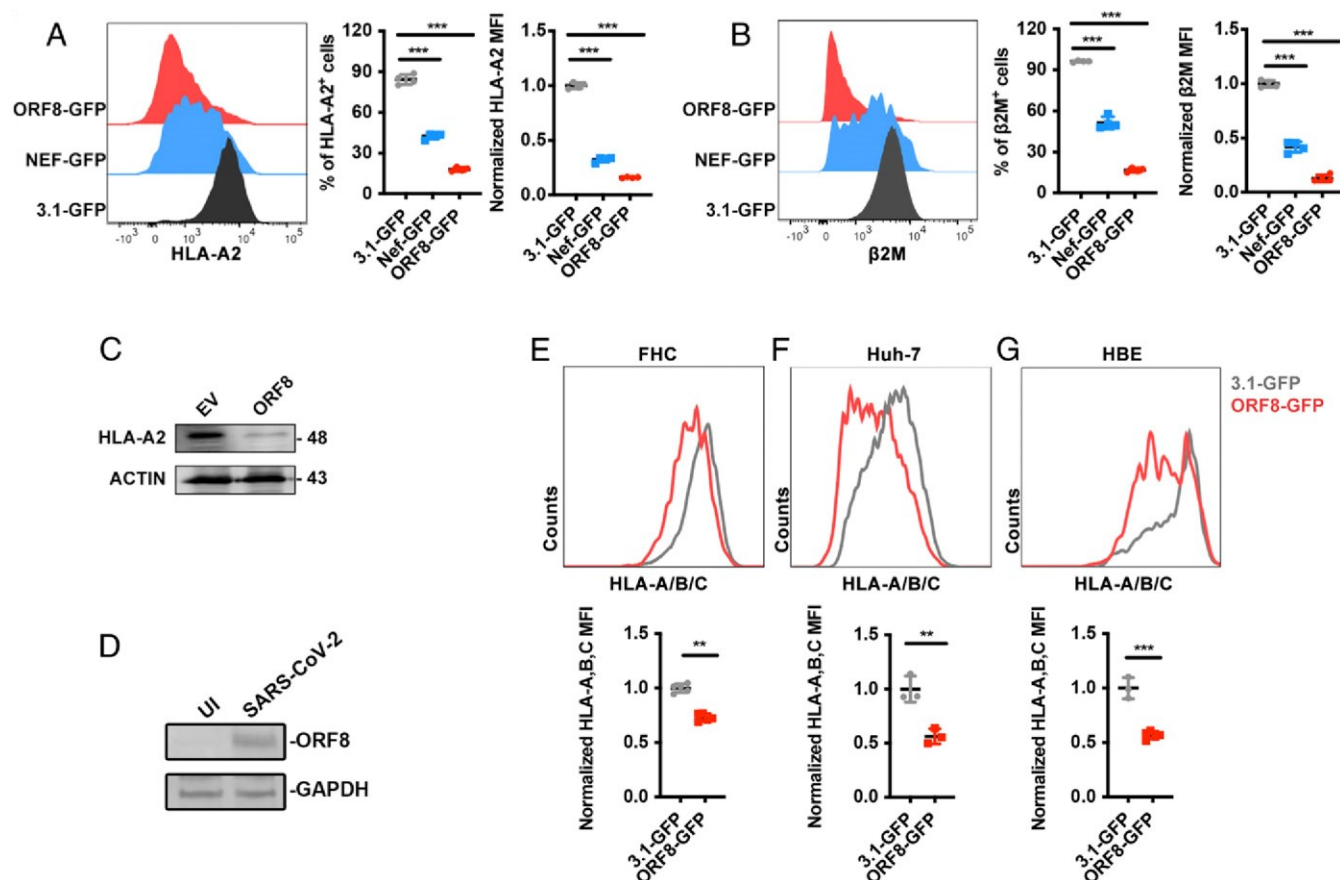
ต่อจากนั้นเราได้ระบุแยกแยะโปรตีนของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่อาจจะมีผลต่อการแสดงออกของ MHC-I จีโนมของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ประกอบไปด้วยนิวคลีโอไทด์ประมาณ 30,000 นิวคลีโอไทด์ซึ่งมีส่วนที่เหมือนกันกับของไวรัสซาร์ส-โควีอยู่ 79% เช่นเดียวกันกับไวรัสซาร์ส-โควี ไวรัสซาร์ส-โควี-2 ก็มีโปรตีนโครงสร้างอยู่ 4 ส่วน คือ

1. ส่วนหนาม หรือ Spike (S)
2. ส่วนเปลือกเซลล์ หรือ Envelope (E)
3. ส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ หรือ Membrane (M) และ
4. ส่วนนิวคลีโอแคปซิด (Nucleocapsid, N) ([22](#), [23](#))

นอกจากนี้ไวรัสซาร์ส-โควี-2 ก็ยังมีโปรตีน ORF ส่วนที่ช่วยส่งเสริม (accessory ORF proteins) อยู่ 3 ส่วน (3' portion) [\(ภาพประกอบที่ 1D\)](#) เนื่องจากการทำหน้าที่ของโปรตีนไวรัสที่เป็นโครงสร้าง (structural viral protein) และโปรตีนไวรัสที่ไม่ได้เป็นโครงสร้าง (nonstructural viral protein) แทบจะทั้งหมดของไวรัสซาร์ส-โควี ได้รับการระบุแยกแยะแล้ว เราจึงให้เหตุผลว่าการทำงานที่เหมือนกับโปรตีน Nef หรือโปรตีน Vpu ของเชื้อ HIV-1 (ถ้าหากว่ามีอยู่จริง) ก็น่าจะเป็นความเป็นไปได้ที่จะตกไปอยู่ในส่วนของโปรตีนโครงสร้างชนิดที่เกาะยึดกับเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound structural proteins) หรือใน ORF ส่วนที่ช่วยส่งเสริมจำนวน 3 ส่วน (3' accessory ORFs) เหล่านี้ ในขั้นแรกเราได้ทดสอบโปรตีนโครงสร้าง (structural proteins) และ unidentify โปรตีน ORFs ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 สำหรับการทำหน้าที่ด้านภูมิคุ้มกันที่อาจจะมีความเป็นไปได้ ในบรรดาโปรตีนเหล่านี้เราพบว่าการแสดงออกที่สูงผิดปกติ (overexpression) ของโปรตีน ORF8 ในเซลล์ HEK293T ทำให้การแสดงออกของ MHC-I (HLA-A2) มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ [\(ภาพประกอบที่ 1E\)](#) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีน ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 แสดงให้เห็นว่ามีส่วนที่เหมือนกันกับไวรัสซาร์ส-โควีน้อยที่สุด [\(ภาพประกอบที่ 1D\)](#) [\(22–24\)](#) ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence homology) ระหว่างไวรัสซาร์ส-โควี-2 และไวรัสซาร์ส-โควี ในช่วงแรก ๆ (SARS-CoV_GZ02) ในปี พ.ศ. 2546 (ซึ่งไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ต่างก็มีโปรตีน ORF8 ชนิด full-length ORF8) อยู่ที่ประมาณ 26% [\(ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S1C\)](#) อย่างไรก็ตามทุกสายพันธุ์ของไวรัสซาร์ส-โควีที่ได้รับการระบุแยกแยะในผู้ป่วยจากช่วงกลางปีและปลายปี พ.ศ. 2546 เช่น SARS-CoV_BJ01 มีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 29 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งส่งผลให้เกิดการแยกโปรตีน ORF8 ออกเป็น ORF8a และ ORF8b [\(ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S1C\)](#) โปรตีน ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีน ORF8a (มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน 10%) และ ORF8b (มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน 16%) ของไวรัสซาร์ส-โควี (SARS-CoV_BJ01) [\(ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S1C\)](#) ทั้งโปรตีน ORF8a และ ORF8b ของ SARS-CoV_BJ01 หรือโปรตีน ORF8 ที่ครบถ้วนไม่ถูกแตะต้อง (intact) ของ SARS-CoV_GZ02 ล้วนไม่มีผลที่ทำให้ MHC-I ทำงานลดลง [\(ภาพประกอบที่ 1F\)](#) การกลายพันธุ์ของ L84S (กรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 84 ของโปรตีน ORF8 เปลี่ยนจาก leucine ไปเป็น serine) ในโปรตีน ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีความสำคัญสำหรับการวิเคราะห์จีโนไทป์ (genotyping) และการตรวจวิเคราะห์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) [\(25, 26\)](#) อย่างไรก็ตามทั้งหน่วยย่อย (subtype) L และหน่วยย่อย (subtype) S ของโปรตีน ORF8

ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ต่างก็ส่งผลกระทบต่อที่คล้ายคลึงกันในการทำให้ MHC-I ทำงานลดลง ([ภาพประกอบที่ 1G](#)) เพื่อที่จะยืนยันผลกระทบของโปรตีน ORF8 ต่อการแสดงออกของ MHC-I ที่ลดลง พลาสมิดที่มีการแสดงออกของโปรตีน ORF8 ที่สามารถสร้างโปรตีน ORF8-green fluorescent (ORF8-GFP) และ 3.1-GFP ได้รับการสร้างขึ้นและถ่ายโอน (transfect) เข้าสู่เซลล์ HEK293T พลาสมิดที่มีการแสดงออกของโปรตีน Nef ของเชื้อ HIV-1 (HIV-1-Nef) ที่มี GFP แยกต่างหาก (Nef-GFP) ซึ่งเราได้สร้างขึ้นก่อนหน้านี้ทำหน้าที่เป็น positive control ([27](#)) การแสดงออกบนผิวเซลล์ของ heavy chain ของ MHC-I และองค์ประกอบที่เป็นพอลิเปปไทด์ (second polypeptide component) ของ MHC-I complex β_2 -microglobulin (β_2 M) ได้รับการระบุแยกแยะโดยใช้เทคนิควิธี flow cytometry ([ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S1D](#)) เมื่อเปรียบเทียบกับ 3.1-GFP แล้ว เราพบว่าความถี่และความเข้มของการเรืองแสงเฉลี่ย (mean fluorescence intensity) ของ MHC-I และ β_2 M มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยการแสดงออกที่สูงผิดปกติของโปรตีน ORF8 ([ภาพประกอบที่ 2 A และ B](#)) รวมถึงการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดของ MHC-I ก็มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญด้วยเช่นกัน ([ภาพประกอบที่ 2C](#)) ปรากฏการณ์นี้ขึ้นอยู่กับปริมาณขนาดและระยะเวลา ([ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S1 E และ F](#)) การแสดงออกของโปรตีน ORF8 ในเซลล์ HEK293T/Hace2 ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 สายพันธุ์แท้ดั้งเดิม HEK293T/Hace2 ได้รับการยืนยันโดยเทคนิควิธี Western blotting ซึ่งสอดคล้องกันกับข้อมูลโปรตีโอมิกส์เมื่อเร็ว ๆ นี้ ([28](#)) ([ภาพประกอบที่ 2D](#)) นอกจากนี้แล้วการแสดงออกของโมเลกุล MHC-I ใน cell lines ต่าง ๆ (ได้แก่ human fetal colon cell line (FHC), human bronchial epithelial cell line (HBE), และ human liver cell line (Huh7) ก็มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยโปรตีน ORF8 เมื่อเปรียบเทียบกับ 3.1-GFP ([ภาพประกอบที่ 2 E- G](#))

ภาพประกอบที่ 2.

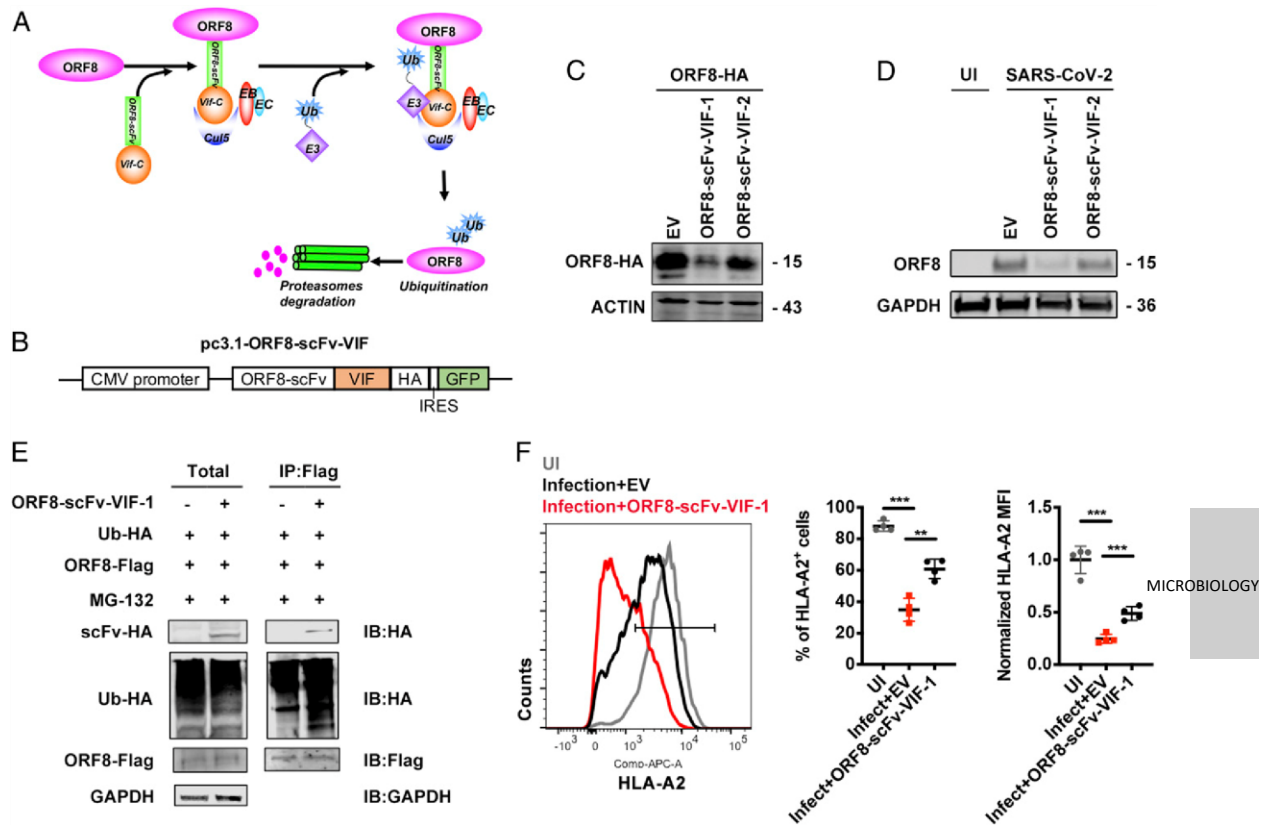


ภาพประกอบที่ 2. แสดงการลดลงของ MHC-I ที่ได้รับการกระตุ้นจากโปรตีน ORF8. (A and B) พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ 3.1-GFP (negative control) พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-GFP หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ HIV-Nef-GFP (positive control) ได้รับการถ่ายโอน (transfect) เข้าสู่เซลล์ HEK293T ตามลำดับ. เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมหลังจากการถ่ายโอน (transfection) ผ่านไป 48 ชั่วโมง สำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry. ความถี่และความเข้มของการเรืองแสงเฉลี่ย (MFI) ของเซลล์ HLA-A2⁺ และ β 2-microglobulin (β 2M)⁺ (gated บน GFP⁺ cells) ได้รับการแสดงในภาพนี้ ($n = 5$). ความถี่และความเข้มของการเรืองแสงเฉลี่ย (MFI) ได้รับการ normalized สู่กลุ่ม GFP. (C) การตรวจวิเคราะห์วิธี Western blot สำหรับ A ($n = 3$). (D) เซลล์ HEK293T/Hace2 ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 (hCoV-19/CHN/SYSU-IHV/2020) (ที่ MOI = 0.1). หลังจากการติดเชื้อผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ($n = 3$). (E-G) พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ GFP (negative control) หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-GFP ได้รับการถ่ายโอน (transfect) เข้าสู่เซลล์ FHC, HBE, หรือ Huh7 ตามลำดับ. หลังจากการถ่ายโอน (transfection) ผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บเกี่ยวสำหรับตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry (gated บน GFP⁺ cells) ($n = 3$) และได้รับการ normalized สู่กลุ่ม GFP. ข้อมูลแสดงเป็น mean \pm SD (error bars). การทดสอบทำโดยใช้วิธี Student's *t* test และ one-way ANOVA. ค่า $P < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

การ knockdown ORF8 ช่วยฟื้นฟูการแสดงออกของ MHC-I เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2

เพื่อที่จะ knockdown การแสดงออกของโปรตีน ORF8 ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 เราจึงได้พยายามใช้ ORF8-specific small interfering RNAs (siRNAs) เพื่อลด subgenomic RNA ของ ORF8 อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพก็ไม่น่าพอใจ ดังนั้นเราจึงได้ใช้วิธีการ knockdown ระบบในระดับโปรตีนซึ่งเราและคณะผู้วิจัยอื่นๆ ได้พัฒนาขึ้นมาเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลาย (degradation) ที่จำเพาะเจาะจงของโปรตีน ORF8 โดยใช้เอนไซม์ E3 ubiquitin-protein ligase ที่สร้างขึ้นมา ([ภาพประกอบที่ 3A](#)) ([29, 30](#)) ในส่วนของ anti-ORF8 scFv (ORF8-scFv-1) ได้รับการเพิ่มพูน (enriched) โดยวิธี phage-display panning ต่อโปรตีน ORF8 จำนวน 4 รอบ ต่อจากนั้น ORF8-scFv-1 ก็ได้รับการเชื่อมต่อกับ (fused) เข้ากับส่วนปลาย C (C terminus) ของ HIV-1 Vif ซึ่งสามารถมีปฏิสัมพันธ์กับ Elongin B, Elongin C, และ Cul5 และนำไปสู่การย่อยสลาย (degradation) ของเป้าหมายตามธรรมชาติคือ APOBEC3G และเป้าหมายประดิษฐ์คือโปรตีนที่สร้างขึ้นโดย Kras ที่อาศัยระบบ ubiquitin-proteasome system (UPS) เป็นสื่อกลาง ([29, 31](#)) ([ภาคผนวก SI, ตารางที่ S1](#)) หลังจากพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-scFv-VIF-1 และ ORF8-scFv-VIF-2 ได้รับการสร้างขึ้นแล้ว ([Fig. 3B](#)) มันก็จะถูกถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ HEK293T ที่มีการแสดงออกของโปรตีน ORF8 มากผิดปกติ หรือเซลล์ HEK293T ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในเวลาต่อมา เราพบว่า ORF8-scFv-VIF-1 มีการ knockdown การแสดงออกของโปรตีน ORF8 อย่างมีนัยสำคัญในเซลล์ทั้ง 2 ประเภท ([ภาพประกอบที่ 3 C และ D](#)) นอกจากนี้เรายังยืนยันว่า ORF8-scFv-VIF-1 สามารถจับกับโปรตีน ORF8 ได้โดยตรง และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ ubiquitination เมื่อมี MG132 อยู่ ซึ่งบ่งบอกว่า ORF8-scFv-VIF-1 เป็นสื่อกลางให้เกิดการย่อยสลาย ORF8 โดยผ่าน UPS pathway ([Fig. 3E](#)) เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อมีการ knockdown โปรตีน ORF8 โดย ORF8-scFv-VIF-1 แล้ว การลดลงของการแสดงออกของ MHC-I บนผิวเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 สายพันธุ์ที่ดั้งเดิมก็ได้รับการกู้กลับคืนมา (rescued) ([ภาพประกอบที่ 3E](#)) เมื่อนำสิ่งเหล่านี้มาเชื่อมโยงกันแล้ว เราได้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ทำให้การทำงานของ MHC-I มีการลดลงอย่างมีศักยภาพโดยผ่านทาง ORF8

ภาพประกอบที่ 3.

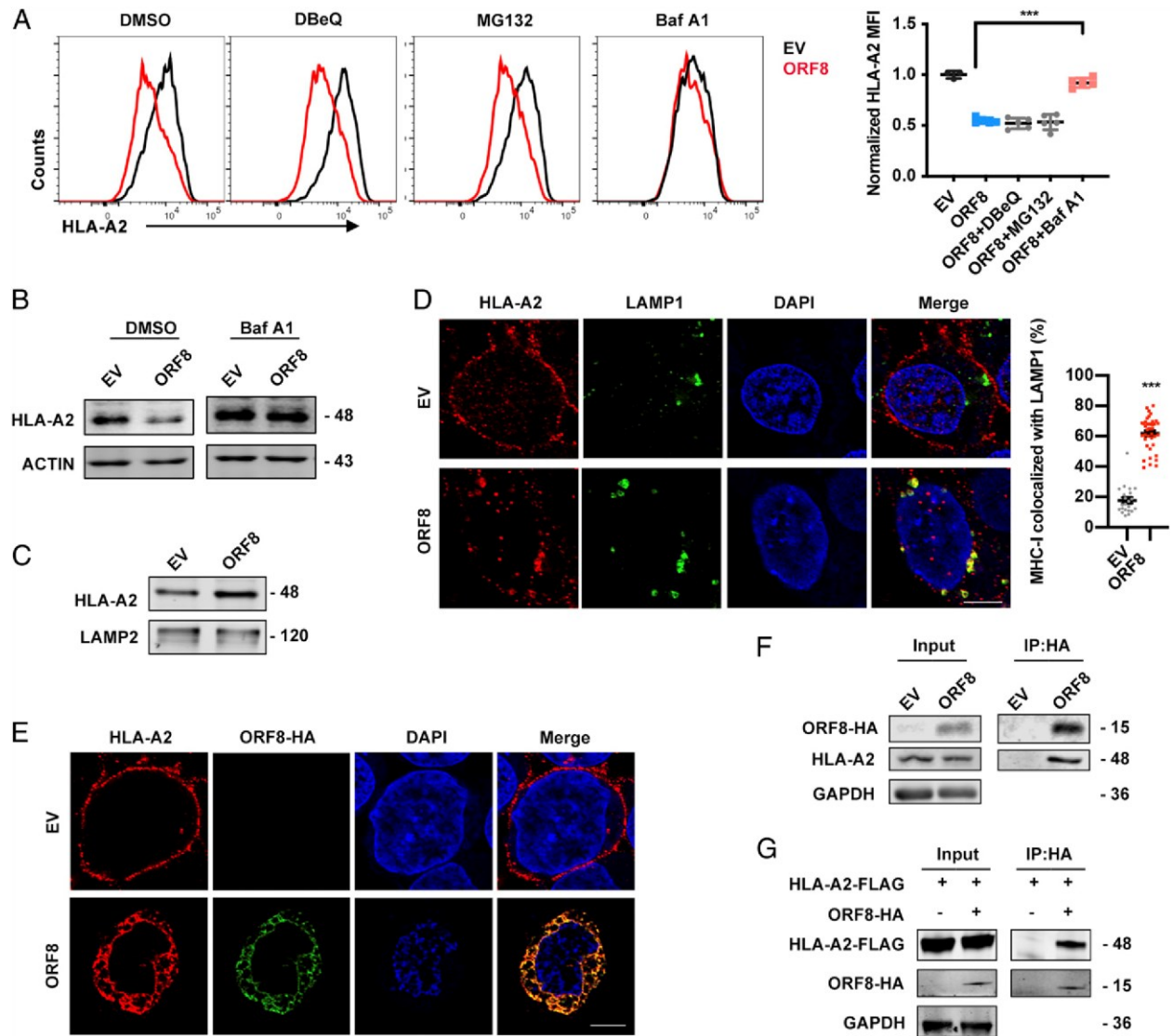


ภาพประกอบที่ 3. แสดงการ knockdown โปรตีน ORF8 ทำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ MHC-I. (A) แผนภูมิของกลไกการ knockdown ORF8-scFv-VIF ในการกระตุ้นการย่อยสลายของ ORF8. (B) แผนภูมิสำหรับการสร้าง ORF8-scFv-VIF plasmid. (C) เซลล์ได้รับการถ่ายโอนกับ empty vector (EV), pORF8-scFv-VIF-1, หรือ pORF8-scFv-VIF-2 ร่วมกับพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA. หลังจากการถ่ายโอนผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ($n = 3$). (D) เซลล์ HEK293T ที่ได้รับการถ่ายโอนกับ ORF8-scFv-VIF หรือที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนกับ ORF8-scFv-VIF ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 (hCoV-19/CHN/SYSU-IHV/2020) (ที่ MOI = 0.1). หลังจากการติดเชื้อผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ($n = 3$). (E) โปรตีน ORF8 co-IP กับ ORF8-scFv-VIF-1 ที่มีการแสดงออกมากผิดปกติ. เซลล์ได้รับการถ่ายโอนกับพลาสมิดที่มีการแสดงออก ORF8-Scfv-1 หรือ GFP (EV) ร่วมกับพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-Flag และ Ubiquitin-HA และ treat ด้วย MG132 (10 μ M) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนการเก็บเกี่ยว. เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมหลังจากการถ่ายโอนผ่านไป 48 ชั่วโมง สำหรับ co-IP กับ anti-Flag-tag beads และได้รับการตรวจหาด้วยแอนติบอดีที่ระบุ ($n = 5$). (F) เซลล์ HEK293T (HEK293T/Hace2) ที่มีการแสดงออกของ ACE2 ที่ได้รับการถ่ายโอนกับ EV หรือ ORF8-scFv-VIF-1 ถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 (hCoV-19/CHN/SYSU-IHV/2020) (MOI = 1). หลังจากการติดเชื้อผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry ($n = 3$). ความเข้มของการเรืองแสงเฉลี่ย (MFI) ได้รับการ normalized สู่กลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ. ข้อมูลแสดงเป็น mean \pm SD (error bars). การทดสอบทำโดยใช้วิธี Student's t test และ one-way ANOVA. ค่า $P < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

MHC-I ถูกกำหนดเป็นเป้าหมายโดยเจาะจง (selectively targeted) สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลโซโซม (lysosomal degradation) โดย ORF8

เพื่อที่จะอธิบายให้กระจ่างชัดถึงกลไกของการลดลงของ MHC-I ที่อาศัย ORF8 เป็นสื่อกลางเซลล์ได้รับการ treat กับ inhibitors ต่าง ๆ กันที่ปิดกั้น (block) การย่อยสลายโปรตีนเมมเบรน (membrane protein) โดยผ่านทางวิธีต่าง ๆ กัน ซึ่งได้แก่ N2, N4-dibenzylquinazoline-2,4-diamine (DBeq) ซึ่งปิดกั้น (block) การย่อยสลายโปรตีนที่สัมพันธ์กับ endoplasmic reticulum (ER) (หรือ ERAD) MG132 ซึ่งปิดกั้น (block) UPS และ bafilomycin A1 (Baf-A1) ซึ่งปิดกั้น (block) การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลโซโซม (lysosomal degradation) ในบรรดา inhibitors เหล่านี้การขัดขวาง (counteraction) ที่มีนัยสำคัญมากที่สุดของการลดการแสดงออกของโปรตีน MHC-I โดย ORF8 มีการอาศัย Baf-A1 เป็นสื่อกลาง ซึ่งบ่งบอกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลโซโซม (lysosomal degradation) เป็นวิธีหลักสำหรับการลดลงของ MHC-I ที่อาศัย ORF8 เป็นสื่อกลาง ([ภาพประกอบที่ 4 A และ B](#)) จริงทีเดียวเราพบว่า MHC-I ได้รับการเพิ่มพูน (enriched) ในไลโซโซมในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ORF8 ([ภาพประกอบที่ 4C](#)) นอกจากนี้แล้ว หลังจากการถ่ายโอน ORF8 ผ่านไปได้ 24 ชั่วโมง เราพบว่าการแสดงออกของ MHC-I บนผิวเซลล์ก็แทบจะถูกยกเลิก (abrogated) และแจกจ่ายใหม่ (redistributed) เข้าสู่ cytoplasm ซึ่งเป็นการแสดงถึงการ colocalization ที่แข็งแกร่งกับ LAMP1 ([ภาพประกอบที่ 4D](#)) นอกจากนี้แล้วเราได้ค้นพบว่า ORF8 และ MHC-I สามารถทำปฏิกิริยากันในความเป็นจริง (physically) ได้หรือไม่ หลังจากการถ่ายโอนโปรตีน ORF8 ผ่านไปได้ 16 ชั่วโมง เราพบว่า ORF8 มีการ colocalize ไปด้วยกันกับ MHC-I อย่างชัดเจนจากการมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล ([ภาพประกอบที่ 4E](#)) ข้อมูลจากเทคนิค immunoprecipitation เพิ่มเติมต่อมาได้ยืนยันถึงการจับ (binding) กันของ ORF8 กับ MHC-I จากภายในเซลล์ (endogenous) หรือไม่ก็จากภายนอกเซลล์ (exogenous) ([ภาพประกอบที่ 4 F และ G](#)) โดยรวมแล้วข้อมูลเหล่านี้ทำให้น่าเชื่อได้ว่า ORF8 มีการจับยึดโดยตรงกับ MHC-I และมุ่งเป้าไปที่โมเลกุล MHC-I สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลโซโซม (lysosomal degradation)

ภาพประกอบที่ 4.



ภาพประกอบที่ 4. แสดง MHC-I ได้รับการกำหนดเป็นเป้าหมาย (targeted) สำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไลโซโซม (lysosomal degradation) โดย ORF8. (A and B) พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ GFP- (EV) หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-GFP ได้รับการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ HEK293T. ก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ได้รับการ treat ด้วย DMSO และ DBE-Q (15 μ M) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง treat ด้วย MG132 (10 μ M) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ treat ด้วย bafilomycin A1 (Baf A1, autophagy inhibitor, 100 nM) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง. หลังการถ่ายโอนผ่านไป 36 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวม และความเข้มของการเรืองแสงเฉลี่ยของ HLA-A2 ได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี flow cytometry (gated บน GFP⁺ cells) และได้รับการ normalized คู่กลุ่ม GFP (EV) และการแสดงออกของโปรตีน HLA-A2 ทั้งหมดได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Western blotting ($n = 5$). (C) เซลล์ที่ได้รับการถ่ายโอนกับพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ empty vector (EV) หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA ได้รับการ treat ด้วย Baf A1 (100 nM) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนการเก็บเกี่ยวสำหรับ crude lysosomal fraction. การสะสม HLA-

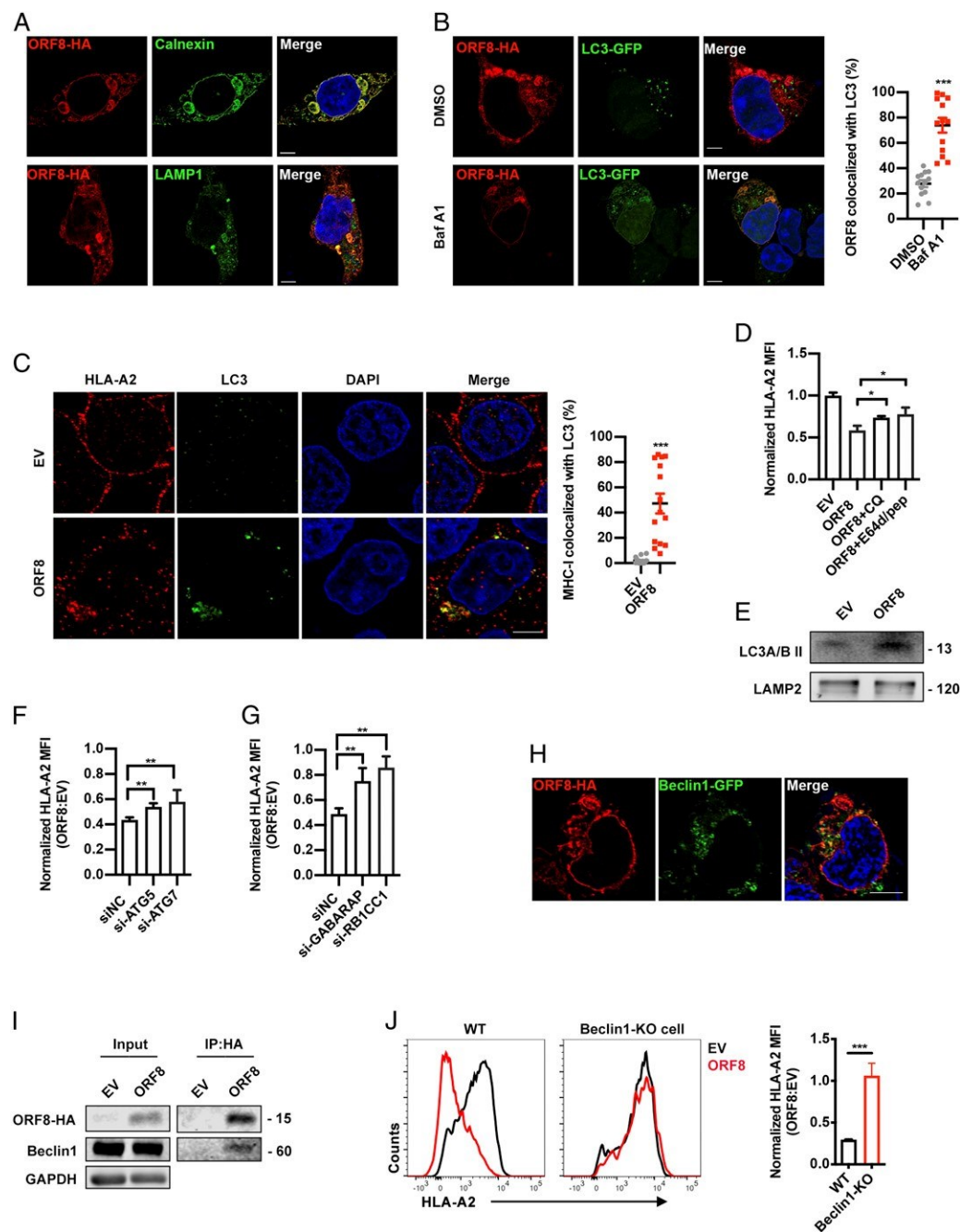
A2 ในไลโซโซมได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Western blotting ($n = 5$). (D) Localization ของ HLA-A2 (สีแดง) ที่เกี่ยวข้องกับสัมพันธ์กันกับ LAMP1-positive (สีเขียว) lysosomes (Scale bars, 5 μ m). เซลล์ได้รับการถ่ายโอนกับพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ EV หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA หลังจากการถ่ายโอนได้ 24 ชั่วโมง การ colocalization ได้รับการมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล ($n = 20$ ถึง 40 fields). (E) การ localization ของ HLA-A2 (สีแดง) ที่เกี่ยวข้องกับสัมพันธ์กันกับ ORF8-HA ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 (สีเขียว) (Scale bars, 5 μ m). เซลล์ได้รับการถ่ายโอนกับพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ EV หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA. หลังจากการถ่ายโอนผ่านไป 16 ชั่วโมง การ colocalization ได้รับการมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล ($n = 14$ ถึง 20 fields). (F) ORF8 มีการ co-IP กับ HLA-A2. พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ EV หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA ได้รับการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ HEK293T ตามลำดับ. เซลล์ได้รับการ treat ด้วย Baf A1 (100 nM) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนการเก็บรวบรวม. เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมหลังจากการถ่ายโอนผ่านไป 48 ชั่วโมง และได้รับการ treat ด้วย cross-linker DSP และ co-IP กับ anti-HA-tag beads ($n = 5$). (G) ORF8 ได้รับการ co-IP กับ HLA-A2 ที่มีการแสดงออกสูงผิดปกติ. เซลล์ได้รับการถ่ายโอนกับพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ HLA-A2-FLAG ร่วมกับพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA หรือ vector และ treat ด้วย Baf A1 (100 nM) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนการเก็บเกี่ยว. เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมที่ 48 ชั่วโมงหลังจากการถ่ายโอนสำหรับ co-IP กับ anti-HA-tag beads ($n = 5$). ข้อมูลแสดงเป็น mean \pm SD (error bars). การทดสอบทำโดยใช้วิธี t test และ one-way ANOVA. ค่า $P < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ; *** $P < 0.001$.

ORF8 เป็นสื่อกลางให้เกิดการย่อยสลาย MHC-I ผ่านวิถีการกลืนกินตัวเอง (autophagy pathway) ที่อาศัย Beclin 1 เป็นสื่อกลาง

เพื่อที่จะค้นหาว่าเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 สามารถลดการแสดงออกของ MHC-I โดยผ่าน ORF8 ได้อย่างไรนั้น เราจึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค mass spectrometry เพื่อระบุแยกแยะโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน ORF8 สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (32) การเพิ่มขึ้น (enrichment) สูงสุดของโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับโปรตีน ORF8 ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ถูกสังเกตพบใน endoplasmic reticulum (ER) ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าปฏิกิริยาของ ORF8 ในเซลล์เจ้าบ้านอาจจะเอื้ออำนวย (facilitate) ต่อการ reconfiguration ที่สำคัญของการขนส่ง (trafficking) ใน endoplasmic reticulum ในระหว่างที่มีการติดเชื้อไวรัส (ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S2A) นอกจากนี้แล้ว ORF8 ก็ยังแสดงให้เห็นถึงการ colocalization ที่แข็งแกร่งกับ CALNEXIN⁺ ER และ LAMP1⁺ lysosome มากกว่า GM130⁺ Golgi หรือ RAB5⁺ ในส่วนต้น ๆ ของเอนโดไซม (ภาพประกอบที่ 5A และ ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S2 B และ C) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้มากที่สุดสำหรับ ORF8 ในการลดการแสดงออกของ MHC-I ใน endoplasmic reticulum (ER) หรือไลโซโซมมากกว่าที่จะเป็นใน Golgi หรือ plasma membrane นอกจากนี้การ knockdown โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่ง (vesicle-trafficking) เช่น AP1, AP2, หรือ AP3 ก็ยังล้มเหลวในการต่อต้าน (counteract) การลดลงของ MHC-I ที่อาศัยโปรตีน ORF8 เป็น

สื่อกลาง ยกเว้นความเกี่ยวข้องที่อาจจะเป็นไปได้ในการขนส่งจากเครือข่าย trans-Golgi, plasma membrane, หรือ endosomal network ([ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S3 A และ B](#)) (33) ในทางตรงกันข้ามการ knockdown โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ ERAD (ได้แก่ HDR1, SEL1L1, ERLIN2, CANX, OS9, หรือ ERLEC1) ก็ล้มเหลวในการต่อต้าน (counteract) การลดลงของ MHC ที่อาศัยโปรตีน ORF8 เป็นสื่อกลาง ([ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S3 C และ D](#)) (34) กระบวนการ ubiquitination ของ MHC-I ไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญตามหลังการแสดงออกที่สูงผิดปกติของ ORF8 ยกเว้นความเกี่ยวข้องที่อาจจะเป็นไปได้ของ ERAD pathway ([ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S3 E](#)) ด้วยเหตุนี้เราจึงได้สันนิษฐานว่า ORF8 อาจจะสามารถเป็นสื่อกลางให้กับการขนส่ง (trafficking) MHC-I จาก endoplasmic reticulum (ER) ไปยังไลโซโซมสำหรับการย่อยสลาย การขนส่ง (trafficking) จาก endoplasmic reticulum (ER) ไปยังไลโซโซมมีความเป็นไปได้มากที่สุดว่าอาศัย ER-phagy เป็นสื่อกลาง ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของ selective autophagy โปรตีน autophagy cargo receptor 6 ชนิดมีการยึดจับกับ substrate และสรรหา (recruit) substrate ต่อ autophagosomal membranes (35) เพื่อที่จะตรวจสอบความเกี่ยวข้องที่อาจจะเป็นไปได้ของมัน receptors เหล่านี้ (ได้แก่ FAM134B, RTN3, ATL3, SEC62, CCPG1, และ TEX264) ได้รับการ knock down ด้วย siRNAs ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเราสังเกตเห็นไม่พบผลกระทบใดๆ ต่อการแสดงออกของ MHC-I เมื่อมี ORF8 อยู่ด้วย ([ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S3 F และ G](#))

ภาพประกอบที่ 5.



ภาพประกอบที่ 5. แสดง ORF8 เป็นสื่อกลางให้เกิดการย่อยสลาย MHC-I ผ่านทาง autophagy pathway. (A) Localization ของ ORF8-HA ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 (สีแดง) เกี่ยวข้องกับ CALNEXIN (สีเขียว, *บน*) หรือ LAMP1 (สีเขียว, *ล่าง*). พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA ได้รับการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ HEK293T. หลังจากการถ่ายโอนผ่านไป 24 ชั่วโมง การ colocalization ได้รับการมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล (Scale bars, 5 μ m). (B) การ localization ของ ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 (สีแดง) ที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับ LC3-GFP (สีเขียว). พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA และพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ LC3-GFP ได้รับการถ่ายโอนร่วม (cotransfected) เข้าสู่เซลล์ HEK293T. หลังจากการถ่ายโอนผ่านไป 24 ชั่วโมง การ colocalization

ได้รับการมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล (Scale bars, 5 μ m) ($n = 14$ to 20 fields). (C) การ localization ของ HLA-A2 (สีแดง) ที่เกี่ยวข้องกับสัมพันธ์กับ LC3 (สีเขียว). พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA ได้รับการถ่ายโอน เข้าสู่เซลล์ HEK293T. หลังจากการถ่ายโอนผ่านไป 24 ชั่วโมง การ colocalization ได้รับการมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล (Scale bars, 5 μ m) ($n = 14$ - 20 fields). (D) พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ GFP (empty vector, EV) หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-GFP ได้รับการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ HEK293T. ก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ได้รับการ treat ด้วย chloroquine (CQ) (50 μ M) และ E64d (10 μ g/mL) และ pepstatin A (pep) (10 μ g/mL) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง. ความเข้มของการเรืองแสงเฉลี่ย (MFI) ของ HLA-A2 (gated บน GFP⁺ cells) ได้รับการ normalized สู่กลุ่ม GFP ($n = 5$). (E) พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ EV หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA ได้รับการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ HEK293T. เซลล์ได้รับการ treat ด้วย Baf A1 (100 nM) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนการเก็บเกี่ยวสำหรับ crude lysosomal fraction. การสะสมของ LC3B ในไลโซโซมได้รับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotting. (F และ G) พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ GFP (EV) หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-GFP และ siRNAs ที่ระบุได้รับการถ่ายโอน เข้าสู่เซลล์ HEK293T. ความเข้มของการเรืองแสงเฉลี่ย (MFI) ของ HLA-A2 (gated บน GFP⁺ cells) ได้รับการ normalized สู่กลุ่ม GFP ($n = 5$). (H) การ localization ของ ORF8-HA ของไวรัสซาร์ส-โคโรนา-2 (สีแดง) ที่เกี่ยวข้องกับสัมพันธ์กับ Beclin 1-GFP (สีเขียว) (Scale bars, 5 μ m). พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA และพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ Beclin 1-GFP ได้รับการถ่ายโอนร่วม (cotransfected) เข้าสู่เซลล์ HEK293T. หลังจากการถ่ายโอนผ่านไป 16 ชั่วโมง การ colocalization ได้รับการมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล ($n = 14$ ถึง 20 fields). (I) ORF8 มีการ co-IP กับ Beclin 1. พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ empty vector (EV) หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-HA ได้รับการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ HEK293T ตามลำดับ. เซลล์ได้รับการ treat ด้วย Baf A1 (100 nM) เป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนได้รับการเก็บรวบรวม. เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมหลังการถ่ายโอนผ่านไป 48 ชั่วโมง และได้รับการ treat ด้วย cross-linker DSP และ co-IP กับ anti-HA-tag beads ($n = 5$). (J) พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ GFP (EV) หรือพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8-GFP ได้รับการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ HEK293T (WT) หรือ Beclin 1 knockout HEK293T cells. เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมหลังการถ่ายโอนผ่านไป 48 ชั่วโมง และ HLA-A2 MFI ได้รับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry (gated บน GFP⁺ cells) และได้รับการ normalized สู่กลุ่ม GFP (EV) ($n = 5$). ข้อมูลแสดงเป็น mean \pm SD (error bars). การทดสอบทำโดยใช้วิธี Student's *t* test และ one-way ANOVA. ค่า $P < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

แต่ถึงอย่างไรก็ตาม เพื่อที่จะค้นหาความเกี่ยวข้องที่เป็นไปได้ของกระบวนการกลืนกินตัวเอง (autophagy) ก่อนอื่นเราจึงได้ตรวจสอบการ colocalize ระหว่าง ORF8 หรือ MHC-I กับ autophagosomes ภายในเซลล์ เศษชิ้นส่วนปริมาณเล็กน้อยแต่สำคัญ (substantial fraction) ของ ORF8 มีการ colocalize กับ LC3B-labeled autophagosomes ในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ORF8 (ภาพประกอบที่ 5B) เศษชิ้นส่วนปริมาณเล็กน้อยแต่สำคัญ (substantial fraction) ของ MHC-I puncta ก็มีการ colocalize กับ LC3B-labeled autophagosomes ด้วยเช่นกัน (ภาพประกอบที่ 5C) นอกจากนี้ autophagy inhibitors ที่จำเพาะเจาะจงคือ chloroquine และ E64/pep ก็ยังทำการฟื้นฟูคืนสภาพ (restore) การแสดงออกของ MHC-I บนผิวเซลล์ รวมทั้งฟื้นฟูคืนสภาพระดับโปรตีนทั้งหมดของมันอีกด้วย (ภาพประกอบที่ 5D และ ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S4A)

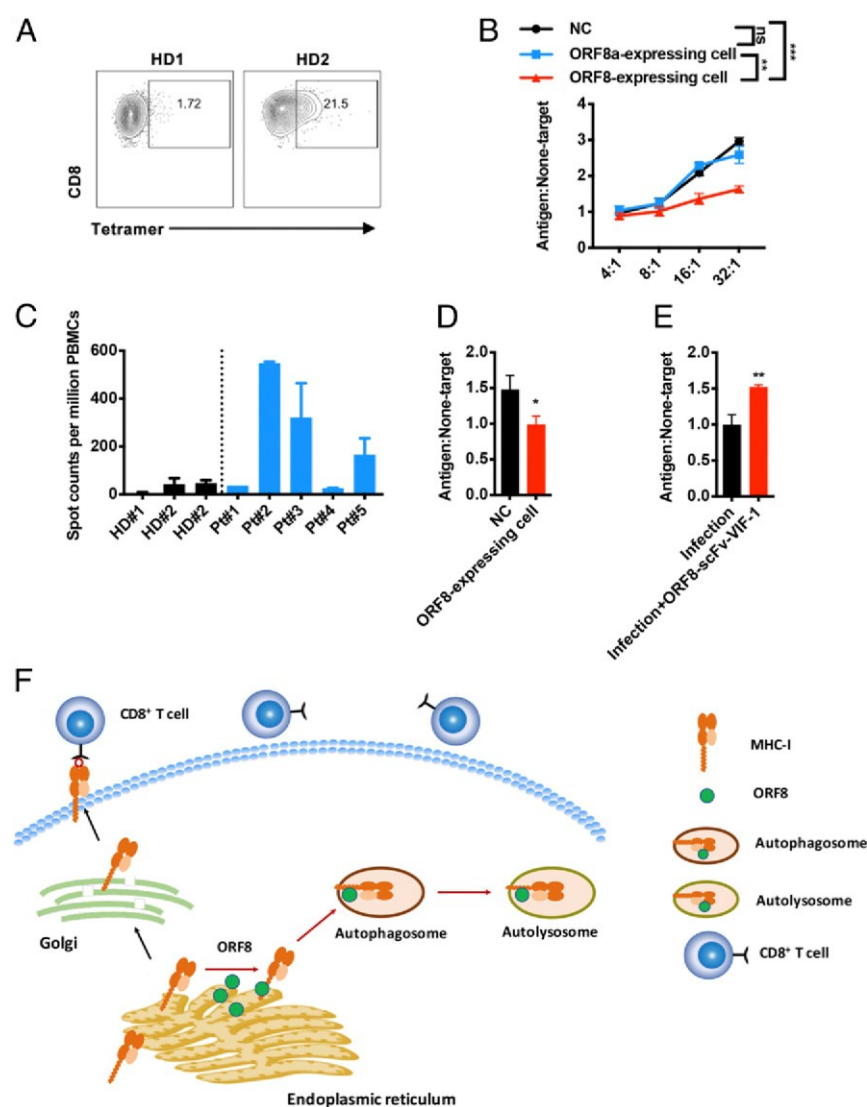
LC3B ก็ได้รับการเพิ่มพูน (enrich) เป็นอย่างสูงในไลโซโซมในเซลล์ที่มีการแสดงออกของ ORF8 ([ภาพประกอบที่ 5E](#)) กล่าวโดยเฉพาะเจาะจงก็คือ เราพบว่าการ knockdown ของ ATG5, ATG7, และการขนส่งโปรตีน RB1CC1 (FIP200) หรือ GABARAP ส่งผลให้มีการฟื้นฟูคืนสภาพ (restore) การแสดงออกของ MHC-I ทั้งบนผิวเซลล์และระดับของโปรตีนทั้งหมด ([ภาพประกอบที่ 5 F และ G](#) และ [ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S4 B-D](#)) นอกจากนี้แล้วเรายังพบว่าเศษชิ้นส่วนปริมาณเล็กน้อยแต่สำคัญ (substantial fraction) ของ ORF8 มีการ colocalize กับ Beclin 1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นสำหรับการเริ่มต้นกระบวนการกลืนกินตัวเอง (autophagy initiation) ในการเป็นสื่อกลาง (mediate) ให้เกิดการสร้าง autophagosome ([ภาพประกอบที่ 5H](#)) (36, 37) ข้อมูลจากเทคนิค immunoprecipitation ได้ยืนยันว่า ORF8 ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ Beclin 1 ([ภาพประกอบที่ 5I](#)) ใน Beclin 1-knockout HEK293T cell line, ORF8 ล้มเหลวในการกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลาย MHC-I บนผิวเซลล์ได้ ในขณะที่การถ่ายโอนโปรตีน Nef ของเชื้อ HIV ยังคงทำให้มีการลดการแสดงออกของ MHC-I บนผิวเซลล์อยู่ ([ภาพประกอบที่ 5J](#) และ [ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S4 E และ F](#)) อย่างไรก็ตามการ knockdown ของ NBR1 ซึ่งเกี่ยวข้องในการลดลงของ MHC-I ในเซลล์มะเร็งตับอ่อนก็ไม่ได้แสดงผลใด ๆ ยกเว้นก็แต่ NBR1 ในฐานะที่เป็น receptor สำหรับการย่อยสลาย MHC-I ที่อาศัย ORF8 เป็นสื่อกลาง ([ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S4 G และ H](#)) (38) การ knockdown receptors อื่น ๆ ที่มีความเป็นไปได้ด้วย siRNAs ก็ไม่ได้แสดงผลกระทบใด ๆ ต่อการลดการควบคุมของ MHC-I ที่อาศัย ORF8 เป็นสื่อกลางเช่นเดียวกัน ([ภาคผนวก SI, ภาพประกอบที่ S4 G และ H](#)) (39) เมื่อนำมาเชื่อมโยงกันแล้วผลที่ได้ของเราบ่งบอกว่า ORF8 อาจจะสามารถเข้ายึดบีบบังคับ (hijack) วิธีการเริ่มต้นกระบวนการกลืนกินตัวเองของ Beclin 1 และด้วยเหตุนี้จึงเป็นสื่อกลางให้เกิดการย่อยสลาย MHC-I โดยผ่านกระบวนการกลืนกินตัวเอง

ORF8 สามารถทำให้เชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 มีความไวต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (antiviral CTLs) น้อยลง

เป็นที่ทราบกันว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) มีส่วนเกี่ยวข้องในการป้องกันการติดเชื้อโคโรนาไวรัสที่อาศัยภูมิคุ้มกันเป็นสื่อกลาง (40) การลดการควบคุมของ MHC-I โดย ORF8 สามารถส่งผลให้เกิดการบกพร่องเสียหาย (impairment) ของการฆ่าทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 ที่อาศัยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) เป็นสื่อกลาง SSp-1 ได้รับการคาดคะเนว่าเป็น

เอพิโทปของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่มีศักยภาพ (41) ซึ่งได้รับการอธิบายลักษณะเป็นอย่างดีสำหรับปฏิกิริยาการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน (42) เพื่อที่จะศึกษาการหลบหลีกภูมิคุ้มกัน (immune evasion) ที่มีสาเหตุมาจากการลดการควบคุมของ MHC-I ที่อาศัย ORF8 เป็นสื่อกลาง เราจึงได้สร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษมาที่จำเพาะต่อ SSp-1 โดยกระบวนการ sensitization ของ peripheral blood lymphocytes (PBLs) จากผู้ที่มีสุขภาพดีที่มี HLA-A2⁺ กับ autologous dendritic cells ที่ prepulse กับ SSp-1 (ภาพประกอบที่ 6A) เซลล์ SSP-1 pulsed control HEK293T หรือเซลล์ HEK293T ที่มีการแสดงออกของ ORF8 ถูกใช้เป็นเซลล์เป้าหมาย (target cells) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษมาที่จำเพาะต่อ SSp-1 สามารถกำจัดทำลายเซลล์เป้าหมาย (target cells) ที่มีการแสดงออกของ ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 โดยที่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เป้าหมายที่มีการแสดงออกของ ORF8a ของไวรัสซาร์ส-โควีหรือของสายพันธุ์ป่า (wild-type) (ภาพประกอบที่ 6B) นอกจากนี้เราได้แยก (isolate) CD8⁺ T cells ที่จำเพาะต่อไวรัสซาร์ส-โควี-2 จากผู้ป่วยจำนวน 5 คนที่หายจากการติดเชื้อแล้วเมื่อไม่นานมานี้ ในบรรดาผู้ป่วย 5 คนนี้ ผู้ป่วยหมายเลข 2 หมายเลข 3 และหมายเลข 5 มีการแสดงปฏิกิริยาการตอบสนองที่แข็งแรงของ T cell ที่จำเพาะต่อแอนติเจนในส่วนของเปปไทด์ของโปรตีนหนาม (S) ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 (ภาพประกอบที่ 6C) ดังนั้น CD8⁺ T cells ของผู้ป่วยหมายเลข 3 ซึ่งมี HLA-A2⁺ จึงถูกใช้สำหรับการทดสอบความสามารถในการฆ่าทำลายเชื้อโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษมา (CTL killing assay) เซลล์เป้าหมายที่มีการแสดงออกของ ORF8 หรือตัวควบคุม (controls) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ป่า (wild-type) ได้รับการหาสัญญาณ (pulsed) กับส่วนผสม (mixture) ของเปปไทด์สังเคราะห์ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ต่อจากนั้นมันก็ถูกผสมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษมา (CTLs) เมื่อเปรียบเทียบกับตัว control แล้ว เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษมาที่จำเพาะต่อไวรัสซาร์ส-โควี-2 (SARS-CoV-2-specific CTLs) ก็มีการกำจัดเซลล์เป้าหมายที่มีการแสดงออกของ ORF8 โดยที่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าเช่นเดียวกัน ซึ่งบ่งชี้ว่า ORF8 สามารถป้องกันเซลล์เป้าหมายจากการแตกสลายที่อาศัยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษมาเป็นสื่อกลาง (CTL-mediated lysis) (ภาพประกอบที่ 6D) ที่น่าสังเกตก็คือการ knockdown ของ ORF8 โดย ORF8-scFv-VIF-1 ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ช่วยฟื้นฟูคืนสภาพ (restore) ความไวต่อการแตกสลายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษมา (CTL lysis) (ภาพประกอบที่ 6E) โดยรวมแล้วผลที่ได้เหล่านี้ชี้ให้เห็นอย่างแน่นหนาว่า ORF8 เป็นสื่อกลางให้เกิดการลดการควบคุมของ MHC-I และคุ้มครองป้องกันเซลล์ของเจ้าบ้าน (host cells) ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 จากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษมา (CTLs)

ภาพประกอบที่ 6.



ภาพประกอบที่ 6. การต้านทานของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาตที่อาศัย ORF8 เป็นสื่อกลาง (A) ความถี่ของ CD8⁺ T cells ที่จำเพาะต่อ SSp-1 (gated บน CD8⁺ cells) ที่สร้างจากผู้บริจาคสุขภาพดีที่มี HLA-A2⁺ (HD). (B) การทดสอบความสามารถในการฆ่าทำลายเชื้อ (killing assay) โดยใช้ CD8⁺ T cells ที่จำเพาะต่อ SSp-1 ที่สร้างจาก HD. เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) ได้รับการ coculture กับ SSp-1 peptide-loaded HEK293T cells (แอนติเจน) หรือกับ HIV-gag peptide (SL9)-loaded HEK293T cells (nontarget) ข้ามคืน. อัตราส่วนของ dead target cells ต่อ nontarget cells (antigen: nontarget) วัดโดยวิธี flow cytometry. (C) IFN-γ ELISpot analysis ของผู้ป่วยโควิด-19 ที่หายแล้ว (Pt) ต่อเปปไทด์สังเคราะห์ เมื่อเปรียบเทียบกับ HD. (D) การทดสอบความสามารถในการฆ่าทำลายเชื้อ (killing assay) โดยใช้ CD8⁺ T cells จาก HLA-A2⁺ ของผู้ป่วยโควิด-19 หมายเลข 3 ซึ่งหายแล้ว. เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาตที่ได้รับการกระตุ้นถูก coculture กับ SARS-CoV-2 peptide -loaded HEK293T cells (แอนติเจน) หรือกับ HIV-gag peptide-loaded

HEK293T cells (nontarget) ที่อัตราส่วนระหว่าง effector ต่อ target อยู่ที่ 8:1. อัตราส่วนของ dead target cells ต่อ nontarget cells (antigen: nontarget) วัดโดยวิธี flow cytometry ($n = 5$). (E) การทดสอบความสามารถในการฆ่าทำลายเชื้อ (killing assay) สำหรับ HEK293T/Hace2 cells ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 สายพันธุ์ที่ดัดแปลงโดยใช้ CD8⁺ T cells ที่จำเพาะต่อ SSp-1 ที่สร้างจาก HD. เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) ได้รับการ coculture กับ HEK293T/Hace2 cells ที่ติดเชื้อ (แอนติเจน) หรือเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ (nontarget) ที่อัตราส่วนระหว่าง effector ต่อ target อยู่ที่ 30:1. อัตราส่วนของ dead target cells ต่อ nontarget cells (antigen: nontarget) วัดโดยวิธี flow cytometry. (F) แผนภูมิที่แสดงว่า ORF8 เป็นสื่อกลางให้เกิด MHC-I lysosome degradation โดยผ่านวิถีที่อิงอาศัยการกลืนกินตัวเอง (autophagy-dependent pathway). ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ORF8 ยึดจับโดยตรงกับโมเลกุล MHC-I ซึ่งเป็นการเอื้ออำนวยต่อการ trafficking ของมันไปสู่ autophagosome สำหรับการย่อยสลายด้วยไลโซโซม. ข้อมูลแสดงเป็น mean \pm SD (error bars). การทดสอบทำโดยใช้วิธี Student's *t* test. ค่า $P < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

การอภิปรายผล (Discussion)

การติดเชื้อไวรัสกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองที่มีประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune) เพื่อยับยั้งขัดขวางการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส ภูมิคุ้มกันต้านไวรัสต่อการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ยังคงเป็นสิ่งลึกลับไม่มีใครรู้เสียเป็นส่วนใหญ่ ผู้ป่วยส่วนหนึ่งที่หายแล้วอาจจะยังคงเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส (virus carriers) และมีการรายงานเกี่ยวกับการทำหน้าที่ผิดปกติ (dysfunction) ของ CD8⁺ lymphocyte ในผู้ป่วยเหล่านี้ (7-9) ลักษณะทางคลินิกเหล่านี้ของโควิด-19 บ่งบอกว่าไวรัสซาร์ส-โควี-2 อาจจะสามารถนำไปสู่ความผิดปกติของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immune disorder) ในขณะที่ยังคงมีการเพิ่มจำนวนของไวรัสอยู่อย่างเข้มข้น ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้แสดงให้เห็นว่า ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 เป็นสื่อกลางให้เกิดการลดการควบคุมของ MHC-I ลง ซึ่งสังเกตไม่พบในเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี สายพันธุ์อื่น ๆ เนื่องจากว่า ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 เป็นโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่มีความเหมือนกันประมาณ 20% กับไวรัสซาร์ส-โควี เราจึงเสนอว่า ORF8 เป็นโปรตีนชนิดใหม่ในเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี ในบริบทนี้การหลบหลีกภูมิคุ้มกัน (immune evasion) ที่อาศัย ORF8 ในไวรัสซาร์ส-โควี-2 เป็นสื่อกลางสามารถอธิบายได้ (อย่างน้อยก็สักส่วนหนึ่ง) ว่าเพราะเหตุใดความถี่ (spectrum) ของโรคโควิด-19 จึงแตกต่างจากกรณีของโรคซาร์ส (SARS) ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้ระบุชี้ว่า ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 สามารถเป็นสื่อกลางให้เกิดการลดการควบคุมของ MHC-I ลงทั้งในการติดเชื้อไวรัสและในการถ่ายโอนพลาสมิด (plasmid transfection) การถ่ายโอน ORF8 สามารถกระตุ้นให้เกิดการลดการควบคุมของ MHC-I ลงในลักษณะที่อิงอาศัยขนาดหรือปริมาณและระยะเวลา (dose- and time-dependent)

และผลที่ได้จากการทดลองในสภาพแวดล้อมของการทดลองที่แตกต่างกันก็มีความสอดคล้องกัน (consistent) นอกจากนี้แล้วจากการใช้ HIV-1 Nef เป็นตัวควบคุม (control) ซึ่งเป็นหนึ่งในจำนวนโมเลกุลไวรัสที่เป็นที่ทราบกันดีว่าสามารถเป็นสื่อกลางให้เกิดการหลบหลีกภูมิคุ้มกันโดยผ่านการลดการควบคุมของ MHC-I แล้ว เราพบว่า การลดการควบคุมของ MHC-I โดย ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีความคล้ายคลึงกับของ HIV-1 Nef ในระบบการทดลองของเรา นอกจากนี้การทดสอบความสามารถในการฆ่าทำลายเชื้อ (killing assay) ก็ได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์เป้าหมาย (target cells) มีการหลบหลีกอย่างมีนัยสำคัญจากการจดจำของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) เมื่อมี ORF8 ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ เมื่อรวมเข้าด้วยกันแล้ว ORF8 ก็เป็นการอธิบายอย่างน้อยหนึ่งอย่างของการหลบหลีกภูมิคุ้มกันที่มีสาเหตุมาจากไวรัสซาร์ส-โควี-2 และมีความคุ้มค่าเป็นอย่างมากต่อการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมต่อไปกับตัวอย่างทางคลินิก การจดจำของ T cell ด้านไวรัสของเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) ที่ติดเชื้อมีความสำคัญเป็นอย่างมากสำหรับการกำจัดไวรัส T cells ที่มีปฏิกิริยาต่อไวรัสรวมทั้ง T cells ที่มีปฏิกิริยาตอบสนองต่อ ORF8 ได้รับการตรวจพบในผู้ป่วยที่หายจากโรคโควิด-19 (43, 44) การลดการควบคุมของ MHC-I ลงโดย ORF8 สามารถป้องกันไวรัสจากภูมิคุ้มกันด้านไวรัสชนิด T cell อย่างเช่นที่การทดสอบความสามารถในการฆ่าทำลายเชื้อ (killing assay) โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTL) ในหลอดทดลองของเราได้ระบุชี้ ปฏิกิริยาการตอบสนองที่ลดลงของ T cell สามารถนำไปสู่อาการต่าง ๆ ที่เลวร้ายลง รวมทั้งการฟื้นตัวที่ขยายเวลายาวนานออกไป สอดคล้องกับการค้นพบของเรา มีงานวิจัยทางคลินิกชิ้นหนึ่งเมื่อเร็ว ๆ นี้ ที่รายงานการค้นพบสายพันธุ์ไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่มี ORF8 บกพร่องผิดปกติ ($\Delta 382$) ในประเทศสิงคโปร์ ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ไวรัสซาร์ส-โควี-2 ($\Delta 382$) ซึ่งมี ORF8 บกพร่องผิดปกตินี้จะมีการแสดงจลนศาสตร์การเพิ่มจำนวนของไวรัส (virus replication kinetics) ที่คล้ายคลึงกันก็ตาม แต่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากไวรัสสายพันธุ์นี้มีการพัฒนาอาการทางคลินิกที่ลดลง และไม่มีผู้ป่วยรายใดที่จำเป็นต้องได้รับการให้ออกซิเจน เปรียบเทียบกับ 28% ของผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากสายพันธุ์ป่า (wild-type strain) ที่จำเป็นต้องได้รับการให้ออกซิเจน นอกจากนี้ก็ยังมี การตรวจพบระดับที่สูงขึ้นของ IFN- γ , TNF- α , IL-2, และ IL-5 ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อจากไวรัสสายพันธุ์นี้เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสสายพันธุ์ป่า ซึ่งบ่งบอกถึงการจดจำของ T cell ที่ได้รับการปรับปรุงให้ดีขึ้นของเซลล์ที่ติดเชื้อเมื่อไม่มี ORF8 (45) รายงานชิ้นนี้เป็นข้อมูลทางด้านระบาดวิทยาในสถานการณ์จริง ที่แสดงให้เห็นว่า ORF8 สามารถมีผลกระทบต่อความรุนแรงของโรคโควิด-19 ตลอดจนต่อปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ T cell ได้อย่างไร

ถึงแม้ว่าเชื้อไวรัสอื่น ๆ ก็มีการพัฒนาความสามารถในการหลบหลีกการเฝ้าระวังของภูมิคุ้มกันโดยการทำให้การนำเสนอแอนติเจน (antigen presentation) เกิดความบกพร่องเสียหายเช่นเดียวกันก็ตาม แต่กลไกพื้นฐานของมันก็มีความแตกต่างกัน HIV-1 Nef เชื้ออำนวยการให้ปฏิกิริยาระหว่าง AP-1 กับ MHC เป็นไปโดยสะดวกเสียเป็นส่วนใหญ่ และป้องกันการเคลื่อนไหวนของโมเลกุล MHC-I ไปที่ plasma membrane แต่มันกลับเปลี่ยนเส้นทาง (reroute) ของ MHC-I จาก trans-Golgi network ไปที่ late endosomes/lysosomes เพื่อให้เกิดการย่อยสลาย (33, 46) โปรตีน K3 และ K5 ของ KSHV กระตุ้นกระบวนการ ubiquitination ของ MHC-I บน plasma membrane และสนับสนุนกระบวนการนำสารเคมีเข้าสู่เซลล์ (endocytosis) ของมัน (14, 47) นอกจากนี้แล้วโปรตีน E3/E19 ที่สร้างโดย adenovirus ก็รบกวนความร่วมมือกันระหว่างโปรตีน TAP ของ endoplasmic reticulum (ER) กับ MHC-I และเก็บรักษาโมเลกุล MHC-I ใน endoplasmic reticulum ซึ่งดังนั้นจึงทำให้การประกอบกัน (assembly) ระหว่างเปปไทด์กับ MHC-I และการเสนอ (presentation) เปปไทด์ของ MHC-I ได้รับความบกพร่องเสียหาย (48, 49) สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ MHC-I ถูกทำให้ลดต่ำลง (pulled down) โดยใช้ ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควิ-2 เป็นเหยื่อล่อ (bait) พร้อมกับโปรตีนอื่น ๆ ของเจ้าบ้าน (host) ในการควบคุมคุณภาพของ endoplasmic reticulum (ER quality control) และการสังเคราะห์ glycosaminoglycan (28) ในการศึกษาวิจัยนี้เราพบว่าโปรตีน ORF8 ที่อยู่ใน endoplasmic reticulum (ER-resident protein) กระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายของ MHC-I หลังจากที่ถูกตัดแยกการเกี่ยวข้องที่อาจจะเป็นไปได้ของ ERAD และการขนส่ง (trafficking) อื่น ๆ ที่ผิดปกติออกไปแล้ว ก็สามารถสันนิษฐานได้ว่าการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการนี้ นอกจากนี้เรายังพบว่า ORF8 และ MHC-I มีการ colocalize กับ LC3-labeled autophagosome การยับยั้งขัดขวางวิถีการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy pathway) โดย autophagy inhibitors ที่จำเพาะหรือโดยการ knockdown ที่จำเพาะกับ siRNAs ที่มุ่งเป้าไปที่ ATG5, ATG7, RB1CC1, หรือ GABARAP ทำให้มีการฟื้นฟูคืนสภาพ (restore) การแสดงออกของ MHC-I บนผิวเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ หลักฐานเหล่านี้บ่งชี้อย่างชัดเจนถึงการเกี่ยวข้องของการกลืนกินตัวเองของเซลล์ ถึงแม้ว่าเราไม่พบหลักฐานใด ๆ ที่แสดงการเกี่ยวข้องของ ER-phagy receptors 6 ชนิดที่ได้รับการระบุแยกแยะ แต่เราก็พบว่า ORF8 มีปฏิกิริยาและ colocalize กับ Beclin 1 การ knockout ของ Beclin 1 ทำให้มีการฟื้นฟูคืนสภาพ การแสดงออกของ MHC-I บนผิวเซลล์ เป็นที่ทราบกันดีว่า Beclin 1 มีปฏิกิริยากับโปรตีนควบคุม (regulatory proteins) มากมายหลายชนิด

และทำหน้าที่เป็นเสมือนนั่งร้าน (scaffold) ในการสร้าง multiprotein complex นอกจากนี้ Beclin 1 ยังเป็นผู้เล่นสำคัญ (key player) ในระหว่างการเริ่มต้นกระบวนการกลืนกินตัวเอง (autophagy initiation) และการเกิด nucleation (36) ถึงแม้ว่าโปรตีนมากมายหลายชนิด (ได้แก่ HIV-1 Nef หรือ influenza virus matrix protein 2) จะสามารถทำปฏิกิริยากับ Beclin 1 และนำไปสู่การขัดขวางการเริ่มต้นของ autophagosome แต่โปรตีนบางชนิดที่ทำปฏิกิริยากับ Beclin 1 (ได้แก่ Ambra1, Atg14L (Barkor), UVRAG, HMGB1, และ Rubicon) ก็ชักนำให้เกิดการกระตุ้นหรือการ maturation ของ autophagosomes (36, 50, 51) เป็นที่น่าสังเกตว่า ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 เป็นตัวอย่างที่มีลักษณะเฉพาะตัว (unique) ของโปรตีนที่สามารถจับกับ Beclin 1 ที่มาจากเชื้อโรค ที่ขับเคลื่อนการกระตุ้นหรือการบริบูรณ์ (maturation) ของกระบวนการกลืนกินตัวเองและกระตุ้นการย่อยสลายของ MHC-I ของเซลล์เจ้าบ้าน (host cells) ต่อไป เมื่ออิงจากการค้นพบของเราแล้วเราเสนอว่า MHC-I บน endoplasmic reticulum ถูกจับโดย ORF8 และต่อมาก็เชื่อมต่อกับ Beclin 1 แทนที่จะเป็นเส้นทาง (routing) ปกติซึ่งผ่าน Golgi ไปที่ plasma membrane ซึ่งกระตุ้นการสร้าง autophagosomes สำหรับการย่อยสลาย (ภาพประกอบที่ 6F) จากการใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษที่จำเพาะต่อแอนติเจนของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ตลอดจนเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษจากผู้ป่วยโรคโควิด-19 ระยะพักฟื้น สำหรับการทดสอบความสามารถในการฆ่าทำลายเชื้อ (killing assay) ในหลอดทดลอง เราพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษไม่สามารถระบุแยกแยะเซลล์เป้าหมายที่มีการแสดงออกของ ORF8 หรือเซลล์เป้าหมายที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต่างจากการย่อยสลาย MHC-I ที่อาศัย HIV-1 Nef เป็นสื่อกลาง ซึ่งเป็นหนึ่งในโมเดลที่มีการศึกษากันอย่างละเอียดและเป็นที่ยอมรับกันมากที่สุดสำหรับไวรัสในการเป็นสื่อกลางให้เกิดการหลบหลีกภูมิคุ้มกัน เรามีความรู้น้อยมากเกี่ยวกับว่าเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 เป็นสื่อกลางให้เกิดการหลบหลีกภูมิคุ้มกันได้อย่างไร ดังนั้นเราจึงได้ใช้ตัวแทน (surrogate) ในโมเดลในหลอดทดลอง เพื่อศึกษาว่า ORF8 เป็นสื่อกลางให้เกิดการหลบหลีกจากการแผ้วระวังของ T cells ได้อย่างไร ในโมเดลนี้เซลล์ HEK293T ได้รับการถ่ายโอนชั่วคราว (transiently transfected) ด้วย ORF8 โดยที่สอดคล้องกันกับโมเดลทางชีวโมเลกุลของเรา หรือถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ตามด้วยการย่อยสลายที่จำเพาะต่อโปรตีน ORF8 โดยผ่านทาง ORF8-ScFv-VIF-1 เพื่อที่จะกำจัดผลกระทบของการถ่ายโอนชั่วคราวต่อความสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ของเซลล์ (cell viability) เราได้ปรับวิธี target-to-nontarget ratio เพื่อตรวจวัดผลของการฆ่าทำลายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษ ซึ่งเป็นวิธีการที่เป็นที่ยอมรับซึ่งใช้ในการศึกษาโรคเอดส์และกลุ่มอาการ

โรคทางเดินหายใจตะวันออกกลางด้วย (52) เราสังเกตพบการฆ่าทำลายเซลล์เป้าหมายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษที่จำเพาะต่อแอนติเจนในลักษณะที่อิงอาศัยปริมาณหรือขนาด (dose-dependent manner) อย่างไรก็ตามเซลล์เป้าหมายที่มีการแสดงออกของ ORF มีความไวต่อการฆ่าทำลายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษลดลงต่ำลง ทั้งในโมเดลที่ถ่ายโอน ORF8 ชั่วคราวและในโมเดลที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 โมเดลของเราเป็นการตรวจสอบความถูกต้อง (validate) ของการหลบหลีกที่อาศัย ORF8 เป็นสื่อกลาง สำหรับการฆ่าทำลายโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิษที่จำเพาะต่อแอนติเจนโดยการย่อยสลาย MHC-I ถึงแม้ว่าการศึกษาวิจัยทางคลินิกเกี่ยวกับสายพันธุ์ไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่มี ORF8 บกพร่องผิดปกติในสิงคโปร์จะมีความสอดคล้องเข้ากันได้เป็นอย่างดีกับสมมติฐานของเรา แต่สายพันธุ์ไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่มี ORF8 บกพร่องผิดปกติก็ยังคงเป็นสิ่งที่กำลังมีการศึกษาวิจัยในขณะนี้และในอนาคต ซึ่งรวมทั้งการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองด้วย (45) ไวรัสซาร์ส-โควี-2 ได้ใช้โปรตีน ORF8 ของมันเป็นกลไกที่มีลักษณะเฉพาะตัว เพื่อเปลี่ยนแปลงการแสดงออก ซึ่งไม่จำกัดเฉพาะแค่เพียงของ MHC-I บนผิวเซลล์ในการหลบหลีกการเฝ้าระวังของภูมิคุ้มกัน ไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีการใช้วิธีการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy pathway) อย่างละเอียดซับซ้อน ซึ่งโดยปกติจะทำหน้าที่เป็นกลยุทธวิธีการต้านไวรัสเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ของมัน ถึงแม้ว่ารายละเอียดของกลไกทางด้านโมเลกุลจะยังคงต้องได้รับการอธิบายชี้แจงให้แจ่มแจ้งก็ตาม แต่การค้นพบของเราก็ได้ให้แง่มุมที่สำคัญสำหรับการทำความเข้าใจว่า ORF8 สร้างความบกพร่องเสียหายให้แก่ระบบการนำเสนอแอนติเจนและช่วยในการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ได้อย่างไร ยาต้านไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในปัจจุบันส่วนใหญ่แล้วมุ่งเป้าไปที่เอนไซม์หรือโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างซึ่งจำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส การศึกษาวิจัยของเราอาจจะให้หลักฐานในการส่งเสริมการพัฒนาสารประกอบต่าง ๆ ที่มุ่งเป้าเจาะจงไปที่การสร้างความบกพร่องเสียหายของการนำเสนอแอนติเจน MHC-I โดย ORF8 ซึ่งด้วยเหตุนี้จึงเป็นการยกระดับการเฝ้าระวังของภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2

วิธีดำเนินการวิจัย (Methods)

คำแถลงด้านจริยธรรมและกลุ่มผู้ป่วย

งานศึกษาวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติโดยคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยของโรงพยาบาลในเครือแห่งที่ 5 ของมหาวิทยาลัยซุนยัตเซ็นและมหาวิทยาลัยซุนยัตเซ็น ผู้ดำเนินการวิจัยได้รับสมัครผู้ป่วยที่หายจากการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 เมื่อไม่นานมานี้จำนวน 5 คน จากโรงพยาบาลในเครือแห่งที่ 5 ของมหาวิทยาลัยซุนยัตเซ็น สำหรับการศึกษานี้ และได้รับเอกสารการยินยอมโดยมีการบอกกล่าว ซึ่งได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยก่อนเริ่มดำเนินการวิจัย เซลล์โมโนนิวเคลียร์ในเลือดส่วนปลายของมนุษย์ (PBMCs) ซึ่งได้รับการปกป้องของผู้บริจาคเลือดที่มีสุขภาพดีได้รับการจัดหาให้โดยศูนย์โลหิตวิทยา เรา คณะผู้วิจัยไม่ได้มีปฏิสัมพันธ์ใด ๆ กับอาสาสมัครเหล่านี้หรือกับข้อมูลที่ได้รับการปกป้องคุ้มครอง และด้วยเหตุนี้จึงไม่มีความจำเป็นต้องมีการยินยอมโดยมีการบอกกล่าว การทดลองทั้งหมดที่ทำในสัตว์ทดลองได้รับการดำเนินการ โดยปฏิบัติตามแนวปฏิบัติและระเบียบข้อบังคับของคณะกรรมการตรวจสอบห้องปฏิบัติการแห่งมหาวิทยาลัยของรัฐของสาธารณรัฐประชาชนจีนอย่างเข้มงวด และได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมว่าด้วยการดูแลสัตว์ทดลอง ของโรงเรียนแพทยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยซุนยัตเซ็น การติดเชื้อไวรัสดำเนินการในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลระดับ 3 (BSL3) ตามคำแนะนำในการดูแลและใช้ประโยชน์จากสัตว์ทดลอง

Cell Lines

HEK293T cell line, Huh7 cell line, และ Vero E6 cell line ได้รับจาก American Type Culture Collection ส่วน FHC cell line และ HBE cell line ได้รับการอนุเคราะห์จากเหวินหลิว แห่งมหาวิทยาลัยซุนยัตเซ็น จังหวัดกวางเจา มณฑลกวางตุ้งสาธารณรัฐประชาชนจีน (53) cell lines เหล่านี้ได้รับการดำเนินการพิสูจน์และยืนยันตัวตน (authentication) ผ่านการทำ short tandem repeat profiling, karyotyping และ cytochrome c oxidase I testing การทดสอบการปนเปื้อนแบคทีเรียและเชื้อราดำเนินการโดยใช้วิธีของ United States Pharmacopeia ในปัจจุบันสำหรับการตรวจไวรัส ซึ่งปฏิบัติตามแนวปฏิบัติของระเบียบข้อบังคับรัฐบาลกลาง ประเทศสหรัฐอเมริกา (9 CFR 113.53) ในขณะที่การตรวจ mycoplasma ดำเนินการโดยการเลี้ยงเซลล์ (culture) โดยตรง และการย้อมวิธี Hoechst DNA staining และการตรวจวิเคราะห์ Limulus amoebocyte lysate assay เพื่อวัดค่าเอนโดท็อกซิน เซลล์ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม

ใน humidified incubator ที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งมี CO₂ ที่ความเข้มข้น 5% และเลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) ซึ่งเสริมด้วย 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 100 units/mL penicillin (Gibco), และ 100 µg/mL streptomycin (Gibco)

การเก็บรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และการจัดเรียงลำดับ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้รับการเก็บรวบรวมจากฐานข้อมูลของ GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) ซึ่งรวมทั้งหนึ่งลำดับจาก SARS-CoV-2_WHU01 (accession number MN988668) หนึ่งลำดับจาก SARS-CoV-2_HKU-SZ (MN938384) หนึ่งลำดับจาก SARS-CoV_BJ01 (AY278488) และหนึ่งลำดับจาก SARS-CoV_GZ02 (AY390556) การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดทั้งจีโนม (complete genome sequences) ดำเนินการโดยใช้ MAFFT software กับ default parameters (54) การจัดเรียงลำดับโปรตีนทำโดย Clustal Omega software ซึ่งใช้ default parameters ที่ดำเนินการใน MEGA X (55) ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่ ๆ (pairwise sequence identities) คำนวณโดยใช้ BioEdit software การตรวจวิเคราะห์ความเหมือนกันซึ่งอิงตามลำดับคู่เบสในสายดีเอ็นเอทั้งหมด (genome sequence) ดำเนินการโดยใช้ SimPlot software (56) การบันทึกคำอธิบายเพิ่มเติม (annotation) ของจีโนมของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ได้รับการปรับปรุงให้ทันสมัย (updated) กับ reference genome sequence ของศูนย์ข้อมูลเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (accession number NC_045512)

ทรัพยากรสำคัญ (Key Resource)

แอนติบอดี สารเคมี เปปไทด์ ตลอดจนโปรตีนรีคอมบิแนนท์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ได้รับการรวบรวมรายชื่อไว้ใน [ภาคผนวก SI, ข้อมูลเสริม \(Supplemental Materials\)](#)

การติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2

สำหรับการติดเชื้อมีเซลล์ HEK293T นั้น เซลล์ HEK293T (1.6×10^5 cells/mL) ได้รับการถ่ายโอน (transfect) ด้วย pcCMV-ACE2-Flag ที่มี pORF8-scFv-VIF-1 และที่ไม่มี pORF8-scFv-VIF-1 หลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง เซลล์ถูกล้างด้วยสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS) และถูกทำให้ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 สายพันธุ์แท้ดั้งเดิมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C ต่อจากนั้นเซลล์ถูกล้างด้วยสารละลาย PBS และแทนที่ด้วย DMEM (FBS ความเข้มข้น 2%) หลังจากการติดเชื้อผ่านไป 48 ชั่วโมงเซลล์ได้รับการเก็บเกี่ยว (harvest) สำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot หรือตรวจสอบการแสดงออกของ HLA-A2 ด้วยวิธี flow cytometry สำหรับการ(ทำให้)ติดเชื้อในหนูทดลองชนิด hACE2 mice นั้น หนูทดลองชนิด hACE2 mice ที่ติดต่อพันธุกรรม (C57BL/6) ได้รับการจัดซื้อจากบริษัทเจมฟาร์มาเทคจำกัด หนูทดลองร่วมครอกเดียวกันเพศเดียวกันได้รับการสุ่มเลือกให้อยู่ในกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อหรือกลุ่มที่มีการติดเชื้อ การ(ทำให้)ติดเชื้อดำเนินการตามที่ได้อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้ (16) หนูทดลองได้รับการระงับความรู้สึกด้วย isoflurane และฉีดไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในปริมาณ 4×10^3 หรือ 4×10^4 PFU เข้าทางจมูก (intranasally) ปอดของหนูทดลองได้รับการเก็บรวบรวมในวันที่ 6 หลังจากการติดเชื้อ stocks ของไวรัสได้จาก supernatant ของ Vero E6 หลังจากการฉีดแล้ว 48 ชั่วโมง และไตเตอร์ได้รับการวัดโดยวิธี plaque assay ซึ่งมุ่งเป้าไปที่โปรตีน N น้ำหนักตัวและอัตราการรอดชีวิตของหนูแต่ละตัวได้รับการวัดเป็นรายวัน

จุลพยาธิวิทยา และอิมมูโนฮิสโตเคมี

หนูทดลองชนิด hACE2 mice ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ได้รับการทำการุณยฆาตในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลระดับ 3 ปอดของหนูได้รับการเก็บรวบรวมและทำให้คงสภาพ (fix) ในสารละลาย paraformaldehyde buffer ที่ความเข้มข้น 4% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามด้วยการฝัง (embed) กับพาราฟิน ต่อจากนั้นก็ย้อมด้วย hematoxylin และ eosin สำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางอิมมูโนฮิสโตเคมีนั้นชิ้นส่วนปอดของหนูแต่ละตัวได้รับการล้างพาราฟิน (deparaffinize) และคืนน้ำ (rehydrate) ด้วย xylene และ gradient alcohol แอนติเจนได้รับการกู้คืนด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave retrieved) โดย citric acid buffer (pH = 6.0) และต่อจากนั้นก็ได้รับการแช่ (quench) สำหรับ endogenous peroxidases ด้วย H_2O_2 ความเข้มข้น 3% เป็นเวลา 10 นาที Bovine serum

albumin (BSA) ถูกใช้ในการ block ตำแหน่งบริเวณจับยึดที่ไม่เฉพาะเจาะจงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ชิ้นส่วนปอดเหล่านี้ของหนูได้รับการบ่ม (incubate) ข้ามคืนด้วย rabbit anti-SARS-CoV-2 N (Sinobiological) และ H2Kb (Biolegend) ที่การเจือจาง 1:200 ที่อุณหภูมิ 4 °C ต่อจากนั้นชิ้นส่วนปอดเหล่านี้ของหนูได้รับการบ่ม (incubate) ด้วย goat anti-rabbit IgG secondary antibody เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และย้อม (stain) ด้วย 3,3'-diaminobenzidine สุดท้ายชิ้นส่วนปอดเหล่านี้ของหนูก็ได้รับการย้อมสี (dye) ด้วย hematoxylin ทำให้แห้ง (dehydrate) ด้วย gradient concentrations ของเอทานอล clear ด้วย xylene และ cover ด้วย neutral balsam สำหรับการตรวจผ่านกล้องจุลทรรศน์ ภาพ (images) ถูกจับ (captured) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Olympus BX63 ผลการทดสอบทางอิมมูโนวิทยา (immunoreactivity) ได้รับการประเมินเชิงกึ่งปริมาณ (semiquantitatively) โดยอิงตามความเข้มและสัดส่วนของการย้อม สัดส่วนของการย้อมได้รับการให้คะแนนจากระดับ 0 ถึง 3 ดังต่อไปนี้: 3 = มีเซลล์ที่มีผลการตรวจเป็นบวกมากกว่า 50%; 2 = มีเซลล์ที่มีผลการตรวจเป็นบวกอยู่ระหว่าง 10 ถึง 49%; 1 = มีเซลล์ที่มีผลการตรวจเป็นบวกน้อยกว่า 10% ความเข้มของการย้อมได้รับการให้คะแนนจากระดับ 0 ถึง 3 (0 = ไม่มี; 1 = อ่อน; 2 = ปานกลาง; 3 = เข้ม) คะแนนผลการทดสอบทางอิมมูโนวิทยาสำหรับแต่ละตัวอย่างวัดโดยการคูณความเข้มและสัดส่วนของเซลล์ที่ย้อม การวิเคราะห์ดำเนินการโดยมีการปกปิด (blindly) โดยที่ไม่ทราบ treatment variables

Flow Cytometry

สำหรับการตรวจวิเคราะห์ดัชนีชี้วัดบนผิวเซลล์ (surface markers) เซลล์ได้รับการย้อม (stain) ในสารละลาย PBS ซึ่งมี BSA ที่ความเข้มข้น 0.5% (wt/vol) ด้วยแอนติบอดีที่ระบุ โปรตีนบนผิวเซลล์ (surface proteins) ได้รับการย้อมเป็นเวลา 30 นาทีด้วย fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies ที่เกี่ยวข้อง และ LIVE/DEAD Fixable Viability Dyes (Thermo Scientific) ในสารละลาย PBS ที่มี BSA ที่ความเข้มข้น 0.5% บนน้ำแข็ง (on ice) แอนติบอดีต่อไปนี้ถูกใช้: anti-HLA-A2 (BB7.2), anti-mouse H-2Kb/H-2Db (28-8-6), anti-mouse EpCAM (G8.8), anti-HLA-A,B,C (W6/32), anti-human β 2-

microglobulin (2M2), และ anti-CD8a (53-6.7) ข้อมูลจากการตรวจวิเคราะห์วิธี flow cytometry ได้จากการใช้เครื่อง LSR Fortessa (Becton Dickinson)

พลาสมิด

ลำดับดีเอ็นเอของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 และ ORFs ที่ tag ด้วย HA ได้รับการสังเคราะห์ทางเคมีใน GENEWIZ และนำเข้าสู่ pcDNA3.1 vector พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ORF8 S mutant ได้รับการสร้างขึ้นผ่านทางวิธีที่ทำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ที่อิง PCR (PCR-based mutagenesis method) จาก pcDNA3.1-ORF8-HA โดยการ introduce การกลายพันธุ์ชนิด point mutation (L ไป S) ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 84 ลำดับที่บรรจุรหัส GFP (GFP coding sequence) อยู่ที่ 3' terminus และถูกสร้างเข้าสู่ pcDNA3.1 vector (57) ลำดับ IRES-GFP ได้รับการนำเข้าสู่ 3' ORF8-HA และมีชื่อว่า ORF8-GFP พลาสมิดที่มีการแสดงออกของ ubiquitin-HA และ HIV-Nef-GFP ถูกใช้ตามที่เราได้อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้ (27) pCMV LC3-GFP เป็นของขวัญจาก Ersheng Kuang แห่งมหาวิทยาลัย ซุนยัตเซ็น จังหวัดกวางเจา มณฑลกวางตุ้ง สาธารณรัฐประชาชนจีน pCMV3-HLA-A-Flag, pCMV-ACE2-Flag, และ pCMV3-Rab5-Myc ได้รับการจัดซื้อจากบริษัท Sino Biological ลำดับดีเอ็นเอของ ORF8-scFv-1 และ ORF8-scFv-2 ได้รับการสังเคราะห์ทางเคมีใน Gene Create ลำดับของ VIF C terminus ที่ tag ด้วย HA ได้รับการ amplify โดยวิธี PCR และถูกเชื่อมต่อกับ ORF8-scFv-1 หรือ ORF8-scFv-2 สำหรับ fusion expression และต่อจากนั้นก็ถูกนำเข้าสู่ pcDNA3.1-IRES-GFP vector ที่ชื่อ ORF8-scFv-VIF-1 หรือ ORF8-scFv-VIF-2 (29) โครงสร้าง (constructs) ทั้งหมดได้รับการตรวจสอบความถูกต้องโดยวิธี DNA sequencing

การคัดกรอง Phage Display ของ Anti-ORF8 scFv

human-sourced scFv phage display library ได้รับการสร้างใน pCANTAB-5E vector โดยการใส่รหัสพันธุกรรม (codons) ที่สุ่มในบริเวณ (region) CDR1, CDR2, และ CDR3 ของ heavy chain และ light chain Recombinant His-tagged ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีการแสดงออกใน *Escherichia coli* โดย pET28a expression system

และถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย **nickel beads** การทำ **phage panning** ดำเนินการตามการศึกษาก่อนหน้านี้ (58) กล่าวโดยย่อคือ **scFv phages** ได้รับการบ่ม (**incubate**) ด้วย **nickel beads** ที่เชื่อมต่อกับ **ORF8-His** หลังจากล้าง 3 ครั้งด้วยสารละลาย **PBS** แล้ว **binding phages** ได้รับการ **elute** และ **amplify** ลำดับขั้นตอนการ **panning** นี้ทำซ้ำ 4 ครั้ง โดยการผ่านลำดับขั้นตอนเหล่านี้ 16 **phagy clones** ก็ได้รับการแยก (**isolate**) และสัมพัทธ์ภาพการจับยึด (**binding affinity**) ของมันก็ได้รับการตรวจสอบความถูกต้อง (**validate**) โดยวิธี **phage enzyme-linked immunosorbent assay** เพราะเหตุนี้ผลที่ตามมาคือเราได้ 2 **phage clones** ที่มี **scFv sequences** ที่ชื่อ **ORF8-SCFV-1** และ **ORF8-SCFV-2** ซึ่งสามารถจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโปรตีน **ORF8** ด้วยปฏิกิริยาอาการในการจับที่สูง (**high binding activity**) (59)

การถ่ายโอน **siRNA**

siRNAs ที่มุ่งเป้าไปที่ยีนของมนุษย์ที่ระบุ และ **negative control siRNA** ได้รับการจัดซื้อจากบริษัท **RiboBio** 3 **siRNAs** ได้รับการสังเคราะห์สำหรับแต่ละยีน **siRNAs** ที่มุ่งเป้าไปที่แต่ละยีนได้รับการถ่ายโอน (**transfect**) เป็นส่วนผสม (**mixture**) และได้รับการตรวจสอบความถูกต้อง (**validate**) โดยทางบริษัทผู้ขาย เพื่อให้แน่ใจว่าอย่างน้อยจะต้องมี 1 **siRNA** ที่สามารถ **knock down** (ยับยั้ง) **target gene messenger RNA** ได้มากถึง 70% หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ (**cell seeding**) ผ่านไปได้ 12 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการถ่ายโอน (**transfect**) ด้วย **siRNAs** จำเพาะที่มุ่งเป้าไปที่แต่ละยีน โดยใช้ **Lipofectamine RNAiMAX** (**ThermoFisher**) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต หลังจากการถ่ายโอน **siRNA** ผ่านไป 12 ชั่วโมง **ORF8-GFP plasmid** ก็ได้รับการถ่ายโอน แต่ละยีนถูก **set** ไว้ที่ 3 **biological replicates** หลังจากการถ่ายโอน **siRNA** ผ่านไปได้ 48 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี **Western blot** และวิธี **flow cytometry**

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี immunofluorescence

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี immunofluorescence (IF) ได้รับการดำเนินการตามที่ได้อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้ (60) เซลล์ HEK293T ได้รับการเพาะเลี้ยง (seed) บน in μ -slide chambered coverslips (Ibidi; 80826) และถ่ายโอน (transfect) ตามที่ได้รับการระบุ เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมที่เวลาตามที่ระบุ และล้างด้วยสารละลาย PBS และทำให้คงสภาพ (fix) ด้วย 4% poly-formaldehyde ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และต่อจากนั้นก็ได้รับการ permeabilize ด้วย 0.1% Saponin ในสารละลาย PBS เป็นเวลา 15 นาที และ block ด้วย 5% BSA PBS เป็นเวลา 30 นาที เซลล์ได้รับการบ่ม (incubate) ด้วยแอนติบอดีตัวแรกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากการล้างด้วย 0.1% Tween-20 PBS จำนวน 3 ครั้งแล้ว เซลล์ก็ถูกย้อม (stain) ด้วยแอนติบอดีตัวที่ 2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) เป็นเวลา 5 นาที ตัวอย่างได้รับการสแกนผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล (Zeiss LSM880) และวิเคราะห์ด้วย Imaris แอนติบอดีตัวแรกที่ใช้ในการตรวจวิธี immunofluorescence นี้ได้แก่ anti-GM130 (CST), anti-Calnexin (Proteintech), anti-Rab5 (CST), anti-HA (MBL), anti-Lamp1 (CST), และ anti-HLA-A2 (MBL) ภาพ (images) ได้จากการสแกนผ่านกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล (Zeiss LSM880) การวิเคราะห์ภาพ (image analysis) และการวัดหาปริมาณ (quantification) ดำเนินการโดยใช้ Imaris 8.4 software (Bitplane)

การแยกไลโซโซม (Lysosome Isolation)

สำหรับการทดลองการแยกไลโซโซม (lysosome isolation) นั้นเซลล์ HEK293T ได้รับการถ่ายโอน (transfect) ด้วยพลาสมิดที่ได้รับการระบุ เซลล์ถูก treat ด้วย 10 μ g/mL E64d และ 10 μ g/mL pepstatin A เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากการถ่ายโอนผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมสำหรับการแยกไลโซโซม (lysosome isolation) การเตรียม crude lysosomal fraction ดำเนินการโดยทำตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต (Sigma-Aldrich, LYSIS01) กล่าวโดยย่อ ๆ คือ 2.7 PCV ของ 1 \times extraction buffer ได้รับการเติมเข้าสู่เซลล์ ตัวอย่างที่ถูกย่อยสลาย (lysis samples) ได้รับการผสม (vortex) เพื่อให้ได้สารเนื้อเดียวกัน (even suspension) และต่อจากนั้นก็ถูกสลาย ใน 7-mL Dounce homogenizer โดยใช้ Pestle B การย้อมด้วย Trypan blue

solution ถูกใช้เพื่อให้มั่นใจว่าเซลล์ตัวอย่างได้แตกจริง ๆ ตัวอย่างได้รับการปั่นแยก (centrifuge) ที่ $1,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที และ supernatant ถูกย้าย (transfer) ไปยัง centrifuge tube อันใหม่ ตัวอย่างได้รับการปั่นแยก (centrifuge) อีกครั้งหนึ่ง ที่ $20,000 \times g$ เป็นเวลา 20 นาที ใน microcentrifuge tubes และ supernatant liquid ก็ถูกดูดเอาออกไป

In-Cell Cross-Linking

In-cell cross-linking ดำเนินการโดยใช้ dithiobis [succinimidyl propionate (DSP)] (Thermo Scientific) ตามที่ได้อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้ (61) DSP ได้รับการเตรียมสด ๆ ใหม่ ๆ เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 25-mM ใน dimethyl sulfoxide (DMSO) และเจือจางให้มีความเข้มข้นเหมาะสมในการใช้งาน (working concentration) อยู่ที่ 0.5 mM ในสารละลาย PBS เซลล์ถูกล้าง 2 ครั้งด้วยสารละลาย PBS และต่อจากนั้นก็บ่ม (incubate) ด้วย cross-linker solution เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นเซลล์ได้รับการบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีด้วย quenching solution (1M Tris-Cl, pH 7.5) ต่อจากนั้น quenching solution ถูกดูดเอาออกไป (removed) และเซลล์ถูกล้าง 2 ครั้งด้วยสารละลาย PBS และ cell lysates ได้รับการเตรียมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี coimmunoprecipitation assay

Coimmunoprecipitation

การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Coimmunoprecipitation (co-IP) assay ดำเนินการตามที่ได้อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้ (57) กล่าวโดยย่อคือ เซลล์ HEK293T ถูกทำให้แตก (lyse) ด้วย Nonidet P-40 lysis buffer (10 mM Tris · HCl, pH = 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM Na₃VO₄, 1% protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich) และ phosphatase inhibitor mixture (TargetMol) เป็นเวลา 30 นาทีบนน้ำแข็ง (on ice) พร้อมกับ vortex เป็นระยะ ๆ สั้น ๆ ทุก ๆ 10 นาที ในระหว่างนี้ anti-HA-tag beads ได้รับการล้าง 3 ครั้งด้วย STN buffer เย็น (ice-cold STN buffer) (10 mM Tris-HCl ที่ buffered ที่ pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% Triton X-100) lysates ได้รับการเก็บรวบรวมและบ่ม (incubate) ด้วย anti-HA-tag beads ที่เตรียมไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือข้ามคืน

ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยการกลิ้งไปมา (rotating) ต่อจากนั้น immunoprecipitates ก็ถูกล้าง 4 ครั้ง ด้วย ice-cold STN buffer จากนั้น elute ด้วย boiling SDS loading buffer และแยกด้วยวิธี SDS-PAGE สำหรับตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blotting หรือ mass spectrometry

Mass Spectrometry Analysis

เซลล์ HEK293T ได้รับการเพาะเลี้ยง (seed) บนจานเพาะเลี้ยงขนาด 10 cm และถ่ายโอน (transfect) ด้วย ORF8-HA ที่ปริมาณ 12 µg หลังจากการถ่ายโอนผ่านไป 48 ชั่วโมง เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมและทำให้แตก (lyse) สำหรับ co-IP assay และ elute ด้วยการต้มที่อุณหภูมิ 100 °C กับ loading buffer ที่เสริมด้วย DTT และแยกผ่าน 10% SDS-PAGE ต่อจากนั้น โปรตีนก็ถูกตรวจดูโดยใช้ ProteoSilver Plus Silver Stain Kit (Sigma-Aldrich) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ทุก lane ถูกตัดออกเป็น 10 slices และได้รับการเตรียมสำหรับการตรวจวิเคราะห์วิธี liquid chromatography–tandem mass spectrometry ตามที่ได้อธิบายมาแล้วก่อนหน้านี้ (60) Functional pathways ที่เป็นตัวแทนของแต่ละ gene signature ได้รับการตรวจวิเคราะห์สำหรับการ enrichment ใน gene categories จากฐานข้อมูลของ gene ontology biological processes (Gene Ontology Consortium) โดยการใช้ DAVID Bioinformatics Resources ซึ่งสังเกตดูสหสัมพันธ์กันระหว่าง 2 การทดลอง

การสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (cytotoxic T lymphocytes) ในผู้บริจาคที่มีสุขภาพดี

การสร้างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) ดำเนินการตามที่ได้รายงานก่อนหน้านี้ (16) กล่าวโดยย่อ ๆ คือ PBMCs ที่ได้จากผู้บริจาคสุขภาพดีที่มี HLA-A2⁺ ได้รับการแยก (isolate) จาก peripheral blood โดยวิธีการ Ficoll-Hypaque gradient separation PBMCs ได้รับการ resuspend ใน Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 และปล่อยให้เซลล์เกาะเพลาที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $5 \times 10^6/\text{mL}$ หลังจากบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 °C เซลล์ที่ไม่เกาะเพลาค่อย ๆ ถูกดูดออกไป เซลล์ที่เกาะเพลาที่ได้มานี้ถูกเลี้ยง (culture) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริม

ด้วย GM-CSF (100 ng/mL, Peprotech) และ IL-4 (100 ng/mL, Peprotech) ใน 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 °C ทุก ๆ 2 วัน ครั้งหนึ่งของอาหารเลี้ยงเชื้อได้รับการแทนที่โดยอาหารเลี้ยงเชื้อสดใหม่ที่มี GM-CSF และ IL-4 ที่มีความเข้มข้นสูงเป็น 2 เท่า (DC) ตามที่ได้ระบุข้างบนนี้ หลังจาก 5 วันของการเลี้ยง recombinant human tumor necrosis factor (TNF- α , Peprotech) ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL ได้รับการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อกระตุ้นการบริบูรณ์ของฟีโนไทป์และการทำหน้าที่ (phenotypic and functional maturation) ต่อจากนั้น 48 ชั่วโมงต่อมา DCs ก็ถูกกระตุ้น (pulse) ด้วย SSP-1 peptide ที่ความเข้มข้น 20 μ g/mL และมี β -microglobulin (Sino Biological) ความเข้มข้น 3 μ g/mL อยู่ด้วย ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้งาน PBLs (2×10^6) ได้รับการ coculture กับ 2×10^5 peptide-pulsed autologous DCs ในเพลทชนิด 24 well ที่มี recombinant human interleukin-2 (IL-2; Peprotech) ความเข้มข้น 10 ng/mL อยู่ ในวันต่อมา recombinant human IL-10 (Peprotech) ถูกเติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 ng/mL หลังจากผ่านไป 7 วัน เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocytes) ได้รับการกระตุ้นอีกครั้ง (restimulate) ด้วย peptide-pulsed autologous DCs ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี IL-2 ความเข้มข้น 10 ng/mL แต่ละสัปดาห์เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocytes) ได้รับการกระตุ้นซ้ำ (restimulate) ในลักษณะเดียวกันนี้ ภายหลังจากการกระตุ้นซ้ำครั้งที่ 4 ผ่านไปได้ 7 วันเซลล์ก็ได้รับการเก็บเกี่ยว (harvest) และ CD8⁺ cells ก็ได้รับการทำให้บริสุทธิ์ (purify) โดย microbeads (BD Bioscience) ซึ่งทดสอบโดยการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity assay) และการย้อม tetramer

IFN- γ ELISpot

PBMCs ที่ได้จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่หายแล้วได้รับการแยก (isolate) จาก peripheral blood โดยการแยกด้วย Ficoll-Hypaque gradient และ PBMCs (1×10^6 /mL) ได้รับการเลี้ยง (culture) กับ S peptides pool (GenScript) ครั้งหนึ่งของอาหารเลี้ยงเชื้อถูกเปลี่ยนในวันที่ 3 พร้อมกับเติม IL-2 ที่ความเข้มข้น 10 ng/mL ในวันที่ 7 T cells ที่หลั่ง IFN- γ ได้รับการตรวจหาโดยใช้ Human IFN- γ ELISpot assay kits (DKW22-1000-096s; Dakewe) ตามโปรโตคอลของบริษัทผู้ผลิต PBMCs ถูกแบ่ง (plated) เป็น 2 ชุด ที่

ปริมาณ 4×10^5 ต่อ well และต่อจากนั้นก็บ่ม (incubate) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจุด (spots) ถูกนับจำนวนโดยใช้ S6 μ Ltra immunoscan reader (Cellular Technology Ltd.) และจำนวนของ IFN- γ -positive T cells ได้รับการคำนวณโดย ImmunoSpot 5.1.34 software (Cellular Technology Ltd.) จำนวนของจุด (spots) ถูกแปลงเป็นจำนวนของจุด (spots) ต่อล้านเซลล์ และค่าเฉลี่ย (mean) ของ duplicate wells ได้รับการ plot

การสร้าง Specificity Tetramer โดยใช้การแลกเปลี่ยนเปปไทด์ (Peptide Exchange)

การทดลองการแลกเปลี่ยนเปปไทด์ดำเนินการโดยใช้ QuickSwitch Quant HLA-A*02:01 Tetramer Kit-PE (MBL) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต กล่าวโดยย่อ ๆ คือ เราละลาย lyophilized peptide (SSp-1) แต่ละตัวใน DMSO ที่ความเข้มข้นของ stock เท่ากับ 10 mM. QuickSwitchTM Tetramer ปริมาณทั้งสิ้น 50 μ L ถูกดูดใส่ใน microtube และเปปไทด์เป้าหมายในปริมาณ 1 μ L ถูกเติมลงไปและผสมรวมกันค่อย ๆ เบา ๆ ด้วยการดูดขึ้น-ลงด้วย pipette ต่อจากนั้น peptide exchange factor ปริมาณ 1 μ L ก็ถูกเติมลงไปและผสมค่อย ๆ เบา ๆ ด้วยการ pipetting ตัวอย่างได้รับการบ่ม (incubate) เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องที่ได้รับการป้องกันแสง

การทดสอบความสามารถในการฆ่าทำลายเชื้อโดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTL killing assay)

1) สำหรับการทดสอบความสามารถในการฆ่าทำลายเชื้อ (killing assay) สำหรับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) ที่สร้างจากผู้ป่วยโรคที่มีสุขภาพดีนั้น เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาตได้รับการแยกและนับจำนวน เซลล์ HEK293T จำนวนทั้งสิ้น 5×10^5 เซลล์ที่ถูกถ่ายโอน (transfect) ด้วย 3.1-GFP, SARS-CoV ORF8a-GFP หรือไม่ก็ SARS-CoV-2 ORF8-GFP ถูก load ด้วย 20 μ g/mL SSP-1 peptides หรือ HIV-gag peptides (SL9) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (42) CD8⁺ T cells ได้รับการ coculture ข้ามคั้นกับเซลล์เป้าหมายที่อัตราส่วนตามที่ได้อธิบายไว้

2) สำหรับการกระตุ้นซ้ำ (restimulation) ของ CD8 T cells ที่แยก (isolate) จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่หายแล้วนั้น PBMCs ถูกเลี้ยง (culture) ด้วยส่วนผสม (mixture) เปปไทด์สังเคราะห์ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 µg/mL หรือ DMSO ใน RPMI medium 1640 ที่มี 10% fetal calf serum และ 20 U/mL recombinant human IL-2 (Peprotech) เป็นเวลา 7 วัน ต่อจากนั้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell พิฆาต (CTLs) จากผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่หายแล้วก็ได้รับการแยกและนับจำนวน เซลล์ HEK293T จำนวนทั้งสิ้น 5×10^5 เซลล์ที่ถูกถ่ายโอนด้วย 3.1-GFP หรือ ORF8-GFP ได้รับการ load ด้วยสารผสมเปปไทด์สังเคราะห์ความเข้มข้น 20 µg/mL ของ SARS-CoV-2 หรือ HIV-gag peptides (SL9) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (42) CD8⁺ T cells ได้รับการ coculture กับเซลล์เป้าหมาย หลังจากนั้นเซลล์ได้รับการติดป้าย (label) ด้วย fixable viability dye eFluor 780 (eBioscience) และตรวจวิเคราะห์โดยวิธี flow cytometry สำหรับการวัดแอนติเจน nontarget ratio cell counts ของ dead SARS-CoV-2 peptides-loaded GFP⁺ cells ถูกแบ่งตามจำนวนโดยการนับ dead HIV-gag peptides-loaded GFP⁺ cells (52)

การทดสอบความสามารถในการฆ่าทำลายเชื้อ (killing assay) สำหรับเซลล์ 293T ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 สายพันธุ์แท้ดั้งเดิม

เซลล์ HEK293T ได้รับการถ่ายโอน (transfect) ด้วย pcCMV-ACE2-Flag ที่มี pORF8-scFv-VIF-1 และที่ไม่มี pORF8-scFv-VIF-1 หลังจาก 24 ชั่วโมง เซลล์ถูกล้างด้วยสารละลาย PBS และทำให้ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 สายพันธุ์แท้ดั้งเดิมที่ MOI = 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C ต่อจากนั้นเซลล์ถูกล้างด้วยสารละลาย PBS และแทนที่ด้วย DMEM (2% FBS) หลังจากการติดเชื้อผ่านไป 24 ชั่วโมง target cells เหล่านี้ได้รับการ coculture ข้ามคืน กับ CD8⁺ T cells ที่สร้างจากผู้บริจาคที่มีสุขภาพดีที่อัตราส่วนตามที่ได้ระบุ หลังจากนั้นเซลล์ได้รับการย้อม (stain) ด้วย propidium iodine (Biolegend) และ CD8 และต่อจากนั้นก็ได้รับการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี flow cytometry สำหรับการวัดแอนติเจน nontarget ratio cell counts ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่ตายแล้วถูกแบ่งตามจำนวนเซลล์ที่ตายแล้วที่ไม่ติดเชื้อ

การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis)

ความแตกต่างระหว่างสองกลุ่มหรือมากกว่าสองกลุ่มวิเคราะห์โดยวิธี Student's *t* test หรือ one-way ANOVA ตามด้วยวิธี Tukey's test ความแตกต่างทางสถิติดำเนินการโดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 6 ผลที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์วิธี flow cytometry ได้รับการวิเคราะห์โดยใช้ FlowJo software (Tree Star Inc.) ค่า *P* ที่ต่ำกว่า 0.05 บ่งชี้ถึงความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ