

ฉบับแปลไทย (Thai Translations)

SARS-CoV-2 variants do not evolve to promote further escape from MHC-I recognition

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.05.04.490614v1>

สายพันธุ์กลายพันธุ์ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ไม่ได้มีวิวัฒนาการเพื่อส่งเสริมการหลบหนีที่เพิ่มมากขึ้นจากการจดจำของโมเลกุล MHC-I

บทสรุป (Summary)

สายพันธุ์ที่น่ากังวล (VOCs) ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีการกลายพันธุ์ (mutations) ซึ่งทำให้เกิดการต้านทานต่อภูมิคุ้มกันชนิดลบข้างฤทธิ์ (neutralizing antibodies) ภายในโปรตีนส่วนหนาม (Spike protein) ของไวรัส และมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันกับการติดเชื้อภายหลังจากที่ได้รับวัคซีนแล้ว (breakthrough infection) รวมทั้งการติดเชื้อซ้ำ (reinfection) ในทางกลับกันเรามีองค์ความรู้ที่น้อยมากเกี่ยวกับการหลบหนี (escape) จากรบบภูมิคุ้มกันแบบพึ่งพาอาศัย $CD8^+$ T cell ($CD8^+$ T cell-mediated immunity) ของสายพันธุ์ที่น่ากังวล ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ที่น่ากังวล (VOCs) ยังคงรักษา (retain) ชีตความสามารถ (capacity) ในการลดองค์ประกอบของเซลล์ (downregulation) ของโมเลกุล MHC-I ที่ใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสสายพันธุ์บรรพบุรุษ (ancestral virus) อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่น่ากังวลก็มีการแสดงออกถึงความสามารถในการระงับยับยั้ง (suppress) อินเตอร์เฟียร์รอนประเภทที่ 1 (type I IFN) ที่เหนือกว่าไวรัสสายพันธุ์บรรพบุรุษ ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ที่น่ากังวลจะมีการกลายพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษ (unique mutations) ภายในยีน ORF8 ซึ่งระงับยับยั้ง (suppress) การแสดงออกของโมเลกุล MHC-I ก็ตาม แต่ก็ไม่ได้มีการกลายพันธุ์ใด ๆ เหล่านี้ที่เพิ่มพูนความสามารถของยีน ORF8 ในการระงับยับยั้ง (suppress) การแสดงออกของโมเลกุล MHC-I ที่เห็นได้ชัดก็คือการเพิ่มองค์ประกอบของเซลล์ (upregulation) ของโมเลกุล MHC-I ได้รับการยับยั้งชัดเจนอย่างเข้มแข็งภายหลังจากการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 สายพันธุ์บรรพบุรุษที่เกิดขึ้นภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต กล่าวโดยรวมแล้วข้อมูลจากการศึกษาวิจัยของเราทำให้น่าเชื่อได้ว่าไวรัสซาร์ส-โควี-2 สายพันธุ์บรรพบุรุษก็มีขีดความสามารถ (capacity) ในการหลบหลีกโมเลกุล MHC-I ที่มีศักยภาพในตัว (intrinsically potent) อยู่แล้ว และเราสังเกตไม่พบว่ามีปรับตัวเพิ่มเติมต่อไปอีกโดยสายพันธุ์เหล่านี้

บทนำ (Introduction)

ไวรัสซาร์ส-โควี-2 ยังคงมีวิวัฒนาการตลอดมา นับตั้งแต่ถูกตรวจพบเป็นครั้งแรกในเมืองหวู่ฮั่น ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนเมื่อเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 เริ่มจากปลายปี พ.ศ. 2563 เป็นต้นมาก็มีการอุบัติขึ้นของสายพันธุ์กลายพันธุ์ต่าง ๆ (variants) ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่มีความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อ (transmissibility) ความสามารถในการหลบหลีกระบบภูมิคุ้มกัน (immune evasion capacity) ตลอดจนความสามารถก่อโรค (pathogenicity) ที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นที่รู้จักกันว่าเป็นสายพันธุ์ที่น่ากังวล (VOCs) และสายพันธุ์ที่ต้องให้ความสนใจ (VOIs) เหตุการณ์การติดเชื้อภายหลังจากการที่ได้รับวัคซีนแล้ว (breakthrough infection) และการติดเชื้อซ้ำ (reinfection) ที่เพิ่มมากขึ้นมีความสัมพันธ์เกี่ยวกับการอุบัติขึ้นของสายพันธุ์ที่น่ากังวล (Kustin และคณะ, พ.ศ. 2564; Tao และคณะ, พ.ศ. 2564) มีความเป็นไปได้ว่าการติดเชื้อภายหลังจากการที่ได้รับวัคซีนแล้วและการติดเชื้อซ้ำได้รับการขับเคลื่อนจากการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของความสามารถในการแพร่กระจายเชื้อ (Sabino และคณะ, พ.ศ. 2564) การหลบหลีกจากระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Guo และคณะ, พ.ศ. 2564; Thorne และคณะ, พ.ศ. 2565) และการหลบหนีจากการกลั่นแกล้ง (neutralization) โดยแอนติบอดีที่ได้รับการกระตุ้นจากวัคซีน/การติดเชื้อสำหรับสายพันธุ์ที่น่ากังวล (Garcia-Beltran และคณะ, พ.ศ. 2564; Lucas และคณะ, พ.ศ. 2564; Planas และคณะ, พ.ศ. 2565; Wang และคณะ, พ.ศ. 2564) ในทางกลับกันมีการรายงานเกี่ยวกับการหลบหลีกจาก T cell epitopes น้อยมากสำหรับสายพันธุ์ที่น่ากังวล (Tarke และคณะ, พ.ศ. 2564b)

CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte (CTL) สามารถจดจำ (recognize) และฆ่าทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ (infected cells) รวมทั้งกำจัดแหล่งที่มา (source) ของไวรัสที่จำลองตัวเอง (replicating viruses) การแสดงออกของแอนติเจนโดย major histocompatibility complex class I (MHC-I) เป็นก้าวที่สำคัญอย่างมากสำหรับการกระตุ้น CD8⁺ T cells ที่จำเพาะต่อแอนติเจน (antigen-specific CD8⁺ T cells) และการฆ่าทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อซึ่งตามมา เปปไทด์ของไวรัสที่ได้รับการ processed จาก cellular proteasome complex ถูก load บนโมเลกุล MHC-I ใน endoplasmic reticulum และ translocate ไปยังพื้นผิวเซลล์ เพื่อให้ได้รับการจดจำโดย CD8⁺ T cells ที่จำเพาะต่อแอนติเจน (antigen-specific CD8⁺ T cells) เพื่อให้เกิดการติดเชื้ออย่างประสบความสำเร็จและจำลองตัวเอง (replicate) ในผู้ที่ถูกอาศัย (host) เชื้อไวรัสมากมายได้มีความสามารถในการยับยั้งขัดขวางการ process ของโมเลกุล MHC-I และการแสดงออกของแอนติเจนไวรัส (Hansen และ Bouvier, พ.ศ. 2552) ในทำนองเดียวกันไวรัสซาร์ส-โควี-2 ก็ใช้โปรตีนไวรัสของมันในการแทรกแซงขัดขวางวิถีของโมเลกุล MHC-I (Yoo และคณะ, พ.ศ. 2564; Zhang และคณะ, พ.ศ. 2564) โปรตีน ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ autophagic degradation ของโมเลกุล MHC-I และมอบความต้านทาน (resistance) ต่อการเข้าระงับของ CTL (Zhang และคณะ, พ.ศ. 2564) การศึกษาวิจัยจากการระบาดในช่วง 3 เดือนแรกได้แสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการอย่างรวดเร็วของยีน ORF8 ในเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 รวมทั้ง isolates ที่มี 382nt deletion ซึ่ง

span ORF7b-ORF8 gene region (Su และคณะ, พ.ศ. 2563; Velazquez-Salinas และคณะ, พ.ศ. 2563) ซึ่งสัมพันธ์กับปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ที่แข็งแกร่ง (robust) และผลลัพธ์ทางคลินิกเล็กน้อย (Fong และคณะ, พ.ศ. 2565; Young และคณะ, พ.ศ. 2563) โดยรวมแล้วสิ่งที่พบ (findings) เหล่านี้ทำให้เกิดคำถามว่าสายพันธุ์ที่น่ากังวลและโปรตีน ORF8 ของมันได้มีวิวัฒนาการเพื่อที่จะเพิ่มขีดความสามารถในการปิดกั้น (shut down) โมเลกุล MHC-I ซึ่งด้วยเหตุนี้จึงยังผลให้สามารถหลบเลี่ยงจาก memory CD8⁺ T cells ที่จำเพาะต่อแอนติเจน (antigen-specific) ที่สร้างขึ้นมาจากการติดเชื้อมาก่อนหน้าหรือจากการได้รับวัคซีนหรือไม่

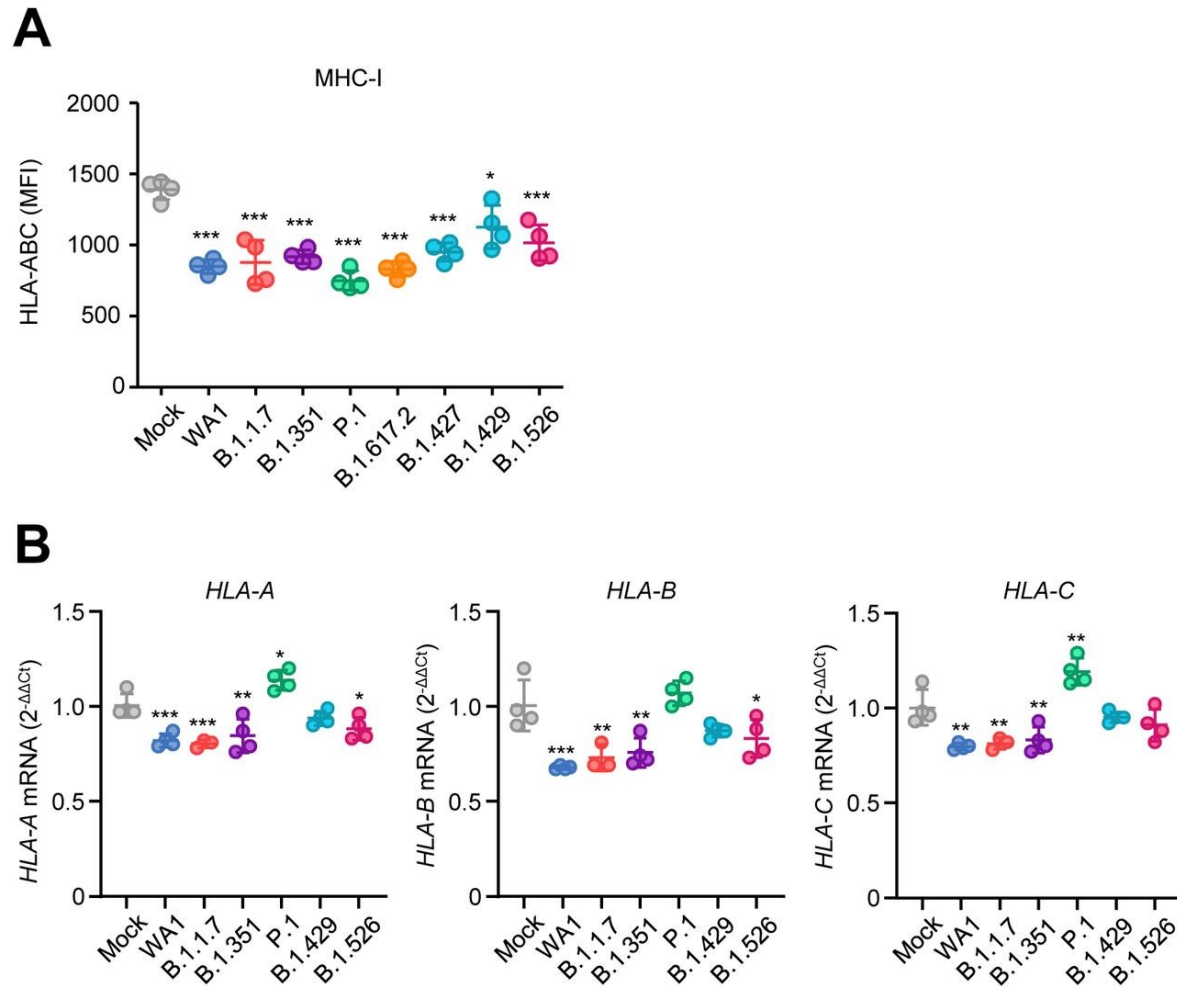
ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้ดำเนินการวิเคราะห์อย่างเป็นระบบสำหรับขีดความสามารถ (capacity) ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในการ downregulate การแสดงออกของโมเลกุล MHC-I และโดยที่ไม่ได้คาดคิดมาก่อน ข้อมูลของเรามีการแสดงให้เห็นถึงการระงับยับยั้ง (suppression) ระบบโมเลกุล MHC-I ที่แข็งแรง (vigorous) ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 สายพันธุ์บรรพบุรุษ (ancestral SARS-CoV-2 virus) และวิวัฒนาการที่น้อยมาก (minimal evolution) ในการ modulate วิถีของโมเลกุล MHC-I โดยสายพันธุ์ที่น่ากังวล (VOCs)

ผลที่ได้จากการศึกษาวิจัย (Results)

สายพันธุ์กลายพันธุ์ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ยังคงรักษาขีดความสามารถในการหลบหลีกโมเลกุล MHC-I ในระดับที่ใกล้เคียง

เพื่อที่จะศึกษาถึงผลกระทบของการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่มีต่อการแสดงออกของโมเลกุล MHC-I เราจึงได้ทำให้เซลล์ Calu-3 ซึ่งเป็น cell line ของเซลล์เยื่อในปอดของมนุษย์ที่ใช้กันทั่วไปเกิดการติดเชื้อมีสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 และสายพันธุ์บรรพบุรุษ (USA-WA1) เราได้ทดสอบสายพันธุ์ที่น่ากังวลจำนวน 4 สายพันธุ์ (B.1.1.7/อัลฟา B.1.351/เบต้า P.1/แกมมา และ B.1.617.2/เดลต้า) และสายพันธุ์ที่ต้องให้ความสนใจ (variants of interest) จำนวน 3 สายพันธุ์ (B.1.427/เอปไซลอน B.1.429/เอปไซลอน และ B.1.526/ไอโอต้า) สายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 และสายพันธุ์บรรพบุรุษมีการ downregulate ระดับของโมเลกุล MHC-I อย่างใกล้เคียงกันภายหลังการติดเชื้อ (ภาพประกอบ 1A) ต่อจากนั้นเราได้ทำการตรวจสอบระดับการถอดรหัสพันธุกรรม (transcriptional level) ของยีน MHC-I ภายหลังการติดเชื้อมีสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ระดับการถอดรหัสพันธุกรรม (transcriptional level) ของยีน MHC-I มีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 นั้น ๆ (ภาพประกอบ 1B) สายพันธุ์บรรพบุรุษมีการ downregulate ยีน HLA-A ยีน B และยีน C อย่างมีนัยสำคัญอย่างที่ได้มีการรายงานมาแล้วก่อนหน้านี้ (Yoo และคณะ, พ.ศ. 2564) สายพันธุ์ B.1.1.7 กับสายพันธุ์ B.1.351 แสดงให้เห็นถึงการลดลงที่ใกล้เคียงกันของการแสดงออกของ HLA-A, B, และ C mRNA เหมือนอย่างในสายพันธุ์บรรพบุรุษ สายพันธุ์อื่น ๆ มีการแสดงถึงการ downregulate ที่อ่อนกว่า (B.1.526) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (B.1.429) หรือการ

upregulation (P.1) ของยีน HLA class I ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อ ผลที่ได้เหล่านี้นับว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ยังคงมีการอ้างไว้ซึ่งขีดความสามารถที่ใกล้เคียงกันในการลด HLA transcription เหมือนกับเชื้อไวรัสบรรพบุรุษ ยกเว้นสายพันธุ์ P.1 กับสายพันธุ์ B.1.429 จากการที่เซลล์ที่ติดเชื้อมีสายพันธุ์ P.1 และเซลล์ที่ติดเชื้อมีสายพันธุ์ B.1.429 ยังคงมีการแสดงออกในระดับที่ต่ำ ๆ ของ MHC-I บนพื้นผิว ยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องใน MHC-I processing และ presentation pathway ซึ่งจำนวนมากเป็น ISGs อาจจะถูกทำให้ลดน้อยลง (dampened) จากการติดเชื้อ

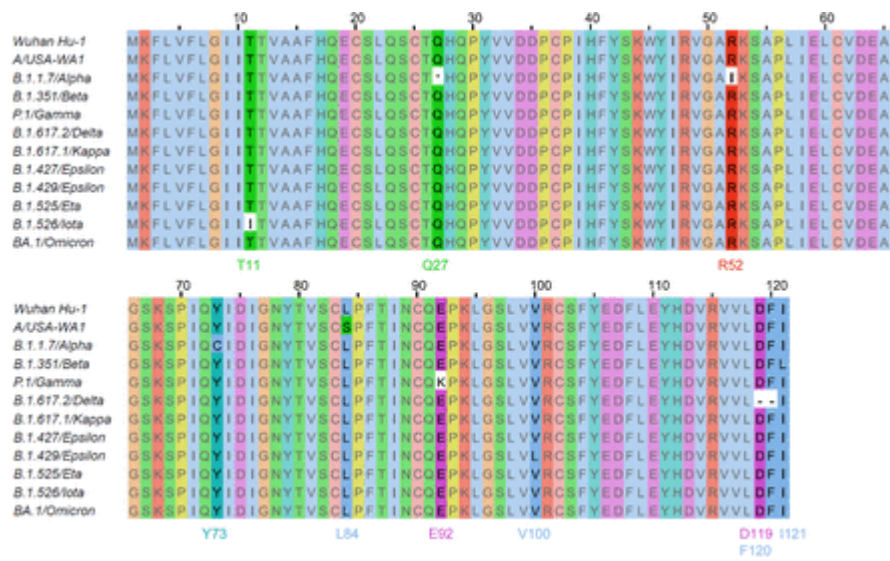


ภาพประกอบที่ 1. การหลั่ง MHC-I ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2

(A) เซลล์ Calu-3 ถูกทำให้ติดเชื้อมีสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่ MOI เท่ากับ 0.3 เป็นเวลา 40 ชั่วโมง. การแสดงออกของ HLA-ABC ที่พื้นผิวเซลล์ได้รับการวิเคราะห์โดย FACS. (B) เซลล์ Calu-3 ถูกทำให้ติดเชื้อมีสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่ MOI เท่ากับ 0.01 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง. ระดับของ mRNA ของ HLA-A, B, และ C ได้รับการตรวจวัดโดยวิธี RT-qPCR. ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s.d.). ข้อมูลเป็นตัวแทนของการทดลองที่เป็นอิสระ (independent experiments) จำนวน 2-3 การทดลอง. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

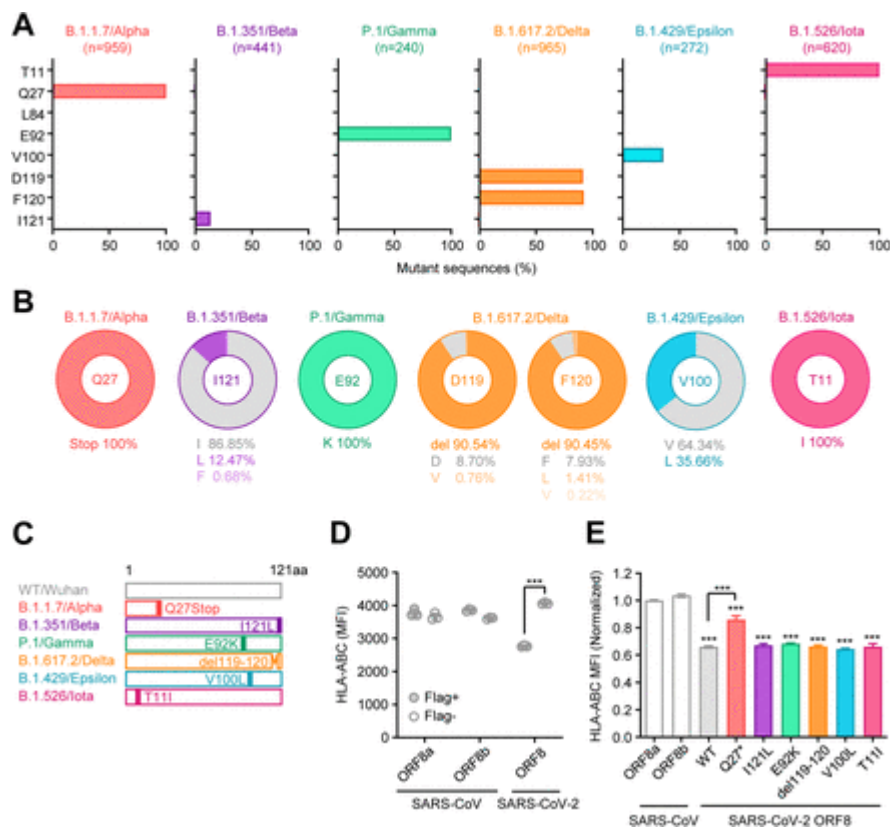
การกลายพันธุ์ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ (variant-specific mutations) ถูกพบในยีน ORF8 ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2

ต่อจากนั้นเราได้ทำการเปรียบเทียบ sequence ของยีนโดยวิธี multiple sequence alignment สำหรับ ORF8 protein sequences จากสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 เพื่อที่จะดูว่ามีการกลายพันธุ์ชนิดที่เป็น non-synonymous mutations อยู่หรือไม่ โดยเบ็ดเสร็จแล้วเราตรวจพบว่ามี 7 non-synonymous mutations และ 2 deletions จากจำนวน 10 สายพันธุ์ที่ได้รับการตรวจหา (ภาพประกอบ S1) ที่เห็นได้ชัดก็คือว่ามี premature stop codon ถูกเพิ่มเข้ามาที่ Q27 ของ B.1.1.7 ซึ่งตัด (truncate) ความยาวของโพลีเปปไทด์ของ ORF8 และมีความเป็นไปได้ที่จะเปลี่ยนแปลงการทำงานของโปรตีน (protein functionality) การกลายพันธุ์ชนิดที่เป็น downstream mutations (R52I และ Y73C) อาจจะไม่มียผลกระทบเพิ่มเติมต่อ B.1.1.7 ORF8 protein เนื่องมาจากการสิ้นสุดการแปลรหัสแต่เนิ่น ๆ (early translation termination) ที่เกิดจาก Q27stop mutation นอกเหนือจาก B.1.1.7/อัลฟาแล้วสายพันธุ์อื่น ๆ ที่เป็นสายพันธุ์ที่นำกังวลทั้งหมด (B.1.351/เบต้า P.1/แกมมา และ B.1.617.2/เดลต้า) ล้วนเป็นที่พักพิง (harbor) ให้แก่การกลายพันธุ์ (mutations) หรือการหลุดหาย (deletions) ของโปรตีน ORF8 ยกเว้นสำหรับ BA.1/สายพันธุ์โอไมครอน จำนวน 2 สายพันธุ์ในบรรดาสายพันธุ์ที่ต้องให้ความสนใจ (variants of interest) ก่อนหน้านี้ คือ B.1.429/เอปไซลอน และ B.1.526/ไอโอต้าเป็นที่พักพิง (harbor) ให้แก่การกลายพันธุ์ของ V100L และของ T11I ตามลำดับ ไม่มีการกลายพันธุ์ (mutations) และการหลุดหาย (deletions) ที่ได้รับการรักษาไว้ (conserved) ในบรรดาลำดับสายพันธุ์ (lineages) ต่าง ๆ กัน เพื่อที่จะศึกษาความชุก (prevalence) ของการกลายพันธุ์ที่พบในสายพันธุ์ต่าง ๆ เราจึงได้ดาวน์โหลดข้อมูล genome sequence ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 จำนวน 3,059 sequences จากฐานข้อมูลกลางโควิด-19 โลก (GISAID database) (<https://www.gisaid.org/>) เราพบว่าการกลายพันธุ์ในกรดอะมิโนที่ผิดปกติ (particular amino acid) พบเห็นได้เฉพาะแค่ในลำดับสายพันธุ์เดี่ยว (single lineage) เท่านั้น (ภาพประกอบ 2A) การกลายพันธุ์ของ ORF8 L84S ซึ่งถูกตรวจพบภายใน 2 เดือนแรกของการระบาด (Ceraolo และ Giorgi, พ.ศ. 2563) และสอดคล้องตรงกัน (corresponding) กับ clade S ไม่ถูกสังเกตพบในสายพันธุ์ใด ๆ นอกจากนี้เรายังสังเกตพบว่าการกลายพันธุ์ที่พบจากการทำ multiple sequence alignment มีความชุกอยู่ในระดับสูงโดยทั่วไป และสัดส่วน (proportions) อยู่ในช่วงระหว่างจาก 12.5 ถึง 100% ของลำดับสายพันธุ์ (ภาพประกอบ 2B) ผลที่ได้เหล่านี้บ่งชี้ว่าการกลายพันธุ์ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ (variant-specific mutations) นี้ได้มาโดยอิสระ (independently) ในระหว่างวิวัฒนาการของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2



ภาพประกอบ S1. Comprehensive screening ของการกลายพันธุ์ของโปรตีน ORF8 ในสายพันธุ์ที่น่ากังวล (variants of concern)/ สายพันธุ์ที่ต้องให้ความสนใจ (variants of interest).

Multiple sequence alignment ของโปรตีน ORF8 จากสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2. กรดอะมิโนที่แตกต่างได้รับการไฮไลต์ตาม ClustalX color scheme โดยคุณสมบัตินี้ทางเคมีฟิสิกส์.



ภาพประกอบ 2. การกลายพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษ (unique mutations) ถูกพบในยีน ORF8 ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2

(A) สัดส่วนของสารก่อกลายพันธุ์ (mutant) ในยีน ORF8 ของสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่ระบุ. ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่แสดงได้รับการคัดเลือกโดยอิงจากผลที่ได้ของการทำ multiple sequence alignment ในภาพประกอบ S1. จำนวนของ sequences ที่ได้รับการวิเคราะห์สำหรับแต่ละลำดับสายพันธุ์ (lineage) แสดงไว้เหนือแต่ละกราฟ. (B)

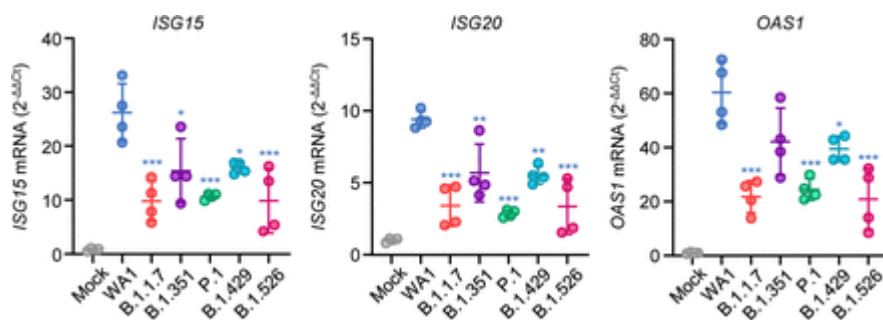
ความถี่ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ได้รับการ enriched สำหรับสารก่อกลายพันธุ์ (mutants) ในแต่ละสายพันธุ์. กรดอะมิโนซึ่งแสดงเป็นสีเทาสอดคล้องตรงกัน (correspond) กับ WT. (C) Schematic diagram ของโปรตีน ORF8 จากสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2. (D และ E) เซลล์ HEK293T ได้รับการ transfect กับพลาสมิดที่บรรจุรหัสนิวคลีโอไทด์ (encode) ของสายพันธุ์ที่มีโปรตีนชนิด C-terminally Flag-tagged SARS-CoV ORF8a/b, SARS-CoV-2 ORF8 WT, หรือ SARS-CoV-2 ORF8. 48 ชั่วโมงหลังจากการ transfection เซลล์ได้รับการเก็บรวบรวมและวิเคราะห์สำหรับการแสดงออกของ cell surface HLA-ABC. ข้อมูลแสดงในรูปของ raw MFI (D) หรือเป็นอัตราส่วนของ MFI ใน Flag+ cells ถึง Flag- cells ที่ได้รับการ normalize เป็นค่าของ SARS-CoV ORF8a (E) (n=3). ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s.d.). ข้อมูลเป็นตัวแทนของการทดลองที่เป็นอิสระ (independent experiments) จำนวน 3 การทดลอง. ***, $p < 0.001$

Downregulation ของ MHC-I ที่บกพร่องเสียหาย (impaired) ซึ่งเกิดจาก B.1.1.7 ORF8 protein

ต่อจากนั้นเราได้ทดสอบว่าการกลายพันธุ์ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ (variant-specific mutations) มีการเปลี่ยนแปลงขีดความสามารถของโปรตีน ORF8 ในการ downregulate โมเลกุล MHC-I หรือไม่ เพื่อการนี้เราได้สร้างพลาสมิดการแสดงออก (expression plasmids) ที่บรรจุรหัสนิวคลีโอไทด์ (encode) ของ 6 ORF8 mutants จากสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 (ภาพประกอบ 2C) และต่อมาก็ transfect เซลล์ HEK293T กับพลาสมิดเหล่านี้สำหรับการตรวจหาผลกระทบของมันที่มีต่อระดับของ surface MHC-I expression เราได้รวมเอาโปรตีน SARS-CoV ORF8a/b ในฐานะที่เป็น negative controls เนื่องจากว่าโปรตีนเหล่านี้ได้รับการแสดงให้เห็นแล้วว่าไม่มีผลต่อระดับของ MHC-I expression (Zhang และคณะ, พ.ศ. 2564) เนื่องจากว่า ORF8 กระตุ้นให้เกิดการ degradation ของ MHC-I โดยผ่านทางกลไกการกลืนกินตัวเองของเซลล์ (autophagy) โดยการมีปฏิสัมพันธ์กับ MHC-I และการ localize ในรูเปิด (puncta) ที่เป็น LC3-positive (Zhang และคณะ, พ.ศ. 2564) ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่า ORF8 จะทำการ downregulate โมเลกุล MHC-I ในลักษณะที่เกิดขึ้นอยู่ภายในเซลล์ (cell-intrinsic manner) เป็นความจริงที่เดียวระดับของ surface MHC-I ของเซลล์ที่แสดง WT ORF8 protein ต่ำกว่าระดับของ surface MHC-I ของเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ ORF8 เป็นอย่างมาก (ภาพประกอบ 2D) ในบรรดาจำนวน 6 ORF8 mutants ที่ทดสอบมีอยู่ 5 mutants ได้แก่ I121L, E92K, del119-120, V100L, และ T11I ที่มีการ downregulate ระดับ surface MHC-I ของเซลล์ที่แสดงออกสำหรับโปรตีนเหล่านั้นในขอบเขตปริมาณที่ใกล้เคียงกับที่โปรตีน WT ORF8 ได้ทำไว้ (ภาพประกอบ 2E) ในทางกลับกัน Q27Stop ORF8 mutant มีการแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการ downregulate MHC-I ที่ถูกลดทอน (attenuated) ลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน WT ORF8 ผลที่ได้เหล่านี้บ่งชี้ว่าไม่มีการกลายพันธุ์ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ (variant-specific mutations) ใด ๆ ที่เพิ่มพูน (enhance) ความสามารถของโปรตีน ORF8 ในการ downregulate MHC-I และโปรตีน ORF8 ที่ได้รับการ encoded โดยลำดับสายพันธุ์ (lineage) B.1.1.7 ถูกลดทอน (attenuated) ความสามารถในการลด surface MHC I expression

สายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 ได้รับการเพิ่มขีดความสามารถในการหลบหลีกอินเตอร์เฟียร์อน

จากการที่สายพันธุ์ B.1.1.7 และสายพันธุ์ P.1 สามารถลดระดับในการแสดงออกของ MHC-I ถึงแม้ว่าลำดับสายพันธุ์ (lineages) เหล่านี้ยังคงเก็บรักษา (retain) ORF8 mutant ที่บกพร่องเสียหายในด้านการทำหน้าที่ (functionally defective) หรือที่มีประสิทธิภาพน้อยกว่าในการลดระดับของ HLA-I mRNA เราจึงได้ตรวจสอบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 มีการระงับยับยั้ง (suppress) การกระตุ้นยีนที่ได้รับการกระตุ้นจากอินเตอร์เฟียร์อน (interferon-stimulated gene หรือ ISG) อย่างเข้มแข็งกว่าสายพันธุ์บรรพบุรุษ (ancestral strain) หรือไม่ เป็นที่น่าสนใจว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ทั้งหมดที่ทดสอบมีการลด upregulation ของ ISG expressions อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์บรรพบุรุษ (ภาพประกอบที่ 3) ผลที่ได้เหล่านี้บ่งชี้ว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 มีขีดความสามารถที่เพิ่มสูงขึ้นในการระงับยับยั้ง (suppress) ISGs ซึ่งอาจจะรวมถึงยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ MHC I processing และ presentation pathways



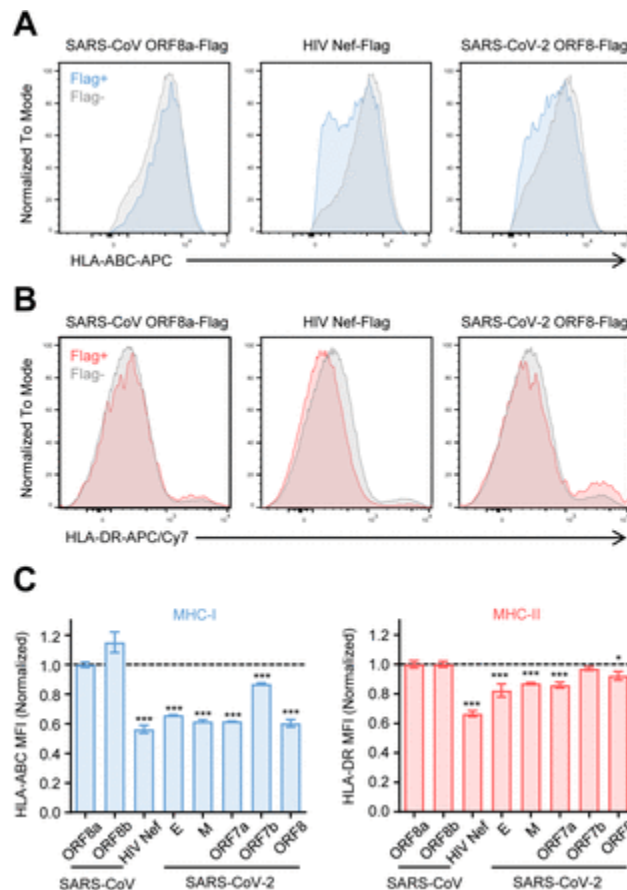
ภาพประกอบที่ 3. การแสดงออกของยีนที่ได้รับการกระตุ้นจากอินเตอร์เฟียร์อนที่บกพร่องเสียหาย ซึ่งเกิดจากสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2

เซลล์ Calu-3 ได้รับการทำให้ติดเชื้อมีสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 ที่ MOI เท่ากับ 0.01 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง. ระดับของ mRNA ของ ISG15, ISG20, OAS1 ได้รับการตรวจวัดโดยวิธี RT-qPCR. ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s.d.). ข้อมูลเป็นตัวแทนของการทดลองที่เป็นอิสระ (independent experiments) จำนวน 2 การทดลอง. * ที่แสดงเป็นสีน้ำเงินเป็นการเปรียบเทียบกับ WA1. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

โปรตีนมากมายหลายชนิดของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 มีบทบาทที่ซับซ้อนในการ downregulate โมเลกุล MHC-I

ในฐานะที่เป็นกลไกการชดเชย (compensation mechanism) อีกกลไกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ เราได้ศึกษาความเป็นไปได้ที่เชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 มีการบรรจุรหัสพันธุกรรม (encode) ของยีนไวรัสมากมายหลายชนิดที่ทำงานซับซ้อนในการ downregulate MHC-I เราได้สร้างพลาสมิดการแสดงออก (expression plasmids) ที่บรรจุรหัสพันธุกรรม (encode) ของ SARS-CoV-2 E, M, ORF7a, และ ORF7b และประเมินผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของ surface MHC-I และ MHC-II ของเซลล์ HEK293T ภายหลังการ transfection กับ พลาสมิดเหล่านี้ นอกจากนี้เรายังได้รวมเอา Human Immunodeficiency Virus (HIV) Nef ในฐานะที่เป็น positive control สำหรับการ downregulate ทั้ง MHC-I

และ MHC-II (Schwartz และคณะ, พ.ศ. 2539; Stumptner-Cuvelette และคณะ, พ.ศ. 2544) และโปรตีนของ SARS-CoV ORF8a/b เป็น negative control และอย่างที่ได้อาการนี้ไว้โปรตีน HIV Nef มีการ downregulate ระดับของทั้ง MHC-I และ MHC-II ในขณะที่ SARS-CoV-2 ORF8 มีการมุ่งเป้าไปที่ MHC-I เป็นการเฉพาะ (ภาพประกอบ 4A-B) เราพบว่านอกเหนือจาก ORF8 แล้ว SARS-CoV-2 E, M, และ ORF7a มีการ downregulate MHC-I อย่างมากภายในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนไวรัสเหล่านี้ (ภาพประกอบ 4C) การลดลงอย่างมีนัยสำคัญของระดับ surface MHC-II ก็ยังถูกสังเกตพบได้จากการแสดงออกของโปรตีนไวรัสเหล่านี้ (ภาพประกอบ 4C) ถึงแม้ว่าจะอยู่ในขอบเขตปริมาณที่น้อยกว่า (ประมาณ 20%) ก็ตาม ผลที่ได้เหล่านี้ทำให้เห็นว่าเชื่อได้ว่าไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีการบรจุรหัสนิวคลีโอไทด์ (encode) ของยีนไวรัสมากมายที่ downregulate MHC-I อย่างซ้ำซ้อนกัน ซึ่งอาจจะมีความเป็นไปได้ในการรับรองว่าจะมีการหลบหลีก (evasion) จากการจดจำของ CTL ที่พึ่งพาอาศัย MHC-I (MHC-I-mediated CTL recognition)



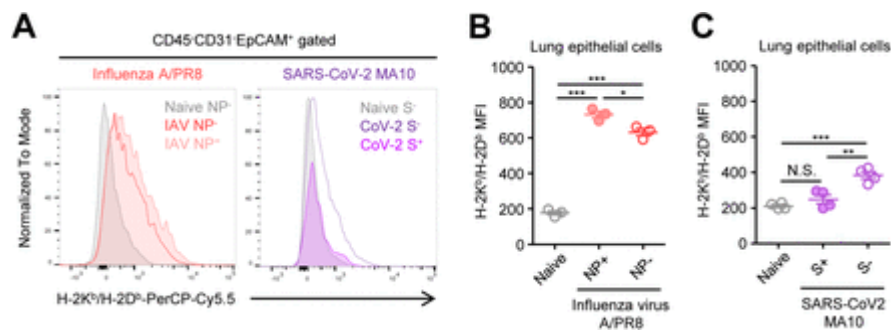
ภาพประกอบที่ 4. ยีนของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีการ downregulate MHC-I อย่างซ้ำซ้อนกัน

(A-C) เซลล์ HEK293T ได้รับการ transfect กับพลาสมิดการแสดงออก (expression plasmids) ที่บรรจุรหัสนิวคลีโอไทด์ (encode) C-terminal Flag-tagged viral proteins ที่ระบุ. หลังจาก 48 ชั่วโมง surface expressions ของ HLA-ABC และ HLA-DR ได้รับการวิเคราะห์โดยวิธี flow cytometry. ฮิสโตแกรมตัวแทนของ HLA-ABC (A) และ HLA-DR (B) ของ SARS-CoV ORF8a-Flag, HIV-Nef-Flag, หรือ SARS-CoV-2 ORF8-Flag +/- cells ได้รับการแสดงไว้. (C) Normalized ratio ของ HLA surface expression ใน Flag+ cells ถึง Flag- cells ได้รับการแสดงไว้ (n=3). ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(s.d.). ข้อมูลเป็นตัวแทนของการทดลองที่เป็นอิสระ (independent experiments) จำนวน 3 การทดลอง. นักวิจัยทางสถิติได้รับการคำนวณเปรียบเทียบกับ SARS-CoV ORF8a *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$

การหลบหลีก MHC-I ที่เหนือกว่าของไวรัสซาร์ส-โควี-2 เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A ในร่างกายสิ่งมีชีวิต

ในการทดลองข้างบนนี้เราได้แสดงให้เห็นว่าไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีการบรรจุรหัสนิวคลีโอไทด์ (encode) ของโปรตีนไวรัสต่าง ๆ มากมายที่มุ่งเป้า (targeting) ไปที่การแสดงออกของ MHC-I ซึ่งสามารถเสริมความแข็งแกร่งอย่างเสริมแรงกัน (synergistically) สำหรับขีดความสามารถของไวรัสในการหลีกเลี่ยงการแสดงออกของ MHC-I นอกจากนี้แล้วเรายังได้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีขีดความสามารถที่ได้รับการเพิ่มพูน (enhanced) ในการยับยั้ง (suppress) การกระตุ้นของ ISG สูงกว่าสายพันธุ์บรรพบุรุษ (ancestral strain) แต่ไม่ใช่ MHC-I ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ว่ากลไกการหลีกเลี่ยง MHC-I มีความเหมาะสมที่สุดอยู่แล้วในสายพันธุ์บรรพบุรุษ นอกจากนี้เราได้ยืนยันสิ่งที่พบ (finding) ก่อนหน้านี้ที่ว่า MHC-I downregulation เป็นฟังก์ชันที่ได้มาใหม่ (newly acquired function) ของโปรตีน ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ซึ่งไม่พบเห็นในโปรตีน ORF8a/b ของไวรัสซาร์ส-โควี เมื่อได้พิจารณาถึงผลที่ได้เหล่านี้แล้วเราจึงตั้งสมมติฐานว่าแม้แต่สายพันธุ์บรรพบุรุษของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ก็มีกลไกการหลีกเลี่ยง MHC-I ที่เหนือกว่าเชื้อไวรัสทางเดินหายใจชนิดอื่น ๆ เพื่อที่จะประเมินสมมติฐานนี้เราได้ทำให้หนู C57BL/6J เกิดการติดเชื้อผ่านทางจมูก (intranasally) กับสายพันธุ์ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่ได้รับการปรับให้เข้ากันกับหนู (SARS-CoV-2 MA10) หรือไวรัสไข้หวัดใหญ่ A/PR8 และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ MHC-I ของเซลล์เยื่อในปอดที่ 2 วันหลังจากการติดเชื้อ SARS-CoV-2 MA10 เป็นที่พึงพิง (harbor) ให้แก่การกลายพันธุ์จำนวน 2 mutations ในโปรตีนหนาม จำนวน 3 mutations ใน ORF1ab และ 1 F7S mutation ใน ORF6 เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสสายพันธุ์บรรพบุรุษ (Leist และคณะ, พ.ศ. 2563) ที่โดดเด่นก็คือไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A กระตุ้นการ upregulation ที่แข็งแกร่งของ MHC-I ทั้งในเซลล์เยื่อในปอดที่ติดเชื้อ (NP+) และในเซลล์เยื่อในปอดที่ไม่ติดเชื้อ (NP-) ในขณะที่ SARS-CoV-2 MA10 มีการ upregulate MHC-I เฉพาะในเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ (S-) เท่านั้น และในขอบเขตปริมาณที่น้อยกว่าไวรัสไข้หวัดใหญ่ (ภาพประกอบ 5A-C) ที่สำคัญก็คือว่า MHC-I upregulation ถูกปิดกั้นอย่างสิ้นเชิงในเซลล์เยื่อในปอดที่ติดเชื้อมี SARS-CoV-2 MA10 (S+) ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่าโปรตีนของไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีการยับยั้งขัดขวาง MHC-I upregulation อย่างแข็งแกร่งในลักษณะที่เกิดขึ้นอยู่ภายในเซลล์ (cell-intrinsic manner) ผลที่ได้เหล่านี้บ่งชี้ว่าไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีขีดความสามารถที่เกือบจะสมบูรณ์ (near complete) ในการปิดกั้นการกระตุ้น MHC-I ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อในร่างกายสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่ไม่พบในไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A



ภาพประกอบที่ 5. การระงับยับยั้งที่แข็งแกร่งสำหรับ MHC-I upregulation โดยไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต

(A-C) หนู C57BL/6J ถูกทำให้ติดเชื้อผ่านทางจมูก (intranasally) กับ 0.5 PFU ของ SARS-CoV-2 MA10 หรือไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A/PR8. 2 วันต่อมาปอดได้รับการเก็บรวบรวมและวิเคราะห์สำหรับ surface MHC-I expressions บนเซลล์เยื่อของประชากรโปรตีนไวรัสที่มีผลเป็นบวกหรือลบ ((SARS-CoV-2 Spike (S) หรือ Influenza A virus Nucleoprotein (NP)) positive and negative populations). (n=3). ฮิสโตแกรมตัวแทน (A) และ MFI (B และ C) ได้รับการแสดงไว้. ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) \pm โดเลสมการโครงสร้าง (s.e.m). ข้อมูลเป็นตัวแทนของการทดลองที่เป็นอิสระ (independent experiments) จำนวน 2 การทดลอง. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

การอภิปราย (Discussion)

การกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อซึ่งพึ่งพาอาศัย $CD8^+$ T cell มีบทบาทสำคัญในปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงเชื้อ (adaptive immune response) ดังนั้นเชื้อไวรัสมากมายหลายชนิดจึงได้พัฒนาหนทางวิธีการต่าง ๆ เพื่อหลีกเลี่ยงการแสดงแอนติเจนที่พึ่งพาอาศัย MHC-I ที่มีประสิทธิภาพต่อ $CD8^+$ T cells ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้เปิดเผยให้เห็นถึงความสามารถที่เข้มแข็งภายในตัว (intrinsically potent ability) ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในการปิดกั้นระบบ MHC-I ของผู้ที่ถูกอาศัย (host) โดยการใช้สายพันธุ์กลายพันธุ์ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ต้นแบบ (authentic) ที่มีชีวิต ตลอดจนการวิเคราะห์องค์ประกอบด้านการทำงาน (functional analysis) ของการกลายพันธุ์ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ (variant-specific mutations) ในยีน ORF8 ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญของไวรัสสำหรับทั้งในการหลบหลีก MHC-I และในการปรับตัวให้เข้ากับผู้ที่ถูกอาศัย (host)

เราได้แสดงให้เห็นว่าส่วนใหญ่ของสายพันธุ์ที่น่ากังวล (variants of concern)/ สายพันธุ์ที่ต้องให้ความสนใจ (variants of interest) มีการกลายพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษ (unique mutations) ภายในยีน ORF8 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบด้านการทำงาน (functional analysis) โดยใช้ mutant ORF8 เราพบว่าไม่มีการกลายพันธุ์ใด ๆ ที่เพิ่มความสามารถของ ORF8 ในการระงับยับยั้ง (suppress) การแสดง MHC-I อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ในลำดับสายพันธุ์ (lineage) B.1.1.7/อัลฟาที่มีการลดทอน (attenuate) การทำงานของมัน ผลที่ได้เหล่านี้ทำให้เกิดคำถามว่าการกลายพันธุ์เหล่านี้เป็นประโยชน์ต่อไวรัสหรือไม่ ความเป็นไปได้อย่างหนึ่งก็คือว่าการกลายพันธุ์เหล่านี้มีบทบาทในการปรับเปลี่ยน (modify) การทำงานของ ORF8 ที่เป็นอิสระจาก MHC-I downregulation เป็นอย่างนั้นจริง ๆ ข้อมูลของเราได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถที่เพิ่มสูงขึ้นของสายพันธุ์ที่น่ากังวล (VOCs) ในการระงับยับยั้งการแสดงออกของ ISG จนถึงขณะนี้ได้มีการรายงานเกี่ยวกับหน้าที่มากมายหลายอย่าง

ของ SARS-CoV-2 ORF8 ซึ่งรวมถึงการยับยั้งขัดขวางการส่งสัญญาณ (signaling) ของ type I IFN, ISGs, หรือ NF-kB (Geng และคณะ, พ.ศ. 2564; Lei และคณะ, พ.ศ. 2563; Li และคณะ, พ.ศ. 2563) และ modulation ของการแสดงออกของไซโตไคน์จากแมคโครฟาจ (Kriplani และคณะ, พ.ศ. 2564) ที่น่าสนใจคือมีงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นว่า SARS-CoV-2 ORF8 ถูกปล่อยออกมาอย่างแข็งขัน (actively secreted) เข้าสู่อาหารเลี้ยงเซลล์ (cell culture media) ในลักษณะที่พึ่งพาอาศัยเปปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide-dependent manner) เมื่อมันถูกแสดงออกมากเกินไป (overexpressed) ในหลอดทดลอง (Kriplani และคณะ, พ.ศ. 2564; Wang และคณะ, พ.ศ. 2563) นอกจากนี้เปปไทด์ ORF8 และแอนติบอดีที่ต่อต้าน ORF8 (anti-ORF8 antibodies) ก็ยังสามารถถูกตรวจพบได้อย่างมากมายในซีรัมของผู้ป่วย ซึ่งทำให้น่าเชื่อได้ว่ามีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันของการปล่อย ORF8 อย่างแข็งขันกับการติดเชื้อจริง ๆ ในมนุษย์ (Wang และคณะ, พ.ศ. 2563) ORF8 มีส่วนเกี่ยวข้องในการปรับตัวให้เข้ากับผู้ที่ถูกอาศัยที่เป็นมนุษย์ (human host) ในระหว่างการระบาดของไวรัสซาร์ส-โควี (Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium, พ.ศ. 2547; Guan และคณะ, พ.ศ. 2546) และเป็นที่รับทราบกันว่า ORF8 เป็น hypervariable genomic region ในไวรัสซาร์ส-โควีและไวรัสโคโรนาที่สัมพันธ์เกี่ยวข้องกับโรคซาร์สในค้างคาว (Cui และคณะ, พ.ศ. 2562; Hu และคณะ, พ.ศ. 2560) นอกจากนั้นการศึกษาวิจัยจากช่วงต้น ๆ ของการแพร่ระบาดของโรคโควิด 19 ก็มีการสังเกตพบความเปลี่ยนแปลง (variability) และวิวัฒนาการที่รวดเร็วของยีน ORF8 ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 (Alkhansa และคณะ, พ.ศ. 2564; Velazquez-Salinas และคณะ, พ.ศ. 2563) ที่เห็นได้ชัดก็คือ isolates ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่มี 382nt deletion ที่ span ORF7b-ORF8 gene region ถูกสังเกตพบในสิงคโปร์ (Su และคณะ, พ.ศ. 2563) ซึ่งมีสหสัมพันธ์กับปฏิกิริยาการตอบสนองของ T cell ที่แข็งแรงและผลลัพธ์ทางคลินิกที่เล็กน้อย (Fong และคณะ, พ.ศ. 2565; Young และคณะ, พ.ศ. 2563) ด้วยเหตุนี้การกลายพันธุ์ของยีน ORF8 จึงอาจจะมีบทบาทสำคัญในการ modulate พยาธิกำเนิดของไวรัสและการปรับตัวเข้ากับผู้ที่ถูกอาศัย (host) โดยการ regulate ระดับของ MHC-I และ ISGs

การหลบเลี่ยงระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับการเพิ่มพูนของสายพันธุ์ที่น่ากังวล (VOCs) ได้รับการบันทึกไว้เป็นอย่างดีสำหรับการหลบหนี (escape) จากแอนติบอดีชนิดบล็อกล้างฤทธิ์ (Garcia-Beltran และคณะ, พ.ศ. 2564; Lucas และคณะ, พ.ศ. 2564; Planas และคณะ, พ.ศ. 2565; Wang และคณะ, พ.ศ. 2564) และจากปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Guo และคณะ, พ.ศ. 2564; Thorne และคณะ, พ.ศ. 2565) ในการศึกษาวิจัยนี้เราได้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ที่น่ากังวลของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ได้มีวิวัฒนาการเพื่อให้จำกัดควบคุมปฏิกิริยาการตอบสนองของ type I IFN ของผู้ที่ถูกอาศัย (host) ได้ดีขึ้น ในทางกลับกันความสามารถในการลด MHC-I expression ก็ยังคงไม่เปลี่ยนแปลงตลอดวิวัฒนาการของสายพันธุ์ที่น่ากังวล สิ่งที่น่าสนใจพบเหล่านี้เสนอสมมุติฐานที่สำคัญ 2 ประการเกี่ยวกับกลยุทธ์ในการหลบหลีก MHC-I ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ประการแรกไวรัสซาร์ส-โควี-2 มีการใช้กลยุทธ์การหลบหลายอย่างที่ซ้ำซ้อนกัน (multiple redundant strategies) ในการระงับยับยั้งการแสดงออกของ MHC-I ยกตัวอย่างเช่น เมื่อพิจารณาถึงการที่ B.1.1.7 มีการเก็บรักษาความสามารถที่ยังคงมีอยู่ครบถ้วน (intact) ในการปิด

กัน MHC-I แล้ว การหลบเลี่ยง MHC-I ที่บกพร่องเสียหายโดย B.1.1.7 ORF8 ก็มีความเป็นไปได้ที่จะได้รับการชดเชย (compensated) จากการทำงานที่ซ้ำซ้อนและ/หรือที่เป็นการชดเชยของโปรตีนอื่น ๆ ของไวรัสซึ่งรวมทั้ง E, M, และ ORF7a นอกจากนี้แล้วลำดับสายพันธุ์ของ B.1.1.7 ก็ได้รับการแสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของ subgenomic RNA ที่เพิ่มสูงขึ้นและความอุดมสมบูรณ์โปรตีนของ ORF6 ([Thorne และคณะ, พ.ศ. 2565](#)) ซึ่งระงับยับยั้ง (suppress) MHC-I ที่ระดับการถอดรหัส (transcriptional level) โดยการรบกวนแทรกแซง STAT1-IRF1-NLRC5 axis ([Yoo และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) ดังนั้นกลไกการหลบเลี่ยง MHC-I หลายชั้น (multi-tiered) จึงทำงานซ้ำซ้อนเพื่อรับรองการหลบหนี (escape) จากการถูกฆ่าโดย CTL

ประการที่ 2 MHC-I downregulation อาจจะไม่เพียงแต่ทำให้การจดจำ (recognition) ของ CTL ของเซลล์ที่ติดเชื้อเพื่อการฆ่าเกิดความบกพร่องเสียหาย เท่านั้น แต่ยังอาจจะทำให้การเตรียมการ (priming) ของ CD8 T cells เกิดความบกพร่องเสียหายอีกด้วย เป็นอย่างนั้นจริง ๆ ความถี่ของเซลล์หน่วยความจำ CD8⁺ T (memory CD8⁺ T cells) ที่จำเพาะต่อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 ในกระแสเลือดของผู้ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 ต่ำกว่าประชากร T cell ที่จำเพาะต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่หรือไวรัส Epstein-Barr อยู่ประมาณ 10 เท่า ([Habel และคณะ, พ.ศ. 2563](#)) ซึ่งบ่งชี้ถึงการกระตุ้นเซลล์หน่วยความจำ CD8⁺ T ที่เป็น suboptimal induction หลังจากการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควิ-2 ในมนุษย์

ประการที่ 3 จากการที่สายพันธุ์ที่น่ากังวล (VOCs) ไม่ได้มีวิวัฒนาการเพิ่มเติมในการ downregulate MHC-I ที่เข้มข้นกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (original strain) ไวรัสซาร์ส-โควิ-2 บรรพบุรุษจึงได้รับการเพิ่มประสิทธิภาพให้เหมาะสมอย่างเต็มที่ (fully optimized) อยู่แล้ว สำหรับการหลบหนี (escape) จากระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัย CD8⁺ T cell (CD8⁺ T cell-mediated immunity) ในส่วนของการ downregulate การแสดงออกของ MHC-I และไม่ได้อยู่ภายใต้ความกดดันของวิวัฒนาการในอันที่จะเพิ่มประสิทธิภาพกลยุทธ์การหลบหนีให้เหมาะสมมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์และการหลบหนีจาก CTL epitopes ที่ถูกจำกัดโดย HLA ที่จำเพาะเจาะจงได้ถูกสังเกตพบในไวรัสซาร์ส-โควิ-2 ที่กำลังแพร่ระบาดอยู่และในสายพันธุ์ที่น่ากังวล ([Agerer และคณะ, พ.ศ. 2564](#); [Motozono และคณะ, พ.ศ. 2564](#)) การตรวจคัดกรอง epitopes ทั่วทั้งจีโนม (genome-wide) ทำให้น่าเชื่อถือได้ว่า epitopes ของ CD8⁺ T cell และ CD4⁺ T cell มีการกระจายอย่างกว้างขวางตลอดทั้งจีโนมของไวรัสซาร์ส-โควิ-2 ([Ferretti และคณะ, พ.ศ. 2563](#); [Tarke และคณะ, พ.ศ. 2564a](#)) และจำนวนของ epitopes ต่อสายพันธุ์ที่ได้รับการประมาณอยู่ที่อย่างน้อย 17 epitopes สำหรับ CD8⁺ T cell และ 19 epitopes สำหรับ CD4⁺ T cell ตามลำดับ ([Tarke และคณะ, พ.ศ. 2564a](#)) และดังนั้นการหลบหนีจาก T cell ที่ใช้งานได้ (functional) โดยสายพันธุ์ที่น่ากังวลจึงมีอยู่จำกัดเป็นอย่างมาก ([Tarke และคณะ, พ.ศ. 2564b](#)) ในทางกลับกันสิ่งนี้ทำให้น่าเชื่อถือได้ว่า MHC-I downregulation อาจจะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับไวรัสในการหลีกเลี่ยงการเฝ้าระวังของ CTL มากกว่าการนำเข้าสู่การกลายพันธุ์ใน epitopes ซึ่งเป็นกระบวนการที่ปรากฏว่ามีอยู่มากที่สุดลำดับสายพันธุ์ของไวรัสซาร์ส-โควิ-2 บรรพบุรุษ ความสำคัญของการหลบหนี

MHC-I โดยไวรัสซาร์ส-โควี-2 ยังได้รับการเน้นย้ำจากความจริงที่ว่าไม่มีการกลายพันธุ์ทางพันธุกรรม (genetic mutations) หรือการเปลี่ยนแปลง (variations) ในวิถีของ MHC-I ที่จนถึงขณะนี้ได้รับการระบุขึ้นว่าเป็นปัจจัยเสี่ยง (risk factor) สำหรับโรคโควิดชนิดอาการรุนแรง (COVID-19 Host Genetics Initiative, พ.ศ. 2564) ซึ่งแตกต่างจากวิถีของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune pathways) ที่เกี่ยวข้องกับ TLRs และ type I IFNs (Zhang และคณะ, พ.ศ. 2565)

การติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ทั้งในโมเดลของร่างกายมนุษย์และในโมเดลพรีคลินิกได้มีการแสดงให้เห็นถึงการกระตุ้นปฏิกิริยาการตอบสนองของ CD8⁺ T cell ที่จำเพาะต่อแอนติเจน (Grifoni และคณะ, พ.ศ. 2564; Joag และคณะ, พ.ศ. 2564) และปฏิกิริยาการตอบสนองของ CTL ในช่วงต้น (early) มีสหสัมพันธ์กับผลลัพธ์ของโรคที่เล็กน้อยกว่า (milder) ในมนุษย์ (Tan และคณะ, พ.ศ. 2564) อย่างไรก็ตามถ้าพิจารณาการ adoptive transfer ของซีรัมหรือ IgG จากสัตว์ที่ฟื้นตัวเพียงอย่างเดียวเท่านั้นก็เพียงพอในการลดปริมาณเชื้อไวรัส (viral load) ในผู้รับหลังจากการทำให้ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในหนูและสัตว์ตระกูลลิง (non-human primates) (Israelow และคณะ, พ.ศ. 2564; McMahan และคณะ, พ.ศ. 2564) และแอนติบอดีชนิดคลบล้างฤทธิ์ได้รับการแสดงว่าเป็น strong correlate ของการป้องกัน (Earle และคณะ, พ.ศ. 2564; Israelow และคณะ, พ.ศ. 2564; Khoury และคณะ, พ.ศ. 2564) ปรากฏว่าบทบาทในการป้องกันของภูมิคุ้มกันที่อาศัย CD8⁺ T cell มีความสำคัญมากขึ้นเมื่อไม่มีปฏิกิริยาการตอบสนองที่อาศัยสารน้ำ/แอนติบอดีชนิดคลบล้างฤทธิ์ที่เหมาะสมที่สุด (Bange และคณะ, พ.ศ. 2564; Israelow และคณะ, พ.ศ. 2564) แอนติบอดีที่ต่อต้านยับยั้ง ORF8 ในเลือดสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางคลินิก (clinical marker) ที่มีความไวเป็นอย่างสูงสำหรับการติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในช่วงแรก ๆ (ประมาณ 14 วัน) หลังจากเริ่มมีอาการ (Hachim และคณะ, พ.ศ. 2563; Wang และคณะ, พ.ศ. 2563) ซึ่งบอกถึงบทบาทของ ORF8 ในระยะแรกมาก ๆ ของโรค ดังนั้น MHC-I downregulation ที่อาศัย ORF8 จึงสามารถนำหน้ามาก่อน (precede) การแสดงแอนติเจน (antigen presentation) และยับยั้งขัดขวางการเตรียมการ (priming) ของปฏิกิริยาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจาก CD8⁺ T cell ที่จำเพาะต่อแอนติเจนไวรัส การปิดกั้น MHC-I ที่แข็งแกร่งโดยไวรัสซาร์ส-โควี-2 อาจจะสามารถอธิบายได้เป็นบางส่วนว่าการป้องกันโดย CD8⁺ T cells มีประสิทธิภาพน้อยลง และผลกระทบที่น้อยลงของการที่ไม่มี CD8⁺ T cell เมื่อเปรียบเทียบกับภูมิคุ้มกันที่อาศัยสารน้ำ (Israelow และคณะ, พ.ศ. 2564) โดยรวมแล้วข้อมูลของเราช่วยอธิบายถึงความสามารถที่เข้มแข็งภายในตัว (intrinsically potent ability) ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในการหลีกเลี่ยงการแสดงออกของแอนติเจนต่อ CD8⁺ T cells ที่อิงอาศัย MHC-I ที่สำคัญคือเราสังเกตเห็นว่าการยับยั้งขัดขวางที่สมบูรณ์สำหรับ MHC-I upregulation ในเซลล์เยื่อปอดที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในระยะแรก ๆ ของการติดเชื้อในโมเดลของหนูทดลอง เนื่องจากความสามารถของ ORF8 ในการ downregulate MHC-I เป็นคุณสมบัติที่ได้มาใหม่ ๆ ใน SARS-CoV-2 ORF8 และเป็นคุณสมบัติที่ไม่มีใน SARS-CoV ORF8 (Zhang และคณะ, พ.ศ. 2564) ด้วยเหตุนี้จึงมีความเป็นไปได้ว่า ORF8 มีบทบาทในการจำลองตัวเอง (replication) และการแพร่กระจายเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในมนุษย์ที่มีประสิทธิภาพ และมีส่วนในศักยภาพการแพร่ระบาดในวงกว้างของมัน การศึกษาวิจัยของเราทำให้เกิด

ความเข้าใจลึกซึ้งในพยาธิกำเนิดและวิวัฒนาการของไวรัสซาร์ส-โควี-2 รวมทั้งสามารถทำนายหรือคาดการณ์สำหรับความยากลำบากของวิธีการรักษาโรคโควิด 19 ที่ใช้ CD8 T cell เป็นฐาน (CD8 T cell-based therapeutic approaches)

โมเดลการทดลองและรายละเอียดเกี่ยวกับผู้ป่วย (EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS)

หนูทดลอง

หนู C57BL/6 เพศผู้ที่มีอายุ 6 -10 สัปดาห์ที่ได้รับการจัดซื้อจาก Jackson Laboratory ทุกการทดลองในสัตว์สำหรับการศึกษานี้ปฏิบัติตามนโยบายของรัฐบาลกลาง และนโยบายของสถาบันของคณะกรรมการการดูแลและใช้สัตว์ทดลองแห่งมหาวิทยาลัยเยล (Yale Animal Care and Use Committee)

Cell lines และไวรัส

เซลล์ HEK293T ได้รับการบำรุงรักษาสภาพในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่เสริมด้วย 1% Penicillin-Streptomycin และ 10% heat-inactivated FBS. เซลล์ Calu-3 ได้รับการบำรุงรักษาสภาพในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด MEM ที่เสริมด้วย 1% Penicillin-Streptomycin และ 10% heat-inactivated FBS. เซลล์ TMPRSS2-VeroE6 ได้รับการบำรุงรักษาสภาพในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่เสริมด้วย 1% sodium pyruvate, 1% Penicillin-Streptomycin และ 10% heat-inactivated FBS ที่อุณหภูมิ 37°C. ไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A/Puerto Rico/8/34 ได้รับความอนุเคราะห์จัดหาให้โดย Dr. Hideki Hasegawa (สถาบันโรคติดเชื้อแห่งชาติของประเทศญี่ปุ่น). Virus stocks ได้รับการแพร่พันธุ์เพิ่มจำนวน (propagated) ใน allantoic cavities จากไข่ไก่ที่ fertile ซึ่งมีอายุระหว่าง 10 – 11 วันเป็นเวลา 2 วันที่อุณหภูมิ 35°C. ไตเตอร์ของไวรัสกำหนดด้วยวิธี plaque assay มาตรฐาน. SARS-CoV-2 MA10 (Leist และคณะ, พ.ศ. 2563) ได้รับความอนุเคราะห์จัดหาให้โดย Dr. Ralph S. Baric (มหาวิทยาลัยนอร์ทแคโรไลนา ณ แชปเปิลฮิลล์). SARS-CoV-2 ลำดับสายพันธุ์ A (USA-WA1/2020) และ B.1.351b (hCoV-19/South Africa/KRISP-K005325/2020) ได้รับจาก BEI resources. ลำดับสายพันธุ์ B.1.1.7, B.1.351a, P.1, B.1.617.2, B.1.427, B.1.429, และ B.1.526 ได้รับการเพาะแยกเชื้อ (isolated) และ sequenced ในฐานที่เป็นส่วนหนึ่งของ Yale Genomic Surveillance Initiative's weekly surveillance program ในมลรัฐคอนเนทิคัต สหรัฐอเมริกา. Virus stocks ได้รับการ propagated และ titered อย่างที่ได้อธิบายไปแล้วก่อนหน้านี้ (Lucas และคณะ, พ.ศ. 2564; Perez-Then และคณะ, พ.ศ. 2565). กล่าวโดยย่อคือเซลล์

TMPRSS2-VeroE6 ถูกทำให้ติดเชื้อที่ multiplicity of infection เท่ากับ 0.01 เป็นเวลา 3 วัน และ cell-free supernatant ได้รับการเก็บรวบรวมและใช้เป็น working stocks. การทดลองทั้งหมดที่ใช้ live SARS-CoV-2 ดำเนินการในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลระดับ 3 (biosafety level 3 laboratory) ซึ่งได้รับการอนุมัติจากสำนักงานอนามัยสิ่งแวดล้อมและความปลอดภัยแห่งมหาวิทยาลัยเยล (Yale Environmental Health and Safety office).

รายละเอียดของวิธีการ (METHOD DETAILS)

การตรวจวิเคราะห์การถอดรหัสพันธุกรรมจีโนมไวรัส (Viral genome sequence analysis)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมสายพันธุ์กลายพันธุ์ของไวรัสซาร์ส-โควี-2 (จำนวน 3,067 sequences) ได้รับการดาวน์โหลดจากฐานข้อมูลกลางโควิด-19 โลก (GISAID database) (<https://www.gisaid.org/>) ซึ่งเป็นข้อมูล ณ วันที่ 23 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2565. Sequences ของ Wuhan Hu-1 (GenBank accession: [NC_045512.2](#)) และ USA-WA1/2020 (GenBank accession: [MW811435.1](#)) ได้รับจาก NCBI Virus SARS-CoV-2 Data Hub (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/sars-cov-2>). เพื่อที่จะศึกษาถึงความชุก (prevalence) ของการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนเราได้ดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์มากถึง 965 sequences ของแต่ละสายพันธุ์ (lineage) และ aligned ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ORF8 เหล่านี้โดยใช้ Jalview software (<http://www.jalview.org/>) (Waterhouse et al. Bioinformatics. 2009) โดย MUSCLE algorithm (Edgar RC. Nucleic Acid Res. 2004). Sequences ที่มีนิวคลีโอไทด์ที่ไม่กระจ่างชัด (undetermined) ภายใน codon ที่สนใจถูกแยกเอาออกไปเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์. การทำ ORF8 amino acid sequence alignment ดำเนินการโดยใช้ Jalview software ซึ่งใช้ using MUSCLE algorithm.

การติดเชื้อไวรัส (Viral infection)

หนูทดลองถูกวางยาสลบอย่างเต็มที่ (fully anesthetized) โดยการฉีด ketamine และ xylazine เข้าทางช่องท้อง และฉีด (inoculated) PBS ปริมาณ 50ul ซึ่งมี 1×10^5 PFU ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A/Puerto Rico/8/34 เข้าทางจมูก (intranasally). สำหรับการทำให้ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลระดับ 3 สำหรับสัตว์ทดลอง หนูถูกวางยาสลบโดย 30% v/v isoflurane ที่เจือจางใน propylene glycol และ 50ul ของ 1×10^5 PFU ของ SARS-CoV-2 MA10 ใน PBS ถูกฉีด

ให้ทางจุลภูมิ. สำหรับการทำให้ cell culture infection เซลล์ถูกล้าง (washed) ด้วย PBS และทำให้ติดเชือกับไวรัสซาร์ส-โควี-2 ที่ multiplicity of infection เท่ากับ 0.01 หรือ 0.3 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37C. หลังจากการ incubation เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วเซลล์ได้รับการเสริม (supplemented) ด้วย complete media และเพาะเลี้ยง (cultured) จนกระทั่งถึงการเก็บเกี่ยวตัวอย่าง (sample harvest).

พลาสมิด (Plasmids)

pDONR207- SARS- CoV- 2 E (#141273), pDONR207- SARS- CoV- 2 M (#141274), pDONR207- SARS- CoV- 2 ORF7a (#141276), pDONR223- SARS- CoV- 2 ORF7b (#141277), pDONR223- SARS- CoV- 2 ORF8 (#141278) ได้รับการจัดซื้อจาก addgene ([Kim และคณะ, พ.ศ. 2563](#)) และใช้เป็น templates สำหรับการสร้างพลาสมิดที่มีการแสดงออกของโปรตีนของไวรัสซาร์ส-โควี-2. สำหรับ HIV Nef ที่มีการแสดงออกของการสร้างพลาสมิด NL4-3-dE-EGFP (ได้รับความอนุเคราะห์จัดหาให้โดย Dr. Ya-Chi Ho) ถูกใช้เป็น template. ยีนไวรัสที่มีความยาวเต็ม (full-length) ได้รับการ amplified โดยวิธี PCR โดยการใช้ iProof™ High- Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad) ที่มี templates ตามที่ได้อธิบายไว้ข้างบนนี้และ primers จำเพาะซึ่งมี XhoI (XbaI for HIV Nef) site และ BamHI site ที่ 5' end และ 3' end ตามลำดับ. หลังจาก restriction enzyme digestion แล้ว PCR fragments ได้รับการ cloned เข้าสู่ c-Flag pcDNA3 vector (addgene, #20011).

สำหรับการสร้างพลาสมิดที่มีการแสดงออกของโปรตีนของไวรัสซาร์ส-โควี-2 oligonucleotides ที่สอดคล้องตรงกัน (corresponding) กับทั้ง 2 เส้น (strands) ของ SARS- CoV Tor2 (GenBank accession: [NC_004718.3](#)) ORF8a และ ORF8b ที่มี XhoI site และ BamHI site ที่ 5' end และ 3' end ได้รับการสังเคราะห์ (IDT) และ cloned เข้าสู่ XhoI-BamHI site ของ c-Flag pcDNA3 vector. Mutant SARS-CoV-2 ORF8 ที่แสดงพลาสมิดได้รับการสร้างขึ้นโดยวิธีการที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenesis) ที่อิงวิธี PCR มาตรฐาน. Integrity ของ inserts ได้รับการตรวจสอบยืนยัน (verified) โดยการ sequencing (Yale Keck DNA sequencing facility).

การแยกเซลล์ปอด (Lung cell isolation)

ปอดได้รับการเก็บเกี่ยว (harvested) และ processed ตามที่ได้อธิบายมาก่อนหน้านี้ ([Israelow และคณะ, พ.ศ. 2564](#)). กล้ามโดยย่นคือปอดถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกรและย่อยใน RPMI1640 media ที่มี 1mg/ml collagenase A, 30ug/ml DNase I ที่อุณหภูมิ 37C เป็นเวลา 45 นาที. ต่อจากนั้นปอดที่ถูกย่อยแล้วก็จะถูกกรองผ่าน 70um cell strainer และ treated ด้วย ACK buffer เป็นเวลา 2 นาที. หลังจากล้างด้วย PBS แล้วเซลล์ก็ได้รับการ resuspend ใน PBS ที่มี 1% FBS.

การวิเคราะห์เซลล์ด้วยวิธี Flow cytometry

เซลล์ถูก block ด้วย Human BD Fc Block (Fc1.3216, 1:100, BD Biosciences) โดยมี Live/Dead Fixable Aqua (Thermo Fisher) เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง. Staining antibodies ถูกเติมลงไปและ incubate เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง. เซลล์ถูกล้างด้วย 2mM EDTA-PBS และ resuspend ใน 100ul 2% PFA เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง. สำหรับการย้อมสีภายในเซลล์ (intracellular staining) เซลล์ที่ถูกทำให้คงสภาพ (fixed) ด้วย PFA ถูกล้างและทำให้เซลล์แตกสลาย (permeabilized) ด้วย eBioscience FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer (Thermo Fisher) เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4C. เซลล์ถูกล้างครั้งเดียวและย้อมใน permeabilization buffer อย่างเดียวกันซึ่งมี staining antibodies. หลังจาก incubate เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4C แล้วเซลล์ถูกล้างและ resuspend ใน PBS ที่มี 1% FBS สำหรับการตรวจวิเคราะห์กับ Attune NxT (Thermo Fisher). FlowJo software (Tree Star) ถูกใช้สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล. Staining antibodies มีดังต่อไปนี้ (Hu Fc Block Pure Fc1.3216 (BD, Cat# 564220), APC anti-HLA-ABC (Thermofisher, Cat# 17- 9983-42), APC/Cy7 anti-HLA-DR (BioLegend, Cat# 307618), PE anti- DYKDDDDK Tag (BioLegend, Cat# 637309), AF488 anti-SARS-CoV-2 Spike S1 Subunit (R&D Systems, Cat# FAB105403G), FITC anti-Influenza A NP (Thermofisher, Cat# MA1-7322), PE anti-mouse CD45 (BioLegend, Cat# 109808), BV421 anti-mouse CD31 (BioLegend, Cat# 102423), APC anti-mouse EpCAM (BioLegend, Cat# 118213), PerCP/Cy5.5 anti-H-2Kb/H-2Db (BioLegend, Cat# 114620)).

การตรวจด้วยวิธี **Quantitative PCR**

เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสซาร์ส-โควี-2 ถูกล้างด้วย PBS และทำให้แตก (lysed) ด้วย TRIzol reagent (Invitrogen). อาร์เอ็นเอทั้งหมดได้รับการสกัดแยก (extracted) โดยใช้ RNeasy mini kit (QIAGEN) และ transcribed ย้อนกลับเป็น cDNA โดยใช้ iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). การทำ RT-PCR ทำโดย CFX96 Touch Real-Time PCR detection system (Bio-Rad) ซึ่งใช้ iTaq SYBR premix (Bio-Rad) primers ดังต่อไปนี้ (5'-3'):

HLA-A (Forward: AAAAGGAGGGAGTTACACTCAGG, Reverse: GCTGTGAGGGACAC ATCAGAG), HLA-B (Forward: CTACCCTGCGGAGATCA, Reverse: ACAGCCA GGCCAGCAACA), HLA-C (Forward: CACACCTCTCCTTTGTGACTTCAA, Reverse: CCACCTCCTCACATTATGCTAACA), human ISG15 (Forward: TGGAC AAATGCGACGAACCTC, Reverse: TCAGCCGTACCTCGTAGGTG), human ISG20 (Forward: TCTACGACACGTCCACTGACA, Reverse: CTGTTCTGGATG CTCTTGTGT), human OAS1 (Forward: CTGAGAAGGCAGCTCACGAA, Reverse: TGTGCTGGGTCAGCAGAATC), human GAPDH (Forward: CAACGG ATTTGGTCGTATT, Reverse: GATGGCAACAATATCCACTT),.

การวิเคราะห์ทางสถิติ (**Statistical analysis**)

นัยสำคัญทางสถิติได้รับการทดสอบโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) ตามด้วยการเปรียบเทียบเชิงพหุคูณของ Tukey (Tukey's multiple comparison test). ค่า P-values ที่น้อยกว่า 0.05 ได้รับการพิจารณาว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ.