

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาระบบขนถ่ายดีเอ็นเอโดยใช้อนุภาคนาโนไคโทซานและการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการออโตฟาจีในเซลล์นำเสนอแอนติเจน

Development of DNA delivery system using chitosan nanoparticle and induction of autophagy in antigen presenting cells

ผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภสร วนิชเวหารุ่งเรือง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยให้คำแนะนำในการเตรียมอนุภาคนาโนจากโคโชน โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (CU-CLUSTER-Emerging H-39-99-53)

บทคัดย่อ

การทรานสเฟกชันโดยการนำพลาสมิดที่มีชิ้นยีนแทรกสอดเข้าสู่เซลล์เป็นขั้นตอนสำคัญในการประยุกต์ใช้งานด้านชีวเวชศาสตร์ เช่น การทำยีนบำบัด และวัคซีนชนิดดีเอ็นเอ เซลล์ส่วนใหญ่รับพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ด้วยประสิทธิภาพที่ต่างกัน เซลล์นำเสนอแอนติเจน (Antigen Presenting Cell; APC) เช่น เซลล์เดนไดรติกและแมโครฟาจ เป็นหนึ่งในเซลล์ที่นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้ยากที่สุด เซลล์เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการนำเสนอแอนติเจนต่อเฮลเปอร์ทีลิมโฟไซด์เพื่อชักนำให้มีการตอบสนองแบบ adaptive อย่างมีประสิทธิภาพ ในการที่จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพหลังจากการปลูกวัคซีนนั้น สามารถที่จะมุ่งเป้าแอนติเจนไปยังเซลล์นำเสนอแอนติเจน วัคซีนชนิดดีเอ็นเอเป็นวัคซีนชนิดใหม่ที่มีศักยภาพที่จะทดแทนวัคซีนที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันได้ จากเหตุผลในด้านความง่ายในการเตรียม ความเสถียรและราคาต้นทุนที่ถูก โดยทั่วไปวัคซีนชนิดดีเอ็นเอจะให้ทาง intradermal หรือ intramuscular และเชื่อกันว่าเซลล์ใดๆ ก็สามารถนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้ การมุ่งเป้าวัคซีนชนิดดีเอ็นเอไปยังเซลล์จำเพาะชนิดแบบจำเพาะนั้นเป็นสิ่งที่พึงประสงค์ในการเหนี่ยวนำการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ดีที่สุด ออกโตฟาจีเป็นกลไกป้องกันการรุกรานของเชื้อก่อโรคในระดับเซลล์โดยจะกำจัดแอนติเจนภายในเซลล์ รวมถึงเชื้อก่อโรคแอนติเจนที่เป็นโปรตีนที่ผ่านการย่อยจะถูกนำเสนอแก่เฮลเปอร์ทีลิมโฟไซด์ ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาระบบนำส่งดีเอ็นเอพลาสมิดที่มุ่งเป้าไปยัง APC โดยใช้ออนุภาคนาโนจากโคโทซานและผนวกระบบการเหนี่ยวนำออกโตฟาจีเมื่อให้นำส่งดีเอ็นเอแล้วโดยใช้พลาสมิดเหนี่ยวนำออกโตฟาจี ก่อนอื่นผู้วิจัยได้หาภาวะที่เหมาะสมในการทรานสเฟกชันโดยใช้โคโทซานละลายได้ในกรดในการห่อหุ้มพลาสมิดในระดับ *in vitro* ที่สัดส่วน N/P ที่ 8:1-10:1 ให้อัตราการทรานสเฟกชันเข้าเซลล์สูงสุดใน HEK293T ผู้วิจัยได้ดัดแปรโคโทซานให้มี strepavidin และใช้ในการห่อหุ้มพลาสมิด หลังจากนั้นนำโคโทซาน-strepavidin-พลาสมิดไปบ่มกับ biotinylated anti-F4/80 antibody ซึ่งจำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์แมโครฟาจ ซึ่งพบว่าโคโทซานดัดแปรนี้มีบ่มร่วมกับ biotinylated anti-F4/80 antibody ไม่สามารถเพิ่มอัตราการทรานสเฟกชันเข้าเซลล์ไลน์แมโครฟาจ RAW264.7 ได้ การศึกษานี้จึงบ่งชี้ว่าจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการใช้โคโทซานดัดแปรให้มี strepavidin เพื่อนำส่งแบบมุ่งเป้าดีเอ็นเอไปยังเซลล์เป้าหมาย อีกทั้ง เพื่อเพิ่มการนำเสนอแอนติเจนต่อทีลิมโฟไซด์ ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาระบบพลาสมิดที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดออกโตฟาจี จากการใช้พลาสมิดที่มียีน mTOR ที่มีการกลายพันธุ์ที่ทำให้โคเนสของ mTOR เสียแอกติวิตี พบว่าสามารถตรวจหาการเกิดออกโตฟาจีใน HEK293T และเซลล์ไลน์เดนไดรติก JAWSII ได้ ดังนั้น ระบบการเหนี่ยวนำออกโตฟาจีจึงได้มีการพัฒนาขึ้น ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าสามารถใช้วัคซีนชนิดดีเอ็นเอในการกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่แรงโดยการนำเทคนิคนี้มาใช้ร่วมกัน

Abstract

Transfection of plasmid containing an insert into cells is an essential step in various application in biomedicine such as gene therapy and DNA vaccine. Most cells take up plasmids with varying efficacy. Antigen presenting cells (APCs) such as dendritic cells and macrophages are one of the hardest cells to transfect. These cells play important roles in antigen presentation to helper T lymphocytes to initiate effective adaptive immune response. In order to induce effective immune response upon vaccination, antigens can be targeted to antigen presenting cells. DNA vaccine is a novel type of vaccine with potentials to replace currently in use vaccine because of its ease in preparation, stability and cost effectiveness. In general, DNA vaccine is administered via intradermal or intramuscular and believed to be taken up by any cells. Specifically targeting DNA vaccine to specific cells are ideal in order to induce optimal immune response. Autophagy is a cellular defense mechanism to target intracellular antigens, including pathogens. Parts of degraded protein antigens are presented to helper T cells. Therefore, in this study, we aimed at developing a DNA plasmid delivery system targeting APCs using chitosan nanoparticles and incorporating autophagy inducing system upon DNA delivery, using autophagy inducing plasmid. First, we optimized the transfection using acid soluble chitosan particles that encapsulated DNA plasmid *in vitro*. At N/P ratio of 8:1-10:1 yielded the highest transfection rate in HEK293T. We modified chitosan to contain streptavidin and encapsulated plasmid DNA. This step was followed by incubation of chitosan-streptavidin-DNA plasmid with biotinylated anti-F4/80 antibody that specifically targeting macrophages. Unexpectedly, modified chitosan incubated with anti-F4/80 antibody did not increase the numbers of transfected macrophage cell line, RAW264.7. These results imply that it is necessary to further study in optimization in using streptavidin-modified chitosan for target cell specific DNA plasmid delivery. In addition, in order to increase antigen presentation to T cells, we developed a DNA plasmid system which induced cells to undergo autophagy. Using plasmid containing mutated mTOR gene encoding inactive mTOR kinase, autophagy could be detected in HEK293T and dendritic cell line, JAWSII. Therefore, autophagy inducing system is established. Combining these techniques, it is possible to use DNA vaccine to induce robust immune response.

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
1. บทนำ	7
1.1 ไคโทซานเป็นพาหะนำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอ	7
1.2 ออโต้ฟาจีและการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน	8
2. วิธีการดำเนินการวิจัย	9
2.1 การเตรียมดีเอ็นเอพลาสมิด	
2.2 การเตรียมอนุภาคนาโนไคโทซานและการศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคที่ได้	
2.3 การทรานสเฟกชันเข้าสู่เซลล์	
2.4 การศึกษาการเกิดออโต้ฟาจีในเซลล์	10
3. ผลการวิจัย	10
4. อภิปราย/วิจารณ์ผลการทดลอง	15
บรรณานุกรม	17
ประวัตินักวิจัย	19
ภาคผนวก	22

สารบัญภาพ

	หน้าที่
รูปที่ 1 สมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนจากโคโทซานที่ห่อหุ้มพลาสมิดดีเอ็นเอ	10
รูปที่ 2 การห่อหุ้มพลาสมิดดีเอ็นเอโดยอนุภาคนาโนจากโคโทซาน	11
รูปที่ 3 การแสดงออกของ GFP ในเซลล์ไลน์ 293T ที่ผ่านการทรานสเฟกชันด้วยอนุภาคนาโนจากโคโทซานที่ห่อหุ้ม พลาสมิดดีเอ็นเอ pMaxGFP ที่อัตราส่วน N/P ต่างๆ	11
รูปที่ 4 การแสดงออกของ GFP ในเซลล์ไลน์ RAW264.7 ที่ผ่านการทรานสเฟกชันด้วยอนุภาคนาโนจากโคโทซานที่ห่อหุ้ม พลาสมิดดีเอ็นเอ pMaxGFP ที่อัตราส่วน N/P ต่างๆ	12
รูปที่ 5 ผลของการวิเคราะห์ FTIR ของโคโทซานดัดแปร	12
รูปที่ 6 การห่อหุ้มดีเอ็นเอพลาสมิด pMAX-GFP ด้วยโคโทซานดัดแปร Chitosan Strepavidin	13
รูปที่ 7 ผลการทรานสเฟกชันด้วยอนุภาคโคโทซานดัดแปร Chitosan-strepavidin ที่ห่อหุ้มพลาสมิด pMAX-GFP เข้าสู่ RAW264.7	14
รูปที่ 8 การเหนี่ยวนำให้เกิดออโต้ฟาจิโดยการทรานสเฟกชันพลาสมิด pmTOR หรือ pmTORKD ในเซลล์ 293T	14
รูปที่ 9 การตรวจหาการเกิดออโต้ฟาจิในเซลล์ไลน์ JAWSII ที่ได้รับพลาสมิด pmTOR หรือ pmTORKD ร่วมกับ pEGFP-LC3	15

1. บทนำ

ปัจจุบันการนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนต่างๆ เข้าสู่เซลล์ของสัตว์นั้น มีการพัฒนาขึ้นมากโดยมีความหลากหลายของทั้งในกระบวนการ ประสิทธิภาพและความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมาย เนื่องจากมีเทคโนโลยีที่จำเป็นต้องใช้กระบวนการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ต่างๆ ที่มีประโยชน์ในการใช้งานทางการแพทย์เพิ่มขึ้น เช่น การทำยีนบำบัด (Gene therapy) การปลูกวัคซีนชนิดดีเอ็นเอ (DNA vaccination) เป็นต้น การทำยีนบำบัด คือ การนำยีนดีเอ็นเอปกติซึ่งประมวลรหัสยีนที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเข้าไปในเซลล์ของอวัยวะที่ยีนนั้นมีความผิดปกติ เพื่อประโยชน์ในการรักษาความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบจำเพาะ เช่น การเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ขาดหายไป หรือการโอนถ่ายยีนที่ปกติเข้าไปแทนที่ ซึ่งการขนถ่ายพลาสมิดซึ่งมียีนที่ต้องการนำเข้าสู่เซลล์เป็นกระบวนการสำคัญที่จำเป็นต้องมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงและมีความจำเพาะสูงต่อเซลล์เป้าหมาย สำหรับดีเอ็นเอไวรัสชนิดนั้น จะใช้ดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสแอนติเจนที่เป็นเป้าหมายในการสร้างภูมิคุ้มกันในรูปแบบดีเอ็นเอเปลือย (naked DNA) หรือใช้โดยการมีพาหะนำเข้า (carrier) และยีนของแอนติเจนจะผ่านการถอดรหัสและแปลรหัส ทำให้มีการแสดงออกเป็นโปรตีน จากนั้นโปรตีนแอนติเจนจะผ่านกระบวนการ antigen processing เพื่อนำเสนอต่อทีลิมโฟไซต์และเหนี่ยวนำให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อไป

1.1 โคโทซานเป็นพาหะนำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอ

ในการนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์เพื่อทำยีนบำบัดหรือใช้ในการปลูกวัคซีนชนิดดีเอ็นเอไวรัสชนิดนั้น ได้มีการนำเวกเตอร์พาหะมาใช้พัฒนาเป็นระบบการขนถ่ายยีน ซึ่งในปัจจุบันมีเวกเตอร์พาหะหลักอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ เวกเตอร์พาหะไวรัส (viral vector) และเวกเตอร์พาหะที่ไม่ใช่ไวรัส (non-viral vector) โดยเวกเตอร์พาหะไวรัสนั้นมีอยู่หลายชนิด เช่น adenovirus, retrovirus, adeno-associated virus, herpes simplex virus และ lentivirus เป็นต้น (Jiang และคณะ, 2007) เวกเตอร์พาหะไวรัสนั้นมีประสิทธิภาพในการขนถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์สูงและยังมีความจำเพาะสูงต่อเซลล์เป้าหมายอีกด้วย แต่อาจมีผลข้างเคียงจากความเสียหายในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านที่ได้รับและอาจมีผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากไวรัสพาหะที่ใช้ ส่วนเวกเตอร์พาหะที่ไม่ใช่ไวรัสที่ใช้กันมักเป็นจำพวก lipid-based vector และ cationic polymer ซึ่งเวกเตอร์พาหะที่ไม่ใช่ไวรัสจะมีประสิทธิภาพในการขนถ่ายยีนต่ำกว่าเวกเตอร์พาหะไวรัส แต่จะมีความปลอดภัยที่ดีกว่า และมีผลข้างเคียงต่อเซลล์น้อยกว่าหรือแทบไม่มีเลย โดยที่ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) ต่ำ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำและง่ายต่อการเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปใช้งาน ดังนั้น จึงได้มีการพัฒนาเวกเตอร์พาหะที่ไม่ใช่ไวรัสมาใช้เพิ่มมากขึ้น

โคโทซานเป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติชนิดหนึ่งที่พบมากในธรรมชาติ โดยเฉพาะเป็นเปลือกหุ้มของสัตว์ทะเลในกลุ่ม crustacean โดยมีโครงสร้างเป็นสายพอลิแซ็กคาไรด์แบบคูลู ประกอบด้วย (1-4) เชื่อมด้วย D-glucosamine และ N-acetyl-D-glucosamine โคโทซานเป็น cationic polymer มีหมู่อะมิโนเป็นส่วนประกอบ โคโทซานสามารถป้องกันดีเอ็นเอจากการย่อยโดยเอนไซม์ได้ หน่วยย่อยของโคโทซานประกอบด้วยหมู่อะมิโนและหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มอื่นๆ ได้ โคโทซานมีประจุเป็นบวกและสามารถละลายน้ำได้ในสารละลายที่เป็นกรดและยังสามารถประกอบเป็นอนุภาคขนาดเล็กในระดับไมโครเมตรและนาโนเมตรได้ อีกทั้ง โคโทซานยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำและมีสมบัติในการยึดเกาะกับเยื่อเมือก (mucoadhesive) ได้ดี ในปี 1998 MacLaughlin และคณะได้รายงานการใช้โคโทซานในการขนถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ (MacLaughlin และคณะ, 1998) โคโทซานในสภาวะที่เป็นกรดสามารถประกอบเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับพลาสมิดดีเอ็นเอได้ โดยเกิดอันตรกิริยาทางไฟฟ้าและสารประกอบเชิงซ้อนนั้นสามารถเข้าไปในเซลล์ได้โดยกระบวนการ endocytosis ของเซลล์ หลังจากนั้นสารประกอบเชิงซ้อนโคโทซาน-ดีเอ็นเอจะถูกปล่อยจาก endosome และเข้าสู่นิวเคลียสและนำไปสู่การถอดรหัสและแปลรหัสของยีนบนพลาสมิดต่อไป (Ishii และคณะ, 2001)

ที่ผ่านมาได้มีการรายงานเกี่ยวกับใช้สารประกอบเชิงซ้อนโคโทซาน-ดีเอ็นเอในการนำพลาสมิติเอ็นเอเข้าไปในเซลล์ชนิดต่างๆ แล้ว เช่น เซลล์โตของตัวอ่อนมนุษย์ HEK293, เซลล์มะเร็งปอด A549, เซลล์มะเร็งผิวหนังเมลาโนมา B16, COS-1, CHO-K1 และเซลล์มะเร็งปากมดลูก HeLa เป็นต้น (Li และคณะ, 2003; Corsi และคณะ, 2003) อีกทั้ง ยังมีการศึกษาการสังเคราะห์และลักษณะสมบัติของอนุภาคนาโนโคโทซานและประสิทธิภาพในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคนาโนโคโทซาน-ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นพาหะขนถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ (Mao, และคณะ, 2001) และยังได้มีรายงานถึงผลกระทบของโครงสร้างโมเลกุลโคโทซานต่อสมบัติของอนุภาคโคโทซานระดับนาโนสำหรับขนถ่ายพลาสมิติเอ็นเอ (Bozkir และ Saka, 2004) โดยพบว่าประสิทธิภาพของโคโทซานในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และปัจจัยต่างๆ เช่น ซีรัม, ค่า pH ของอาหารที่ใช้ในการทำทรานสเฟกชัน และมวลโมเลกุลของโคโทซาน เป็นต้น (Koping-Hoggard, และคณะ, 2001; Ishii, และคณะ, 2001) ซึ่งโคโทซานนั้นสามารถที่จะถูกตัดแปรโดยการเติมหมู่หรือสารต่างๆ ได้ เช่น สารจำพวกพอลิเมอร์ สารเคมี และสารกัมมันตรังสี เช่น โกลโคไซด์ ทรานเฟอร์ริน โฮมโซมต่างๆ โพลีเอธิลีนไมด์ เป็นต้น แต่ยังมีปัญหาในเรื่องประสิทธิภาพในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ที่ยังได้ปริมาณต่ำและมีความจำเพาะต่ำ จึงได้มีการตัดแปรโคโทซานเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ซึ่งได้มีการใช้อนุภาคโพลีเอทิลีนไกลิคโคโทซาน-ดีเอ็นเอระดับนาโน ในการทำยีนบำบัด (Mansouri, และคณะ, 2005) และมีรายงานการใช้ galactosylated 6-amino-6-deoxychitosan ในการขนถ่ายพลาสมิติเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ไลน์มะเร็งตับ HepG2 (Satoh, และคณะ, 2007)

ปัจจุบันการนำพลาสมิติเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบบจำเพาะโดยเฉพาะเซลล์ในกลุ่มเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันนั้นมีรายงานอยู่บ้างแต่ไม่มากนัก เนื่องจากเป็นที่รู้กันว่ากลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวจัดเป็นเซลล์ที่ยากต่อการนำพลาสมิติเข้าสู่เซลล์ ซึ่งหากสามารถพัฒนาเทคนิคการขนถ่ายพลาสมิติเอ็นเอเข้าสู่เซลล์กลุ่มนี้ได้แบบจำเพาะก็จะจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในการให้วัคซีนชนิดดีเอ็นเอ โดยเซลล์ที่จะเป็นเป้าหมายหลักในกรณีนี้ คือ เซลล์นำเสนอแอนติเจน (Antigen Presenting Cell; APC) ซึ่งดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสโปรตีนแอนติเจนที่ต้องการทำให้สร้างภูมิคุ้มกันจะมีการแสดงออกใน APC และนำไปสู่การกระตุ้นทีลิมโฟไซต์แบบจำเพาะได้ต่อไปผ่านกระบวนการนำเสนอแอนติเจน (Khatiri และคณะ, 2008)

ที่ผ่านมาได้มีความพยายามพัฒนาอนุภาคนาโนจากโคโทซานที่มีการตัดแปรโครงสร้างทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพและความจำเพาะของอนุภาคในการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ เช่น การเติมหมู่ mannose เข้าสู่โคโทซานเพื่อทำให้อนุภาคโคโทซานจับแบบจำเพาะกับ mannose receptor ซึ่งมีการแสดงออกบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดขาวบางชนิดโดยเฉพาะเซลล์ในกลุ่ม APC ได้แก่ Dendritic cell (DC) และแมโครฟาจได้ ทำให้การนำดีเอ็นเอมีความจำเพาะต่อเซลล์นำเสนอแอนติเจนมากยิ่งขึ้นซึ่งคาดว่าจะนำไปสู่การเหนี่ยวนำการตอบสนองของ helper T cell ได้ดียิ่งขึ้น (Jiang และคณะ, 2008)

1.2 ออโตฟาจีและการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน

ออโตฟาจี (autophagy) เป็นกระบวนการสลายองค์ประกอบของเซลล์ที่พบทั่วไปในเซลล์ของร่างกาย ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการหมุนเวียนทรัพยากรภายในเซลล์กลับมาใช้ซ้ำเพื่อความอยู่รอดของเซลล์ ออโตฟาจียังมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน โดยการติดเชื้อภายในไซโทพลาสซึม เช่น ไวรัสหรือแบคทีเรียที่เจริญภายในเซลล์ ออโตฟาจีจะทำลายและย่อยแอนติเจนจากการหลอมรวมของออโตฟาโกโซม (autophagosome) และไลโซโซม (lysosome) แอนติเจนที่ได้จากการย่อยนี้ส่วนหนึ่งจะถูกส่งไปนำเสนอบน MHC class II ซึ่งจะกระตุ้นเฮลเปอร์ทีเซลล์โคลนที่จำเพาะต่อแอนติเจนได้ วิธีการนำเสนอแอนติเจนบน MHC class II นี้เป็นวิธีที่สำคัญสำหรับการนำเสนอแอนติเจนภายในเซลล์ขึ้นไปนำเสนอต่อเฮลเปอร์ทีลิมโฟไซต์ (Deretic และคณะ, 2009; Munz, 2009) วิธีสัญญาณในการเหนี่ยวนำให้เกิดออโตฟาจีนั้นได้มีการศึกษากันอย่างละเอียดในยีสต์ โดยพบว่าโปรตีน mTOR ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการออโตฟาจี โดยหาแอกติวิตีของ mTOR ถูกกด จะเกิดออโตฟาจีในเซลล์ได้ โดยได้มีรายงานถึงการเหนี่ยวนำออโตฟาจีให้เกิดใน DC ที่ได้รับแบคทีเรีย BCG ซึ่งเป็นวัคซีนสำหรับป้องกันโรควัณโรค ส่งผลให้วัคซีน BCG มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นโดยการเพิ่มการนำเสนอแอนติเจนต่อทีลิมโฟไซต์ (Jagannath และคณะ, 2009) ผลที่ได้จากการรายงานเหล่านี้แสดงว่านอกจากกระบวนการออโตฟาจีจะมีบทบาทสำคัญ

ในการควบคุมการเจริญของเชื้อก่อโรคร้ายในเซลล์ที่ติดเชื้อมาแล้ว ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพวัคซีนได้อีกด้วย

ดังนั้น ในโครงการวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ในการพัฒนาระบบขนถ่ายดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบบจำเพาะโดยจะมุ่งเป้าไปยังเซลล์นำเสนอแอนติเจนโดยใช้ออนุภาคนาโนที่เตรียมได้จากโคโทซานและพัฒนาให้ดีเอ็นเอพลาสมิดมีชิ้นยีนที่สามารถทำให้เซลล์เกิดกระบวนการออกฤทธิ์ได้ เพื่อเป็นระบบนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนต่อไป ในการดัดแปรโคโทซานเพื่อให้สามารถนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์นำเสนอแอนติเจนนั้น ได้ทดลองทำโดยการติด strepavidin บนโคโทซานเพื่อใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโมเลกุลเครื่องหมายบนผิวเซลล์นำเสนอแอนติเจนที่ติดฉลากด้วย biotin ในการนำอนุภาคไปยังเซลล์เป้าหมายและวิธีการดัดแปรเป็น Mannosylated chitosan เพื่อให้แมนโนสที่ติดอยู่บนโคโทซานไปจับกับ mannose receptor ที่มีการแสดงออกบนเซลล์นำเสนอแอนติเจนเป็นหลัก

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมดีเอ็นเอพลาสมิด

พลาสมิดที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้เป็นพลาสมิดต้นแบบ pMAX-GFP ที่มียีน *gfp* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ CMV (บริษัท Amaxa) ซึ่งสามารถตรวจติดตามการแสดงออกของโปรตีน GFP ได้โดยการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยใช้พลาสมิดนี้ในการทดลองหาภาวะเหมาะสมในการทรานสเฟกชัน พลาสมิดในการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดออกฤทธิ์เป็น พลาสมิด *prk5-myc-mTOR* (pmTOR; พลาสมิดควบคุม) และ *prk5-myc-mTOR kinase dead* (pmTORKD) (สร้างขึ้นโดย Dr. David M. Sabatini, MIT) ซึ่งพลาสมิดควบคุมมีชิ้นยีน mTOR ซึ่งติด myc tag และพลาสมิด pmTORKD เป็นพลาสมิดที่มีชิ้นยีน mTOR ที่มี point mutation ที่กรดอะมิโนสองตำแหน่งทำให้มีการสูญเสียแอกติวิตีของ mTOR ในการเป็นเอนไซม์ไคเนส (Addgene) พลาสมิดที่ใช้ในการตรวจติดตามการเกิดออกฤทธิ์คือ pEGFP-LC3 (อนุเคราะห์โดย Professor Tamotsu Yoshimori, Osaka University) ซึ่งมีชิ้นยีน LC3 หลอมรวมกับ GFP

2.2 การเตรียมอนุภาคนาโนโคโทซานและการศึกษาสมบัติทางกายภาพของอนุภาคที่ได้

ใช้โคโทซานที่ได้จากแกนปลาหมึกซึ่งมีมวลโมเลกุลในช่วง 32 kDa และมีเปอร์เซ็นต์ของการ deacetylation ในช่วง 80% (อนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร. ศุภสร วนิชเวชารุ่งเรือง ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) มาประกอบใช้ในการห่อหุ้มดีเอ็นเอพลาสมิดโดยละลายโคโทซานใน 0.1% acetic acid และนำไปประกอบเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอพลาสมิดโดยวิธี complex coacervation โดยทำการแปรค่าอัตราส่วนหมู่เอมีน (N) ของโคโทซานและหมู่ฟอสเฟต (P) ของดีเอ็นเอ (N/P ratio) และเมื่อทำได้อนุภาคโคโทซานที่ห่อหุ้มพลาสมิดดีเอ็นเอแล้วนำไปวัดขนาดของอนุภาคโดยการส่องด้วย scanning electron microscope และตรวจการห่อหุ้มพลาสมิดโดยวิธี agarose gel electrophoresis

เพื่อดัดแปรโคโทซานให้มี strepavidin จึงสังเคราะห์ chitosan-strepavidin hydrazide โดยเริ่มจากการเตรียม chitosan oxidation โดยเติม sodium meta-periodate และกวนที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยการ oxidation ทำให้ได้ periodate-oxidation chitosan จากนั้นเติม strepavidin hydrazide และกวนที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดย FITR spectroscopy และยืนยันการประกอบเป็นโคพอลิเมอร์โดย Mass spectrometry (MALDI-TOF) จากนั้นตรวจยืนยันการสังเคราะห์ chitosan strepavidin hydrazide โดยเครื่อง NMR และวิเคราะห์มวลโมเลกุลด้วยเครื่อง Mass spectrometer

2.3 การทรานสเฟกชันเข้าสู่เซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยใช้โคโทซาน คือ HEK293T (human embryonic kidney cell line) โดยเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติม 10% FBS และ Penicillin/streptomycin สำหรับเซลล์ไลน์ที่ใช้เป็นเซลล์แบบจำลองของเซลล์นำเสนอแอนติเจน คือ เซลล์ไลน์แมโครฟาจ RAW264.7

ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ที่เติม 10% fetal bovine serum (FBS), sodium pyruvate, HEPES และ Penicillin/streptomycin และเซลล์ไลน์ DC JAWSII (ATCC# CRL11904) ซึ่งเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ α -MEM ที่มีการเติม ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 5 ng/ml murine GM-CSF และ 20% FBS ในการทรานสเฟกชันชุดควบคุมนั้นใช้น้ำยาสำเร็จรูป FuGene6HD (Roche) ในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยดำเนินการตามคำแนะนำของผู้ผลิต

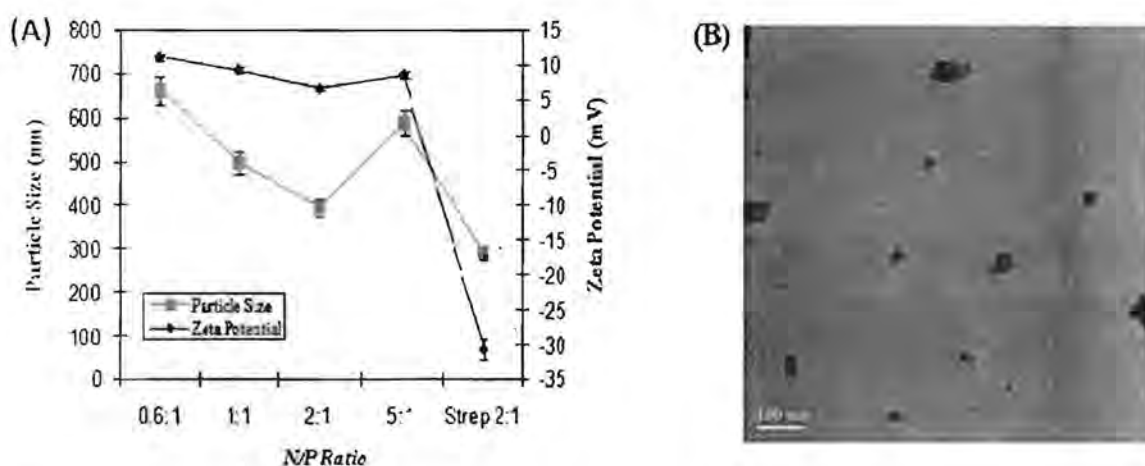
2.4 การศึกษาการเกิดออดีฟาจในเซลล์

เพื่อตรวจวิเคราะห์การเกิดออดีฟาจในเซลล์ จะใช้วิธีการตรวจหาระดับของ LC3 โดยวิธี Western blot และการตรวจติดตามลักษณะการเรืองแสงของ LC3-EGFP โดยส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง สำหรับการติดตามโดยวิธี Western blot นั้น นำ cell lysate ที่สกัดได้จากเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดในรูปแบบต่างๆ มาแยกโดย SDS-PAGE (12%) และโอนถ่ายโปรตีนลงบน PVDF membrane จากนั้นบ่ม membrane ด้วยแอนติบอดีต่อ LC3 (Sigma Aldrich) และตรวจสัญญาณด้วยวิธี chemiluminescence สำหรับวิธีการติดตามรูปแบบการเรืองแสงของ LC3-EGFP นั้น นำเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดในรูปแบบต่างๆ มาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงเพื่อตรวจหาการเกิดออดีฟาจ

3. ผลการวิจัย

3.1 ทาภาวะที่เหมาะสมในการสร้างห่อหุ้ม (encapsulation) ดีเอ็นเอโดยอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโคโทซาน

นำโคโทซานในการห่อหุ้มดีเอ็นเอพลาสมิด pMaxGFP เพื่อใช้ในการติดตามการขนถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ประกอบเป็นอนุภาคนาโนเพื่อห่อหุ้มพลาสมิดนั้นทำโดยวิธี complex coacervation โดยทำการแปรค่า N/P ratio และเมื่อได้อนุภาคโคโทซานที่ห่อหุ้มพลาสมิดดีเอ็นเอแล้วนำไปวัดขนาดของอนุภาคและค่า Zeta Potential โดยเครื่อง Nanosizer แสดงผลที่ได้ในรูปที่ 1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าขนาดของอนุภาคที่ได้อยู่ในช่วง 350–650 nm และมีค่า Zeta Potential ในช่วง +6 to +11 mV เมื่อนำอนุภาคนาโนที่เตรียมได้ที่ N/P ratio = 5:1 ไปส่องดูด้วยกล้อง Transmission Electron Microscopy (TEM) พบว่าอนุภาคที่ได้มีขนาดของอนุภาคในช่วงที่เล็กกว่า 100 nm ซึ่งแตกต่างจากค่าที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Nanosizer ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากขีดจำกัดของเครื่อง Nanosizer ที่ใช้ในการวัด

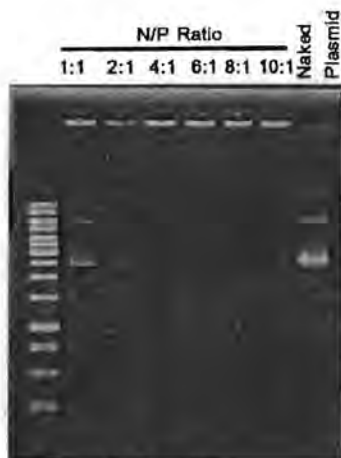


รูปที่ 1 สมบัติทางกายภาพของอนุภาคนาโนจากโคโทซานที่ห่อหุ้มพลาสมิดดีเอ็นเอ

(A) ขนาดและค่า Zeta Potential ของอนุภาคนาโนโคโทซานที่ห่อหุ้มพลาสมิด pMaxGFP ที่ N/P Ratio ต่างๆ ซึ่งวัดโดยเครื่อง Nanosizer

(B) อนุภาคนาโนโคโทซานที่ส่องด้วยกล้อง TEM

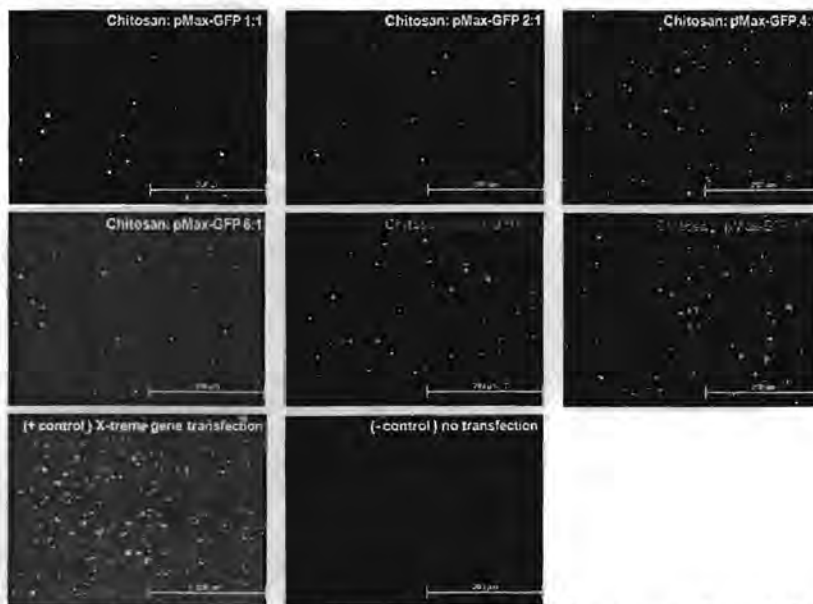
เพื่อตรวจยืนยันว่าอนุภาคนาโนจากโคโทซานที่ได้สามารถห่อหุ้มพลาสมิดดีเอ็นเอได้จริง จึงนำอนุภาคนาโนที่ได้มาวิเคราะห์โดย Agarose Gel Electrophoresis ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าในทุกค่า N/P ratio ที่ทดสอบสามารถห่อหุ้มพลาสมิดดีเอ็นเอได้โดยไม่พบว่ามีารรั่วไหลของพลาสมิดออกมาภายนอก เมื่อเปรียบเทียบกับ พลาสมิดเปลือยที่ไม่ได้ห่อหุ้ม จากผลที่ได้ทั้งหมดจึงสรุปได้ว่าอนุภาคนาโนที่เตรียมจากโคโทซานมีขนาดในระดับนาโนเมตรและสามารถห่อหุ้มดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ



รูปที่ 2 การห่อหุ้มพลาสมิดดีเอ็นเอโดยอนุภาคนาโนจากโคโทซาน

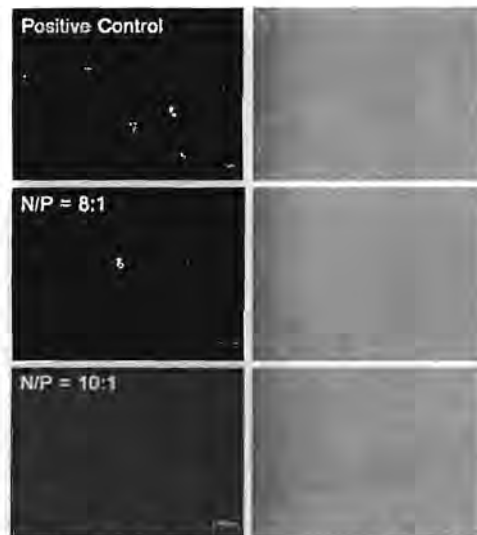
นำพลาสมิดเปลือย หรือพลาสมิดที่ห่อหุ้มโดยอนุภาคนาโนจากโคโทซานที่อัตราส่วน N/P ต่างๆ โดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยมี DNA marker อยู่ด้านซ้ายมือ

จากนั้นนำอนุภาคนาโนที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพการขนส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ไลน์มนุษย์ 293T พบว่าความสามารถในการนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์และทำให้มีการแสดงออกของโปรตีน GFP นั้นขึ้นกับอัตราส่วนของ N/P เมื่อเตรียมอนุภาค โดยพบว่าเซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP สูงสุดเมื่อใช้อนุภาคนาโนโคโทซานที่เตรียมที่อัตราส่วน N/P ที่ 8:1 และ 10:1 (รูปที่ 3) แต่จำนวนเซลล์ที่พบว่ามี การแสดงออกของ GFP ในชุดควบคุมที่ทำการทรานสเฟกชันโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป XTreme Gene Transfection (Roche) นั้นมีจำนวนมากที่สุด



รูปที่ 3 การแสดงออกของ GFP ในเซลล์ไลน์ 293T ที่ผ่านการทรานสเฟกชันด้วยอนุภาคนาโนจากโคโทซานที่ห่อหุ้ม พลาสมิดดีเอ็นเอ pMaxGFP ที่อัตราส่วน N/P ต่างๆ

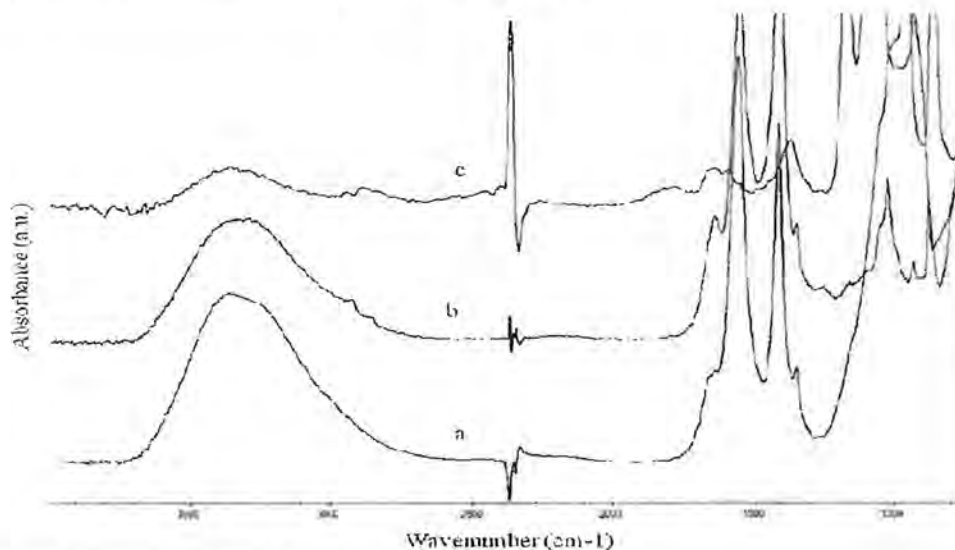
เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ไลน์แมโครฟาจ RAW264.7 พบว่าเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีการแสดงออก GFP นั้นอยู่ที่ 3.3% ที่อัตราส่วน N/P 8:1 ซึ่งต่ำกว่าน้ำยาสำเร็จรูป FuGENE HD ซึ่งอยู่ที่ประมาณ 20% (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 การแสดงออกของ GFP ในเซลล์ไลน์ RAW264.7 ที่ผ่านการทรานสเฟกชันด้วยอนุภาคนาโนจากโคโทซานที่ห่อหุ้มพลาสมิดดีเอ็นเอ pMaxGFP ที่อัตราส่วน N/P ต่างๆ

3.2 ดัดแปรอนุภาคนาโนโคโทซานให้ขนถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ Antigen Presenting Cell (APC) แบบจำเพาะและทดสอบการนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ในระดับ *in vitro*

เพื่อดัดแปลงโคโทซานให้สามารถใช้เป็นพาหะนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แบบจำเพาะได้ จึงสังเคราะห์ chitosan-streptavidin ผ่านการออกซิเดชันโดย sodium *meta*-periodate และการเติม streptavidin hydrazide และยืนยันผลโดยวิธี FTIR (รูปที่ 5) โดยพบว่าจะมีหมู่แอลดีไฮด์ (CHO) ที่ตำแหน่ง 1600-1700 และตรวจยืนยันการสังเคราะห์ chitosan-streptavidin โดยเครื่อง mass spectrometer (ไม่แสดงผล) ซึ่งพบว่าโคโทซานที่ติด streptavidin มีมวลโมเลกุลในช่วง 10920-10930 m/z ผลจากการวิเคราะห์ทางเคมีจึงยืนยันได้ว่าสามารถสังเคราะห์โคโทซานที่ติดกับ Streptavidin ได้



รูปที่ 5 ผลของการวิเคราะห์ FTIR ของโคโทซานดัดแปร (a) โคโทซาน

(b) ไคโทซานที่ผ่านการออกซิเดชันโดย sodium meta-periodate

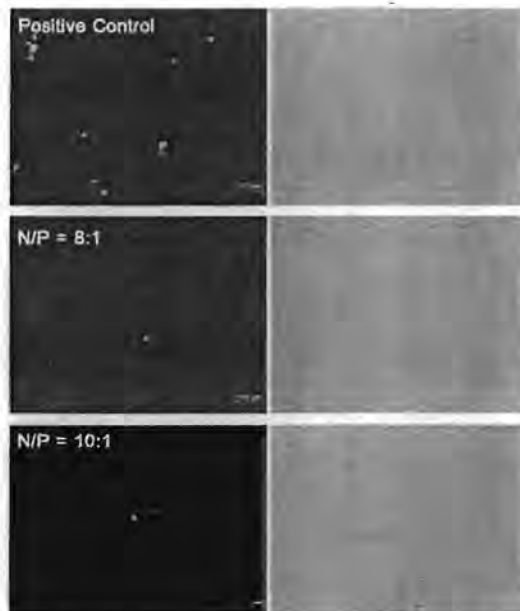
(c) ไคโทซานที่ติด Strepavidin

จากนั้นนำไคโทซานที่ตัดแปรไปห่อหุ้มพลาสมิด pMax-GFP ที่ภาวะต่างๆ โดยวิธี coacervation technique ดังที่ได้ระบุข้างต้น ปรากฏว่าเมื่อบ่มไคโทซาน-strepavidin และดีเอ็นเอพลาสมิดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที ตามวิธีที่ได้ใช้ในการห่อหุ้มพลาสมิดข้างต้น มีการรั่วไหลของดีเอ็นเอพลาสมิดอย่างชัดเจน (รูปที่ 6) จึงได้ปรับเปลี่ยนระยะเวลาการอุ่นไคโทซาน-strepavidin เป็น 20 นาที จึงพบว่าสามารถห่อหุ้มดีเอ็นเอพลาสมิดได้สมบูรณ์



รูปที่ 6 การห่อหุ้มดีเอ็นเอพลาสมิด pMAX-GFP ด้วยไคโทซานตัดแปร Chitosan Strepavidin

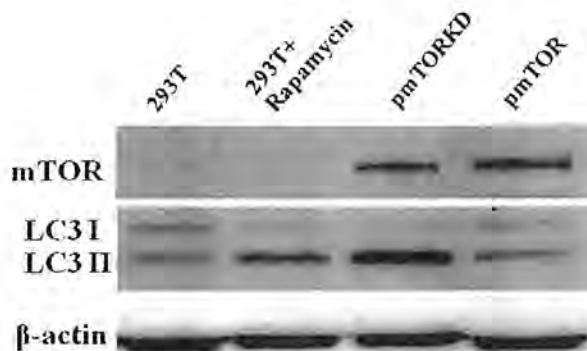
จากนั้นนำอนุภาคนาโนไคโทซานตัดแปรที่ห่อหุ้มพลาสมิดไปบ่มร่วมกับแอนติบอดี F4/80 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีการแสดงออกบนผิวเซลล์ของแมโครฟาจโดยที่แอนติบอดีมีการติดโมเลกุลไบโอติน เพื่อให้ประกอบเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแบบจำเพาะกับ strepavidin บนอนุภาคไคโทซานและนำไปใช้ในการทรานสเฟกชันเข้าสู่เซลล์ไลน์แมโครฟาจ RAW264.7 ซึ่งพบว่าการใช้อนุภาคไคโทซานที่ตัดแปรไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ได้ โดยสังเกตจากการที่เซลล์ที่มีการแสดงออกของ GFP ไม่ได้เพิ่มมากขึ้นจากการที่ใช้ไคโทซานที่ไม่ได้ตัดแปร (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 ผลการทรานสเฟกชันด้วยอนุภาคโคโทซานตัดแปรร Chitosan-streptavidin ที่ห่อหุ้มพลาสมิด pMAX-GFP เข้าสู่ RAW264.7

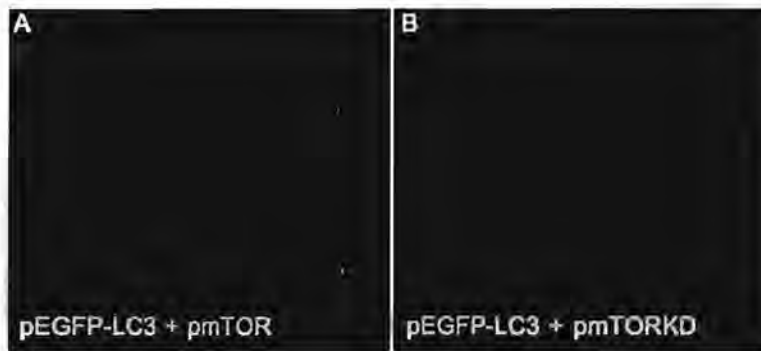
3.3 การสร้างระบบเหนี่ยวนำออโตฟาจีในเซลล์นำเสนอแอนติเจน

ออโตฟาจีเป็นกระบวนการสำคัญในการป้องกันและกำจัดเชื้อที่เจริญภายในเซลล์ ซึ่งนอกจากจะมีฤทธิ์ในการกำจัดเชื้อแล้วยังนำแอนติเจนที่ได้จากการย่อยไปนำเสนอต่อที่ลิแกนด์ผ่านโมเลกุล MHC ดังนั้น เพื่อพัฒนาระบบการให้ดีเอ็นเอวัคซีนที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดออโตฟาจีได้ จึงใช้พลาสมิดดีเอ็นเอ prk5-myc-mTOR (pmTOR; พลาสมิดควบคุม) และ prk5-myc-mTOR kinase dead (pmTORKD) ซึ่งพลาสมิดควบคุมมีขั้วขึ้น mTOR ชนิด wild type ซึ่งติด myc tag และพลาสมิด pmTORKD เป็นพลาสมิดที่มีขั้วขึ้น mTOR ที่มี point mutation ทำให้มีการสับเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 2537 และ 2364 ซึ่งมีรายงานว่าทำให้แอกติวิตีโคเนสของ mTOR สูญเสีย (Sarbassov และคณะ, 2005) ซึ่งมีรายงานจำนวนมากระบุว่าหากยับยั้งการทำงานของ mTOR หรือโมเลกุลที่เกี่ยวข้องจะทำให้เกิดออโตฟาจีในเซลล์ ดังนั้น เพื่อทดสอบความสามารถของพลาสมิดนี้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดออโตฟาจี จึงได้ทำการทรานสเฟกชันพลาสมิดเหล่านี้เข้าสู่เซลล์ไลน์แบบจำลอง 293T โดยใช้ยาน้ำสำหรับทรานสเฟกชันสำเร็จรูป XTreme Gene Transfection Reagent และตรวจติดตามการแสดงออกของโปรตีน mTOR และ mTOR kinase dead โดยใช้แอนติบอดีต่อ myc tag ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองในระดับที่เท่ากัน และเมื่อตรวจติดตามการเกิดออโตฟาจีโดยระดับของ LC3II พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ LC3II เฉพาะในเซลล์ที่ได้รับการทรานสเฟกชันโดยพลาสมิด mTOR kinase dead เท่านั้น โดยที่ในกลุ่มควบคุมบวกโดยใช้ Rapamycin สามารถทำให้เกิดการเพิ่มของ LC3II เช่นกัน ดังนั้น แสดงว่าโปรตีนที่ได้จากพลาสมิดนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดออโตฟาจีได้ (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 การเหนี่ยวนำให้เกิดออโตฟาจีโดยการทรานสเฟกชันพลาสมิด pmTOR หรือ pmTORKD ในเซลล์ 293T

เพื่อยืนยันการเหนี่ยวนำให้เกิดออโตฟาจีในเซลล์นำเสนอแอนติเจนจึงได้ทำการทรานสเฟกชันโดยนำพลาสมิดทั้งสองแบบเข้าไปในเซลล์ไลน์ JAWSII ซึ่งเป็น DC ที่ได้จากหนูโมซ โดยใช้น้ำยาสำหรับทรานสเฟกชันสำเร็จรูป XTreme Gene Transfection Reagent โดยทำการทรานสเฟกชันร่วมกับพลาสมิด pEGFP-LC3 เพื่อติดตามรูปแบบของ LC3 โดยได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าลักษณะการเรืองแสงของ EGFP-LC3 ที่กระจายไปทั่วเซลล์บ่งบอกว่าเซลล์ไม่มีการเกิดออโตฟาจี แต่หากการเรืองแสงอยู่ในรูปแบบของ punctate เป็นสัญญาณบ่งบอกว่าเซลล์กำลังเกิดออโตฟาจี ดังแสดงในรูปที่ 9 เซลล์ไลน์ JAWSII ที่ได้รับพลาสมิด mTORKD มีลักษณะของ GFP ที่เป็นแบบ punctate ที่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ pmTOR ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าพลาสมิด pmTORKD สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์นำเสนอแอนติเจนเกิดออโตฟาจีได้



รูปที่ 9 การตรวจหาการเกิดอโดโฟฟาจในเซลล์ไลน์ JAWSII ที่ได้รับพลาสมิด pmTOR หรือ pmTORKD ร่วมกับ pEGFP-LC3

4. อภิปราย/วิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เบื้องต้นเพื่อพัฒนาระบบการนำส่งดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์นำเสนอนแอนติเจนแบบจำเพาะเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีการให้วัคซีนชนิดดีเอ็นเอวัคซีน อีกทั้ง ยังพยายามนำระบบการเหนี่ยวนำให้เกิดอโดโฟฟาจมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนที่สามารถเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การนำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอ นั้น ใช้อนุภาคนาโนที่เตรียมได้โคโทซาน โดยได้หาภาวะที่เหมาะสมต่อการทรานสเฟกชันในเซลล์แบบจำลองก่อน ซึ่งพบว่าค่า N/P ratio ที่แตกต่างกันมีผลต่อการนำส่งดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์แม้ว่าความสามารถในการห่อหุ้มพลาสมิดจะค่อนข้างเท่ากัน ซึ่งบ่งชี้ว่าการห่อหุ้มพลาสมิดโดยโคโทซานแต่เพียงอย่างเดียวไม่ใช่ปัจจัยกำหนดความสามารถในการนำส่งดีเอ็นเอ ซึ่งคาดว่าจะมีปัจจัยทางสมบัติกายภาพของอนุภาค เช่น รูปร่างและขนาดของอนุภาค เป็นต้น ซึ่งในเบื้องต้นพบว่าขนาดของอนุภาคอยู่ในระดับไม่เกิน 500 นาโนเมตร แต่ยังไม่ได้ศึกษาสมบัติกายภาพอื่นๆ เช่น ค่า Zetapotential เป็นต้น ซึ่งอาจจะช่วยทำนายประสิทธิภาพในการนำส่งดีเอ็นเอพลาสมิดได้

เมื่อนำโคโทซานมาติด Streptavidin และตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีพบว่าสามารถติดได้ แต่เมื่อนำมาห่อหุ้มพลาสมิดพบว่าสมบัติในการห่อหุ้มเปลี่ยนแปลงไป โดยระยะเวลาที่ใช้ในการอุ่นโคโทซานและพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อนำมาผ่านการ complex coacervation นั้นต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้น (จาก 5 นาทีเป็น 20 นาที) อีกทั้งสัดส่วนของ N/P ที่สามารถใช้ในการนำส่งพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ HEK293T ก็เปลี่ยนแปลง โดยที่ความสามารถในการนำส่งพลาสมิดไม่ดีขึ้น เมื่อนำโคโทซานตัดแปรนี้มาบ่มร่วมกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์แมโครฟาจ (F4/80) ที่มีการเชื่อมติดไปอดีตและนำไปบ่มร่วมกับเซลล์ พบว่าไม่ทำให้ประสิทธิภาพในการนำส่งดีขึ้นแต่อย่างใด ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปของอนุภาค ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไปในรายละเอียด เช่น ขนาดของอนุภาค ค่า Zetapotential และการจับกันของแอนติบอดีและแอนติเจน ซึ่งจะช่วยให้สามารถอธิบายสาเหตุได้และอาจนำไปสู่การปรับปรุงระบบการนำส่งแบบจำเพาะนี้ต่อไปในอนาคตได้ ซึ่งที่ผ่านยังไม่มีการรายงานถึงการใช้ระบบ streptavidin-biotin กับโคโทซานมาก่อนเพื่อนำส่งอนุภาคโคโทซานเข้าสู่เซลล์แบบจำเพาะ ซึ่งการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ถือเป็นก้าวแรกในการนำไปสู่การประยุกต์ใช้ระบบดังกล่าวได้

สำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดอโดโฟฟาจนั้น ผู้วิจัยสังเกตเห็นว่ากระบวนการนี้ที่เกิดภายในไซโตพลาสซึม น่าจะช่วยให้การย่อยและนำเสนอนแอนติเจนที่มีการสังเคราะห์ภายในเซลล์ (endogeneous antigen) มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยเฉพาะเพื่อนำไปสู่การกระตุ้น helper T cells ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำการตอบสนองภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพ โดยผู้วิจัยได้ใช้พลาสมิดที่เตรียมมาก่อนหน้านี้ซึ่งมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 2 ตัว ทำให้การทำงานของ mTOR ซึ่งเป็นโคเนสที่สำคัญในการกระบวนการต้นน้ำที่เหนี่ยวนำให้เกิดอโดโฟฟาจสูญเสียแอกทิวิตี (mTORKD) แต่ยังไม่มีการรายงานว่าพลาสมิดดังกล่าวสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดอโดโฟฟาจได้หรือไม่ ซึ่งผู้วิจัยได้นำพลาสมิดนี้และพลาสมิดชุดควบคุมที่มี mTOR wild type เข้าสู่เซลล์แบบจำลอง HEK293T และตรวจดูการเกิดอโดโฟฟาจจากการติดตามการเพิ่มขึ้นของ LC3II ซึ่งพบว่าพลาสมิด mTORKD นี้สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดอโดโฟฟาจได้ในระดับเทียบเท่ากับการใช้ยากด mTOR อีกทั้ง เมื่อนำเข้าสู่เซลล์ไลน์

JAWSII ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์เดนไดรติกของหนูโมซ พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดออโตฟาจีเช่นเดียวกัน ดังนั้น การใช้พลาสมิดนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดออโตฟาจีได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในงานวิจัยนี้ได้พยายามพัฒนาระบบนำส่งดีเอ็นเอพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบบจำเพาะโดยใช้ streptavidin chitosan และแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ซึ่งยังไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำส่งดีเอ็นเอแบบจำเพาะได้ โดยยังจำเป็นต้องมีการหาภาวะที่เหมาะสมต่อไป และได้พัฒนาระบบการเหนี่ยวนำให้เกิดออโตฟาจีภายในเซลล์โดยใช้พลาสมิดที่มีชิ้นยีน mTORKD

หากสามารถผนวกองค์ความรู้ที่ได้ในงานวิจัยนี้และพัฒนาต่อยอดต่อไป อาจนำไปสู่การได้ระบบนำส่งดีเอ็นเอวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันอย่างมีประสิทธิภาพต่อไปได้ โดยอาจใช้วิธีการอื่นๆ ในการตัดแปรอนุภาคโคโทซาน ให้มีความจำเพาะต่อเซลล์นำเสนอแอนติเจนได้ เช่น การติด mannose บนโคโทซานเพื่อให้ไปจับกับ mannose receptor ที่มีการแสดงออกบนผิวเซลล์นำเสนอแอนติเจน เป็นต้น

บรรณานุกรม

- Bozkir, A., and Saka, O.M. (2004). Chitosan-DNA nanoparticles: effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency. *J Drug Target* 12, 281-288.
- Corsi, K., Chellat, F., Yahia, L., and Fernandes, J.C. (2003). Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 24, 1255-1264.
- Deretic, V., Delgado, M., Vergne, I., Master, S., De Haro, S., Ponpuak, M., and Singh, S., (2009). Autophagy in immunity against mycobacterium tuberculosis: a model system to dissect immunological roles of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 335, 169-188.
- Ishii, T., Okahata, Y., and Sato, T. (2001). Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta* 1514, 51-64.
- Jagannath, C., Lindsey, D.R., Dhandayuthapani, S., Xu, Y., Hunter, R.L. Jr., and Eissa, N.T. (2009) Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells, *Nat Med* 15, 267-276.
- Jiang, H.L., Kim, Y.K., Arote, R., Nah, J.W., Cho, M.H., Choi, Y.J., Akaike, T., and Cho, C.S. (2007). Chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier. *J Control Release* 117, 273-280.
- Jiang, H.L., Kang, M.L., Quan, J.S., Kang, S.G., Akaike, T., Yoo, H.S., Cho, C.S. (2008). The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization. *Biomaterials* 29, 1931-1939.
- Khatri, K., Goyal, A.K., Gupta, P.N., Mishra, N., and Vyas, S.P. (2008). Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B. *Int J Pharm* 354, 235-241.
- Li, X.W., Lee, D.K., Chan, A.S., and Alpar, H.O. (2003). Sustained expression in mammalian cells with DNA complexed with chitosan nanoparticles. *Biochim Biophys Acta* 1630, 7-18.
- MacLaughlin, F.C., Mumper, R.J., Wang, J., Tagliaferri, J.M., Gill, I., Hinchcliffe, M., and Rolland, A.P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *J Control Release* 56, 259-272.
- Mansouri, S., Cuie, Y., Winnik, F., Shi, Q., Lavigne, P., Benderdour, M., Beaumont, E., and Fernandes, J.C. (2006). Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. *Biomaterials* 27, 2060-2065.
- Mao, H.Q., Roy, K., Troung-Le, V.L., Janes, K.A., Lin, K.Y., Wang, Y., August, J.T., and Leong, K.W. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release* 70, 399-421.
- Monhaphol, T., Yibchok-Anun, S., Banlunara, W., Wittayasuporn, M., Palaga, T., Asawanonda, P., and Wanichweacharunguang, S. (2008). Cytotoxicity, acute oral toxicity, and skin irritation of 2-ethylhexyl-2,4,5-trimethoxycinnamate and di(2-ethylhexyl)-2,4,5-trimethoxybenzalmalonate. *Drug Chem Toxicol* 31, 289-301.
- Munz, C. (2009). Enhancing immunity through autophagy. *Annu Rev Immunol* 27, 423-449.

- Palaga, T., Buranaruk, C., Rengpipat, S., Fauq, A.H., Golde, T.E., Kaufmann, S.H., and Osborne, B.A. (2008). Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur J Immunol* 38, 174-183.
- Satoh, T., Kakimoto, S., Kano, H., Nakatani, M., Shinkai, S., and Nagasaki, T. (2007). In vitro gene delivery to HepG2 cells using galactosylated 6-amino-6-deoxychitosan as a DNA carrier. *Carbohydr Res* 342, 1427-1433.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol.* 27, 1296-302.

ประวัตินักวิจัย

(ภาษาไทย) นายธนภัทร ปาลกะ ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์

(ภาษาอังกฤษ) TANAPAT PALAGA

หน่วยงานสังกัด ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

โทรศัพท์ 02-2185070 โทรสาร 02-2527576 E-mail tanapat.p@chula.ac.th

ที่อยู่ปัจจุบัน 100/152 ซอย 7/2 หมู่บ้านชัยพฤกษ์ ถนนคุ้มเกล้า เขตลาดกระบัง กทม. 10520

โทรศัพท์ 02-9148265

1.1 ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
Tokyo Institute of Technology	B. Eng.	Bioengineering	2534
Tokyo Institute of Technology	M. Eng.	Biotechnology	2536
University of Massachusetts at Amherst	Ph.D.	Microbiology/Immunology	2545

1.2 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติที่อยู่ในฐานข้อมูล ISI

- 1) Wongchana, W, and Palaga, T. (2011) Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. *Cell. Mol. Immunol.* (accepted) (IF=2.016)
- 2) Ravangpai, W, Sommit, D, Teerawatananond, T, Sinpranee, N, Palaga T, Pengpreecha, S, Muangsin, N, Pudhom, K. (2011) Limonoids from seeds of Thai *Xylocarpus moluccensis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 4485-4489. (IF=2.661)
- 3) Kuncharin, Y, Sangphech, N, Kueanjinda, P, Bhattarakosol, P, and Palaga, T. (2011) MAML1 regulates cell viability via the NF-kB pathway in cervical cancer cell lines. *Exp. Cell Res.* 317, 1830-1840. (IF=3.589)
- 4) Puwipirom, H, Hirankarn, N, Sodsai, P, Avihingsanon, Y, Wongpiyabovorn, J, and Palaga, T. (2010) Increased interleukin-23 receptor+ T cells in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 12, R215. (IF=4.25)
- 5) Kammarnjesadakul, P, Palaga, T, Sritunyalucksana, K, Mendoza, L, Krajaejun, T, Vanittanakom, N, Tongchusak, S, Denduangboripant, J, and Chindamporn, A. (2010) Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COXII) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). *Med. Mycol.* 49, 289-295. (IF = 2.133)
- 6) Wittayasuporn, M, Rengpipat, S, Palaga, T, Asawanonda, P, Anumansirikul, N, and Wanichwecharunguang, SP. (2009) Chitosan derivative nanocarrier: Safety evaluation, antibacterial property and ascorbyl palmitate encapsulation. *J. Microencapsul.* 27, 218-225. (IF=1.314)
- 7) Pimpitak, U, Putong, S, Komolpis, K, Petsom, A, and Palaga, T. (2009) Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples. *Food Chem.* 116, 785-791. (IF=2.696)
- 8) Palaga, T. (2009) Update on the Immunology of Tuberculosis. *Siriraj Med. J.* 61, 37-41.

- 9) Rengpipat, S, Wongtangprasert, N, and Palaga, T. (2008) The use of green fluorescent protein as a marker for monitoring a probiotic *Bacillus* S11 in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquacult. Nutr.*, 15, 297-305. (IF=1.398)
- 10) Sodsai, P, Avihingsanon, Y, Hirankarn, N, and Palaga, T. (2008). Defects in Notch1 upregulation upon activation of T cells from patients with systemic lupus erythematosus are related to lupus disease activity. *Lupus* 17, 645-653. (IF=2.244)
- 11) Suwanjune, S, Wongchana, W, and Palaga, T. (2008) Inhibition of gamma-secretase affects proliferation of leukemia and hepatoma cell lines through Notch signaling. *Anticancer Drug* 19, 477-486. (IF=2.358)
- 12) Palaga, T, Buranaruk, C, Rengpipat, R, Fauq, AH, Golde, TE, Kaufmann, SHE, and Osborne, BA. (2008). Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur. J. Immunol.* 38, 174-183. (IF=4.865)
- 13) Monhaphol, T, Yibchok-anun, S, Banlunara, W, Wittayasuporn, M, Palaga, T, Asawanonda, P and Wanichweacharunguang, S. (2008) Cytotoxicity, acute oral toxicity and skin irritation of 2-ethylhexyl-2,4,5 trimethoxycinnamate and di(2-ethylhexyl)-2,4,5 trimethoxybenzalmalonate. *Drug. Chem. Toxicol.* 31, 289-301. (IF=1.239)
- 14) Minter, LM, Turley, DM, Das, P, Shin, HM, Joshi, I, Lawlor, RG, Cho, OH, Palaga, T, Gottipati, S., Telfer, JC, Kostura, L, Fauq, AH, Simpson, K, Such, KA, Miele, L, Golde, TE, Miller, SD, and Osborne BA. (2005). Inhibition of γ -secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat. Immunol.* 6, 680-688. (IF=27.596)
- 15) Palaga, T. (2004). Nuclear Hormone Receptor, Apoptosis and Notch: A lesson from an immune system. *Sci. Res. Chula.* 29, 129-144.
- 16) Palaga, T, Kataoka, T, and Nagai, K. (2004). Extracellular ATP inhibits apoptosis and maintains cell viability by inducing autocrine production of interleukin 4. *Int. Immunopharmacol.* 4, 953-961. (IF=2.157)
- 17) Palaga, T, Miele, L, Golde, TE and Osborne, BA. (2003). TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN- γ production in peripheral T cells. *J. Immunol.* 171, 3019-3024. (IF=6.239)
- 18) Palaga, T, and Osborne, BA. (2002). The 3D's of apoptosis: death, degradation and DIAPs. *Nature Cell Biol.* 4, E149-151. (IF=17.623)
- 19) Palaga, T, Kataoka, T, Woo, J-T, and Nagai, K. (1996). Suppression of apoptotic cell death of IL-3-dependent cell lines by ER/SR Ca²⁺-ATPase inhibitors upon IL-3 deprivation. *Exp. Cell Res.* 228, 92-97. (IF=3.777)

1.3 ทุนและรางวัลที่ได้รับ

ทุนวิจัย

1. ทุนอาจารย์ใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (2545-2546)
2. ทุนวิจัยมูลนิธิกระจกเงา (The Asahi Glass Foundation) (2546-2547)
3. ทุนวิจัยจาก Third World Academy of Sciences (2547-2548)
4. ทุนพัฒนาศักยภาพของอาจารย์รุ่นใหม่ (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย) (2548-2550)
5. ทุนเพิ่มขีดความสามารถด้านการวิจัยของอาจารย์รุ่นกลาง (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย) (2552-2555)

6. ทุนวิจัยจาก International Science Foundation, 2552-2553
7. ทุนวิจัย Grand Challenges Explorations จาก The Bill & Melinda Gates Foundation, 2552-2553

รางวัล

1. Junior Faculty Travel Award (The American Association of Immunologists) (2547)
2. นักวิจัยรุ่นใหม่ดีเด่นสาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2549)
3. Global Health Travel Award (The Bill & Melinda Gates Foundation) (2550, 2552)
4. รางวัลจูลงมกุฏ Science Echo Award คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2552

ขอรับรองว่าข้อความที่ให้ไว้เป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อ..... *อนาถิร ปาลกะ*

(รองศาสตราจารย์ ดร. อนาถิร ปาลกะ)

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

1. บทความในวารสารวิชาการนานาชาติ

- Wongchana, W, and Palaga, T. (2011) Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. Cell. Mol. Immunol. (accepted) (IF=2.016)

2. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการในประเทศ

2.1 วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

-Palaga, T and Meerak, J. (2011) Current Research on Tuberculosis Vaccine เวชศาสตร์ร่วมสมัย การประชุมวิชาการ Joint Conference in Medical Science 2011: Chula-Rama-Siriraj (JCMS 2011) วันที่ 15-18 มิถุนายน 2554