

การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ทางกายภาพระหว่างโปรตีน Tripatite Motif-Containing 21  
(TRIM21) และ Fas-Associated Death Domain (FADD)  
Analysis of Physical Interaction between Tripatite Motif-Containing 21 (TRIM21) and  
Fas-Associated Death Domain (FADD) Proteins

นุรียา วาจิ

Nureeya Waji

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษิตตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biochemistry

Prince of Songkla University

2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**ชื่อวิทยานิพนธ์** การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ทางกายภาพระหว่างโปรตีน Tripartite Motif-Containing 21 (TRIM21) และ Fas-Associated Death Domain (FADD)

**ผู้เขียน** นางสาวนุรียา วาจิ

**สาขาวิชา** ชีวเคมี

---

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดชา เสริมวิทย์วงศ์)

**คณะกรรมการสอบ**

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณ์ น้อยผา)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดชา เสริมวิทย์วงศ์)

.....กรรมการ

(ดร.นัฐ ตันศิลา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วน  
เกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เดชา เสริมวิทยวงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวนุริยา วาจิ)

นักศึกษา

**ชื่อวิทยานิพนธ์** การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ทางกายภาพระหว่างโปรตีน Tripartite Motif-Containing 21 (TRIM21) และ Fas-Associated Death Domain (FADD)

**ผู้เขียน** นางสาวนุรียา วาจิ

**สาขาวิชา** ชีวเคมี

**ปีการศึกษา** 2557

### บทคัดย่อ

Fas-associated death domain (FADD) และ Tripartite motif-containing 21 (TRIM21) โปรตีนที่ทำหน้าที่ในหลายๆ ส่วนของเซลล์ทั้งการเกิด apoptosis, proliferation, หรือในกระบวนการของ innate immunity และพบว่า FADD ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ TRIM21 ในการควบคุมการลดระดับการทำงานของวิถีการสร้าง interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการต่อต้านการติดเชื้อไวรัสของเซลล์ได้ โดยโครงสร้างของ FADD ประกอบด้วย DED และ DD domain ส่วน TRIM21 คือ Ring, B-box, coiled-coil (CC) และ B30.2 domain ถึงแม้จะมีการพบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองแล้ว แต่ก็ยังขาดองค์ความรู้ในเรื่องกระบวนการเกิดหรือรูปแบบของปฏิสัมพันธ์นั้นว่าเกิดได้อย่างไร เช่น B30.2 domain ซึ่งเป็นโดเมนที่พบได้ในโปรตีนหลายชนิด และถูกระบุว่ามีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเกิดปฏิสัมพันธ์นั้นจำเป็นและเพียงพอต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์นี้หรือไม่ ในการทดลองครั้งนี้ทำทั้ง *in vitro* และ *ex vivo* ผลการทดลองจากแบคทีเรียพบว่า FADD และ TRIM21 มีความสามารถในการละลายต่ำ ในขณะที่ B30.2 domain ของ TRIM21 ละลายได้ แต่ต้องใช้ในการ induce ที่อุณหภูมิต่ำ และความเข้มข้นของ IPTG ต่ำ หรือการ coexpression กับโปรตีนพีเลี้ยง ถึงแม้ว่าระบบของแบคทีเรียสามารถใช้ในการศึกษาขนาดและโครงสร้างได้ แต่ไม่เหมาะกับการศึกษาการเกิดปฏิสัมพันธ์ เนื่องจากผลการทดสอบด้วย pull down assay ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนเส้นเต็ม FADD (wild type) หรือ F25Y FADD mutant กับ TRIM21 อาจเป็นเพราะปฏิสัมพันธ์นี้จำเป็นต้องอาศัยการเกิด post translational modification บางประการของโปรตีนทั้งสองชนิด ส่วนการทดลองใน tissue culture ด้วย HEK 293T cells พบการแสดงออกของ wild type FADD และ TRIM21 ขนาดต่างๆ กันที่อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ จึงใช้วิธี Co-immunoprecipitation พบปฏิสัมพันธ์ของ hFADHisFlag กับทั้ง HAhTRIM21 และ HAhTRIM21 $\Delta$ 3 (131-475) ซึ่งรีคอมบิแนนท์ทั้งสองมีส่วนของ CC อยู่หน้า B30.2 domain ส่วน HAhTRIM21 $\Delta$ 1 (287-475), HAhTRIM21 $\Delta$ 4 (131-275) และ HAhTRIM21 $\Delta$ 5 (183-475) ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน FADD ดังนั้น B30.2 domain จึงจำเป็นแต่ไม่เพียงพอต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง ต้องมี CC domain ที่ครบทั้ง

โดเมนด้วย นอกจากนี้ผู้วิจัยได้สร้างโปรตีนลูกผสม HAYCChTRIM21 $\Delta$ 1 ซึ่งใช้ส่วนของ CC domain จากยีสต์ โปรตีนลูกผสมดังกล่าวไม่สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับ hFADD ได้ ดังนั้น การศึกษาหน้าที่ของ CC domain และ การเกิด post-translational modification จึงเป็นที่ น่าสนใจในการศึกษาต่อไป

**Thesis Title**            Analysis of Physical Interaction between Tripartite Motif-Containing  
21 (TRIM21) and Fas-Associated Death Domain (FADD) Proteins

**Author**                    Miss Nureeya Waji

**Major Programs**        Biochemistry

**Academic Year**         2014

### **Abstract**

Fas-associated death domain (FADD) and Tripartite motif-containing 21 (TRIM21) play multiple functions, including apoptosis, proliferation, and innate immunity. Previously, it was shown that FADD enhances TRIM21 function to negatively down regulate the interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) pathway. Although the physical association between FADD and TRIM21 has been studied, a complete picture of how they interact requires further investigation. For example, it is not known whether the B30.2 domain of TRIM21 is sufficient for interaction with FADD. In this report, the physical association between FADD and TRIM21 was characterized by using both bacterial and mammalian expression systems. The bacterial system result showed that FADD and TRIM21 were mostly insoluble when expressed in bacteria. Expression of the B30.2 domain of TRIM21 in bacteria required a low temperature and a low concentration of IPTG or coexpression with chaperones. While the bacterial system is suitable for structural studies of FADD and TRIM21, it is not the best system for studying their interaction. The pull down assay results did not show any interaction between FADD or F25Y FADD and TRIM21. Perhaps, some post-translational modifications might play a role in such interaction. Thus, the mammalian expression system was used to analyze the interaction. And for result of tissue culture with HEK293T cells, the expression FADD and TRIM21 were partial soluble protein. Co-immunoprecipitation technique showed the interaction between FADD and HA $\Delta$ TRIM21 or HA $\Delta$ TRIM21 $\Delta$ 3 (131-475), which contains the coiled-coil (CC) and B30.2 domains, HA $\Delta$ TRIM21 $\Delta$ 1 (287-475), HA $\Delta$ TRIM21 $\Delta$ 4 (131-275) และ HA $\Delta$ TRIM21 $\Delta$ 5 (183-475) were unable to interact with FADD. These results suggest that B30.2 domain is essential but not sufficient to interact with FADD. Both CC and B30.2 domains are sufficient for interaction with FADD. To test whether TRIM21 dimerization,

which is created by the CC domain, is needed for such interactions, a chimeric HAYCChTRIM21 $\Delta$ 1 protein is created. In this construct, the CC domain was replaced with the CC domain from yeast GCN4 protein. The results showed that HAYCchTRIM21 was unable to interact with FADD. Thus, the roles of CC domain and post-translational modification in interaction with FADD require further investigation.

## สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	(11)
รายการตาราง	(12)
รายการภาพประกอบ	(13)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(16)
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 การตรวจเอกสาร	2
1.3 วัตถุประสงค์	18
2. วิธีการวิจัย	
2.1 รายการสารเคมี	19
2.2 วัสดุอุปกรณ์	23
2.3 วิธีการทดลอง	24
3. ผลการทดลอง	51
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	81
5. สรุปผลการทดลอง	87
เอกสารอ้างอิง	88
ภาคผนวก	99
รายการนำเสนอผลงาน	102
ประวัติผู้เขียน	108



## รายการตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 แสดงการทำ double digestion	25
2.2 แสดงไพรเมอร์พร้อมตำแหน่งที่ใช้ในการทดลอง	26
2.3 แสดงรายการพลาสติกที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้	35
2.4 ตารางแสดงความเหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการใช้ Lipofectamine™2000	47
2.5 ตารางแสดงความเหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการใช้ TransIT®-LT1 Transfection	48

## รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1.1 แสดงการเปรียบเทียบโดเมนนอร์คซ์และตำแหน่งที่เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตของ FADD ระหว่างสิ่งมีชีวิต 7 สปีชีส์	3
1.2 ภาพแสดงโครงสร้างของ FADD ในมนุษย์	3
1.3 แสดงโครงสร้าง DED domain ของ FADD	4
1.4 แสดงโครงสร้าง DD domain ของ FADD	6
1.5 แสดงภาพประกอบปฏิสัมพันธ์ของ death-inducing signaling complex (DISC) ระหว่าง Fas, FADD และ Procaspase 8	7
1.6 แสดงโครงสร้างของ TRIM21 พร้อมขอบเขตของแต่ละโดเมน	13
2.1 ภาพแสดงสปีนคอลัมน์ที่เตรียมขึ้นจากหลอดทดลองขนาด 0.5 และ 1.5 ml	26
2.2 ภาพแสดงคอลัมน์ Sephadex G-25 จาก micropipette tip ขนาด 1 และ 5 ml ในหลอดทดลองขนาด 15 ml	31
2.3 แสดงโครงสร้างของ insert รวมทั้ง expression และ co-expression plasmid ที่ใช้ในการทดลองในแบคทีเรีย	34
2.4 แสดงตัวอย่างโครงสร้างของ insert และ plasmid ที่ใช้สำหรับการทดลองใน tissue culture	34
3.1 ผลการแสดงออกของยีน และความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475)	53
3.2 ความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อการละลาย HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475)	54
3.3 การกระตุ้นเซลล์ด้วย 0.02 mM IPTG สร้างรีคอมบิแนนท์ HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ที่มีคุณสมบัติของการละลายมากกว่าการกระตุ้นด้วย 0.2 mM IPTG	55
3.4 ผลการแสดงออกของยีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) และการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนร่วมกับโปรตีนพีเอช	57
3.5 แสดงผลการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ภายใต้ระบบ SPM ที่ 37°C	69
3.6 ผลการแสดงออกของยีน และความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475)	60

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
3.7 รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ที่สังเคราะห์ร่วมกับโปรตีนพีเลี้ยง มีการแสดงออกของยีน ความสามารถในการละลาย และการทำบริสุทธิ์โปรตีนได้มากขึ้น ด้วยการเลี้ยงที่ 18°C	61
3.8 ผลการสังเคราะห์ hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2 (F25Y) และความสามารถในการละลายที่มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ hFADD $\Delta$ 1HisSTRx1(wt) ทำให้ทำบริสุทธิ์โปรตีนได้มาก	63
3.9 hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์กับ HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) โดยแสดงผลการทำ <i>Strep</i> -Tactin pull down assay	64
3.10 hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์กับ HishTRIM21 $\Delta$ 1 ด้วยการทดสอบด้วย <i>Strep</i> -Tactin pull down assay ทั้งโปรตีนที่อยู่ในรูปที่บริสุทธิ์และ crude extract	66
3.11 ผลการแสดงออกของยีน และความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADDHisSTR	68
3.12 HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ hFADDHisSTR(wt) จากการทดสอบด้วย <i>Strep</i> -Tactin pull down assay จากโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์	70
3.13 co-expression โปรตีน hFADDSTR(wt) และ HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) จากเซลล์เจ้าบ้านเดียวกันไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันได้	72
3.14 ผลการแสดงออกของยีน และความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21	73
3.15 hFADDHisSTR(wt) ไม่สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับ HishTRIM21(wt) จากการแสดงผลการทำ pull down assay ด้วย <i>Strep</i> -Tactin resin	74
3.16 ภาพแสดงผลการสังเคราะห์โปรตีน hFADD และ hTRIM21 ในเซลล์เริ่มต้นขนาด 500,000 และ 900,000 เซลล์	75
3.17 GSThTRIM21 ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ hFADDHisFlag ได้ โดยแสดงผลการทำ pull down assay ด้วย GST pull down assay	76
3.18 ทั้ง GSThTRIM21 และ hTRIM21 ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ hFADDSTR ได้ ใน <i>Strep</i> -tactin pull down assay	77

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
3.19 hFADDHisflag สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ HAhTRIM21 และ HAhTRIM21 $\Delta$ 3(131-475) ได้ ด้วยการทำให้ co-immunoprecipitation	79
4.1 ภาพแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ CC domain	84
4.2 ภาพแสดงโครงสร้างของ B30.2 domain จาก GUSTAVAS ซึ่งมีลำดับโปรตีนบางส่วน เหมือนกับ B30.2 domain	85
4.3 ภาพแสดงโครงสร้างการเรียงตัวของ rhTRIM5 $\alpha$ ระหว่างการเกิดปฏิสัมพันธ์ กับ HIV capsid	86

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

สิ่งมีชีวิตชั้นสูงมีความซับซ้อนของการทำหน้าที่และการควบคุมไม่ว่าจะเป็นการควบคุมในระดับยีน อาร์เอ็นเอ การสร้างโปรตีน หรือแม้กระทั่งการควบคุมในระดับที่เหนือขึ้นไป อันเกิดจากการส่งต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันของโปรตีนหรือโมเลกุลต่าง ๆ ภายในร่างกาย ที่อาจส่งผลให้การแสดงออกของโปรตีนหรือโมเลกุลในร่างกายทำงานแตกต่างกันไปตามช่วงเวลาของชีวิต เช่น Fas-associated death domain (FADD) ซึ่งเป็นโปรตีนที่รู้จักกันดีว่าทำงานในระบบการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยเป็นโปรตีนในไซโตซอลที่สามารถจับกับ Fas ซึ่งเป็นตัวรับสัญญาณบนผิวเซลล์ จากนั้น FADD จะส่งต่อสัญญาณนี้เพื่อให้เซลล์เปลี่ยนแปลงสถานะที่เข้าสู่การตายต่อไป แต่การค้นพบครั้งต่อ ๆ มา นักวิทยาศาสตร์พบว่า FADD เป็นโมเลกุลที่สามารถทำหน้าที่ได้ซับซ้อนกว่านั้นขึ้นอยู่กับตำแหน่งของโปรตีนหรือกระบวนการเกิด phosphorylation ดังนั้นตัว FADD เองก่อให้เกิดหน้าที่ๆ หลากหลาย เช่น apoptosis, cell cycle หรือการเกิด proliferation เป็นต้น ซึ่งจะได้มีการกล่าวถึงรายละเอียดต่าง ๆ ต่อไป

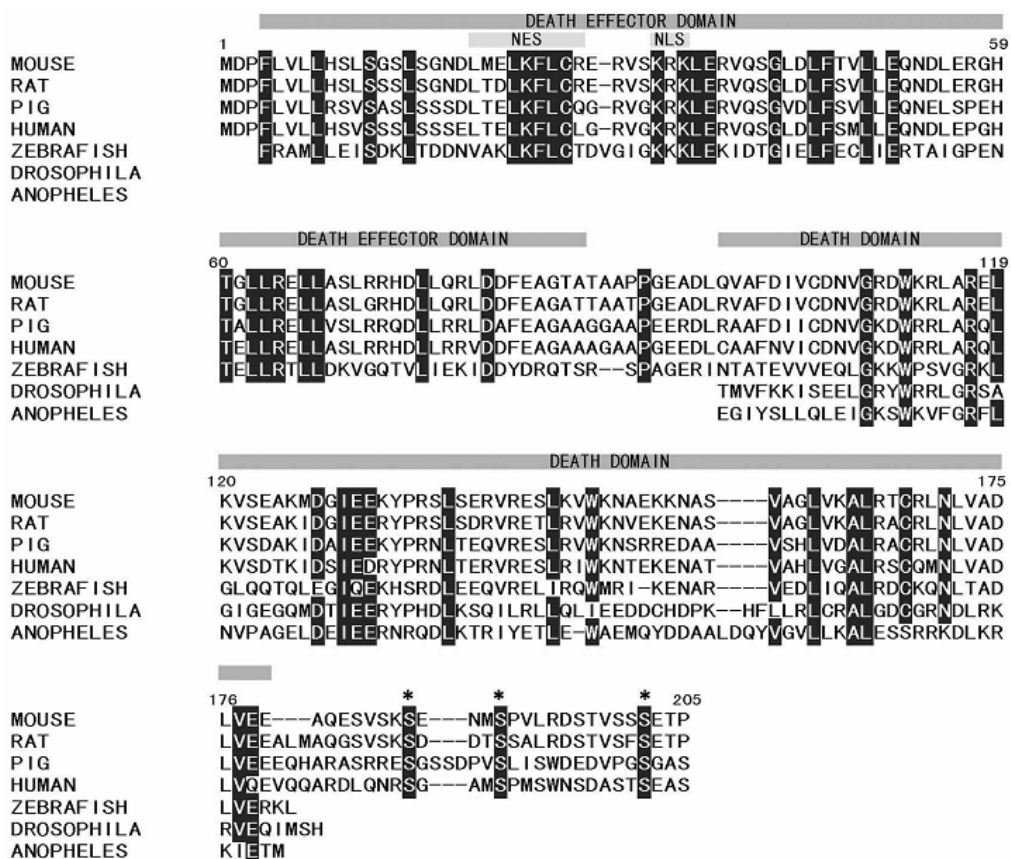
ดังนั้นเพื่อทำความเข้าใจว่า FADD ทำหน้าที่ดังกล่าวอย่างไรในหลายระบบทั้งการควบคุมการเพิ่มจำนวน หรือการตายของเซลล์ จึงมีความพยายามในการหาว่าโปรตีนใดบ้างที่สามารถมีปฏิสัมพันธ์กับ FADD ได้ การทดลองก่อนหน้านี้พบว่า Tripartite motif-containing 21 (TRIM21) เป็นหนึ่งในหลายชนิดของโปรตีนที่เกิดปฏิสัมพันธ์กับ FADD ซึ่งการทำงานร่วมกันของโปรตีนทั้งสองในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) ชักนำไปเกิดการยับยั้งการผลิต interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) ส่งผลให้อัตราการติดเชื้อกลุ่ม RNA virus น้อยลง และจากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า TRIM21 ที่ขาด B30.2 domain ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ FADD ได้ จึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อยืนยันว่า B30.2 domain มีความจำเป็นและเพียงพอต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน TRIM21 กับ FADD รวมถึงโดเมนอื่นใดอีกหรือไม่ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพื่อให้เข้าใจความสัมพันธ์ในเชิงหน้าที่และกลไกการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองนั้นดีขึ้นต่อไป

## 1.2 ทบทวนวรรณกรรม

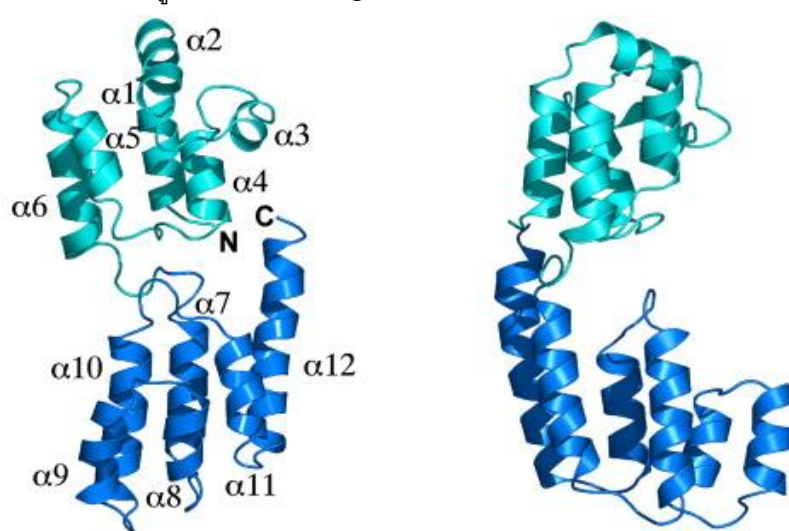
### 1.2.1 Fas-associated death domain (FADD)

#### 1) ยีน, การแสดงออกและโครงสร้าง

Fas-associated death domain (FADD) หรือ mediator of receptor-induced toxicity (MORT1) (Boldin *et al.*, 1995) เป็น adaptor protein ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis (Berghe *et al.*, 2004; Chinnaiyan *et al.*, 1996; Siegmund *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1998b; Zhang *et al.*, 2001), การเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) (Alappat *et al.*, 2003; Hua *et al.*, 2003; Osborn *et al.*, 2010; Osborn *et al.*, 2007), การอยู่รอดของเซลล์ (cell survival), การแบ่งตัวของเซลล์ (cell cycle progression), ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) (Balachandran *et al.*, 2004; Balachandran *et al.*, 2007), embryonic development FADD เป็นโปรตีนที่พบในสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตหลายชนิดตั้งแต่ไพรเมต สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ปลากระดูกแข็ง พืชสีเขียว และรา เป็นต้น มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ในทุกเนื้อเยื่อทั้งในระยะโตเต็มวัยและระยะตัวอ่อนของมนุษย์ หนู และยุง (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kabra *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 2009) โดยยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ FADD ในมนุษย์อยู่ในโครโมโซมคู่ที่ 11 ตำแหน่ง q13.3 (11q13.3) มีขนาด 4,240 เบส ส่วน mRNA มีขนาด 627 เบส เมื่อแปลรหัสโปรตีนแล้วประกอบด้วยกรดอะมิโน 208 amino acids น้ำหนักโมเลกุล 23,279 ดาลตัน (Kim *et al.*, 1996) การเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิดพบว่ามีความคล้าย (similarity) ค่อนข้างสูง เนื่องจากมีลักษณะการเรียงตัวของโปรตีนเป็นโดเมนอนุรักษ์ คือ death-effector domain (DED) และ death domain (DD) ดังแสดงในรูปที่ 1.1 โดยสิ่งมีชีวิตที่มีความคล้ายกันมากที่สุด คือ หนู (*Mus musculus*) ซึ่งมี 205 amino acids และจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่าระหว่าง FADD ของมนุษย์กับหนูมีความเหมือน (identity) อยู่ที่ 68% ส่วนความคล้าย (similarity) อยู่ที่ 80% (Zhang & Winoto, 1996; Zhang *et al.*, 2004) ซึ่งโครงสร้างทุติยภูมิหลักของ FADD ที่มีลักษณะร่วมกับโปรตีนอื่น ๆ ในกลุ่มเดียวกัน ประกอบด้วย  $\alpha$ -helix 12 อัน ที่เรียงต่อกันเป็นสองกลุ่ม หรือ สองโดเมนที่มีรูปแบบการเรียงตัวเป็น orthogonal tail-to-tail คือ death effector domain (DED) ทางปลายหมู่อะมิโน (N-terminus) และ death domain (DD) ทางปลายคาร์บอกซิลิก (C-terminus) ดังแสดงในรูปที่ 1.2

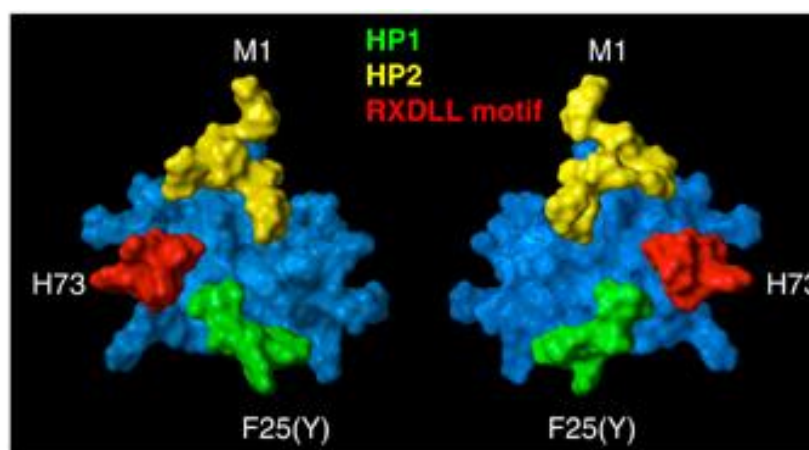


รูปที่ 1.1 แสดงการเปรียบเทียบโดเมนนูรั็กซ์และตำแหน่งที่เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตของ FADD ระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้ง 7 สปีชีส์ โดยแสดงขอบเขตของ DED, DD domain และตำแหน่งของ nuclear export signals (NES) และ nuclear localization signals (NLS) โดย \* แทนตำแหน่งที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟต (Zhang *et al.*, 2004)



รูปที่ 1.2 ภาพแสดงโครงสร้างของ FADD ในมนุษย์ โดยแสดงลักษณะ DED และ DD domain ทางปลาย N และ C ตามลำดับ (Carrington *et al.*, 2006)

DED หรือ Death-effector domain ครอบคลุมตั้งแต่กรดอะมิโนที่ 2-83 (ตาม crystal structure) ซึ่งจะพบ DED domain ในกลุ่มของ caspase recruitment domain (CARD) ประกอบขึ้นจาก  $\alpha$ -helices 6 อัน ที่ถูกเชื่อมด้วย loop และเรียงต่อกัน ส่วนโครงสร้างของ FADD DED ที่ตำแหน่งเชื่อมระหว่าง  $\alpha$ -helix ที่ 4 และ 5 มี  $\beta$  turn แทรกอยู่ ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะเฉพาะของโปรตีนชนิดนี้ โครงสร้างรอบนอกของ DED domain มีบริเวณที่ไม่มีขั้ว (Hydrophobic) 2 ตำแหน่ง คือ Phenylalanine 25 (F25) บน  $\alpha$  2 และเป็นตำแหน่งสำคัญที่ใช้ในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่นๆ หรือการเกิด self-dimer ของ FADD เอง โดย F25 เป็นตำแหน่งที่มีผลต่อการเกิด hydrophobic interaction เนื่องจากมีการทดลองพบว่าหากเปลี่ยนกรดอะมิโนที่นิลอะลานีนซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของกรดอะมิโนไม่มีขั้วเป็นไทโรซีน (F25Y) ที่มีโครงสร้างแบบมีขั้วเพียงตำแหน่งเดียวพบว่าไม่มีการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน และอีกจุดคือ L26, L28 บน  $\alpha$ 2 และ L66, L70 บน  $\alpha$ 5 นอกจากนี้ ใน DED ส่วนใหญ่พบลักษณะของ electrostatic surface โดยรอบ RXDL motif ใน helix 6 ดังรูปที่ 1.3 ซึ่งพบใน c-FLIP (Cellular FLICE-inhibitory protein) และ MC159 เช่นกัน ในโมเลกุลของ FADD DED ทำหน้าที่ในการควบคุม apoptosis ซึ่งโดเมนนี้จำเป็นต่อการเกิด self-association และต่อการมีปฏิสัมพันธ์กับ procaspase-8 ในการส่งเสริมให้เกิด apoptosis ผ่านทาง Fas signaling หรือสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่นๆ ผ่าน DED domain เช่น c-FLIP เป็นต้น (Carrington *et al.*, 2006; Eberstadt *et al.*, 1998; Muppidi *et al.*, 2006; Sandu *et al.*, 2006; Siegel *et al.*, 1998)



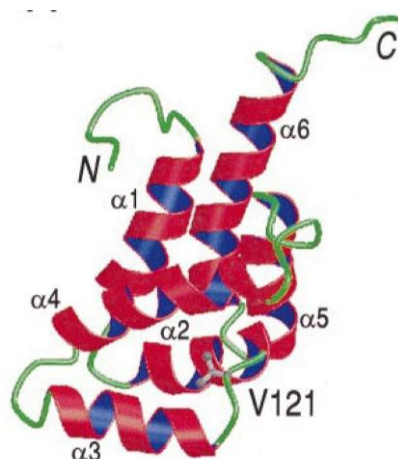
รูปที่ 1.3 แสดงโครงสร้างของ DED domain (Muppidi *et al.*, 2006)

นอกจากนี้ ในระหว่างสายเปปไทด์ของ DED domain พบว่ามี leucine-rich motif LTELKFLCL ที่ลำดับเบส 20 - 28 และ KRK sequence ซึ่งมีลำดับเบสอยู่ที่ 33-35 บน  $\alpha$ 3 ซึ่ง motif ทั้งสอง คือ ตำแหน่งของ NES (nuclear export signal) และ NLS (nuclear localization



signal) ตามลำดับ มีความเป็นลักษณะอนุรักษสูงมาก เชื่อว่ามีส่วนในการกำหนดตำแหน่งที่อยู่ของ FADD และการทำงานบางอย่างในเซลล์ เนื่องจากพบการแสดงออกของ FADD ได้ทั้งในนิวเคลียสและไซโทพลาส เช่น NES จำเป็นต่อการส่งออกนอกนิวเคลียสของ FADD หรือ NLS เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของ FADD (nuclear localization) ซึ่งการมี compartmentalization นี้อาจเป็นหนึ่งในกระบวนการควบคุมการทำงานของ FADD ในเซลล์ โดย FADD ที่อยู่ในไซโทพลาสเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิด apoptosis ส่วน FADD ในนิวเคลียสอาจกระตุ้นเกี่ยวกับการอยู่รอดของเซลล์และลดความสามารถของ FADD ในการกระตุ้นการเกิด apoptosis ใน T-cell ได้ นอกจากนี้ มีการค้นพบว่า FADD ถูกส่งออกนอกเซลล์ผ่านทาง adenosine receptor ซึ่งจะได้กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของ FADD และหน้าที่อย่างละเอียดต่อไป

Death Domain (DD) ของ FADD มีลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ 93–192 ประกอบด้วย 6  $\alpha$  helix ที่มีการพับม้วนแบบ Greek Key topology (Steward *et al.*, 2009) จากการทดลองของ Berglund และคณะในปี 2000 พบว่า โครงสร้างของโดเมนนี้ประกอบด้วย  $\alpha 1$  (D96-N107),  $\alpha 2$  (K112-K120),  $\alpha 3$  (D123-Y133),  $\alpha 4$  (T138-T151),  $\alpha 5$  (V158-C168),  $\alpha 6$  (N171-Q182) ที่จับกลุ่มขนานกันในทางตรงกันข้าม โดย  $\alpha 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  วางตัวอยู่เหนือ  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , และ  $\alpha 4$  ซึ่งการพับม้วนคล้ายกับ DD อื่น ๆ แต่เมื่อเปรียบเทียบแล้วมีความใกล้เคียงกับ DD ของ Fas ที่สุด นอกจากนี้พบว่า บริเวณผิวโดยรอบของโครงสร้างตติยภูมิของ FADD DD เป็นแบบ electrostatic potential ซึ่งมีการกระจายของประจุและความเป็นขั้วที่เป็นกลุ่ม โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย K110, R113, R114, R117 และ R140 แสดงความเป็นประจุบวกบน  $\alpha 2$  ส่วนกลุ่มที่สองประกอบด้วย D123, D127, E130 และ D131 ทำให้เกิดแนวเส้นของ negative electrostatic potential ขนานไปกับกรดอะมิโน S122, T124 และ S128 ที่ไม่แสดงประจุแต่มีลักษณะความมีขั้วกลุ่มนี้อยู่บน  $\alpha 3$  ซึ่งการทดลองโดยการทำให้ mutagenesis พบว่ามี electrostatic potential ซึ่งน่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง DD domain ทั้งของ FADD และ Fas receptor ที่ฝังอยู่ภายในเซลล์เมมเบรน หรือโปรตีนบางตัวในกลุ่มของ tumor necrosis factor (TNF) superfamily เช่น DR4, DR5, TNFR1 เป็นต้น (Berglund *et al.*, 2000) รวมทั้งการทดลองของ Jeong ในปี 1999 ก็สนับสนุนว่าปฏิสัมพันธ์เกิดที่  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  helix loop motif ดังรูปที่ 1.4 (Carrington *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 1999; Zhang & Winoto, 1996)



**รูปที่ 1.4** แสดงโครงสร้างของ DD domain (Berglund *et al.*, 2000)

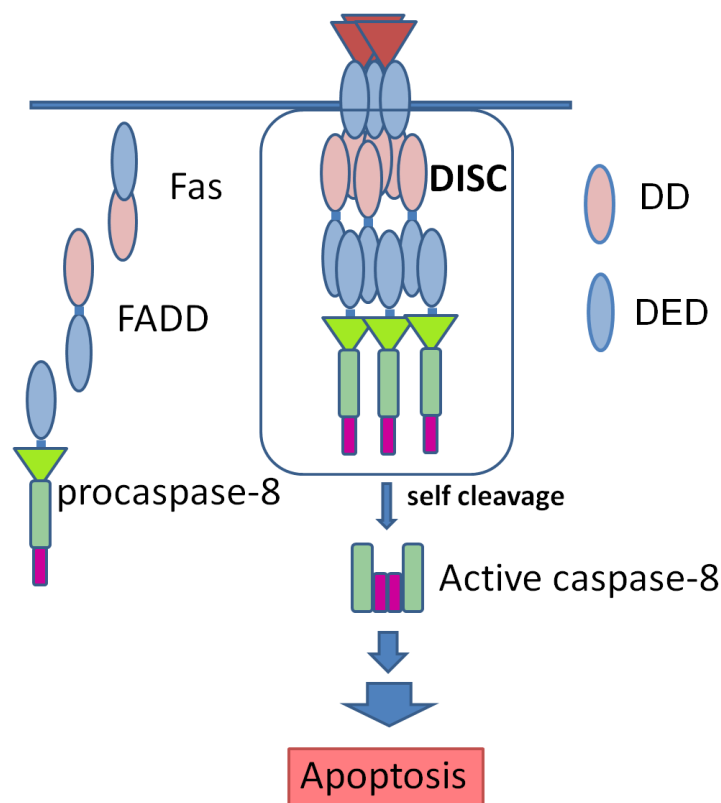
นอกจากโดเมนทั้งสองแล้ว พบว่ามีส่วนของโปรตีนที่อยู่นอกเหนือโดเมนไปทางปลายคาร์บอกซิลิกซึ่งมีตำแหน่งของกรดอะมิโนซีรีนที่ตำแหน่ง 194 ทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตและส่งผลกระทบต่อการทำงานของ T-cell ซึ่งจะได้กล่าวในลำดับต่อไป นอกจากนี้ซีรีนที่ตำแหน่ง 194 แล้วยังพบที่ 187 และ 202 ด้วย แต่ไม่มีการเกิดฟอสโฟริเลชัน และจากการทดลองที่เปลี่ยนกรดอะมิโนเป็นแอสปาติกเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงก็ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ซึ่งการเติมหรือไม่เติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่งซีรีน 194 นี้ไม่มีผลต่อกระบวนการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ Fas หรือการเกิด apoptosis

การทำงานของ FADD เกิดจากการ translocation, protein phosphorylation, หรือการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่น ๆ ก่อให้เกิดการทำหน้าที่ที่หลากหลายได้ จึงอาจเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้ FADD ถูกจัดเป็น adaptor protein เมื่อมีการจับกันมักจะอยู่ในลักษณะที่ FADD เป็นนิวเคลียส และถึงแม้ว่า DED จะเป็นส่วนที่ใช้ในการจับกันโดยตรงเพื่อให้เกิดปฏิสัมพันธ์ที่นำไปสู่ apoptosis แต่จำเป็นต้องมี DD domain เพื่อจับกับ Fas จึงจะทำให้เกิดการ apoptosis ได้ เช่นเดียวกันหากมีเพียง DD domain อย่างเดียวสามารถจับกับ Fas ได้ แต่ไม่สามารถส่งต่อให้เกิด apoptosis ได้ในที่สุด เนื่องจากขาด DED domain (Spencer *et al.*, 1996; Tourneur & Chiochia, 2010; Young *et al.*, 2011)

## 2) FADD กับหน้าที่ใน apoptosis

ดังที่กล่าวมาแล้วในขั้นต้นว่า FADD ถูกค้นพบครั้งแรกผ่านระบบการตายของเซลล์ ซึ่งก็นับได้ว่าเป็นหน้าที่หรือบทบาทหลักได้ เนื่องจาก FADD ทำหน้าที่เป็นเหมือนตัวดึงหรือเชื่อมระบบการรับรู้เวลาที่เซลล์ถึงเวลาเข้าสู่กระบวนการตาย จึงเรียกได้ว่า FADD เป็น adaptor protein ในกระบวนการเกิด apoptosis ที่มีสาเหตุจากภายนอกเซลล์ (extrinsic pathway) โดย

เซลล์รับสัญญาณการกระตุ้นจากภายนอกผ่านการจับระหว่าง ligand กับ Fas receptor บนผิวเซลล์จากนั้นจะเกิดปฏิสัมพันธ์กันระหว่าง Fas กับ FADD โดยส่วน DD domain ของทั้งสองโมเลกุลแบบ trimer แล้วส่งสัญญาณให้เกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรแคสเปส 8 (Procaspase-8) ผ่านทาง DED domain ด้วยอัตราส่วนการจับเป็น 3:3:3 ซึ่งเรียกโครงสร้างเชิงซ้อนนี้ว่า death-inducing signaling complex (DISC) จากนั้นสัญญาณจาก DISC จะถูกส่งต่อไปโดยการที่ procaspase 8 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น protease และสามารถเกิด self cleavage ได้ ถูกกระตุ้นให้ active เป็น caspase 8 และไปกระตุ้น procaspase อื่นๆ เช่น procaspase 3, 7 และ 10 ให้ active และขยายสัญญาณออกไปจนเกิด apoptosis ในที่สุด (Carrington *et al.*, 2006) ดังแสดงในรูปที่ 1.5 และมีการทดลองอีกมากที่ยืนยันว่าการทำงานของ FADD เพื่อ recruit โปรตีนต่างๆ จะจับเป็นรูปแบบเช่นนี้



**รูปที่ 1.5** แสดงภาพประกอบปฏิสัมพันธ์ของ death-inducing signaling complex (DISC) ระหว่าง Fas, FADD และ Procaspase 8 และกระบวนการต่อเนื่องสู่การเกิด apoptosis

แต่ในขณะเดียวกันถ้า TNFR1 (TNF-receptor 1) ถูกกระตุ้นจะทำให้เกิดการรวมกันของ complex ในไซโตซอลเป็น FADD-TRADD-caspase 8 หรือ RIP1-FADD-caspase 8 นำไปสู่การตายแบบ apoptosis ได้ (Wilson, *et al.*, 2009) ดังนั้นการทำหน้าที่อย่างถูกต้อง

สมบูรณของ FADD จึงเป็นการรักษาสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันได้อีกทางหนึ่ง อนึ่ง FADD เป็น main adaptor ในหลาย death receptor (DR) ทั้งทางตรง ( Fas, TRAIL) และอ้อม (TNFR1 ผ่าน TRADD) แต่ปกติแล้วร่างกายต้องรักษาสมดุลของปริมาณเซลล์ไว้ นอกจากนี้พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง FADD, caspase 8 และ มิวเทชันโปรตีน Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) ซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุของการเกิด Parkinson Disease (PD) ที่เกี่ยวเนื่องกับความผิดปกติทางพันธุกรรม ซึ่งพบว่า mutant form ของ LRRK2 ทำให้เกิดเป็นสายยาวที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ FADD และ TRADD ได้ จึงเป็นการส่งสัญญาณให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท เกิดการทำลายเซลล์ประสาท (neurodegeneration) นอกจากนี้การทดลองของ Hartmann และคณะในปี 2002 พบการสะสมของ FADD ในนิวรอนที่มีรอยโรค ซึ่งน่าจะมีการชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ผ่านการกระตุ้นของ caspase 8 ซึ่งอาจเป็นปัจจัยร่วมให้เกิดการตายของนิวรอนเซลล์ในผู้ป่วยพาร์กินสันต่อไป (Hartmann *et al.*, 2002)

### 3) FADD กับหน้าที่ต่อการแบ่งตัวของ T-cell

ในทางกลับกันที่ FADD ถูกจัดว่าเป็นส่วนสำคัญของกระบวนการการตายในระดับเซลล์ แต่การทดลองของ Zhang และคณะในปี 1998 โดยทำการทดลองในหนูที่ Knockout FADD พบว่ามีอายุของการเป็นเอมบริโอประมาณ 10 วัน จากนั้นจะตายตั้งแต่ในท้อง โดยเกิดจากการมีส่วนร่วมในการยับยั้งการเกิด proliferation ของ T cell (Zhang *et al.*, 1998) นอกจากนี้ FADD ยังเป็นโปรตีนอีกชนิดที่สามารถเกิด phosphorylation ของกรดอะมิโนซีรีนทางปลายหมู่คาร์บอกซิลิกที่ตำแหน่ง S194 ในขณะที่ FADD ของหนูเกิดได้ทั้งที่ทีริโอนีนและซีรีนแต่เกิดที่ซีรีนมากกว่า และหนึ่งในตำแหน่งนั้นคือ S191 ที่เทียบเท่ากับ hFADD S194 (Zhang & Winoto, 1996) ซึ่งตำแหน่งนี้อยู่นอกโดเมน DED และ DD ของ FADD แต่พบว่ามีส่วนสำคัญในการควบคุมการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งซีรีนทางปลาย C พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด แต่ไม่พบในปลาหางนกยูง แมลงวัน และยุง หรือสัตว์ที่วิวัฒนาการต่ำลงมา จึงเป็นไปได้ว่าลำดับกรดอะมิโนนอก DD โดเมนเป็นส่วนที่เพิ่มขึ้นมาในระหว่างวิวัฒนาการของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Zhang *et al.*, 2004) ซึ่งเป็นที่ชัดเจนแล้วว่าการเกิด phosphorylation-dephosphorylation ที่กรดอะมิโนซีรีนบนปลาย C เพียงตำแหน่งเดียว เป็นส่วนสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ โดย FADD จำเป็นต่อการแบ่งตัวของ T-cell ซึ่งการขาดหายไปของ FADD หรือการทำให้ขาดคุณสมบัติต่างๆ เช่น การทำให้เกิด point mutation จากซีรีนเป็นแอสปาทิกแอซิดที่ 194 (S194D) ก่อให้เกิดคุณลักษณะเป็นการเลียนแบบ phosphorylation ของ FADD ป้องกันไม่ให้เกิดการ

dephosphorylation มีผลทำให้ T-cells ไม่ผ่านวัฏจักรเซลล์จากระยะ G1 เข้าสู่ระยะ S ซึ่งเป็นช่วงที่มีการจำลองดีเอ็นเอเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ต่อไป (Alappat *et al.*, 2005; Hua *et al.*, 2003; Osborn *et al.*, 2007) การขาด FADD ยับยั้งการกระตุ้นการเจริญแบ่งตัวของ B-cell ผ่านทาง TLR3/4 (Beisner *et al.*, 2005; Imtiyaz *et al.*, 2006) ส่วนการทดลองในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนูและมนุษย์ FADD เกี่ยวข้องกับ IFN pathway ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส จากผลที่ได้จึงเชื่อว่าหน้าที่หลักของ FADD ต่อระบบภูมิคุ้มกันน่าจะอยู่ที่ช่วงท้ายของ IFN pathway และลดการถอดรหัสของ IRF7 เมื่อได้รับ sendai หรือ VSV virus (Balachandran *et al.*, 2007) แต่ยังไม่มีความชัดเจนว่า FADD ควบคุมการถอดรหัสของ IRF7 และการตอบสนองต่อ IFN อย่างไร

นอกเหนือจากที่ได้กล่าวมาแล้วว่า FADD มีส่วนในการเจริญพัฒนา และการแบ่งตัวของ T-cell ยังมีการทดลองที่ระบุว่า FADD มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์อื่น ๆ ด้วย จึงมีความสนใจในความเกี่ยวข้องระหว่าง FADD กับการก่อเกิดหรือการสลายไปของเซลล์มะเร็ง มีการทดลองว่า การเกิดฟอสโฟริเลชันที่กรดอะมิโนซีรีน 194 มีผลให้การตอบสนองต่อยาต้านมะเร็งเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีผลต่อการเคลื่อนที่ของ FADD ภายในเซลล์อีกด้วย จากการทดลองของ Alappat และคณะในปี 2005 พบว่า casein kinase I $\alpha$  (CKI $\alpha$ ) ทำหน้าที่ในการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ FADD ที่ตำแหน่ง S194 ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* และการถูกเติมฟอสเฟตที่ตำแหน่งนี้ถือว่าเป็นกุญแจสำคัญของการควบคุมการทำงานของ FADD ในบทบาทหน้าที่ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเกิด apoptosis (Alappat *et al.*, 2005) ในส่วนของการควบคุมวัฏจักรเซลล์ พบว่ามี FADD ที่ได้รับการเติมหมู่ฟอสเฟตอยู่ในช่วง G2/M มากกว่า G1/S (Alappat *et al.*, 2005) ปริมาณของ FADD ที่ปรากฏอาจเป็นหนึ่งใน check point เพื่อให้เซลล์พร้อมเข้าสู่การแบ่งตัวต่อไป มีการทดลองใน tumor cell ซึ่งพบว่าหากขาด FADD จะต้านทานต่อการเกิด apoptosis ได้ มีผลต่อการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Tourneur *et al.*, 2005; Tourneur *et al.*, 2003) มีการพบแล้วว่าเอ็มบริโอหนูนั้นตายเกิดจากการขาด FADD ไม่ใช่การบกพร่องของกระบวนการ apoptosis แต่อาจเกี่ยวข้องกับระบบเมตาบอลิซึม เนื่องจากการความรู้ทางด้านชีวสารสนเทศ (bioinformatic) การทดลองนี้ทำโดยการ predict จากโปรแกรม พบว่ามีโปรตีนถึง 45 ตัวที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากขาด FADD อีกทั้งเมตาบอลิซึมของลิปิด กรดไขมัน glycolysis tricarboxylic acid (TCA) oxidative phosphorylation มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้พบการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ ubiquitin-proteasome (UP) pathway และ c-Myc น่าจะเป็นศูนย์กลางการควบคุมนี้การเชื่อมกันระหว่าง FADD กับระบบ metabolism น่าจะเป็นอีกแขนงที่น่าสนใจของการศึกษาหน้าที่ FADD (Zhuang *et al.*, 2013)

#### 4) FADD กับการมี compartmentalization

จากที่กล่าวไว้ข้างต้น ว่า FADD มีสัญญาณของ NLS ทำให้มีการสะสมของ FADD ได้ในนิวเคลียสและเกี่ยวข้องกับการลดความสามารถของ FADD ในการกระตุ้นการเกิด apoptosis ใน T-cell อาจเนื่องจากว่าเฉพาะ FADD ในไซโทพลาสตเท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ ในขณะที่โปรตีนในนิวเคลียสเกี่ยวกับการอยู่รอดของเซลล์ มีรายงานว่า exportin 5 nucleocytoplasmic transport protein เป็นตัวกลางระหว่าง FADD และ MBD4 ถ้า mutate S194A จะยับยั้งการ export ของ FADD เพราะ S194A และ  $\Delta 1-80$  ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์กับ exportin 5 ซึ่งการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ exportin 5 ควบคุมด้วย phosphorylation MBD4 จึงมีส่วนในการควบคุม apoptosis ผ่านการจับกับ FADD โดยตรง ทำให้ FADD ถูกกักในนิวเคลียสยับยั้งการแสดงออกและไม่เกิด apoptosis โดยไม่จำเป็น นอกจากนี้การ mutate ที่ตำแหน่งของ NES มีผลต่อการกระจายตัวของ FADD ด้วย (Screaton *et al.*, 2003) โดย Fas recruit FADD ไปยัง endosome และเมื่อกระตุ้น Fas จะมีการ relocate กลับไปยังไซโทพลาสตอีกครั้ง (Föger *et al.*, 2009)

FADD เป็น tumor suppressor gene ด้วย เนื่องจากไม่พบการแสดงออกของโปรตีน FADD ทั้งที่ตรวจพบ FADD mRNA ใน thyroid adenoma/adnocarcinoma และ acute myeloid leukemia (AML) จากการทดลองของ Tourneur และคณะในปี 2008 (Tourneur *et al.*, 2008) ซึ่งตรวจหา FADD ในต่อมไทรอยด์ พบว่ามีการปลดปล่อย FADD ออกจากเซลล์แต่ไม่เกิดจากการขาดหรือรั่วของ plasma membrane เนื่องจากไม่พบ LDH ที่จะพบได้ใน supernatant หากมีการแตกของเซลล์ นอกจากนี้ในการทดลองดังกล่าวพบว่า FADD ไม่ถูกทำลายด้วยทริปซิน แสดงว่า FADD ที่ถูกปล่อยนี้อยู่ในรูปแคปซูลจากการ encapsulation และปล่อยในรูป vesicle ที่มี phosphatidylserine (PS) เป็นส่วนประกอบของเมมเบรน ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกับ MacKenzie และคณะที่ตั้งสมมติฐานว่าการปล่อยโปรตีนด้วย microvesicle เป็นวิธีการขนส่งโปรตีนที่ไม่มี secretory signal sequence ออกนอกเซลล์ (MacKenzie *et al.*, 2001) ซึ่งนอกจากไทรอยด์แล้ว ยังพบการปล่อยโปรตีน FADD จากเซลล์ตับ ต่อมไทมัส ผิวหนัง กล้ามเนื้อ และไต ด้วย การปลดปล่อยนี้ต้องมีแคลเซียมอยู่ในสารละลายนอกเซลล์ด้วย และน่าจะเป็นตัวช่วยในขั้นตอนของการขนส่งออกนอกเซลล์ ซึ่งการทดลองของนักวิทยาศาสตร์กลุ่มนี้พบว่าการปล่อย FADD อยู่ภายใต้การทำงานของตัวรับจำเพาะที่ใช้ adenosine เป็นซับสเตรท เนื่องจากพบว่าปริมาณการเพิ่มขึ้นนั้นสอดคล้องกับการเพิ่มของ ATP ในสารละลายนอกเซลล์ เช่น p2x receptor เป็น ion channel gate ที่ต้องอาศัย ATP โดย microvesicle นี้ เป็นวิธีการปล่อย IL-1 $\beta$  อย่าง

รวดเร็วจากโมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้น (MacKenzie *et al.*, 2001) ซึ่งการปล่อย FADD จาก thyroid lobe อาจัยการทำงานของ A<sub>3</sub>AR receptor (adenosine receptor) ที่เกิดเมื่อมีพยาธิสภาพขึ้นกับเซลล์หรืออวัยวะนั้น นอกจากนี้พบการปล่อย FADD ผ่านทาง vesicle ที่เกี่ยวกับ adenosine receptor เนื่องจากพบ adenosine ซึ่งถูกรายงานว่าเป็น regulator of inflammation ในผู้ป่วยรูมาตอยด์ ดังนั้นการทดลองนี้แสดงว่าการปล่อย FADD ใน *in vivo* เกิดในสภาวะที่มีพยาธิสภาพเช่นกัน และเนื่องจาก adenosine จะถูกขับออกอย่างรวดเร็วในสภาวะที่เซลล์เกิดความเครียดหรือได้รับความเสียหาย การตัดชิ้นส่วนในการทดลองนี้อาจนำไปสู่การปล่อย FADD อย่างรวดเร็วเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด apoptosis เนื่องจากสภาวะเครียดนี้ นอกจากนี้มีการพบ FADD ในซีรัมจากหนูที่เป็น nonpathological gsp แต่ไม่พบในหนูปกติที่เป็น non transgenic ทางผู้ทดลองตั้งข้อสังเกตว่า การปลดปล่อย FADD อาจเป็นหนึ่งในสัญญาณการพัฒนารวมของ tumor ได้เช่นกัน โดยพบการสูญเสีย FADD ในเซลล์ carcinoma และ พบ FADD ใน serum ที่ใช้เลี้ยง tumor cell (Tourneur *et al.*, 2008)

#### 5) FADD กับการทำหน้าที่และความเกี่ยวข้องกับโปรตีนอื่นๆ

จากการศึกษาพบว่า FADD มีความสำคัญในการต้านแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่มของแมลง เช่น แมลงหวี่ ยุง ผ่านทาง immunodeficiency pathway pathway (IMD) ที่ใช้ต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบ IMD นี้ เทียบได้กับ RIP1 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งจับกับ FADD และ caspase 8 เพื่อกระตุ้น NF- $\kappa$ B pathway ให้สร้าง drosomycin ซึ่งเป็น anti bacterial peptide (Cooper *et al.*, 2009; Naitza *et al.*, 2002) การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง FADD กับ death receptor เป็นขั้นตอนที่สำคัญของการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน (Newton *et al.*, 2001) และ NF- $\kappa$ B เป็นอีกส่วนสำคัญในกระบวนการ apoptosis โดยเป็น nuclear transcription factor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนหลาย ๆ ตัวที่เกี่ยวข้องกับ apoptosis การเพิ่มจำนวนไวรัส การเกิด tumor การอักเสบ และโรคเกี่ยวกับการแพ้ภูมิตัวเอง

นอกจากนี้พบความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน Calmodulin ในการควบคุมวัฏจักรเซลล์ (Ho *et al.*, 2009; Papoff *et al.*, 2010; Tourneur *et al.*, 2008) ซึ่ง Calmodulin (CaM) เป็นโปรตีนที่มีขนาด 17 KDa อยู่ในไซโตพลาส มีลักษณะเหมือนดัมเบลโดยจับกับกับ Ca<sup>2+</sup> ผ่านทาง EF-hand ที่อยู่ส่วนปลายโปรตีนก่อนกลม ซึ่งทำให้เกิดเป็น hydrophobic ที่ตำแหน่งระหว่างโปรตีนก่อนกลมทั้งสองซึ่งจะไปจับกับโปรตีนอื่นเพื่อให้เกิดผลต่างๆ ต่อไป ทั้ง FADD, CaM และ casein kinase I  $\alpha$  (CKI $\alpha$ ) เคลื่อนที่ไปด้วยกันสู่ตำแหน่ง mitotic spindle ใน

HeLa cells พบว่าเมื่อทำให้เกิดการมิวเทชันที่ตำแหน่งจับจำเพาะของ CaM สามารถยับยั้งการเข้าสู่กระบวนการพักของเซลล์ที่ G2/M cell cycle จากการกระตุ้นด้วย Taxol และการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง FADD กับ CaM ไม่ต้องการการกระตุ้นจาก Fas ถึงแม้ว่าทั้ง Fas และ CaM จะเป็นซับสเตรตแข่งขันในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ FADD ซึ่งตำแหน่งที่ใช้ในการจับ CaM อยู่บน S194 ที่เป็นตำแหน่งเดียวกับที่ใช้ในการเกิดฟอสโฟริเลชัน เนื่องจาก CKI $\alpha$  สามารถจับและเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ FADD และ CaM ได้

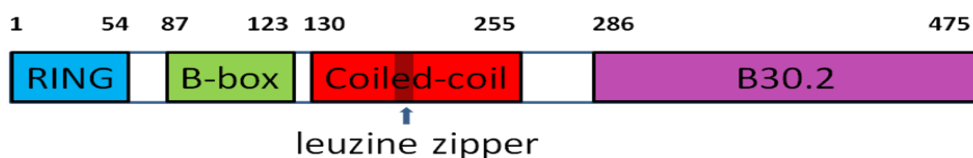
การทำงานของ FADD ต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ในระหว่างอินเทอร์เฟส ซึ่ง FADD ไม่ได้เกาะโครงสร้างใดหรือสะสมที่ใดเป็นสำคัญภายในเซลล์ แต่ในระหว่างเมทาเฟสจะพบความเข้มข้นของ FADD ที่บริเวณขั้วของ spindle พร้อมทั้ง CaM และ CKI $\alpha$  ซึ่ง Papoff และคณะกล่าวว่า CaM จับกับ DD ของ FADD โดยมี Ca<sup>2+</sup> ร่วมด้วย นอกจากนี้พบว่า โปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม DD domain สามารถจับกับ CaM ได้ เช่น Fas หรือ FLIP อีกทั้งไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างการจับกันระหว่าง FADD และ CaM ไม่ต้องการการเติมหมู่ฟอสเฟตของ FADD แต่อย่างใด (Papoff *et al.*, 2010) โดย c-FLIP (Cellular FLICE-inhibitory protein) เป็น antiapoptotic protein ที่ช่วยยับยั้งกระบวนการการตายของเซลล์ได้เช่นเดียวกับ caspase 8 แต่ไม่มี cystein ในโครงสร้าง แต่มีหลายรายงานการวิจัยที่ไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง CaM กับ FADD เป็นที่น่าสนใจว่าการจับกันของ CaM-Fas, CaM-FLIP ทำให้เกิดกระบวนการที่ตรงข้ามกับ Fas-FADD-Caspase8 ของ DISC ที่ส่งต่อสัญญาณของ apoptosis



## 1.2.2 TRIM21 Tripartite motif-containing 21 หรือ TRIM21

### 1) แหล่งผลิตและโครงสร้าง

Tripartite motif-containing 21 (TRIM21) หรือ Ro52/SSA (Chan *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1991) จัดเป็นโปรตีนในกลุ่มของ TRIM Superfamily (tripartite motif) (Nisole *et al.*, 2005) ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่มใหญ่ที่พบยีนนี้ในมนุษย์มากกว่า 75 ยีน นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนที่คล้ายกันนี้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งไพรเมต ปลา หรือในกลุ่มของหนอนตัวกลม โปรตีนเหล่านี้ถูกค้นพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนา การควบคุมวัฏจักรเซลล์ ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด และการตอบสนองต่อไวรัส TRIM family protein ถูกเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า RBCC protein เนื่องจากมีโครงสร้างเป็น 4 โดเมนอนุรักษ์ คือ RING, B-box, และ coiled-coil (RBCC) (Reymond *et al.*, 2001) สำหรับในมนุษย์นั้น พบการแสดงออกของ TRIM21 ที่ระดับต่ำ ๆ ในเกือบทุกเซลล์และถูกกระตุ้นด้วยการควบคุมของอินเตอร์เฟอรอน (interferon-IFN) โดยถูกสร้างและทำงานในไซโตพลาสแต่สามารถเข้าออกนิวเคลียสได้ (shuttle) โดยเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 ที่ตำแหน่ง p15.5 (11p15.5) มีขนาด 8,800 เบส ที่แบ่งเป็น 6 axon เมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนจะมีขนาด 475 อะมิโนแอซิด น้ำหนักประมาณ 54 KDa สำหรับโครงสร้างของ TRIM21 Protein ประกอบด้วย 4 โดเมนที่เรียงจากปลายอะมิโนดังนี้ คือ Ring, B-box, coiled-coil และ B30.2/PRY-SPY domain ดังรูปที่ 1.6



รูปที่ 1.6 แสดงโครงสร้างของ TRIM21 พร้อมขอบเขตของแต่ละโดเมน

RING โดเมนมีลักษณะของ Zinc finger ที่สามารถจับ Zinc 2 โมเลกุลและมีกิจกรรมของ E3 Ubiquitin ligase ซึ่งทำหน้าที่ในการเชื่อมต่อโมเลกุล Ubiquitin ที่ถูกกระตุ้นแล้วกับซับสเตรตซึ่งมีได้หลายชนิด เช่น p27 cell cycle inhibitor, IRF3, IRF7, IRF8 รวมทั้งโมเลกุล TRIM21 เองด้วย ซึ่งก่อให้เกิดการป้องกันการบุกรุกของไวรัส (Higgs *et al.*, 2008) B-box โดเมนยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด ส่วน coiled-coil โดเมนจำเป็นต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลของ TRIM เอง (self aggregation) เนื่องจากโดเมนนี้สามารถพบในโปรตีนหลายชนิดโดยสามารถส่งเสริมให้เกิด dimer หรือ trimer ได้ และมีตำแหน่งของ leucine zipper แทรกอยู่ช่วง 211-232 ซึ่งเป็นตำแหน่งจดจำของ autoantibody ในผู้ป่วย Sjogren's Syndrome และ CC domain น่าจะมีส่วนสำคัญในการที่ทำให้ TRIM21 อยู่ในไซโตพลาส (Rhodes *et al.*, 2002) สำหรับ B30.2

domain ทำหน้าที่ในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่นและมีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Ottoosson *et al.*, 2006) ซึ่ง CC และ B30.2 domain มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่นิวเคลียส เนื่องจากมีการทดลองพบว่า TRIM21 ที่ขาด leuzine zipper ใน CC domain จะเข้าไปสะสมในนิวเคลียส ต่อเมื่อตัดส่วนของ B30.2 domain ด้วย โปรตีนนี้จะไม่เข้าสู่นิวเคลียส แต่ TRIM21 ไม่มี NES sequence ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำเข้านิวเคลียส จึงเป็นไปได้ว่าการเข้าสู่นิวเคลียสเกิดจาก B30.2 หรือ PRY-SPY domain ซึ่งเป็นโดเมนทางปลายคาร์บอกซิลิก อาจต้องอาศัยการเกิด post-translational modification บางอย่าง หรือด้วยกระบวนการ “piggy-back mechanism” ซึ่งเป็นกระบวนการนำส่งโปรตีนเข้าสู่นิวเคลียสโดยทางอ้อมผ่านการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนขนส่ง (shuttling protein) ที่มีสัญญาณ NLS ภายในโครงสร้าง จึงต้องมีการศึกษาเพื่อเพิ่มความชัดเจนของกระบวนการขนส่ง TRIM21 เข้าสู่นิวเคลียสต่อไป ตัวอย่างของกระบวนการ “piggy-back mechanism” เช่น โปรตีน 46-kDa subunit ของ DNA primase ในหนูซึ่งไม่มีสัญญาณ NLS แต่เข้าสู่นิวเคลียสระหว่างการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ 46-kDa subunit ที่มีสัญญาณ NLS (Chan *et al.*, 1995; Espinosa *et al.*, 2008; Mizuno *et al.*, 1996; Oke & Wahren-Herlenius, 2012)

## 2) TRIM21 กับการทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน

จากที่กล่าวมาแล้วว่า TRIM21 (Ro52) หรือ Tripatite motif containing-21 เป็นหนึ่งในกลุ่มของ TRIM protein ที่มีการแสดงออกในทุกเซลล์ และถูกกระตุ้นด้วยการควบคุมของอินเตอร์เฟอรอน (interferon-IFN) TRIM หลาย ๆ ตัวมีความเกี่ยวข้องกับการต่อต้านไวรัส เช่น การเหนี่ยวนำ RIG-1 (Retinoic acid-inducible gene I) ต้องการการแสดงออกของ TRIM25 และ TRIM5 เป็น factor จำเพาะต่อ HIV (Adachi *et al.*, 1995; Gack *et al.*, 2007; McNab *et al.*, 2011; Stremlau *et al.*, 2004) การศึกษาในหนูที่ขาด TRIM21 พบว่า TRIM21 จะทำหน้าที่ในการควบคุมย้อนกลับแบบลบ (negative feedback) ของการสร้างไซโตไคน์ โดยเซลล์ splenocyte ที่ขาด TRIM21 จะสร้าง inflammatory cytokines เพิ่มขึ้น รวมทั้ง type I interferon เมื่อได้รับ CpG DNA (Espinosa *et al.*, 2009; Yoshimi *et al.*, 2009) นอกจากนี้ TRIM21 ยังเกี่ยวกับการสร้าง inflammatory cytokines ผ่านทาง NF- $\kappa$ B ด้วยการควบคุมย้อนกลับแบบลบต่อ NF- $\kappa$ B พบว่า TRIM21 จับกับ fragment crystallizable region (Fc region) ของ immunoglobulin แบบมีสัมพรรคภาพสูง (high affinity binding) ซึ่งจะจับกับไวรัสที่เข้าสู่เซลล์ไปทำลายยัง proteasome ผ่านทาง ubiquitin ligase activity ที่จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วก่อนที่ไวรัสจะสามารถแปลรหัสโปรตีนของตัวเองได้

จากการทดลองของ Manocha และคณะในปี 2014 พบว่าการได้รับ Japanese encephalitis virus (JEV) กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ทำให้เกิดการสร้าง type I interferon และการสร้างนี้ถูกควบคุมด้วยหลายโมเลกุล ซึ่ง JEV จะเพิ่ม TRIM21 และการทำงานของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) โดยการเพิ่ม IFN- $\beta$  ผ่าน interferon regulatory factor 3 activation และการเติมหมู่ฟอสเฟตของ TRIM21 (p-TRIM21) ที่มากขึ้นจะกด p-IRF และ IFN- $\beta$  ในขณะที่การลด TRIM21 จะเพิ่มการสร้าง p-IRF3 และ IFN- $\beta$  ในเซลล์ที่ติดเชื้อ JEV ขั้นตอนที่สำคัญในการกระตุ้น innate immunity เพื่อต่อต้านการติดเชื้อไวรัส รวมทั้ง JEV คือการสร้าง type I interferon การปรากฏของไวรัสจะถูกจับโดย pattern recognition receptors (PRRs) เช่น retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) และ Toll-like receptors (TLRs) ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกัน การทดลองเพิ่มการแสดงออกของ TRIM21 ก่อนการรับเชื้อ JEV ทำให้ลดระดับของ p-IRF3 เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับการเพิ่ม TRIM21 ซึ่ง Manocha และคณะเชื่อว่า TRIM21 สามารถชะลอการทำงานของ JEV ต่อ IRF3 ได้ เมื่อได้รับเชื้อ JEV การทำงานของ TLRs และ RIG-I ทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ IRF3 จากนั้นเข้าสู่นิวเคลียสนำไปสู่การสร้าง IFN- $\beta$  ออกไป เมื่อมีปริมาณมากพอจะกระตุ้น TRIM21 ให้ยับยั้งการเติมฟอสเฟตให้ IRF3 ทำให้ลดการสร้าง IFN- $\beta$  ลง ซึ่งการ up regulate ของ TRIM21 แบบควบคุมย้อนกลับ (feedback mechanism) ต่อการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immune response) นอกจากนี้ RING และ PRY-SPRY domain จำเป็นต่อการควบคุมการแสดงออกของ IRF3 โดยการเกิดปฏิสัมพันธ์และทำลายด้วย proteasome ซึ่ง TRIM21 เป็นโปรตีนที่ทราบอยู่แล้วว่าทำหน้าที่ในการป้องกันไวรัสด้วย activity จำเพาะต่อแต่ละชนิดของไวรัส เช่น TRIM79 มีความจำเพาะต่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (replication) ของ TBEV (Manocha *et al.*, 2014)

นอกจากนี้ความผิดปกติของการแสดงออกของ TRIM21 มีความเกี่ยวข้องกับอาการเกิดโรคในกลุ่มของภูมิคุ้มกัน คือกลุ่มอาการของโรคภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง (autoimmune disease) Sjögren syndrome (Chan *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1991) เป็นต้น ซึ่ง Sjogren's Syndrome หรือโรคปากแห้งตาแห้งจัดเป็น non-organ specific autoimmune disease ที่มีพยาธิสภาพเกิดขึ้นได้ในหลายอวัยวะ เช่นเดียวกับโรค systemic lupus erythematus (SLE) และ rheumatoid arthritis เป็นต้น เป็นกลุ่มอาการที่จะมีความบกพร่องอย่างรุนแรงในการทำงานของต่อมต่างๆ ซึ่งทำหน้าที่สร้างน้ำหล่อเลี้ยงให้เกิดความชุ่มชื้นแก่ร่างกาย ผลคือทำให้อวัยวะบางแห่งของร่างกายเกิดอาการไม่สบายต่างๆ จากการขาดน้ำหล่อเลี้ยงนี้ เช่น การขาดน้ำลายทำให้ปากแห้ง ขาดน้ำตาทำให้ตาแห้งและไม่สบายตา เป็นต้น TRIM21 ถูกระบุว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด

โรค Sjogren's Syndrome และ SLE เนื่องจาก anti-TRIM21 ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ และระดับของโปรตีน TRIM21 เพิ่มขึ้นในเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (Peripheral Blood Mononuclear Cell -PBMC) ของผู้ป่วย (Adachi *et al.*, 1995; Espinosa *et al.*, 2006; Rhodes *et al.*, 2002)

### 1.2.3 การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง FADD & TRIM21 กับผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity)

จากที่กล่าวมาแล้วว่าการสร้างไซโตไคน์ เช่น type I IFN จำเป็นต่อ innate immunity ดังนั้นการมี cytokine ไม่เพียงพอทำให้เจ้าบ้านติดเชื้อได้ง่ายขึ้น แต่ถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดการอักเสบขึ้นได้ จึงต้องมีการควบคุมอย่างรัดกุม จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า Tripartite motif-containing 21 (TRIM21) มีผลต่อความเสถียรภาพของ interferon regulatory factor 7 (IRF7) การ overexpression ของ FADD ส่งผลให้ ubiquitination activity ของ TRIM21 เพิ่มขึ้น ทำให้ IRF7 ซึ่งเป็นซับสเตรทตัวหนึ่งของ TRIM21 ถูกเติมหมู่ ubiquitin นำไปสู่การทำลาย IRF7 ผ่านทาง proteasome complexes ซึ่ง IRF7 เป็น transcription factor ที่จำเป็นต่อการแสดงออกของ IFN- $\alpha$  gene เมื่อปริมาณของ IFN- $\alpha$  ลดลง ทำให้ประสิทธิภาพของการกำจัดและป้องกันไวรัสที่บุกรุกเซลล์ตกต่ำลง (Young *et al.*, 2011)

ในการทดลองของ Young และคณะในปี 2011 พบว่ามีการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง FADD และ TRIM21 ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* โดย TRIM21 และ FADD ทำงานร่วมกันในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immunity) และยังไม่ทราบว่าแน่ชัดว่าโปรตีนทั้งสองจับกันได้อย่างไร โดย FADD ใช้กรดอะมิโนลำดับที่ 74 ช่วยในการสร้างปฏิสัมพันธ์กับ TRIM21 การ mutate D74A ใน DED ของ FADD ทำให้ระดับการเกิดปฏิสัมพันธ์ต่ำ เป็นไปได้ว่าปฏิสัมพันธ์นี้ต้องการตัวแปรอื่นด้วย และในการทดลองพบว่า TRIM21 ที่ขาด B30.2 domain ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ FADD ได้ ทางผู้วิจัยสรุปว่า FADD และ TRIM21 ทำงานร่วมกันในการควบคุมในทาง negative regulation ส่วนท้ายของ IFN- $\alpha$  pathway ในการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส (Young *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2005) ดังนั้น B30.2 จำเป็นแต่ไม่ทราบว่าเพียงพอหรือไม่ในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ FADD และการใช้เพียง DED ของ FADD สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์นี้ได้หรือไม่

ซึ่ง FADD เกิดปฏิสัมพันธ์กับ TRIM21 เพื่อ down regulate การสร้างไซโตไคน์ ในขณะที่ TRIM21 นั้นมี negative feedback loop เพื่อควบคุมปริมาณ inflammatory cytokines การลด TRIM21 ทำให้ปริมาณของ pro-inflammatory cytokines มากขึ้นและเพิ่มการตอบสนองต่อการแสดงออกของ IFN- $\alpha$  นอกจากนี้พบว่า TRIM21 เกี่ยวกับการ proteolysis ของแอนติบอดี

การควบคุม TRIM21, FADD และ TRAF6 ที่เป็นจุดเริ่มต้นของ inflammatory cytokines ส่งผลต่อ IFN ด้วย

จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่า ทั้ง FADD และ TRIM21 ต่างก็เป็นโปรตีนที่มีความสำคัญ และมีหน้าที่ที่น่าสนใจ ไม่ว่าจะเป็นหน้าที่ต่อกระบวนการ apoptosis การเจริญแบ่งตัวของเซลล์ของ FADD หรือหน้าที่ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสของ TRIM21 เมื่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสองก่อให้เกิดหน้าที่และความสามารถที่มากขึ้นจากการทดลองของ Young และคณะ ในปี 2011 ที่พบว่า DED domain ของ FADD สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ TRIM21 ที่มีส่วนของ CC และ B30.2 domain ได้ และ หากขาด B30.2 domain ปฏิสัมพันธ์นี้จะเกิดขึ้นไม่ได้ (Young, *et al.*, 2011) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาตำแหน่งโดเมนของการเกิดปฏิสัมพันธ์ให้มากขึ้นว่า B30.2 domain มีจำเป็นและเพียงพอต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์หรือไม่ เป้าหมายในระยะยาวของงานวิจัยนี้คือการที่สามารถเข้าใจความความสัมพันธ์และหน้าที่ของโปรตีนทั้งสองเนื่องจากหน้าที่อันหลากหลาย อันจะเป็นความรู้พื้นฐานในการป้องกันและรักษาการติดเชื้ออาร์เอ็นเอไวรัส เพื่อสุขภาพที่ดีของมนุษย์ต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน TRIM21 และ FADD
2. เพื่อศึกษาความจำเพาะและเพียงพอของ B30.2 domain จากโปรตีน TRIM21 ในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน FADD

## บทที่ 2

### 2.1 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต, ประเทศ
Absolute ethanol	Labscan, ไทย
Ammonium persulfate	MERCK, ไทย
Ampicillin	รพ.สงขลานครินทร์, ไทย
Arabinose	Biobasic, ไทย
Benzamide	Across organics, ไทย
Betaine	Biobasic, ไทย
Bovine serum albumin	NEB, ไทย
Butanol	Labscan, ไทย
Chloramphenicol	รพ.สงขลานครินทร์, ไทย
Carboxy methyl cellulose	SIGMA, ไทย
Cobalt chloride hexahydrate acs	MP Biomedical, ไทย
Complete Protease Inhibitor	Roche, ไทย
Coomassie brilliant blue R-250	SIGMA, สิงคโปร์
Dextrose	Fluka, ไทย
Deoxynucleotide-5'-triphosphate	AMRESCO, ไทย
$\alpha$ -Desthiobiotin	SIGMA, ไทย
Diatomaceous earth non-washed, Sio4 appear 90%	SIGMA, ไทย
DNA Ladder 100 bp plus	NEB, RBC, ไทย
Dithiothreitol (DTT)	Promega, ไทย
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, ไทย
Tween 20	Labscan, ไทย
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	MERCK, ไทย

ECL Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase-Linked	GE Healthcare, ไทย
ECL Anti-Rabbit IgG	GE Healthcare, ไทย
Enhance Chemiluminescent (ECL)	Thermo Scientific, ไทย
Ethylene diamine dihydrochloride	Biobasic, ไทย
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	MERCK, ไทย
Fetal bovine serum	Gibco, ไทย
Glutathione Sepharose™ 4B	GE Healthcare, ไทย
Guanidine hydrochloride	SIGMA, สิงคโปร์
Human embryonic kidney cell HEK293T cell	ATCC# CRL-11268, USA
2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid	Acros organics, ไทย
Imidazole	Fisher Scientific, ไทย
Isopropanol	Labscan, สิงคโปร์
Isopropylthio-β-galactosidase (IPTG)	Biobasic, ไทย
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, ไทย
β-mercaptoethanol	BDH biochemical, ไทย
ANTI-FLAG® M2 Monoclonal antibody	SIGMA, สิงคโปร์
<i>N,N'</i> -methylene-bis-acrylamide	SIGMA, สิงคโปร์
<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-1,2-diaminoethane (TEMED)	Fluka, ไทย
Non-fat milk	SIGMA, สิงคโปร์
Octyl phenoxy polyethoxy ethanol-40 (Nonidet P-40)	Biobasic, ไทย
Peptone	HIMEDIA, ไทย
Phenol reagent	AMRESCO, ไทย
Ponceau S sodium salt	SIGMA, สิงคโปร์
Prestained molecular weight marker	NEB, BioRAD, ไทย
Protein A bead	Thermo Scientific, ไทย
Protein molecular weight marker	GE Healthcare, ไทย



Rabbit polyclonal to HA tag – CHIP Grade	Abcam, ไทย
Rabbit polyclonal to 6xHis tag – CHIP Grade	Abcam, ไทย
Sodium azide	Labscan, ไทย
Sodium fluoride	MERCK, ไทย
Sodium orthovanadate	Biobasic, ไทย
Sorbitol	Biobasic, ไทย
<i>Sterp</i> -tactin Sepharose	IBA, สหรัฐอเมริกา
Supersignal west Pico chemiluminescent substrate	Thermo Scientific, ไทย
TALON <sup>®</sup> Metal Affinity resin	Clontech, ไทย
Triton X-100	SIGMA, ไทย
TransIT <sup>®</sup> -LT1 Transfection Reagent	Mirus, สหรัฐอเมริกา
TE (Tris-EDTA)	AMRESCO, ไทย
Tryptone	HIMEDIA, ไทย
Trysin/EDTA	invitrogen, ไทย
Yeast extract	Labscan, ไทย

Enzyme and restriction enzyme
-------------------------------

Restriction enzymes	NEB, สหรัฐอเมริกา
Ribonuclease A, Bovine Pancreas (RNase A)	USBiological, สหรัฐอเมริกา
Polynucleotide kinase	NEB, สหรัฐอเมริกา
<i>Pfu</i> DNA polymerase	จาก ดร.เดชา เสริมวิทย์วงศ์
T <sub>4</sub> DNA ligase	NEB, สหรัฐอเมริกา และจาก ดร.เดชา เสริมวิทย์วงศ์

อุปกรณ์การทดลอง	รุ่น บริษัทผู้ผลิต
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ	ES315 TOMY
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	AB204-S METTLER TOLEDO
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	PG5002-S METTLER TOLEDO
เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis system)	Mupid
ไมโครออโตปิเปตพร้อมทิป ขนาด 0.2-10, 2-20, 10-100, 100-1000 $\mu$ l	
เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง	Avanti™ J-30 Beckman
ตู้ปลอดเชื้อ Class 2 Type A2	ESCO
เครื่องผสมสาร Vortex-mixer	GENESYS
อ่างน้ำรับอุณหภูมิ	EcoTempTW20 JUIlabo
เครื่องแก้วพื้นฐาน (โถรงบด กระบอทดวง ขวดรูปชมพู่ ปีกเกอร์ หลอดทดลอง เป็นต้น)	
จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร	
อุปกรณ์พลาสติกสำหรับ cell culture	
ชิ้นโลหะและชิ้นพลาสติกสำหรับตัดสาร	
CO <sub>2</sub> water Jacketed incubator	IR AUTOFLOW NUAIRE
Gel Document	BioDoc-It™ system UVP
Microcentrifuge	Mikro 200R Hettich zentrifugen
Orbital shaking incubator	Thermo electron corporation
pH meter	713pH Metrohm
Polyacrylamide gel electrophoresis	ATTO
Semi-dry blotting transfer	ATTO
Spectrophotometer	8453 HEWLETT PACKARD
Spectrophotometer	Genesys 20Thermo Scientific
Sonicator	VCX130 vibra cell™ (tip รุ่น 130-0438)
Thermal cycler	Mycycler BIORAD

## 2.2 การโคลนยีน hFADD และ hTRIM21

### 2.2.1 การเตรียม Bacterial competent cells

เริ่มจากการนำเซลล์มา streak (streak) ลงบนอาหารแข็ง TYE (1% Bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 0.8% NaCl, 1.5% agar) และผสมยาปฏิชีวนะตามความจำเป็น บ่มที่ 37°C 12-16 ชั่วโมง เชื้อเชื้อ 1 โคโลนีลงเลี้ยงในอาหารเหลว 2xTY (1.6% Bacto-tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl) 50 ml เชื้อที่อุณหภูมิ 28°C 220 รอบต่อนาที ประมาณ 3-4 ชั่วโมง ติดตามความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm ให้ได้ประมาณ 0.4 ใส่อาหารเหลวใสในอาหารเหลวขวดใหม่ 50 ml ที่เติม competent cell salt solution (0.44 M MgCl<sub>2</sub>, 0.44 M MgSO<sub>4</sub>, 0.11 M KCL) 1.1 ml ให้มีความเข้มข้นเซลล์สุดท้ายมีค่า OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.04 เพื่อใช้เป็นตัวตั้งต้นเลี้ยงที่ 18°C 220 รอบต่อนาที ประมาณ 20 ชั่วโมง ติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์จากความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 nm จนกระทั่ง OD<sub>600</sub> เท่ากับ 0.4 นำภาชนะเลี้ยงเซลล์แช่ในน้ำแข็งหรือ 4°C 10 นาที เก็บเซลล์ด้วยการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 2000 รอบต่อนาที 10 นาที เทอาหารเลี้ยงทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย transformation buffer (FB) (10 mM PIPES, 250 mM KCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub> pH 6.7) ซึ่งผ่านการทำให้เย็นแล้ว 30 ml ที่ทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 10 นาที ปั่นเก็บเซลล์อีกครั้งที่ความเร็วและเวลาเดิม แล้วจึงละลายตะกอนด้วย FB 8 ml จากนั้นค่อยๆ หยด 100% DMSO 0.6 ml ในสารละลายเซลล์ใน FB พร้อม ๆ กับการหมุนหลอดเซลล์เพื่อป้องกันไม่ให้ความเข้มข้นต่อพื้นที่ของ DMSO มากเกินไป เนื่องจากความเป็นพิษอาจส่งผลต่อคุณภาพของคอมพิเทนท์เซลล์ได้ แบ่งบรรจุลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดละ 100 และ 200 µl ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บไว้ที่ -80°C จนกว่าจะทำการทดลองต่อไป ส่วน JM109/Chap ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เกิดจากการที่ย้าย chaperone plasmid pG-KJE8 (TaKaRa) เข้าสู่เซลล์ *E.coli* JM109 ก่อนแล้วจึงนำเซลล์ที่มีพลาสมิดนี้มาเตรียมเป็นเซลล์เจ้าบ้านต่อไป

### 2.2.2 การเตรียม vector/insert

การวิจัยในครั้งนี้ทำทั้งใน *in vitro* และ *ex-vivo* จึงต้องใช้ expression vector ต่างชนิดกัน โดยในแบคทีเรียใช้พลาสมิด pST50Trc1 สำหรับยีน hFADD, pST50Trc2 สำหรับ hTRIM21 และ pST44 ซึ่งเป็น co-expression vector สำหรับแบคทีเรีย พลาสมิดเหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Song Tan แห่ง The Pennsylvania State University ส่วนการทดลองใน *Ex-vivo* ซึ่งเป็นการทดลองในระบบ tissue culture ใช้พลาสมิด pCI และ pcDNA3

โดยได้รับการอนุเคราะห์พลาสมิด pCI vector, pCI-hFADDHisFlag และ pCDNA3-HAhTRIM21 จาก Prof. Dr. Astar Winoto แห่ง University of California at Berkley

ทำการย่อยเวกเตอร์ดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยวเส้นตรงด้วย restriction enzyme ที่เหมาะสมกับ insert ดีเอ็นเอที่ต้องการ ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วย พลาสมิด 3 µg, 1x NEBuffer, 3 µg BSA, 0.1 mM DTT, 15 U restriction enzyme ในปริมาตรทั้งหมด 30 µl บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนกรณีที่มีการใช้ restriction enzyme สองชนิด หรือ double digestion นั้นทำได้พร้อมกันโดยเลือกชนิดบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมตามการแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ยกเว้นในกรณีที่เลือกใช้ BamHI - NgoMIV, BamHI - BsrGI หรือ XbaI - BglII จะต้องย่อยทีละชนิด (sequential digestion) ตามตารางต่อไปนี้

### ตารางที่ 2.1 แสดงการทำ double digestion

Enzyme to use	Digest 1	Digest 2
BamHI & NgoMIV	digest with NgoMIV in NEBuffer 4 for 90 min	Add 150 mM NaCl and BamHI for 90 min
BamHI & BsrGI	digest with BsrGI in NEBuffer 2 for 90 min	Add 100 mM NaCl and BamHI for 90 min
XbaI & BglII	digest with XbaI in NEBuffer 2 for 90 min	Add 50 mM NaCl and BglII for 90 min

จากนั้นตัดแยกส่วนของ vector ที่ต้องการด้วยการทำ agarose gel electrophoresis ตามข้อ 2.2.3 และ gel purification ข้อ 2.2.4

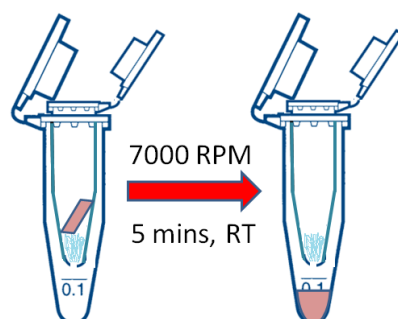
### 2.2.3 การทำ agarose gel electrophoresis

การทำ agarose gel electrophoresis เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองทางอณูชีววิทยาเพื่อทดสอบความเหมือน การแยก หรือการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ โดยการเตรียม agarose 1.5 % ใน TAE buffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA) ด้วยขวดรูปชมพูให้ความร้อนจนละลายได้ทั่วกันทิ้งให้เย็นตัวเล็กน้อยก่อนเทลงในถาดเจล เมื่อเจลแข็งพร้อมใช้งาน นำตัวอย่างที่ต้องการมาผสมกับ 6x gel loading buffer (60% Glycerol, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 60 mM EDTA, 0.03% Bromophenol Blue, 0.03% Xylene Cyanol) หยอดตัวอย่างลงในเจลและแยกขนาดดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้าใน TAE buffer กำหนดความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เสร็จแล้วนำมาแช่ในสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 10 µg/ml 3

นาที่ ล้างในน้ำกลั่น 25 นาที จึงนำไปส่องภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Document (BioDoc-It™ system) หรือ UV box เพื่อตรวจสอบความถูกต้องหรือตัดแยกดีเอ็นเอเพื่อทำบริสุทธิ์ต่อไป โดยเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder หรือ 2 log DNA marker

#### 2.2.4 การทำ gel purification

หลังจากการทำ agarose gel electrophoresis ตัดแยกส่วนของ vector ภายใต้แสงยูวีใส่ในสปีนคอลัมน์ (spin column) ที่ถูกเจาะรูและมี glass wool เตรียมไว้บนที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เจลจะถูกดึงผ่าน glass wool ลงมาและได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารละลายใสพร้อมใช้สำหรับการทดลองต่อไป ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ภาพแสดงสปีนคอลัมน์ที่เตรียมขึ้นจากหลอดทดลองขนาด 0.5 และ 1.5 ml โดยแสดงภาพก่อนและหลังการปั่นตกที่ขึ้น agarose gel ถูกดึงผ่าน glass wool ได้เป็นสารละลายที่กั้นหลอดทดลอง

#### 2.2.5 การเตรียมขึ้นดีเอ็นเออินสำหรับ hFADD และ hTRIM21

การทดลองครั้งนี้ได้ออกแบบ primer เพื่อการทำ PCR หรือเพื่อเป็น tag ซึ่งจะช่วยในกระบวนการทำบริสุทธิ์โปรตีน ตารางต่อไปนี้จะแสดง primer ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 2.2 แสดง primer พร้อมตำแหน่งที่ใช้ในการทดลอง

Primer name	Sequence	Description
DS001- HisSTR	CCGGCCATCATCATCATCA CAGCAGCTGGTCTCATCCGA GTTTGAAAATAAT	top strand primer to create C-terminal HisSTR tags between NgoMIV and BsrGI sites in pST50Trc1 vector
DS002- HisSTR	GTACATTATTTTCAAAGTGGG ATGAGACCAGCTGCTGTGATGA TGATGATGATGG	bottom strand primer to create C-terminal HisSTR tags between NgoMIV and BsrGI sites

Primer name	Sequence	Description
DS003-HAHis	TATGTACCCGTATGACGTCCCG GATTACGCACATCATCATCATC ATCACG	top strand primer to create N-terminal HA-His tandem tags between NdeI and BamHI sites in pST50Trc2 vector
DS004-HAHis	GATCCGTGATGATGATGATGAT GTGCGTAATCCGGGACGTCATA CGGGTACA	bottom strand primer to create N-terminal HA-His tandem tags between NdeI and BamHI sites in pST50Trc2 vector
DS007-hFADD	GGCCAATTCATATGGACCCGTT CCTGGTGCT	forward primer to PCR amplify hFADD to create pST50Trc1-hFADDHisSTR and attach 5' NdeI restriction site
DS008-hFADD	CAGCCGGCAGACGCTTCGGAG GTAGAGACGCTTCGGAGGTAG ATGCG	reverse primer to PCR amplify hFADD to create pST50Trc1-hFADDHisSTR and attach 3' NgoMIV restriction site
DS009-hTRIM21	CCTAGATCTGCTTCAGCAGCAC GCTTGAGCTAGTGGATCCTTGT GATCC	Forward primer to PCR amplify hTRIM21 to create pST50Trc2-HAhTRIM21 and pST50Trc2-HAHishTRIM21 vector and attach 5' BglII restriction site
DS010-hTRIM21	CGCTGTACATCAATAGTCAGTG GATCCTTGTGATCC	Reverse primer to PCR amplify hTRIM21 to create pST50Trc2-HAhTRIM21 and pST50Trc2-HAHishTRIM21 vector and attach 3' BsrGI restriction site
DS018-hTRIM21	CCGAGATCTGGGCTGAAGAAG ATGCTGAG	Forward primer to PCR amplify hTRIM21(276-475) and attach 5' BglII restriction site
DS019-hTRIM21	AGCAGGAGTTGGCTGAGAAG	Forward sequencing primer for hTRIM21 at 465 bp
DS020-hFADD	CAGCCGGCTTCTCCCCAGCG CGGCC	Reverse primer to PCR amplify hFADD1(2-95) to create pST50Trc1-hFADDHisSTR $\Delta$ 1 and attach 3' NgoMIV restriction site
DS021-HA	TATGTACCCGTATGACGTCCCG GATTACGCAG	top strand primer to create N-terminal HA tags between NdeI and BamHI sites in pST50Trc2 vector

Primer name	Sequence	Description
DS022-HA	GATCCTGCGTAATCCGGGACGT CATACGGGTACA	bottom strand primer to create N-terminal HA tags between NdeI and BamHI sites in pST50Trc2 vector
DS025-T7	GATCCCGCGAAATTAATACGAC TCACT	Forward sequencing primer for T7 promoter
DS026-T7	TATGCTAGTTATTGCTCAGCGGT G	reverse sequencing primer for T7 promoter
DS028-hFADD	GCATTTAACGTCATTTGTGATAA TGTGGG	forward SDM primer to mutate an internal NdeI site in hFADD
DS029-hFADD	CCCACATTATCACAAATGACGT TAAATGC	reverse SDM primer to mutate an internal NdeI site in hFADD
DS032-pClrev	CACTGCATTCTAGTTGTGG	reverse sequencing primer for pCl vector
DS037-hTRIM21	CCTAGATCTGTCCACATCACTC TGGATCC	Forward primer to PCR amplify hTRIM21 (287-465) and attach 5' BglII restriction site
DS038-hTRIM21	CGCTGTACATTACAGTGGACAG AGGGTTAGAG	Reverse primer to PCR amplify hTRIM21(287-465) and attach 3' BsrGI restriction site
DS039-hFADD	CGAGTCCAAGTACCTATGCCTC G	Forward SDM primer to mutate F25 to Y25 in FADD
DS040-hFADD	CGAGGCATAGGTAAGTGGAGCTC G	reverse SDM primer to mutate F25 to Y25 in FADD
DS043-STR	CCGGCTGGTCTCATCCGCAGTT TGAAAATAAT	top strand primer to create a C-terminal STR tags construct between NgoMIV and BsrGI sites
DS044-STR	GTACATTATTTTCAAACCTGCGG ATGAGACCAG	bottom strand primer to create a C-terminal STR tags construct between NgoMIV and BsrGI sites
DS053-GST	GCGCTAGCGCCACCATGTCCC CTATACTAGGTTATTG	Forward primer to PCR amplify GST tag, KOZAK seq and attach 5' NheI restriction site
DS054-GST	GCGAATTCACGACCTTCGATCA GATC	reverse primer to PCR amplify GST tag and attach 3' EcoRI restriction site



Primer name	Sequence	Description
DS055-hTRIM21	GCGAATTCGCTTCAGCAGCAC GC	forward primer to PCR amplify hTRIM21 and attach 5' EcoRI restriction site to create pCI-GSThTRIM21
DS057-hTRIM21	GCGAATTCGCTGCACAGGAGT ACC	forward primer to PCR amplify hTRIM21 (131-475) and attach 5' EcoRI restriction site to create pCI-GSThTRIM21D3
DS058-hTRIM21	GCGAATTCGGGCTGAAGAAGA TGCTGA	forward primer to PCR amplify hTRIM21 (276-475) and attach 5' EcoRI restriction site to create pCI-GSThTRIM21 $\Delta$ 1
DS056-hTRIM21	CCGGTACCTCAATAGTCAGTGG ATCCTTG	reverse primer to PCR amplify hTRIM21 and attach 3' KpnI restriction site
DS059-pCI	CTCTTTGCGTTTCTGATAGG	Forward sequencing primer for pCI vector (108 bp upstream of NheI )
DS060-pCI	TGCAGCTTATAATGGTTACAAAT	reverse sequencing primer for pCI vector (108 bp downstream of KpnI )
DS068-HAtagN	CTAGCGCCACCATGTACCCATA TGACGTCCCAGATTACGCAG	Top strand primer to create an N-terminal HA tag (NheI Kozak sequence, start codon, HA tag and EcoRI site)
DS069-HAtagN	AATTCTGCGTAATCTGGGACGT CATATGGGTACATGGTGGCG	Bottom strand primer to create an N-terminal HA tag (NheI, Kozak sequence, start codon, HA tag and EcoRI site)
DS088-hTRIM21	GCGGTACCTTATGGCACATGGC ACACA	Reverse primer to PCR amplify hTRIM21 $\Delta$ 4(131-275) and attach 3' KpnI restriction site to create pCI-HAhTRIM21 $\Delta$ 4
DS089-hTRIM21	GCGAATTCGTGCAGCAAAAAA CTTCCTG	Forward primer to PCR amplify hTRIM21 $\Delta$ 5(183-475) and attach 5' EcoRI restriction site to create pCI-HAhTRIM21 $\Delta$ 5
DS091-yGcn4	CGGAATTCAGAATGAAACA TGAAGACAAGG	Forward primer to PCR amplify the CC domain of yGcn4 and attach 5' EcoRI restriction site

Primer name	Sequence	Description
DS092-yGcn4	CCGGTACCGCGTTTCGCCAACT AATTTCT	Reverse primer to PCR amplify the CC domain of yGcn4 and attach 3' KpnI restriction site
DS093-yGcn4	GCGCTAGCTCCGAATATCAGCC AAGTTTA	Forward primer to PCR amplify yGcn4 and attach 5' NheI restriction site
DS094-hTRIM21	GCGGTACCGGGCTGAAGAAGA TGCTGA	Forward primer to PCR amplify hTRIM21 and attach 5' KpnI restriction site to create pCI-HAyCChTRIM21 $\Delta$ 1
DS095-hTRIM21	CCTCTAGATTAATAGTCAGTGG ATCCTTGTG	Reverse primer to PCR amplify hTRIM21 and attach 3' XbaI restriction site to create pCI-HAyCChTRIM21 $\Delta$ 1

### 2.2.6 การเตรียม insert ดีเอ็นเอด้วยการทำ polymerase chain reaction (PCR)

เนื่องจากการทดลองนี้มีการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน hFADD และ hTRIM21 ที่โดเมนต่างๆ เช่น pST50Trc2-HishTRIM21 $\Delta$ 1(276-475) และ pST50Trc2-HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) จึงใช้ปฏิกิริยาถูกใส่พอลิเมอเรส หรือ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยเตรียม mastermix ในอัตราส่วนต่อไปนี้

1. สำหรับ 1 ปฏิกิริยา = 100  $\mu$ l ประกอบด้วย 1x *Pfu* buffer, 0.25 mM dNTP, 0.5  $\mu$ M forward และ reverse primer, 10 ng ของดีเอ็นเอตั้งต้น, *Pfu* polymerase 2  $\mu$ l

2. ผสมให้เข้ากันนำเข้าเครื่อง Thermo Cycler โดยกำหนด condition ดังนี้

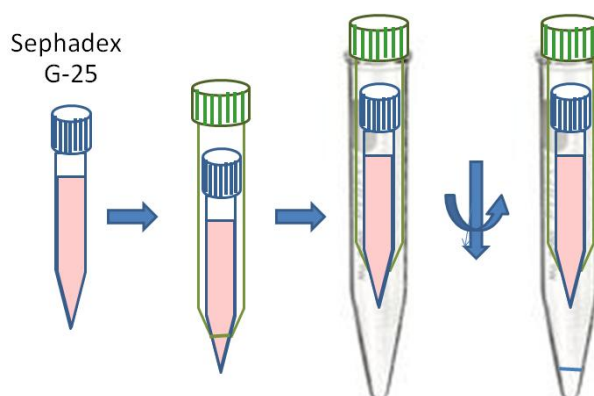
ก. Initial denaturation	95°C	2 นาที	1 รอบ
ข. Denatured temperature	95°C	30 วินาที	5 รอบ
Annealing temperature	Tm-5°C	30 วินาที	
Extension temperature	75°C	1 นาที/Kb	
ค. Denatured temperature	95°C	30 วินาที	20 รอบ
Annealing temperature	58°C	30 วินาที	
Extension temperature	75°C	1 นาที	
ง. Extension temperature	75°C	3 นาที	1 รอบ
จากนั้นเครื่องจะลดอุณหภูมิลงที่	10°C	$\infty$	

ในการสร้างดีเอ็นเอแต่ละครั้งอาจใช้ annealing temperature (Ta) ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับ ค่า melting temperature (Tm) ของ primer คู่ นั้น ๆ

3. ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วย agarose gel electrophoresis 1.5% (w/v) และย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 100 bp DNA ladder (NEB) และอ่านผลด้วย Gel Document

### 2.2.7 การเติมหมู่ฟอสเฟตให้ oligo DNA

เป็นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับปลาย 5'-OH ของ oligo DNA ทั้งสายบนและล่าง ใช้หลอดขนาด 1.5 ml 2 หลอด โดยแต่ละหลอดมีส่วนประกอบดังนี้ 1x T4 DNA ligase buffers (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM DTT) 1 µM oligo 1 หรือ oligo 2 และ 5 unit T4 PNK ในปริมาตรทั้งหมด 20 µl บ่มที่ 37 °C 15 นาที นำสารละลายทั้งสองหลอดมารวมกันเพิ่ม 10x TM buffer (100 mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM MgCl<sub>2</sub>) 10 µl เพิ่มน้ำ MilliQ 50 µl ให้ความร้อนเป็นเวลา 2 นาที ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90 °C ในบีกเกอร์ จากนั้นปิดบีกเกอร์และทิ้งข้ามคืนเพื่อให้อุณหภูมิเย็นลงช้า ๆ วันถัดไปทำการสกัดด้วย phenol chloroform ตามข้อ 2.2.8 ซึ่งขั้นตอนสุดท้ายของการทำบริสุทธิ์ annealed oligos ต้องทำการผ่านคอลัมน์ Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia Biotech) ที่เตรียมจาก micropipette tip ขนาด 1 และ 5 ml ในหลอดทดลองขนาด 15 ml (ยี่ห้อ Corning เท่านั้นเพื่อป้องกัน 5 ml tip ติดค้างในหลอดทดลอง) ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ภาพแสดงคอลัมน์ Sephadex G-25 จาก micropipette tip ขนาด 1 และ 5 ml ในหลอดทดลองขนาด 15 ml

### 2.2.8 การทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอด้วย phenol chloroform

เตรียมสารละลาย Phenol ที่อิ่มตัวด้วย TE จากนั้นผสมกับ CIA (chloroform-isoamyl alcohol โดยที่ chloroform:isoamyl alcohol=24:1) ในอัตราส่วน 1:1 ให้เป็น PCIA ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย Vortex Mixer 30 วินาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ผสมกับสารละลายดีเอ็นเอในปริมาตรเท่ากัน เขย่าด้วยเครื่อง vortex-mixer 30 วินาที แล้วหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นสารละลายที่ความเร็วและเวลาเดิม แยกสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่โดยระวังไม่ให้ปนเปื้อนตะกอนขาวของโปรตีนหรือเศษเซลล์ นำสารละลายใสผสมกับสารละลาย PCIA ในปริมาตรเท่ากันอีกครั้ง จากนั้นเขย่าให้สารแตกตัวและกระจายแล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วและเวลาเดิม เก็บส่วนใสด้านบน ทำซ้ำอีกครั้งด้วย CIA เก็บสารละลายส่วนบนซึ่งมีผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์พร้อมสำหรับการทดลองต่อไปหรือนำไปตกตะกอนด้วยเอทานอลเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น

### 2.2.9 การตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตกตะกอนใส่ 3M sodium acetate, pH 5.2 ในปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลาย จากนั้นเติม 100% เอทานอล 2.5 เท่าของปริมาตรเดิม ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex 10 วินาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ดูดสารละลายใสทิ้งให้หมด ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที จึงละลายด้วยน้ำ MilliQ หรือ TE buffer (10mM Tris, 0.1mM EDTA) ประมาณ 300  $\mu$ l.

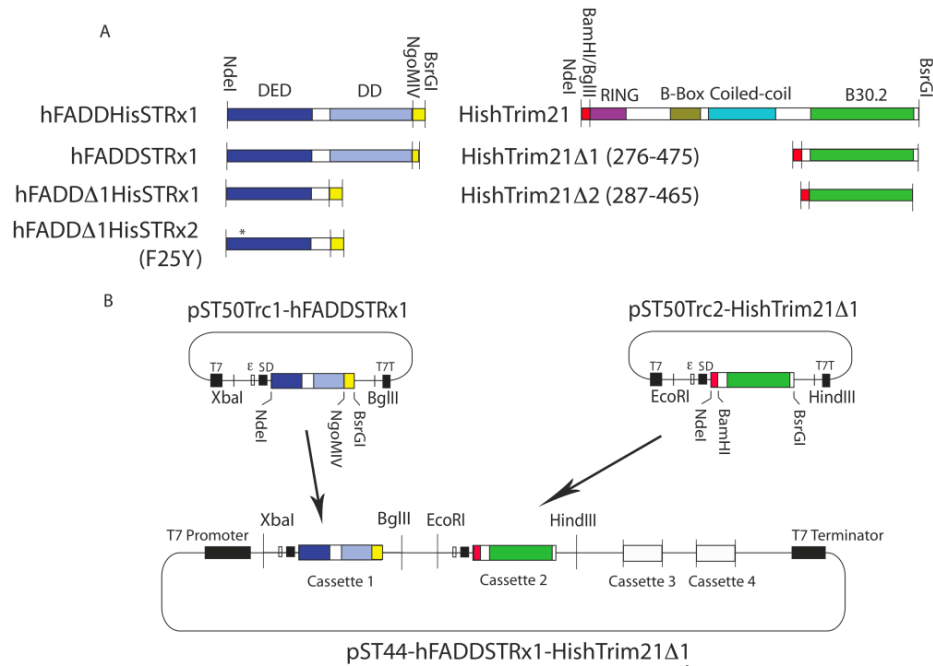
### 2.2.10 การเพิ่มขึ้น insert ด้วย oligo nucleotide

การวิจัยนี้จำเป็นต้องมีการสร้าง insert ดีเอ็นเอของโปรตีน FADD และ TRIM21 ตามขนาดและตำแหน่งที่ต้องการ รวมทั้งการเติมโอลิโกนิวคลีโอไทด์เพื่อทำหน้าที่เป็น tag เพื่อช่วยในการทำบริสุทธิ์หรือการตรวจสอบโปรตีนด้วย Western blot (ข้อ 2.5.8) ซึ่ง insert ที่สร้างขึ้นจะสามารถเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ที่มีอยู่ใน FADD ได้มีการเติม tag ทางปลาย C เช่น STR tag โดยการสร้าง oligonucleotides สายสั้น ๆ (DS043-STR, DS044-STR) ดังตารางที่ 2.2 และทำการเชื่อม double stranded oligos ทั้งสองเข้าระหว่าง NgoMIV- BsrGI restriction sites ส่วน TRIM21 จะเติมทางปลาย N โดยการใส่ DS021-HA, DS022-HA เพื่อสร้าง hemeagglutinine (HA) tag เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับชิ้นยีน TRIM21 และพลาสมิดเวกเตอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 นอกจากนี้ยังมีการสร้าง vector ที่มี HisSTR tag (6xHis tag เชื่อมกับ Strep-tag II (STR) tag) ซึ่ง

6xHis tag หรือ *Strep-tag II* (NH<sub>2</sub>-WSHPQFEK-COOH) เป็นสายเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กไม่ขัดขวางการพับม้วนของโปรตีน โดยการเชื่อม double stranded oligos DS001-HisSTR, DS002-HisSTR ระหว่างตำแหน่ง NgoMIV และ BsrGI ซึ่งจะได้ pST50Trc1-HisSTR plasmid บนปลาย C

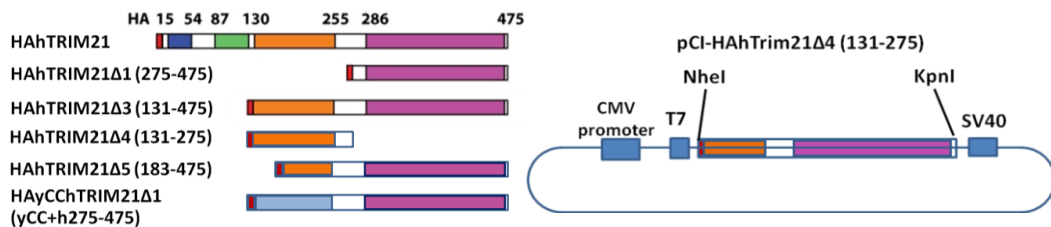
### 2.2.11 การสร้าง insert จากพลาสมิด

การทดลองนี้ใช้ vector pST50Trc1 และ c2 ซึ่งมีตำแหน่งที่สามารถเติม tag ได้ทางปลายด้าน C เนื่องจากมีลำดับเบสของ His tag อยู่แล้วใน pST50Tr ในการสร้าง รีคอมบิแนนท์ยีนที่มี His tag ทางปลาย N ทำได้โดยโคลนยีนที่สนใจเข้าระหว่าง 5'-BamHI และ 3'-NgoMIV BamHI/HindIII site ของ pST50Tr vector หากยีนที่สนใจมีตำแหน่งตัดจำเพาะของ restriction enzyme ที่ใช้สามารถแก้ปัญหาโดยการทำ site-directed mutagenesis (SDM) เพื่อเปลี่ยนลำดับเบสโดยที่ไม่เปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโน การทดลองนี้สร้าง pST50Trc2-HishTRIM21, pST50Trc2-HishTRIM21 $\Delta$ 1(276-475) และ pST50Trc2-HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) และจากพลาสมิด pST50Trc1-HisDHFR plasmid สามารถโคลนยีนที่ต้องการเข้าระหว่าง 5'NdeI หรือ BamHI และ 3'NgoMIV เพื่อให้ได้ส่วน construct ที่มี FADD (ปกติ NdeI จะไม่ใช้เพื่อ sub cloning ยกเว้นในกรณีที่ gene มี BamHI internal sites) อาทิ เช่น pST50Trc1-hFADDHisSTRx1 (x1 แสดงถึง mutate NdeI restriction site ใน hFADD) pST50Trc1-hFADD $\Delta$ 1HisSTRx1 และ pST50Trc1-hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2 (x2 แสดงถึง F25Y mutation ใน DED ของ FADD) ดังที่แสดงในรูปที่ 2.3 และตารางที่ 2.3



**รูปที่ 2.3** แสดงโครงสร้างของ (A) insert รวมทั้ง (B) expression และ co-expression plasmid ที่ใช้ในการทดลองในแบคทีเรีย (Waji, *et al.*, 2011)

ส่วนใน tissue culture ที่ใช้ HEK293T cells ซึ่งเป็น mammalian cell lines ต้องใช้พลาสมิดที่ต่างไป คือ pCI vector โดยใส่ GST tag ลงไปในระหว่าง 5'NheI และ 3'EcoRI ของ pCI vector เพื่อสร้าง pCI-GST construct และการโคลน hTRIM21 สามารถทำได้ โดยการตัด pCI-GST ด้วย 5' EcoRI และ 3' KpnI และเชื่อมต่อ (ligate) กับชิ้น PCR amplified hTRIM21 ที่มีความยาวต่างๆ ซึ่งได้ pCI-GSThTRIM21 รวมทั้ง pCI-GSThTRIM21Δ3(131-475) และ pCI-GSThTRIM21Δ1(276-475) อีกทั้งสร้างพลาสมิด pCI-HAhTRIM21Δ1(276-475), pCI-HAhTRIM21Δ3(131-475), pCI-HAhTRIM21Δ4(131-275), pCI-HAhTRIM21Δ5(183-475) และ pCI-HAyCCChTRIM21Δ1 ดังแสดงในรูปที่ 2.4 และตารางที่ 2.3 เพื่อใช้ในการหาตำแหน่งที่จำเป็นของการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง



**รูปที่ 2.4** แสดงตัวอย่างโครงสร้างของ insert และ plasmid ที่ใช้สำหรับการทดลองใน tissue culture

ตารางที่ 2.3 แสดงรายการพลาสมิดที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้

รายการพลาสมิดที่สร้างขึ้น ในงานวิจัยครั้งนี้	คุณสมบัติ
pST50Trc1-hFADDHisSTRx1	x1 แสดงถึงการเอา NdeI ออกจาก hFADD เส้นเต็ม มีการเติม 6x-Histidine (His) กับ Streptavidine (STR) tag ที่ปลาย C
pST50Trc1-hFADD $\Delta$ 1HisSTR x2	x2 แสดงถึง F25Y ใน DED domain ของ hFADD ( $\Delta$ 1) และมีการเติม 6x-Histidine (His) กับ Streptavidine (STR) tag ที่ปลาย C
pST50Trc2-HishTRIM21	hTRIM21 เส้นเต็ม และ 6x-Histidine (His) tag ที่ปลาย N
pST50Trc2-HishTRIM21 $\Delta$ 1(276-475)	B30.2 domain และส่วนสายเปปไทด์ขนาด 10 aa ก่อน B30.2 domain ของ hTRIM21 และ 6x-Histidine (His) tag ที่ปลาย N
pST50Trc2-HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475)	B30.2 domain ของ hTRIM21 และ 6x-Histidine (His) tag ที่ปลาย N
pCI-GSThTRIM21	hTRIM21 เส้นเต็ม และ glutathione S-transferase (GST) tag ที่ปลาย N เชื่อมเข้าใน pCI vector เพื่อใช้ในงาน tissue culture
pCI-GSThTRIM21 $\Delta$ 1 (276-475)	B30.2 domain และส่วนสายเปปไทด์ขนาด 10 aa ก่อน B30.2 domain ของ hTRIM21 และ GST tag
pCI-GSThTRIM21 $\Delta$ 3 (131-475)	hTRIM21 ตั้งแต่ coiled-coil domain ถึง B30.2 domain และ GST tag
pCI-HAhTRIM21 $\Delta$ 1 (276-475),	B30.2 domain และส่วนสายเปปไทด์ขนาด 10 aa ก่อน B30.2 domain ของ hTRIM21 และ Hemagglutinine (HA) tag
pCI-HAhTRIM21 $\Delta$ 3 (131-475),	hTRIM21 ตั้งแต่ coiled-coil domain ถึง B30.2 domain และ Hemagglutinine (HA) tag
pCI-HAhTRIM21 $\Delta$ 4 (131-275),	Coiled-coil domain ของ hTRIM21 และ Hemagglutinine (HA) tag

รายการพลาสมิดที่สร้างขึ้น ในงานวิจัยครั้งนี้	คุณสมบัติ
pCI-HAhTRIM21 $\Delta$ 5 (183-475)	hTRIM21 ตั้งแต่ส่วนที่ 2 ของ coiled-coil domain ถึง B30.2 domain และ Hemagglutinine (HA) tag
pCI-HAyCChTRIM21 $\Delta$ 1	Sequence เพื่อสร้าง chimeric protein ของ TRIM21 โดยใช้ coiled-coil domain จากยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> และ B30.2 domain จากมนุษย์

### 2.2.12 การทำ ligation

เมื่อได้ชิ้นส่วนของทั้งยีนที่ต้องการและvectorที่เหมาะสมต่อการใช้แล้ว จึงทำการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอทั้งสองให้เข้ากัน โดยการใช้ T4 DNA ligase โดยมีหลอดทดลองสองหลอดสำหรับ vector กับ insert ที่สนใจ และ vector อย่างเดียวเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอแต่ละส่วนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยอัตราส่วนระหว่าง vector กับ insert เป็น 2:1.5 ในปริมาตรทั้งหมด 5  $\mu$ l ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ 1x T4 DNA ligase buffer, 0.1 mM DTT, vector 2  $\mu$ l, insert DNA 1.5  $\mu$ l, T4 DNA ligase 0.5  $\mu$ l ผสมทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิห้อง ligated DNA ที่ได้สามารถนำไปใช้ในการ transform bacterial cells ได้ทันที

### 2.2.13 การทำ site-directed Mutagenesis

เพื่อสร้าง F25Y ของ hFADD $\Delta$ 1 และ เส้นเต็ม วิธีการทำเหมือนกับการทำ PCR ทั่วไปหากแต่ใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบให้มีการเปลี่ยนแปลงบางตัว และใช้เอนไซม์ *Pfu turbo* DNA polymerase (Invitrogen) สำหรับ 1 ปฏิกริยา= 25  $\mu$ l)

1x *Pfu* buffer, 0.25mM dNTP, 2.8  $\mu$ M forward primer และ reverse primer 10 ng ของดีเอ็นเอตั้งต้น, เอนไซม์ *Pfu Turbo* polymerase (Invitrogen) 0.4  $\mu$ l

ก. Initial denaturation	95°C	2 นาที	1 รอบ
ข. Denatured temperature	95°C	30 วินาที	18 รอบ
Annealing temperature	55°C	1 นาที	
Extension temperature	68°C	1 นาที/Kb DNA	
จากนั้นเครื่องจะลดอุณหภูมิลงที่	10°C	$\infty$	



สิ่งที่ต้องคำนึงมากเป็นพิเศษคือการกำหนดอุณหภูมิและเวลาของ Extention เพื่อป้องกันการ overlap และ duplicate จากนั้นเก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ 2  $\mu$ l เป็น -DpnI แล้วนำส่วนที่เหลือมาบ่มด้วยเอนไซม์ DpnI 1  $\mu$ l ที่ 37°C 1 ชั่วโมง เป็น + DpnI เพื่อตัดสายดีเอ็นเอตั้งต้น (Parent plasmid) เนื่องจาก DpnI มีคุณสมบัติในการตัดจำเพาะสายนิวคลีโอไทด์ที่มีการเติมหมู่เมทิล (methylated DNA) ซึ่งการเติมนี้เกิดได้เฉพาะในสิ่งมีชีวิตเท่านั้น เนื่องจากแบคทีเรียที่ใช้เลี้ยงเป็น Dam methylase positive strain ทำให้ในสารละลายเหลือเพียงพลาสมิดดีเอ็นเอที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการทำ PCR จากนั้นแบ่งสารละลายดีเอ็นเอทั้งสองชุด (+DpnI และ -DpnI) ที่ผ่านการย่อยมา 2  $\mu$ l เพื่อทำการย้ายพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี heat shock transformation ตามข้อ 2.2.14 แล้วมากระจาย (spread) ลงบนอาหารแข็ง TYE ที่มีแอมพิซิลิน 100  $\mu$ g/ml บ่มที่ 37°C 16-18 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดบน TYE plate ด้วยการทำ PCR screen ตามข้อ 2.2.15 แล้วจึงเลี้ยงในอาหารเหลว 2xTYE ที่มีแอมพิซิลิน 100  $\mu$ g/ml เพื่อสกัดพลาสมิดและส่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

#### 2.2.14 Bacterial transformation

วางหลอดที่มี competent cells จาก -80°C freezer บนน้ำแข็งเพื่อให้เซลล์ละลายช้าๆ เป็นเวลาประมาณ 10 – 15 นาที จากนั้นใส่สารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อมต่อกับเอนไซม์ T4 DNA ligase แล้ว หรือใช้พลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการทำ site-directed Mutagenesis (SDM) จากข้อ 2.2.13 ในหลอดที่มีเซลล์อยู่แล้ว 50  $\mu$ l (อัตราส่วน 1:25) ผสมให้เข้ากัน บ่มต่อในน้ำแข็ง 15 นาที จึงนำเซลล์ไป heat shock ที่ 42°C 30 วินาที ให้เกิดการเสื่อมสภาพการซึมผ่านชั่วคราวของผนังเซลล์เพื่อนำพลาสมิดเข้า จากนั้นนำลงน้ำแข็งทันทีอย่างน้อย 10 วินาที ใส่อาหาร 2xTYE ปริมาตร 250  $\mu$ l บ่มเซลล์ที่ 37°C 30 นาที จึงนำเซลล์ทั้งหมดไปกระจายลงอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง TYE ที่มีแอมพิซิลิน 100  $\mu$ g/ml บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จึงเก็บเซลล์เพื่อสกัดพลาสมิดต่อไป

#### 2.2.15 การทำ PCR Screen

หลังจากการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านและเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะแล้ว จะต้องทดสอบว่าโคโลนีที่รอดชีวิตหรือขึ้นบนอาหารเหล่านั้นโคโลนีใดที่มีชิ้นส่วนของพลาสมิดที่มียีนที่ต้องการอย่างถูกต้องทั้งขนาดและตำแหน่งยีนโดยการทำ PCR screen ด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสมและให้ PCR product ประมาณ 300 – 700 bp โดยมีขั้นตอนต่อไปนี้ เลือก 8 โคโลนีต่อหนึ่ง ligation มากระจายในน้ำ MilliQ 100  $\mu$ l ที่เตรียมไว้ในแต่ละหลอด 1.5 ml เขย่า

ให้เซลล์กระจายจากนั้นเตรียมสารละลายเพื่อการ PCR screen ซึ่งใน master mixture ประกอบด้วย 1x *Pfu* buffer, 0.25 mM dNTP, 0.5  $\mu$ M forward และ reverse primer และ เอนไซม์ *Pfu* polymerase นำ reaction mixtures 19  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันกับสารละลายเซลล์ที่เตรียมไว้ 1  $\mu$ l ในหลอด PCR นำเข้าเครื่อง Thermo Cycler และให้เครื่องทำปฏิกิริยา ดังนี้

ก. Initial denaturation	95°C	2 นาที	1 รอบ
ข. Denatured temperature	95°C	30 วินาที	25 รอบ
Annealing temperature	Tm-5°C	30 วินาที	
Extension temperature	75°C	1 นาที/Kb DNA	
ค. Extension temperature	75°C	3 นาที	1 รอบ
จากนั้นเครื่องจะลดอุณหภูมิลงที่	10°C	$\infty$	

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis โดยเลือก 2 โคลนที่มีพลาสมิดที่ถูกต้องเพื่อนำไป restreak บน TYE + Amp plate แล้วค่อยเลือกหนึ่งโคลนนี้เดี่ยวมาเลี้ยงในอาหาร เพื่อทำการสกัด plasmid ต่อไป

### 2.2.16 การสกัดพลาสมิดด้วย Merlin method

เลือกโคลนเดี่ยวนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว 2xTY 50 ml เขย่าที่ 37°C 220 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ 5000 รอบต่อนาที 5 นาที ละลายตะกอนด้วย Merlin I buffer (50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, 40  $\mu$ g/ml RNase A) 5 ml จากนั้นเติม Merlin II (0.2 M NaOH, 1% SDS) 10 ml Invert เบา ๆ 2-3 ครั้ง ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เมื่อครบกำหนดเติม Merlin III (1.25 M KAc, 1.25 M HAc) 5 ml บ่มในน้ำแข็ง 30 นาที พร้อมทั้ง invert และเขย่า 2-3 ครั้ง เพื่อให้ตะกอนเล็กกลางทำให้ลำดับต่อไปของการกรองด้วยกรวยพลาสมิดิกและกระดาษกรองขนาด 11 cm เร็วขึ้น หลังจากขั้นตอนนี้จะได้สารละลายประมาณ 16 ml เติม Isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของสารละลาย หรือ 9.6 ml Invert เบา ๆ 2-3 ครั้ง ปั่นตกตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ออกเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อระเหย Isopropanol จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ MilliQ 500  $\mu$ l เติม MerlinMax binding buffer (0.07 mM GuHCl, 1.25 M KAc, 1.25 M HAc) และ MerlinMax Resin Slurry (15 g celite powder of diatomaceous earth/100 ml MerlinMax binding buffer) อย่างละ 5 ml ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปวางบนเครื่องเขย่า Rocker (LabNet) เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับเรซินประมาณ 1 ชั่วโมง นำ

ส่วนผสมทั้งหมดแบ่งใส่ใน spun column (เตรียมจากหลอดทดลอง 15 ml pipette tip ขนาด 5 ml และอัดสำลีเพื่อใช้กรองเรซินให้อยู่ในคอลัมน์) คอลัมน์ละ 2.5 ml ปั่นเพื่อเก็บเรซิน ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบแขนหมุนรุ่น IEC HN-S II ที่ความเร็ว  $\frac{3}{4}$  เท่า 5 นาที เก็บสารละลาย (flows trough) ที่ได้ไว้ จากนั้นปั่นล้างเรซินด้วย Merlin V (20 mM Tris-Cl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50% Ethanol) 2.5 ml 2 ครั้ง จากนั้นหมุนเหวี่ยงให้เรซินแห้งอีกครั้ง 10 นาที เปลี่ยนหลอดใหม่เพื่อชะดีเอ็นเอด้วยน้ำ MilliQ อุณหภูมิ 72°C 250 ml โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วเดิม 5 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง เก็บพลาสติกที่ได้ใน 20°C เพื่อการทดลองต่อไป

### 2.2.17 การทำแผนที่ดีเอ็นเอบนพลาสมิด (DNA mapping)

การทำแผนที่ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบว่าเวกเตอร์ลูกผสมที่ได้นั้นมีขนาดและการจัดเรียงตัวของชิ้นดีเอ็นเอถูกต้องหรือไม่ โดยใช้หลักการความจำเพาะของรีสทริกชันเอนไซม์ในการย่อยพลาสมิดซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาจะประกอบด้วย 1xNEBuffer ที่เหมาะสมกับเอนไซม์ 1 µg BSA, 0.1 mM DTT, 0.2 µg พลาสมิด และรีสทริกชันเอนไซม์ 0.5 U บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 1 ชั่วโมง ทำเจลิเล็กโตรโฟเรซิสตามข้อ 2.2.3 และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ เปรียบเทียบความถูกต้องของขนาดดีเอ็นเอกับการคำนวณโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เช่น NEB cutter2.0 (NEB)

### 2.2.18 การสกัดดีเอ็นเอจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จาก LB Broth เลี้ยงในอาหารเหลว YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) 5 ml ประมาณ 20 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ดูดอาหารเลี้ยงทิ้ง ละลายตะกอนด้วย lysis buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) บดเซลล์ด้วยโกร่งบดโดยการเติมไนโตรเจนเหลวลงในโกร่งแล้วค่อยๆหยดสารละลายเซลล์ลงไป เพื่อให้เป็นผลึกน้ำแข็งบดให้ละเอียดและทำซ้ำอีก 2 ครั้ง แล้วนำสารละลายที่ได้ไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 95°C 2 นาที หลังจากนั้นนำกลับมาแช่ในไนโตรเจนเหลว 2 นาที และนำอุณหภูมิ 95°C อีก 2 นาที เขย่าให้สารละลายแตกตัวด้วยเครื่อง vortex-mixer 2 นาที แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 300 ml และ vortex อีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที ตกตะกอนเศษเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 5 นาที จึงย้ายสารละลายใสส่วนบนไปใส่หลอดใหม่ เดิม 100% เอทานอลเย็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ปั่นเก็บได้ เขย่าให้ผสมกันเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน -20°C 5 นาที เพื่อเพิ่มอัตราการตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง 5 นาที ที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที ดูดสารละลายใสส่วนบนออก ล้าง

ตะกอนด้วย 70% เอทานอล และปั่นตกที่สภาวะเดิมอีกครั้งดูส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ลำดับสุดท้ายจึงละลายตะกอนด้วย 100 ml 2 µg/ml RNase A in TE ตรวจสอบประสิทธิภาพของการสกัดด้วย agarose gel electrophoresis ตามข้อ 2.2.3 ต่อไป

## 2.3 การทดสอบการแสดงออกของยีนที่ต้องการในแบคทีเรีย

### 2.3.1 การแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ที่อุณหภูมิ 37°C

การทดสอบการแสดงออกของแบคทีเรีย ส่วนใหญ่กระทำในเซลล์ BL21(DE3)pLysS การทดสอบการแสดงออกและการละลายของโปรตีนทำตามวิธีการของ Selleck and Tan (Selleck and Tan, 2008) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย กล่าวโดยสรุปคือ transform พลาสมิดที่ต้องการในเซลล์และทำการเลือกโคโลนีที่ต้องการบนอาหารแข็ง TYE ที่มี ampicillin 100 µg/ml และ chloramphenicol 25 µg/ml เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เลือก 5-6 โคโลนีเพื่อนำไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว 2xTY ที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่า 220 รอบต่อนาทีให้เซลล์โต จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ได้เป็น 0.5-0.6 กระตุ้นด้วย Isopropylthio-β-D-galactosidase (IPTG) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2 mM โดยก่อนใส่ IPTG ต้องเก็บเซลล์ปริมาตร 500 µl หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ 13,000 รอบต่อนาที แล้วละลายตะกอนด้วย 2xPGLB 100 µl (2x protein gel loading buffer - 1.25 M Bis-Tris pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 2.16 M β-mercaptoethanol, and 0.4 mg/ml bromophenol blue) เมื่อเติม IPTG ลงในตัวอย่าง แล้ว เก็บเซลล์ 250 µl ที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง หลังการให้ IPTG หมุนเหวี่ยง และละลายตะกอนเซลล์ด้วย 2xPGLB ทำการแยกโปรตีนแบบเสียสภาพ (denaturing polyacrylamide gel electrophoresis หรือ SDS-PAGE) ตามข้อ 2.3.5 เพื่อเปรียบเทียบการสร้างโปรตีนเป้าหมายในแบคทีเรีย ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับ IPTG เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ในชั่วโมงที่ 3 หลังการกระตุ้นด้วย IPTG ทำการเก็บตัวอย่าง 40 ml 2 หลอด หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ เทสารละลายทิ้งแล้วจึงละลายตะกอนเซลล์ด้วย P150-EDTA 10 ml (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM benzamidine และ 5 mM β-mercaptoethanol) เก็บเซลล์ที่ -20°C จนกว่าจะทำการทดลองต่อไป (Selleck and Tan, 2008)

### 2.3.2 การแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ที่อุณหภูมิ 28 และ 18°C

นอกจากศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่ 37°C มีการลดอุณหภูมิลงที่ 28 °C และ 18°C เพื่อตรวจสอบความสามารถในการผลิตโปรตีนว่ามีความสามารถในการละลายน้ำได้มากขึ้นหรือไม่ ทั้งนี้ต้องทำการย้ายเซลล์ไปยังอุณหภูมิที่ต้องการในขณะที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm เป็น 0.1-0.2 จากนั้นให้เซลล์โตต่อไป เมื่อเซลล์มีค่า  $OD_{600} = 0.6$  กระตุ้นด้วย IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.02 หรือ 0.2 mM ตามความเหมาะสม และเนื่องจากอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่เลี้ยงใน 18 °C ช้ามาก เมื่อกระตุ้นด้วย IPTG แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีก 14-16 ชั่วโมง จึงเก็บเซลล์ตามเวลาที่กำหนด ซึ่งขั้นตอนการเก็บเซลล์ทำเช่นเดียวกับเซลล์ที่เจริญที่ 37°C ตามข้อ 2.3.1 และทำการเก็บตัวอย่างที่เหลือ 40 ml ที่เวลา 3 ชั่วโมงหลังการกระตุ้นด้วย IPTG หรือ 14-16 ชั่วโมง ที่ 18°C เพื่อตรวจสอบการละลายทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีที่เหมาะสมและทำการทดลองต่อไป

### 2.3.3 การทดสอบการแสดงออกของ FADD และ TRIM21 ร่วมกับโปรตีนที่เลี้ยง (Chaperone protein)

การทดสอบนี้ใช้เซลล์เจ้าบ้าน JM109 ที่มีการใส่พลาสมิดที่ช่วยสังเคราะห์โปรตีนในกลุ่มของโปรตีนที่เลี้ยง (Chaperone protein) ซึ่งต้องใช้ L-arabinose 1 mg/ml และ tetracyclin 10 ng/ml เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนบน chaperone plasmid pG-KJE8 บ่มเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่า 220 รอบต่อนาที ติดตามการเติบโตจน  $OD_{600}$  ได้ 0.6 จึงกระตุ้นด้วย IPTG ที่ 0.2 M และเก็บเซลล์ในชั่วโมงที่ 3 เพื่อทดสอบการละลายและทำบริสุทธิ์ตามวิธีการใน 2.3.1 หากเป็นการทดลองที่อุณหภูมิ ต่ำกว่า 37°C จะย้ายขวดรูปชมพู่ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ไปยังอุณหภูมิที่ต้องการดังข้อ 2.3.2 และกระตุ้นด้วย IPTG เมื่อ  $OD_{600}$  เท่ากับ 0.6 จากนั้นเก็บเซลล์ที่ชั่วโมงที่ 16 เพื่อตรวจสอบการแสดงออก การทำบริสุทธิ์ หรือการทดลองอื่นๆ ตามวิธีการในข้อ 2.3.7 เก็บเซลล์ที่ -20°C จนกว่าจะทำการทดลองขั้นต่อไป

### 2.3.4 การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยระบบ SPM (Soluble protein media)

เนื่องจากโปรตีนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ละลายน้ำได้น้อยประมาณ 10% จึงได้มีความพยายามในการหาวิธีที่ช่วยในการสังเคราะห์โปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการลดอุณหภูมิ ความเข้มข้นของ IPTG การใช้โปรตีนที่เลี้ยง (chaperone protein) ก็ไม่

สามารถเพิ่มการสร้าง soluble protein ได้ จึงมีความสนใจที่จะวิธีการเพิ่มสารเคมีบางตัวลงไป คือ sorbitol และ betaine ซึ่งวิธีการเลี้ยงเซลล์และเติมสารเคมีในกลุ่มนี้เป็นกระบวนการเลี้ยงที่พัฒนาขึ้นโดยการลอกเลียนแบบธรรมชาติ เนื่องจากในสภาวะที่การเจริญของสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำในสภาพแวดล้อมที่ผิดปกติไป จะมีการสร้างสารบางอย่างเพื่อรักษาคุณภาพของโปรตีนภายในเซลล์ เรียกว่า osmolyte ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ polyols/sugar, amino acid, และ polyions (Kai, et al., 2013) เช่น สิ่งมีชีวิตที่อาศัยในที่ที่อุณหภูมิสูงและตอบสนองต่อความเครียดจากอุณหภูมิสูงจะมีการสะสมสาร betaine, ectaine ในปริมาณมาก ซึ่งมีการอธิบายถึงหน้าที่อาจเป็นไปได้ของสารเหล่านี้ เช่น การลดอัตราเร็วในการปล่อยสายเปปไทด์จากไรโบโซมเพื่อเพิ่มเวลาของการพับม้วนโปรตีน หรือการที่เพิ่ม osmolarity จะเป็นการกระตุ้นให้เซลล์สร้าง Hsp protein เพื่อช่วยในการพับม้วนอีกทางหนึ่ง เช่นการทดลองของ Ackerley และคณะ ในปี 2003 พบว่า การเลี้ยงเซลล์ที่ 18°C ที่มี betaine และ sorbitol ร่วมด้วยสามารถเพิ่มปริมาณของ soluble His-PvdD ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Ackerley et al., 2003)

ซึ่งขั้นตอนการเลี้ยงมีดังนี้ ลงเชื้อ 1-2 โคโลนีในอาหารเหลว SPM (soluble protein media) (1.6% bacto tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, 1 M Sorbitol, 2.5 mM betaine) 100 ml ที่มีแอมพิซิลิน 100 µg/ml และคลอแรมฟินิคอล 25 µg/ml บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่าที่ 220 รอบต่อนาที เมื่อ OD<sub>600</sub> อยู่ที่ประมาณ 1.2 แต่ไม่เกิน 1.5 (หาก OD สูงเกินไปไม่เหมาะสมแก่การนำไปเลี้ยงต่อ) นำสารละลายเซลล์นั้นปริมาตร 1 ml มาเป็นตัวตั้งต้นในอาหารเหลวใหม่ เลี้ยงเซลล์ในสภาวะเดิม คือ 37°C บนเครื่องเขย่าที่ 220 รอบต่อนาที ต่อไปจน OD<sub>600</sub> เป็น 0.6 เติม IPTG 0.2 M เก็บเซลล์ในช่วงเวลาที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 เพื่อดูการแสดงออกโดยทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และช่วงเวลาที่ 3 เก็บเซลล์เพื่อทดสอบการละลายและทำทดลองต่อไป

### 2.3.5 การทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

การทำ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis เป็นอีกหนึ่งวิธีการที่นิยมใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ ปริมาณ หรือน้ำหนักของโปรตีน ในงานวิจัยนี้จะใช้ความเข้มข้นของ acrylamide gel ที่ 12% ยกเว้นกล่าวเป็นอย่างอื่น โดยชั้นล่างเป็น separating gel (10% of 30%/0.5% acrylamide/bis-acrylamide, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% ammonium persulphate, 0.1% TEMED) เทใน slab gel apparatus ให้มีความสูงอยู่ได้ปลายหัวประมาณ 0.5 cm เติมพื้นที่เหนือเจลด้วย H<sub>2</sub>O saturated butanol เพื่อป้องกันน้ำเจลแห้ง

เมื่อเจลให้แข็งตัวดีแล้วทำการล้าง butanol ออกด้วย 70% เอทานอลหลายครั้ง ตามด้วยน้ำ จากนั้นใส่ stacking gel (3% of 30%/0.5% acrylamide/bis-acrylamide, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% ammonium persulphate, 0.1% TEMED ) ใส่วี เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว จึงแกะซีทวี่และทำความสะอาดหลุม load gel และนำไปประกอบเข้ากับ chamber หลังจากนั้นจึง load ตัวอย่างจากแต่ละ fraction ที่ผ่านการผสมกับ 2x PGLB แล้ว หลุมละเท่า ๆ กัน รวมทั้งโปรตีนมาตรฐานเพื่อให้เป็นตัวเปรียบเทียบ เมื่อต่อระบบเรียบร้อยแล้วให้วิ่งภายใต้ความต่างศักย์คงที่ 167 โวลต์ ใน gel running buffer (10 mM Tris, 0.076 M glycine, 0.01% SDS) หลังจากการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแล้วจึงตรึงโปรตีนบนเจลไว้ด้วยการแช่ใน FIX solution (45% Ethanol, 10% glacial acetic acid) 10 นาที ย้อมด้วย staining solution ( 0.5% Coomassie brilliant blue R 250 ใน FIX) 10 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วย destaining solution 1 (20% glacial acetic acid, 20% methanol) ที่อุณหภูมิ 60°C 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาทีหรือจนกว่าสีพื้นหลังของเจลจางลงแล้วล้างต่อด้วย destaining solution 2 (5% glacial acetic acid, 5% methanol) จนพื้นหลังเจลใส

### 2.3.6 การทดสอบความสามารถในการละลาย

ในการทดสอบการละลายจะต้องทำการย่อยผนังเซลล์โดยการ ละลายเซลล์ตัวอย่างจาก -20°C และเติมไลโซไซม์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mg/ml เพื่อช่วยในการย่อยผนังเซลล์ บ่มในน้ำแข็ง 30 นาที พร้อมเขย่าเบาๆ เป็นระยะเพื่อให้ไลโซไซม์ทั่วถึง จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) จากเครื่อง sonicator ยี่ห้อ vibra cell รุ่น VCX130 โดยใช้ tip รุ่น 130-0438 ด้วยกำลัง amplitude 50% ครั้งละ 10 วินาที 3 ครั้ง โดยพยายามให้อุณหภูมิของสารละลายเย็นหรือแช่ในน้ำแข็ง และพักระหว่างครั้งด้วยการแช่ในน้ำแข็ง เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของโปรตีนจากความร้อนเมื่อเซลล์แตกแล้ว เก็บสารสกัดเซลล์หยาบ 50 µl เพื่อทำ SDS-PAGE ของ whole fraction ซึ่งการทดสอบการละลายอาศัยหลักในการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่สนใจในแต่ละ fraction คือ ส่วนของ pellet และ supernatant ที่มีการปรับปริมาตรให้เท่ากับปริมาตรเริ่มต้น โดยเก็บ 500 µl ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml ปั่นตกตะกอนเศษเซลล์ที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C แยกส่วนของสารละลายใส่ใส่หลอดใหม่ เป็น supernatant และละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ P150-EDTA เท่ากับปริมาตรเริ่มต้น คือ 500 µl จากนั้นนำตัวอย่างจาก pellet และ supernatant 50 µl ผสมกับ 2x PGLB แล้วจึงนำแต่ละส่วนจาก whole, supernatant และ pellet ในปริมาณที่เท่ากันมาทำการวิเคราะห์ หาปริมาณการละลายของโปรตีนที่สนใจด้วย SDS-PAGE ตามข้อ 2.3.5 โดยเปรียบเทียบการละลายจากขนาด

และปริมาณความเข้มข้นของแถบโปรตีนจากแต่ละส่วน โดย supernatant และ pellet แทนโปรตีนส่วนที่ละลายและไม่ละลายน้ำ ตามลำดับ และทั้งสองส่วนรวมกันจะเป็นผลรวมของการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจทั้งหมดในเซลล์ คือ Whole

### 2.3.7 การทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย TALON<sup>®</sup> Metal Affinity resin

ทำการแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มี polyhistidine-tagged (เช่น HishTRIM21, hFADD $\Delta$ 1HisSTRx1, hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2) ให้บริสุทธิ์ด้วย TALON metal affinity (Clontech) โดยทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงตามข้อ 2.3.6 จากนั้นนำไปปั่นแยก เอาส่วนสารละลายใสส่วนบนประมาณ 10 ml ใส่ในหลอดขนาด 15 ml ที่มีทาลอนเรซินที่อิมมูบิลิซด์ด้วยบัฟเฟอร์ (talon resin 50% slurry in 20% ethanol ล้างด้วยน้ำ 10 ml 1 รอบ และ P150-EDTA buffer 2 รอบ ซึ่ง P150-EDTA buffer ประกอบด้วย 50 mM sodium phosphate pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM benzamidine, 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) บ่มที่ 4°C บนเครื่องเขย่าเพื่อผสมสารเป็นเวลา 20 นาที ปั่นตกตะกอนเรซิน 2 นาที ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เก็บส่วนของ extract ที่ไม่เกาะกับเรซิน (flow through-FT) จากนั้นล้างเรซินด้วยบัฟเฟอร์ P150-EDTA 2 ครั้ง ๆ ละ 10 ml แล้วย้ายเรซินไปยังคอลัมน์พลาสติกด้วยบัฟเฟอร์ P150-EDTA 1 ml ดูดใส่ในคอลัมน์โดยตรง และทำการชะโปรตีนที่ติดอยู่กับเรซินด้วยบัฟเฟอร์ P150-EDTA + 100 mM imidazole 4 ครั้ง ๆ ละ 0.5 ml เก็บ eluate ที่ได้ในหลอดขนาด 1.5 ml (E1, E2, E3 และ E4) จากนั้นนำตัวอย่างจาก fraction ต่าง ๆ มาทำ SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ ตามข้อ 2.3.5 และเก็บไว้เพื่อการทดลองต่อไปโดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาเติมกลีเซอรอลให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20% เพื่อป้องกันการทำลายโครงสร้างตามธรรมชาติของโปรตีน เก็บที่ -80°C จนกว่าจะใช้ทดลองต่อไป ส่วนเรซินที่ผ่านการใช้สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้โดยต้องทำการล้าง imidazole ออกด้วยขั้นตอนต่อไปนี้ ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำ MilliQ 2-3 เท่าของปริมาตรเรซิน 0.1 M EDTA 2 เท่า น้ำ MilliQ 2-3 เท่า 6 M Guanidine HCl เท่ากับปริมาตรเรซิน น้ำ MilliQ 2-3 เท่า 20% Ethanol 1 เท่า ตามลำดับ จากนั้นเก็บใน 20% Ethanol 4°C

### 2.3.8 การทำบริสุทธิ์โปรตีน hFADD ด้วย Strep-tactin resin

การทำบริสุทธิ์ FADD ด้วย Strep-tactin resin มีขั้นตอนที่เหมือนกับการใช้ talon resin ต่างกันในส่วนของบัฟเฟอร์ที่ใช้บัฟเฟอร์ P150-EDTA หรือ T150 (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM benzamidine และ 10% glycerol) และการชะโปรตีนที่ใช้ 2.5 mM *d*-Desthiobiotin ในบัฟเฟอร์ 4 ครั้ง ๆ ละ 500  $\mu$ l เก็บส่วนใสที่ชะได้ คือ



E1, E2, E3 และ E4 นำตัวอย่าง 30  $\mu$ l ผสม 2xPGLB เพื่อทำพอลิอคริลลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟเรซิสแบบเส้นอมสภาพ และเก็บที่เหลือไว้ใช้ในการทดลองโดยเติมกลีเซอรอลให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20% เก็บใน  $-80^{\circ}\text{C}$  ส่วนเรซินที่ผ่านการใช้แล้วนำมาชะ *d*-Desthiobiotin ได้ด้วย 1 mM HABA (2-[4'-hydroxy-benzeneazo]benzoic acid) ใน T150 buffer (ใช้ T150 เท่านั้นไม่มีเช่นนั้น HABA จะไม่ละลาย) 8 ml ล้างเรซินอีกครั้งด้วย T150 buffer อย่างน้อย 8 ml สีของเรซินจะกลับเป็นสีขาวพร้อมใช้งาน หรือหากต้องการเก็บต้องล้างด้วยน้ำ MilliQ และเก็บใน 20% เอทานอล ที่  $4^{\circ}\text{C}$  ต่อไป

## 2.4 การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ของ hFADD และ hTRIM21 จากแบคทีเรีย

### 2.4.1 *Strep*-tactin pull down

นำสารละลายในส่วนที่มีโปรตีนมากพอ (E2) ไปทำการทดลองหาความสามารถในการเกิดปฏิสัมพันธ์กันระหว่างโปรตีนทั้งสอง โดยนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มี *Strep*-tag II (STR) เช่น hFADDHisSTR บ่มด้วย *strep*-tactin resin 25  $\mu$ l ที่  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างโปรตีนส่วนเกินออกด้วย P150-EDTA 3 ครั้งๆ ละ 500  $\mu$ l จากนั้นนำสารละลายโปรตีนที่ต้องการทดสอบปฏิสัมพันธ์ซึ่งไม่มี *Strep*-tag II เช่น HisTRIM21 ใส่ในหลอดที่มี hFADDHisSTR - *Strep*-tactin resin บ่มต่อที่  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างส่วนเกินออกด้วย P150-EDTA 3 ครั้งๆ ละ 500  $\mu$ l ตรวจสอบการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนด้วย SDS-PAGE ตามข้อ 2.3.5 โดยสังเกตว่าโปรตีนที่ต้องการทดสอบปฏิสัมพันธ์ปรากฏอยู่ใน bead fraction พร้อมกับ STR-tagged โปรตีนหรือไม่

## 2.5 การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการในระบบ Ex-vivo

### 2.5.1 Tissue culture

การทดลองนี้ใช้ HEK293T cell (ATCC# CRL-11268) เริ่มการทดลองโดยเตรียม DMEM-F ซึ่งประกอบด้วย DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) ที่มี 10% FBS (fetal bovine serum), D-Glucose 4.5 g/l, Sodium Pyruvate 1.1 g/l, Sodium Bicarbonate 3.7 g/l, L-Glutamine 0.584 g/l, penicillin 100 U/ml และ streptomycin 100  $\mu$ g/ml ในหลอดฝาเกลียวขนาด 15 ml ปริมาตร 9 ml นำเซลล์ที่เก็บในถังเก็บไนโตรเจนเหลว (liq.  $\text{N}_2$ ) ละลายผลึกน้ำแข็งในอ่างน้ำที่ปรับอุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  จนเหลือผลึกเล็กน้อยเท่านั้น (ไม่ควรรอให้น้ำแข็งละลายจน

หมด), จึงทำให้สารละลายเซลล์เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการดูดปล่อยเบา ๆ ด้วย autopipette 1 รอบ แล้วถ่ายโอนไปยัง cDMEM 9 ml ในหลอดที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปตกตะกอนเซลล์เพื่อล้าง DMSO ออก ด้วยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายทิ้ง จากนั้นกระจายเซลล์เบา ๆ ด้วย DMEM-F 1 ml นำทั้งหมดไปเลี้ยงต่อในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm ในอาหารทั้งหมด 10 ml โดยในขั้นตอนการเพลด เซลล์ต้องเขย่าจานเลี้ยงเพื่อให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอแล้วนำไปเลี้ยงต่อในตู้บ่มเซลล์ 37°C ในบรรยากาศที่มี CO<sub>2</sub> 5% ติดตามการเจริญเติบโตทุกวัน ถ้าหากเซลล์ตายให้ล้าง plate ด้วย PBS (8% NaCl, 0.2% KCl, 1.15% Na<sub>5</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) แล้วเปลี่ยนอาหารเมื่อเซลล์เจริญเติบโตดีและเกือบแน่นเต็ม plate แล้วให้แยกเซลล์ด้วยทริปซินต่อไป

### 2.5.2 การแยกเซลล์ด้วยทริปซิน

เนื่องจาก HEK293T cell ที่เลี้ยงเป็นชนิด immortal cell line จึงมีความสามารถในการแบ่งตัวได้เรื่อย ๆ ตามพื้นที่ผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ แต่เมื่อเต็มพื้นที่แล้วจะมีการแบ่งตัว ช้อนทับเหนือชั้นเซลล์เดิม ซึ่งมีผลให้เซลล์ที่อยู่ชั้นล่างขาดอาหารหล่อเลี้ยงและมีสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจึงต้องมีการแยกเซลล์ออกเป็นเซลล์เดี่ยวแล้วเพลดเซลล์ใหม่เพื่อให้มีการเจริญและแบ่งตัวต่อไป โดยเริ่มจากการดูดเอาอาหารเลี้ยงเก่าออกจากภาชนะเลี้ยงเซลล์ ล้าง ด้วย Phosphate Buffer Saline (1xPBS - 8% NaCl, 0.2% KCl, 1.15% Na<sub>5</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 10 ml แล้วดูดออก เติม 0.025% trypsin/0.02% EDTA 2 ml นำเข้าตู้บ่ม 37°C ที่ความเข้มข้นของ CO<sub>2</sub> 5% 5 นาที เติมอาหารเลี้ยง 8 ml เพื่อหยุดการทำงานของทริปซิน หลังจากนั้น gently resuspend ให้เชื้อเซลล์หลุดออกจากกัน แล้วนำสารละลายเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดฝาเกลียว 15 ml ตกตะกอนเซลล์ด้วยการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย DMEM-F 1 ml ดูดมา 50 µl หาความหนาแน่นของเซลล์ โดยนับบน hemacytometer นำเซลล์ไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ใหม่ด้วย เซลล์ปริมาณ 1.8 ล้านเซลล์ใน plate ขนาด 10-cm และปริมาตรอาหารเลี้ยง 10 ml ตามการเจริญเติบโตให้เติมจานเลี้ยง ซึ่งปกติจะทำการแยกเซลล์ทุก ๆ 2 วัน

### 2.5.3 Cell transfection

เพื่อทำการทดสอบผลของโปรตีนจึงใช้วิธีการนำเข้าดีเอ็นเอพลาสมิดที่มียีนของโปรตีนด้วยสารนำส่งซึ่งการทดลองนี้ใช้จากสองบริษัท คือ Lipofectamine™ 2000 (invitrogen) และ TransIT®-LT1 Transfection Reagent (Mirus) ซึ่งทั้งสองชนิดมีรายละเอียดการทำที่ต่างกัน

รวมถึงความหนาแน่นของเซลล์ดังนั้นจึงต้องทดสอบหาปริมาณเซลล์เริ่มต้นของการเพาะเพื่อให้ได้ความหนาแน่นในปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการ transfection ด้วยสารนำส่งจากแต่ละบริษัทผู้ผลิต

### 1) Lipofectamine™2000

การใช้ lipofectamine™2000 ซึ่งวิธีนี้ต้องใช้เซลล์ที่ความหนาแน่น 90-95% จึงจะทำให้การส่งพลาสมิดมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยต้องทำการแยกเซลล์ด้วยทริปซินและนับจำนวนเซลล์แล้วจึงเพาะที่ปริมาณ 800,000 เซลล์ สำหรับเพาะ 6 เซนติเมตร จะได้เซลล์ที่ความหนาแน่น 90-95% ในวันที่ 2 ก่อนการ transfection 4 ชั่วโมง เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเป็น DMEM-F ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ ขั้นตอนการ transfection เริ่มด้วยการเตรียมหลอดทดลองขนาด 1.5 ml 2 หลอด หลอดแรกผสมพลาสมิด 8 g กับ Opti-MEM หรือ DMEM ที่ไม่มีทั้งซีรัมและยาปฏิชีวนะ 500 µl ส่วนอีกหนึ่งหลอด Lipofectamine™2000 20 µl ผสมกับ DMEM 500 µl บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นผสมทั้งสองหลอดเข้าด้วยกันบ่มต่ออีก 20 นาที ก่อนนำไปใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ให้ทั่ว เลี้ยงเซลล์ต่อที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี CO<sub>2</sub> 5% เป็นเวลา 36-40 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเซลล์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งปริมาณการใช้เซลล์ พลาสมิด หรือ Lipofectamine™2000 จะขึ้นอยู่กับขนาดภาชนะเลี้ยงที่ใช้ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2.4 ตารางเปรียบเทียบความเหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการใช้ Lipofectamine™2000

Culture vessel	Surf. area per well <sup>1</sup>	Shared reagents		DNA transfection		RNAi transfection	
		Vol. of plating medium	Vol. of dilution medium <sup>2</sup>	DNA	Lipofectamine™2000	RNA	Lipofectamine™2000
96-well	0.3 cm <sup>2</sup>	100 µl	2 x 25 µl	0.2 µg	0.5 µl	5 pmol	0.25 µl
24-well	2 cm <sup>2</sup>	500 µl	2 x 50 µl	0.8 µg	2.0 µl	20 pmol	1.0 µl
12-well	4 cm <sup>2</sup>	1 ml	2 x 100 µl	1.6 µg	4.0 µl	40 pmol	2.0 µl
6-well	10 cm <sup>2</sup>	2 ml	2 x 250 µl	4.0 µg	10 µl	100 pmol	5 µl
60-mm	20 cm <sup>2</sup>	5 ml	2 x 0.5 ml	8.0 µg	20 µl	200 pmol	10 µl
10-cm	60 cm <sup>2</sup>	15 ml	2 x 1.5 ml	24 µg	60 µl	600 pmol	30 µl

### 2) TransIT®-LT1 Transfection Reagent

ลักษณะการเลี้ยงโดยทั่วไปเหมือนกับการใช้ Lipofectamine™2000 แตกต่างเพียงเล็กน้อย คือ สามารถใช้อาหารเลี้ยงปกติได้โดยไม่มีผลต่อการ transfection และปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมจะใช้ที่ความหนาแน่น 50-60% จึงเริ่มต้นเพาะเซลล์ที่ปริมาณ 400,000 เซลล์บนเพาะขนาด 6 cm เลี้ยงต่อ 48 ชั่วโมง จะได้เซลล์ที่ความหนาแน่น 50-60% ขั้นตอนการใส่

ดีเอ็นเอดังนี้ เตรียมหลอดทดลองขนาด 1.5 ml 2 หลอดต่อหนึ่งเพลต หลอดแรกใส่พลาสติก 5  $\mu\text{g}$  หลอดที่สองประกอบด้วย Opti-MEM หรือ DMEM ที่ไม่มีทั้งซีรัมและยาปฏิชีวนะ 242.5  $\mu\text{l}$  และ LT1 7.5  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำสารละลายในหลอดที่บ่มแล้วใส่ในหลอดแรกผสมให้เข้ากันบ่มต่อ 20 นาที แล้วจึงนำไปหยดลงจานเลี้ยงเซลล์ที่มีความหนาแน่นเซลล์เหมาะสม ให้กระจายทั่วทั้งจานเลี้ยงนำเซลล์ไปเลี้ยงต่อในตู้บ่มต่อเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บเซลล์เพื่อทำการทดลองต่อไป ซึ่งปริมาณการใช้เซลล์ พลาสติก หรือ TransIT<sup>®</sup>-LT1 Transfection Reagent ที่ใช้จะขึ้นอยู่กับขนาดภาชนะเลี้ยงที่ใช้ดังตารางการเทียบต่อไปนี้

**ตารางที่ 2.5** ตารางเปรียบเทียบความเหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการใช้ TransIT<sup>®</sup>-LT1 Transfection

Culture vessel	96-well plate	48-well plate	24-well plate	12-well plate	6-well plate	10-cm dish	T75 flask
Surface area	0.35 cm <sup>2</sup>	1.0 cm <sup>2</sup>	1.9 cm <sup>2</sup>	3.8 cm <sup>2</sup>	9.6 cm <sup>2</sup>	59 cm <sup>2</sup>	75 cm <sup>2</sup>
Complete growth medium	92 $\mu\text{l}$	263 $\mu\text{l}$	0.5 ml	1.0 ml	2.5 ml	15.5 ml	19.7 ml
Serum-free medium	9 $\mu\text{l}$	26 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	250 $\mu\text{l}$	1.5 ml	1.9 ml
DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ stock)	0.1 $\mu\text{l}$	0.26 $\mu\text{l}$	0.5 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	2.5 $\mu\text{l}$	15 $\mu\text{l}$	19 $\mu\text{l}$
TransIT-LT1 Reagent	0.3 $\mu\text{l}$	0.78 $\mu\text{l}$	1.5 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$	7.5 $\mu\text{l}$	45 $\mu\text{l}$	57 $\mu\text{l}$

#### 2.5.4 การเก็บเซลล์

ดูดอาหารเลี้ยงออกและทำตามวิธีแยกเซลล์ด้วยวิธีปั่นตามวิธีการข้อ 2.5.2 ด้วยปริมาณที่ผู้ผลิตแนะนำ เมื่อเซลล์แยกแล้วดูดเป่าและปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที 1 นาที ล้างเซลล์ด้วย 1xPBS 2 ครั้ง เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้ใน  $-80^{\circ}\text{C}$

#### 2.5.5 GST pulldown

ทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer 500  $\mu\text{l}$  โดย resuspend ด้วย 150  $\mu\text{l}$  ก่อน เมื่อเซลล์กระจายดีแล้วเพิ่มบัฟเฟอร์อีก 350  $\mu\text{l}$  (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 10 mM PMSF, 1 mM benzamidine และ 10% glycerol) ที่ใช้น้ำแข็ง 20 นาที เขย่า 2-3 ครั้ง จากนั้นนำ Glutathione Sepharose<sup>™</sup> 4B (GE healthcare) ที่อิมมูด้วยบัฟเฟอร์ T150 (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40 และ 10% glycerol) บ่มในสารละลายเซลล์ที่ได้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนเรซินและชะโปรตีนส่วนเกินออกด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ตรวจสอบการเกิดปฏิสัมพันธ์ ระหว่างโปรตีนทั้งสองโดยการทำ SDS-

PAGE ขยายสัญญาณ และยืนยันผลด้วย Western blot ตามข้อ 2.5.9 เพื่อทดสอบว่า FADD ปรากฏอยู่ในชุดการทดลองที่มี TRIM21 หรือไม่

### 2.5.6 Coimmunoprecipitation

การทดลองนี้ทำตามวิธีการของ Young และคณะ (Young *et al.*, 2011) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย กล่าวโดยสรุป คือ นำ HEK293T cells ที่ผ่านการเลี้ยงเพื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีน FADD และ TRIM21 จากการทดลองที่เก็บใน  $-80^{\circ}\text{C}$  ทำให้ละลายบนน้ำแข็งซึ่งการทดลองในขั้นต่อไปจะต้องรักษาอุณหภูมิไว้ที่  $4^{\circ}\text{C}$  เพื่อรักษาคุณสมบัติเดิมของเซลล์ไว้ ทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer 500  $\mu\text{l}$  (โดย resuspend ด้วย 150  $\mu\text{l}$  ก่อน เมื่อเซลล์กระจายดีแล้วเพิ่มบัฟเฟอร์อีก 350  $\mu\text{l}$ ) (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, and 1x complete protease inhibitor from Roche) เป็นเวลา 30 นาทีโดยระหว่างนั้นเขย่า 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปแยกส่วนของตะกอนเซลล์และสารละลายภายในเซลล์ที่ความเร็ว 13,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใส่ออกใส่ในหลอดใหม่ แล้วแบ่ง 25  $\mu\text{l}$  ในแต่ละตัวอย่าง สำหรับการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE จากนั้นเติมแอนติบอดี anti-Flag tag M2 monoclonal antibody (Sigma) 10  $\mu\text{g}$  ใน extract ที่เหลือนำไปบ่มที่  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้แอนติบอดีเกาะกับ Flag tag บน FADD จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นตกที่ 3,000 รอบต่อนาที เพื่อให้ได้สารทั้งหมดแล้วถ่ายโอนใส่ในหลอดที่มี Protein A beads (Thermo Scientific) ที่ผ่านการทำให้อิ่มตัวด้วย wash buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 0.1 mM EDTA) นำไป rotate ต่อที่  $4^{\circ}\text{C}$  เพื่อให้ anti-Flag antibody เกาะกับ Protein A บนผิวเรซินเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อแยกเรซินออกจากส่วนใส ทำการเก็บส่วนใสในหลอด 1.5 ml และทำการล้างเรซิน 4 ครั้ง ด้วย wash buffer ครั้งละ 1 ml ซ้ำ ๆ resuspend เรซินด้วย 2xPGLB 30  $\mu\text{l}$  ทำการวิเคราะห์ fraction ที่ได้ เช่น lysates และ beads โดย SDS-PAGE ตามข้อ 2.3.5 และ Western blot ข้อ 2.5.9 ตามลำดับ

### 2.5.7 Western blot

ทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเสียดสภาพเพื่อแยกโปรตีนตามขนาด ย้ายแถบโปรตีนไปไว้บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน (nitrocellulose membrane) ด้วยวิธี semi-dry transfer ด้วยเครื่อง semi-dry blotting transfer (ATTO) โดยใช้ blotting paper ที่ชุ่มด้วย Towbin

Transfer Buffer/0.1%SDS (25 mM Tris,192 mM glycine, 20% methanol, 0.1% SDS) ประกอบเจลและแผ่นเมมเบรนเป็นลักษณะของแซนวิช ซึ่งขั้นตอนการประกอบเจลต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ เนื่องจากจะขัดขวางการวิ่งของกระแสไฟทำให้โปรตีนไม่ถูกเคลื่อนย้ายสู่แผ่นเมมเบรน โดยให้แผ่นเมมเบรนอยู่ระหว่างเจลและขั้วบวก ให้กระแสไฟฟ้าที่กำลังไฟคงที่  $1 \text{ mA/cm}^2$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเมมเบรนที่ผ่านการย้ายแถบโปรตีนมาตรวจสอบประสิทธิภาพของการย้ายโปรตีนด้วย Ponceau S solution (0.2% Ponceau S sodium salt, 10% acetic acid) 5 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำ บล็อกโปรตีนส่วนเกินบนเมมเบรนด้วย 5% non-fat milk in 1xTTBS (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0) 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 1xTTBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นบ่มด้วย 1°แอนติบอดี เช่น 1:2000 rabbit anti-hTRIM21 antibody, 1:500 rabbit anti-hFADD antibody, 1:1000 mouse anti-Flag antibody, 1:4000 rabbit anti-HA antibody, mouse 1:500 anti-His antibody ตามอัตราส่วนที่เหมาะสม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย 1xTTBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที บ่มต่อด้วย 2°แอนติบอดี คือ 1:10,000 anti-mouse antibody หรือ 1:10,000 anti-rabbit antibody เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย 1xTTBS นำแผ่นเมมเบรนมาใส่ enhance chemiluminescent (ECL) ก่อนประกอบฟิล์มเอกซเรย์ในห้องมืด วิเคราะห์แถบสัญญาณโปรตีนที่ได้โดยเทียบกับ purified protein และโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการใช้แล้วสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้โดยการทำให้แอนติบอดีที่เกาะอยู่บนผิวเมมเบรนหลุดออกด้วยการทำ membrane strip ตามขั้นตอน 2.5.10 ซึ่งเมมเบรนที่ผ่านการ strip antibody แล้วไม่เหมาะแก่การนำไปใช้เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเนื่องจากความไม่คงที่ของโปรตีนที่เหลือหลังจากการ strip

### 2.5.8 การกำจัดแอนติบอดีบนไนโตรเซลลูโลส เมมเบรน (stripping)

แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนใน stripping buffer ที่เตรียมเมื่อต้องการใช้ (100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% (w/v) sodium dodecyl sulphate, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8) ที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที พร้อมเขย่า 3 ครั้ง จากนั้นล้างแผ่นเมมเบรนด้วยน้ำสะอาดจนปราศจากกลิ่นของ  $\beta$ -mercaptoethanol จะได้แผ่นเมมเบรนที่พร้อมใช้งาน ล้างและแช่แผ่นเมมเบรนใน 1x TTBS หรือนำไปบ่มด้วย 1° แอนติบอดีต่อไป

## บทที่ 3

### ผลการทดลอง

#### 3.1 การทดสอบการแสดงออกของยีนที่ต้องการในแบคทีเรีย

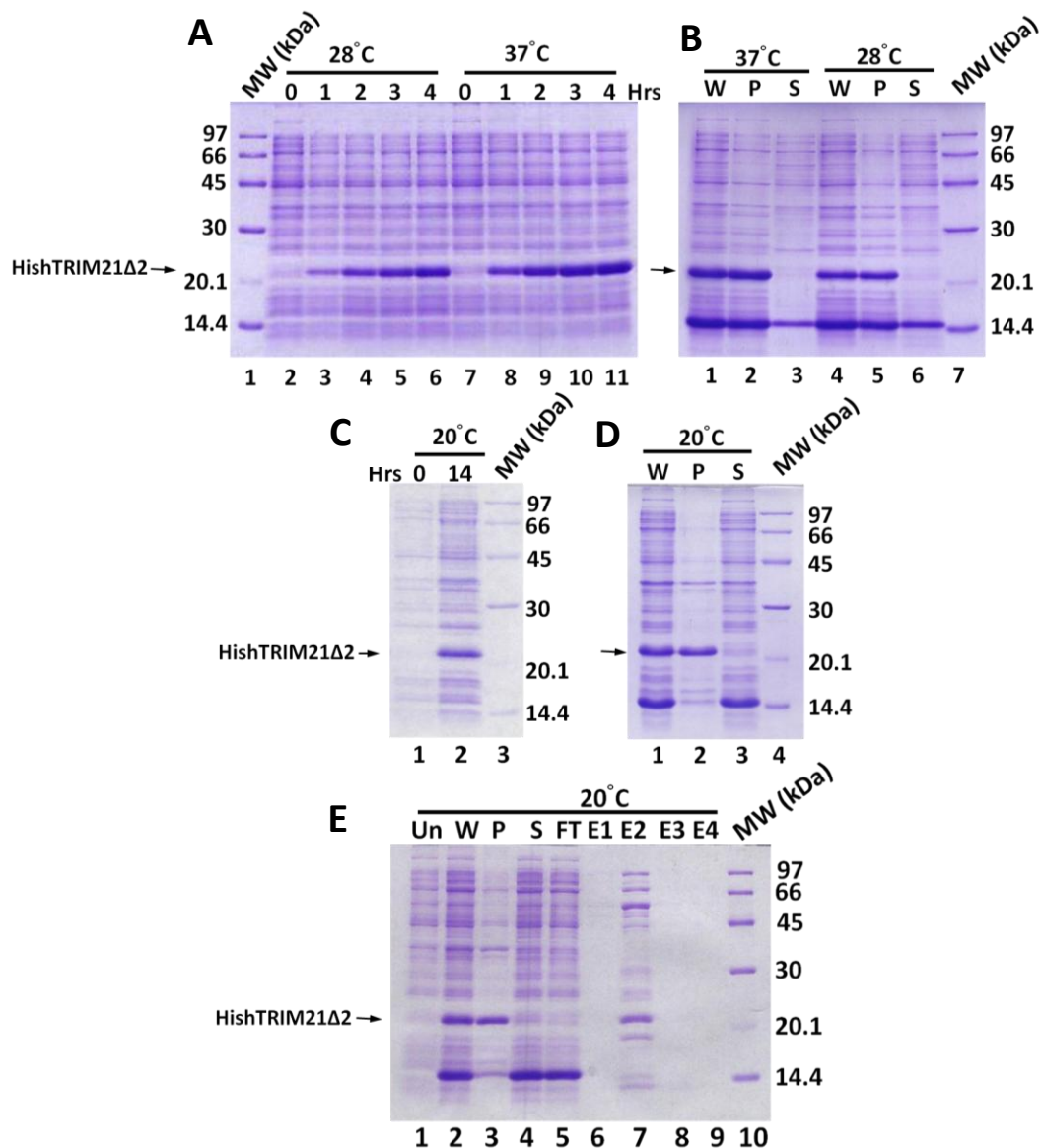
เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการทดลองที่ทำต่อเนื่องจากงานวิจัยของ Young และคณะในปี 2011 (Young *et al.*, 2011) ซึ่งเป็นการทดลองที่ทำขึ้นใน HEK293T cells โดยมีจุดประสงค์เพื่อทดสอบว่าโปรตีนใดบ้างที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ FADD หนึ่งในนั้นคือ TRIM21 และทำการศึกษาผลที่เกี่ยวข้องกันในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ส่วนการทดลองที่จะทำต่อไปเพื่อหาตำแหน่งที่จำเป็นและมีผลต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง โดยงานวิจัยในครั้งนี้เลือกที่จะสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรีย

##### 3.1.1 การสังเคราะห์ การทดสอบความสามารถในการละลาย และการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ที่ผลิตในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS

การทดลองในครั้งนี้ผู้วิจัยมีความสนใจต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง B30.2 domain ของ TRIM21 และ DED domain ของ FADD ซึ่งมีการรายงานผลถึงกระบวนการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนจากทั้งสองส่วน ซึ่งส่วนของ B30.2 domain หรือ PRY-SPY domain ได้มีการรายงานว่ามีคุณสมบัติที่สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่น ๆ ได้ (Rhodes & Trowsdale, 2007; Yang *et al.*, 2009) ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการสร้างพลาสมิด pST50Trc2-HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ซึ่งจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *E.coli* BL21(DE3)pLysS ที่ใช้ในการทดลองสามารถสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนนี้ได้ หลังจากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) แบบสี่อสมสภาพพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) มีขนาดประมาณ 23 KDa (รูปที่ 3.1 A และ C) ซึ่ง HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ถูกเหนี่ยวนำที่อุณหภูมิ 37°C มีการแสดงออกของโปรตีนมากกว่า 28°C เกือบสองเท่า (เปรียบเทียบรูปที่ 3.1 A แถวที่ 8-11 และ 3-6) โดยพบการแสดงออกเพียงเล็กน้อยก่อนการชักนำ (pre induction) ด้วย IPTG (รูปที่ 3.1 A แถวที่ 2 และ 7) และเพิ่มปริมาณของการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนขึ้นตามเวลาและอุณหภูมิ (รูปที่ 3.1 A แถวที่ 3-6 และ 8-11) ซึ่งอัตราการแสดงออกของโปรตีนที่ได้ค่อนข้างสูง แต่โปรตีนที่ผลิตได้ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อยมาก และไม่สามารถนำไปใช้ในการทดลองได้ (รูปที่ 3.1 B)

อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงว่าการลดอุณหภูมิมีผลต่อการสร้างโปรตีน เช่น งานวิจัยของ Mujacic และคณะในปี 1999 พบในการทดลองนั้นมีการสร้างโปรตีนที่เป็นพิษและไม่เสถียร นักวิจัยจึงปรับปรุงโดยการเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่ำที่ 15 และ 23°C ซึ่งสามารถลดการเกิดพิษได้ แต่ป้องกันการสลายได้น้อยลง การเปลี่ยนโปรโมเตอร์เป็น cold-shock สามารถลดปัญหาการถูกทำลายดังกล่าวได้ (Mujacic *et al.*, 1999) ส่วน Schein และ noteborn กล่าวว่า การลดอุณหภูมิลงสามารถเพิ่มการละลายของโปรตีนได้ (Schein & Noteborn, 1988) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกสภาวะใหม่โดยการเลี้ยงที่ 20°C เขย่าที่ 220 รอบต่อนาที และชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.02 mM และเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 14 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มสภาวะเครียดของเซลล์ อันจะมีผลให้การสร้างโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำนี้จะช้าลงเป็นการยืดเวลาให้เซลล์ปรับรูปร่างโปรตีนให้ถูกต้องยิ่งขึ้น พบว่าอัตราการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนน้อยลง แต่มีอัตราการละลายน้ำเพิ่มขึ้นประมาณ 20-40% (รูปที่ 3.1 C และ D) เนื่องจากโปรตีนที่เซลล์เจ้าบ้านผลิตได้นั้นอยู่ในรูปที่ละลายน้ำและมีคุณสมบัติที่จะนำไปทำการทดลองต่อได้มีปริมาณน้อยไม่สามารถนำส่วนในไซของเซลล์ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมาใช้ทำการทดลองได้ จึงต้องมีการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนที่ต้องการด้วยการทำบริสุทธิ์ด้วย TALON<sup>®</sup> Metal Affinity column ซึ่งใช้หลักการการจับอย่างจำเพาะระหว่าง Histidine tag บนโปรตีนกับโคบอลต์ที่ถูกตรึงไว้กับ bead ทำให้โปรตีนไม่ถูกชะออกไปพร้อมส่วนที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้มีรายงานว่า การใช้ tag ก็ช่วยในการละลายของโปรตีนรวมทั้งการทำบริสุทธิ์โปรตีนได้ (Pryor & Leiting, 1997; Sorensen & Mortensen, 2005) แต่ในการทดลองพบการละลายต่ำมากสอดคล้องกับผลการคำนวณความสามารถในการละลายของโปรตีน TRIM21 ที่ได้ทำการสังเคราะห์ครั้งนี้ด้วย Wilkinson-Harrison model จาก [www.biotech.ou.edu](http://www.biotech.ou.edu) พบว่าเป็นกลุ่มที่ไม่สามารถละลายน้ำได้เมื่อทำการสังเคราะห์ในแบคทีเรีย *E. coli* การคำนวณ pI และน้ำหนักโมเลกุลจาก expasy พบว่า TRIM21 ค่า pI อยู่ที่ 5.98 และน้ำหนักโมเลกุลเป็น 54169.73 ส่วน hTRIM21 $\Delta$ 1 มี pI เท่ากับ 6.43 และน้ำหนักโมเลกุลเป็น 23641.75 โดยเมื่อนำโปรตีนทั้งสองไปคำนวณค่าการละลายน้ำจาก [www.biotech.ou.edu](http://www.biotech.ou.edu) พบว่าให้ค่าการละลายเป็น 0.0% หรือไม่สามารถละลายน้ำได้ (Diaz *et al.*, 2010) เมื่อนำไปทำบริสุทธิ์โปรตีนเพื่อใช้ในการทดลองลำดับถัดไป ผลจากเจลิเล็กโตรโฟเรซิสแสดงให้เห็นว่าสามารถทำบริสุทธิ์โปรตีนได้จำนวนหนึ่ง โดยพบโปรตีนดังกล่าวใน eluted fraction บนเจลิเล็กโตรโฟเรซิส (รูปที่ 3.1 E)

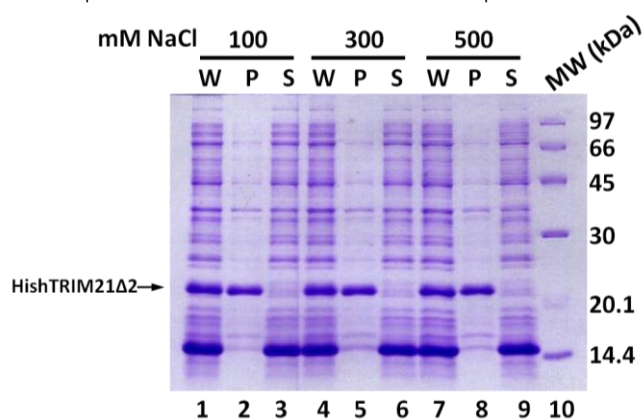




**รูปที่ 3.1** ผลการแสดงผลของยีน ความสามารถในการละลาย และการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน (A) ผลการแสดงผลของยีนในการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ที่อุณหภูมิ 37, 28°C ที่เวลา 0 ถึง 4 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย 0.2 mM IPTG พบว่าปริมาณการแสดงผลไม่ต่างกัน และ (B) ผลการทดสอบการละลายที่ 37 และ 28°C พบว่าอัตราการละลายต่ำมากถึงไม่ละลาย (S fraction แถว 3 และ 6) (C) ผลการแสดงผลของยีนที่อุณหภูมิ 20°C ที่เวลา 14 ชั่วโมง ด้วย 0.02 mM IPTG โดย (D) พบการละลายเพียงเล็กน้อยใน S fraction (แถวที่ 3) (E) ผลการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ 20°C พบโปรตีนเป้าหมายใน E2 fraction แสดงว่า Talon resin มีความสามารถในการดูดซับ HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ได้ และมีการลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ

flow through (FT) fraction (Un=uninduced, W=whole, P=pellet, S=supernatant, FT=flow through และ E=eluted fraction)

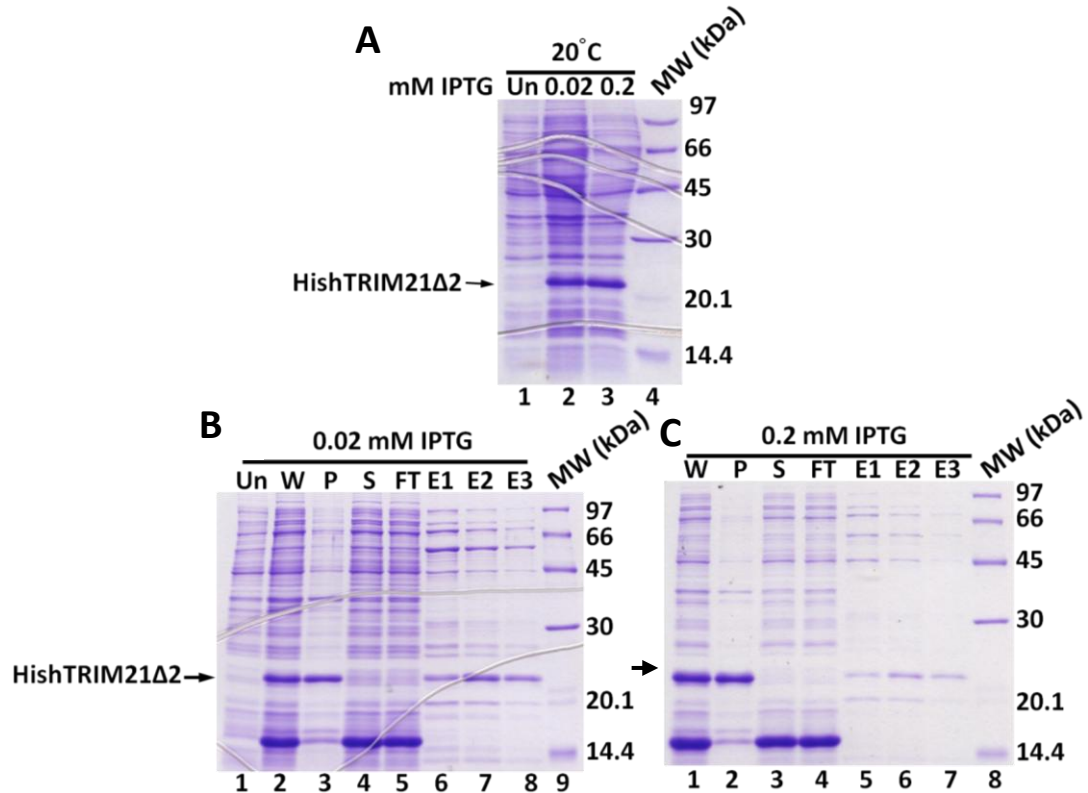
อนึ่ง ในการทดสอบการละลายของโปรตีนใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 1 mM benzamidine และ 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) ที่ประกอบด้วยเกลือ และเพื่อเป็นการขจัดผลกระทบจากการรบกวนการละลายของเกลือ จึงทำการทดสอบความสามารถในการละลายของ recombinant HishTRIM21 $\Delta$ 2 (287-475) protein จากการสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 20°C ที่เวลา 14 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย 0.2 mM IPTG ที่ความเข้มข้นเกลือต่าง ๆ กัน ตามวิธีการทดสอบดังข้อที่ 2.3.6 โดยเลือกความเข้มข้นเกลือที่ 150, 300, 500 mM ตามลำดับ ซึ่งพบว่าความแตกต่างของความเข้มข้นเกลือไม่มีผลในการเพิ่มหรือลดความสามารถในการละลายของโปรตีนชนิดนี้ ดังรูปที่ 3.2 อาจเนื่องจากความไม่ละลายที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากคุณสมบัติความเป็นประจุ ดังนั้น จึงเลือกความเข้มข้นเกลือที่ 150 mM (P150-EDTA) เพื่อทำการทดสอบคุณสมบัติการละลายและการทำบริสุทธิ์ของโปรตีนต่อไป



**รูปที่ 3.2** ความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อการละลายของ HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ดังภาพที่แสดงการตรวจสอบการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ที่ใช้ทำละลายโปรตีนพบว่าทั้งสามความเข้มข้น คือ 100, 300 และ 500 mM ให้ผลการละลายไม่ต่างกัน (W, P และ S แสดงถึง whole, pellet และ supernatant fraction ตามลำดับ)

นอกจากนี้ได้เปรียบเทียบผลของ IPTG ที่มีต่อการการแสดงออกของยีน ด้วยการเปรียบเทียบผลสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ที่อุณหภูมิ 20°C ที่เวลา 14 ชั่วโมง ด้วย 0.02 กับ 0.2 mM IPTG พบว่าที่ความเข้มข้น 0.02 mM IPTG เซลล์เจริญได้ดีกว่าการเลี้ยงที่ 0.2 mM IPTG (รูปที่ 3.3 A) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการละลายน้ำของโปรตีน

พบว่าที่ความเข้มข้น IPTG ต่ำ (0.02) สามารถสังเคราะห์โปรตีนที่อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้สูงกว่าการเลี้ยงที่ความเข้มข้น IPTG สูง (0.2) ดังผลการทดลองในรูปที่ 3.3 B และ C



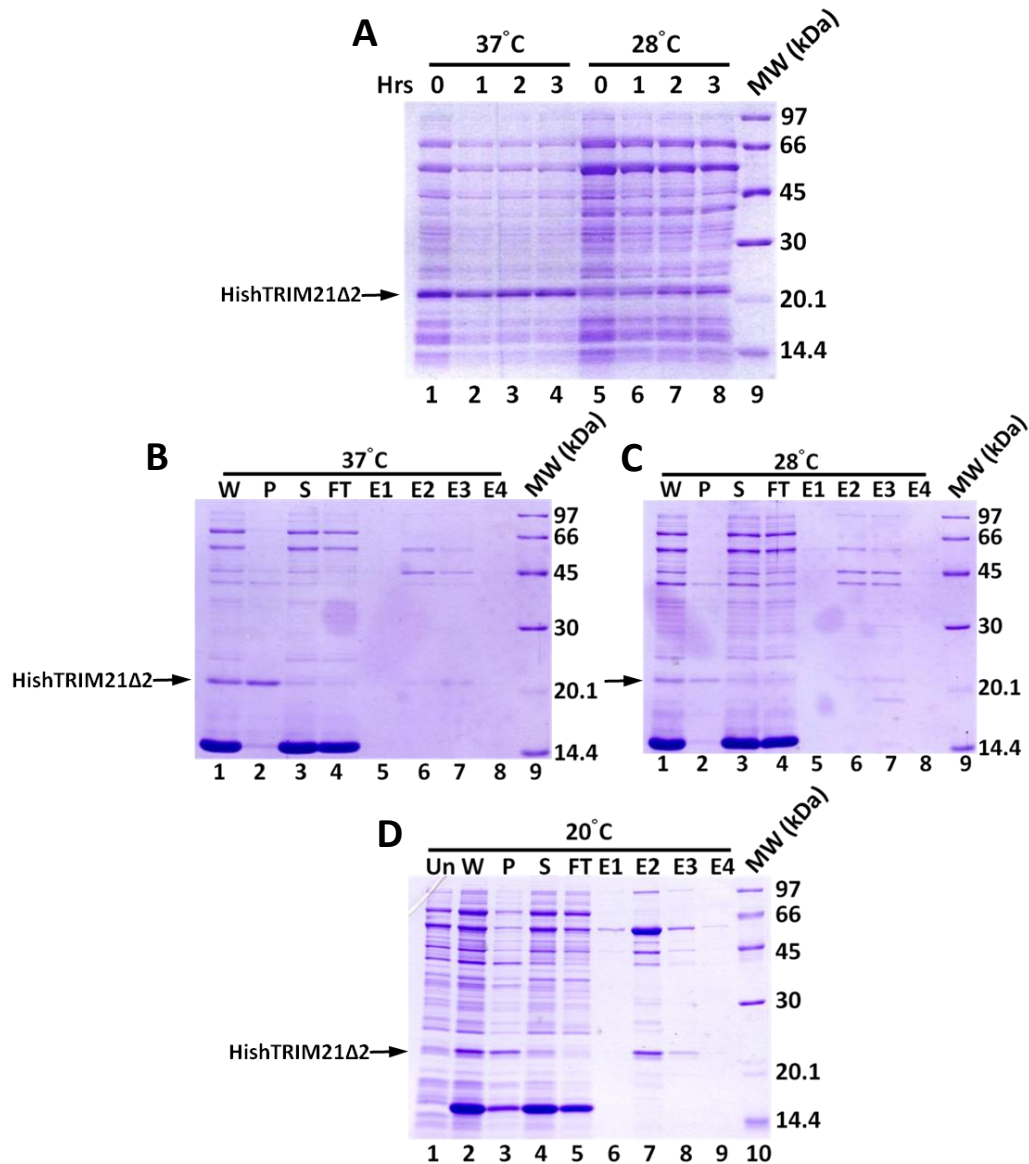
**รูปที่ 3.3** การกระตุ้นเซลล์ด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.02 mM สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21Δ2(287-475) ที่มีคุณสมบัติของการละลายมากกว่าการกระตุ้นด้วย IPTG 0.2 mM (A) ผลการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21Δ2(287-475) ที่อุณหภูมิ 20°C ที่เวลา 14 ชั่วโมง ด้วย 0.02 กับ 0.2 mM IPTG ตามลำดับ พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงด้วย 0.02 mM IPTG (แถวที่ 2) มีปริมาณเซลล์หนาแน่นกว่าเซลล์ที่เลี้ยงด้วย 0.2 mM IPTG (B) ผลการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ที่ 20°C จาก (A) เพื่อเปรียบเทียบผล IPTG ต่อการละลายของโปรตีน พบว่าการลด IPTG ทำให้โปรตีนอยู่ในรูปที่ละลายมากขึ้น (Un=uninduced, W=whole, P=pellet, S=supernatant, FT=flow through และ E=eluted fraction โดยที่ E1-E4 แสดงโปรตีนที่ผ่านการชะด้วย imidazole ครั้งที่ 1 ถึง 4)

### 3.1.2 การทดสอบการแสดงออกของยีน ความสามารถในการละลายและ การทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ร่วมกับโปรตีนพี่เลี้ยง (Chaperone protein)

เนื่องจากผลการทดสอบการละลายน้ำตามข้อ 3.1.1 รูปที่ 3.1 ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ที่ได้ต่ำมาก ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองสร้างโปรตีนในกลุ่มโปรตีนพี่เลี้ยง (Chaperone protein) เนื่องจาก Swartzs กล่าวว่า การสะสมของโปรตีนในไซโทพลาสมมากเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิด inclusion bodies เนื่องจากมีโปรตีนพี่เลี้ยงหรือกระบวนการป้องกันการตกตะกอนไม่เพียงพอ (Swartz, 2001) ถึงแม้ว่าการทดลองนี้ไม่เกิด inclusion bodies แต่การที่โปรตีนในการทดลองครั้งนี้ถูกสังเคราะห์ได้ยากใน *E.coli* (ผลการคำนวณจาก [www.biotech.ou.edu](http://www.biotech.ou.edu)) หากมีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนพี่เลี้ยงน่าจะมีส่วนเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีนเหล่านี้ได้ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ Chaperone set ของ TaKaRa ที่ต้องเพิ่ม tetracycline และ L-arabinose เพื่อกระตุ้นให้พลาสมิดสร้าง Chaperone protein ขึ้นก่อนการกระตุ้นการสร้างโปรตีนที่สนใจเมื่อ  $OD_{600} = 0.6$  โดยในชุดนี้ประกอบ DnaK หรือที่ถูกเรียกโดยทั่วไปว่า hsp70, GroEL, Tf (trigger factor), DnaJ, GrpE และ GroES ซึ่งมีขนาด 70, 60, 56, 40, 22 และ 10 KDa ตามลำดับ

โดยพลาสมิด pST50Trc2-HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ถูกนำเข้าสู่เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ JM109 ที่มี pG-KJE8 plasmid สำหรับ chaperone protein และทำการเลี้ยงเซลล์ที่ 37, 28°C 0.2 mM IPTG 4 ชั่วโมง และ 18°C 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง 0.02 mM IPTG และเติม 1 mg/ml L-arabinose, 10 ng/ml tetracycline เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของ pG-KJE8 plasmid ซึ่งช่วยสังเคราะห์โปรตีนพี่เลี้ยง ผลการสังเคราะห์โปรตีนที่แต่ละอุณหภูมิมีปริมาณน้อยกว่าหรือใกล้เคียงกับการสังเคราะห์ใน BL21(DE3)pLysS ดังรูปที่ 3.4 A รวมทั้งปริมาณของโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ แต่จะมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนมากกว่า (รูปที่ 3.4 B-D) จากผลการทดลองที่ได้ไม่พบความแตกต่างของปริมาณการผลิตโปรตีน โดยพบการแสดงออกของโปรตีนที่ตำแหน่งเดียวกับโปรตีนที่สนใจตั้งแต่เวลาที่ 0 ชั่วโมง ซึ่งเป็นตำแหน่งโปรตีนที่มีขนาดเท่ากับ GrpE protein ที่มีขนาด 22 KDa เช่นกัน อาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มความเครียดด้วยวิธีการนี้ส่งผลให้การเจริญของเซลล์ต่ำกว่าเดิมมาก เพื่อรักษาพลังงานในการสร้างความเสถียรให้เซลล์ เนื่องจากมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยของโปรตีนใน 2 ตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับการแสดงออกในเซลล์ที่มีการเพิ่ม chaperone plasmid โดยพบว่ามีการเพิ่มของความเข้มข้นโปรตีนที่ประมาณ 70 และ 56 KDa ซึ่งเป็นตำแหน่งของ DnaK และ Tf protein ที่เป็นโปรตีนพี่เลี้ยงพื้นฐานที่พบการแสดงออกได้บ่อยและทำหน้าที่ในการรักษาและเพิ่มความสามารถในการทนต่อ

ความเครียดของเซลล์ ดังการทดลองของ Sandee และคณะรวมทั้ง Kohiyama ที่พบการเพิ่มขึ้นของ DnaK chaperone protein เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของ osmolarity ภายในเซลล์ (meury *et al.*, 1991; Meury *et al.*, 1993; Sandee *et al.*, 2002)

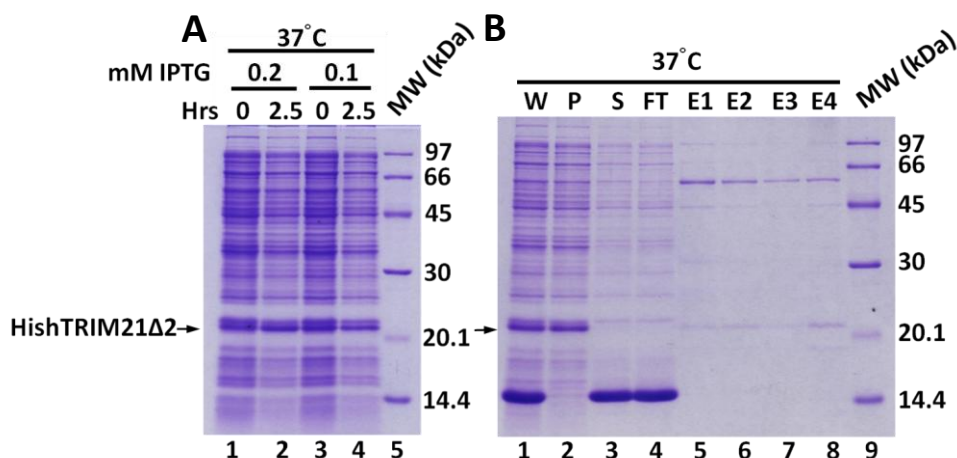


**รูปที่ 3.4** ผลการแสดงผลของยีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) และการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีนร่วมกับโปรตีนพี่เลี้ยง (Chaperone protein) ที่ 37, 28 และ 20°C (A) ผลการปรับปรุงการแสดงผลของยีนในการสังเคราะห์บีแอนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ร่วมกับโปรตีนพี่เลี้ยง (Chaperone protein) ที่ 37 และ 28°C พบว่าอัตราการเจริญของเซลล์และการผลิตโปรตีนเป้าหมายต่ำ โดยที่ (B และ C) แสดงผลการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ด้วย Talon affinity resin ที่อุณหภูมิ 37 และ 28°C ตามลำดับ พบว่าอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้เล็กน้อยทำให้ปริมาณโปรตีนที่ได้จากกระบวนการทำบริสุทธิ์ต่ำมาก และ

(D) แสดงผลการทำบริสุทธิ์ของโปรตีนจากการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ด้วย 0.02 mM IPTG พบว่าที่อุณหภูมิต่ำลงการละลายดีขึ้นเล็กน้อย และสามารถทำบริสุทธิ์ได้ดีขึ้น เนื่องจากพบแถบโปรตีนเป้าหมายที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ได้อย่างชัดเจน (แถวที่ 7 และ 8) (Un=uninduced, W=whole, P=pellet, S=supernatant, FT=flow through และ E=eluted fraction โดยที่ E1-E4 แสดงโปรตีนที่ผ่านการชะด้วย imidazole ครั้งที่ 1 ถึง 4)

### 3.1.3 การทดสอบการแสดงออกของยีนและความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ที่ผลิตในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ใน SPM (soluble protein media)

นอกจากการใช้วิธีการเพิ่ม chaperone protein แล้ว มีความสนใจที่จะเลียนแบบความเครียดที่เกิดขึ้นอีกอย่างตามธรรมชาติ ด้วยการเพิ่มสารเคมีบางตัวลงไป คือ sorbitol และ betaine ซึ่งวิธีการเลี้ยงเซลล์และเติมสารเคมีในกลุ่มนี้เป็นกระบวนการเลี้ยงที่พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่ม osmotic pressure ให้กับเซลล์ มีการสร้างสารบางอย่างเพื่อรักษาคุณภาพของโปรตีนภายในเซลล์ เช่น heat shock protein (Hsp) ดังที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 2.3.4 จากการทดลองเลี้ยงที่ 37°C พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ต่ำและเมื่อกระตุ้นด้วย IPTG แล้วไม่พบว่าคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเซลล์ต่างจากเดิมเมื่อเทียบด้วยการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงปกติ (ไม่แสดงภาพ) อย่างไรก็ตาม การเก็บตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมงจะเป็นการเก็บครั้งละ 500  $\mu$ l ส่วนเวลาอื่นๆ เก็บที่ 250  $\mu$ l จึงเป็นเหตุผลที่ทำให้ crude extract ที่ 0 ชั่วโมงมีความเข้มข้นมากกว่าที่ 2.5 ชั่วโมง เนื่องจากความเข้มข้นเซลล์มากกว่าจากใช้ปริมาตรที่เท่ากัน และการแสดงออกของยีนนั้นเกิด autoinduction (รูปที่ 3.5 A แถวที่ 1 และ 3) หรืออาจเป็น GrpE protein ซึ่งมีขนาดประมาณ 22 KDa เนื่องจากรูปแบบการแสดงผลของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสคล้ายกับรูปแบบผลของการผลิตโปรตีนร่วมกับโปรตีนที่เลี้ยง ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นเล็กน้อยของแถบโปรตีนที่ประมาณ 70 และ 56 KDa ซึ่งเป็นตำแหน่งของ DnaK และ Tf protein (รูปที่ 3.5 A) เมื่อนำมาทำบริสุทธิ์โปรตีน ผลของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสไม่พบแถบโปรตีนเป้าหมายใน Supernatant และ Flow Through fractions หากแต่พบแถบโปรตีนที่สนใจในส่วนของ eluted (E) fraction ดังแสดงในรูปที่ 3.5 B อย่างไรก็ตาม การทดลองเลี้ยงเซลล์ด้วย SPM media ไม่ประสบความสำเร็จ ให้ปริมาณโปรตีนในรูปที่ละลายน้ำไม่เพียงพอต่อการวิจัย จึงไม่เลือกวิธีการนี้ในการเลี้ยงเซลล์เพื่อการวิจัยต่อ



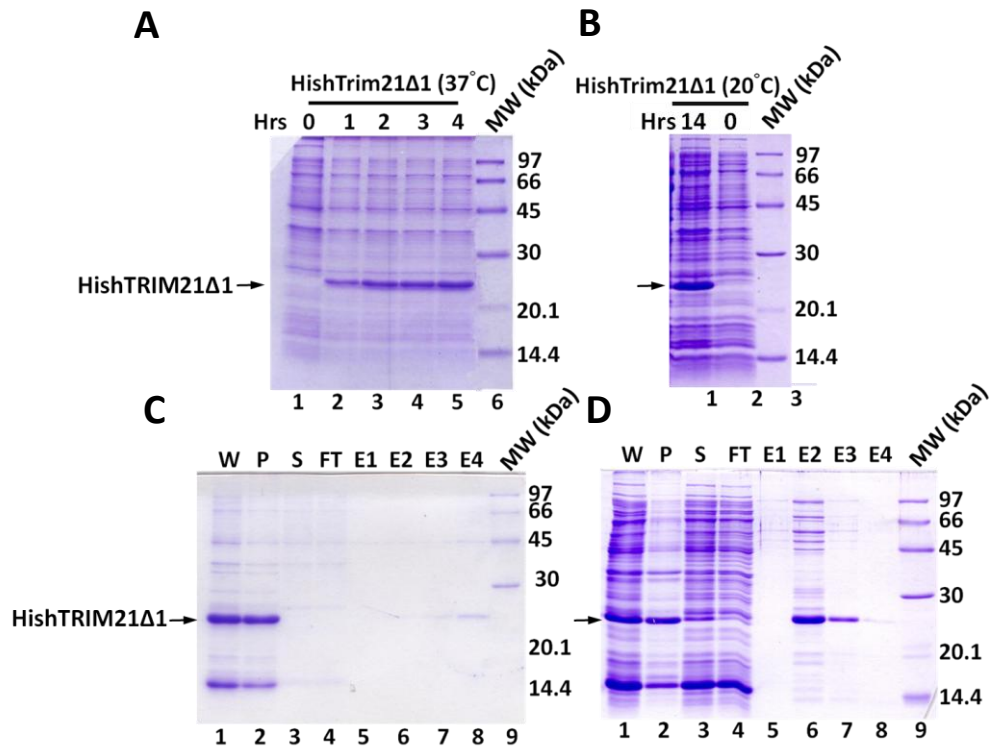
**รูปที่ 3.5** แสดงผลการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ภายใต้ระบบ SPM ที่ 37°C (A) ภาพแสดงผลการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ในระบบ SPM ที่อุณหภูมิ 37°C ที่เวลา 0 ถึง 2.5 ชั่วโมง โดยการกระตุ้นด้วย 0.2 และ 0.1 mM IPTG ตามลำดับ พบว่าปริมาณการแสดงออกไม่ต่างกัน (B) ผลการทำบริสุทธิ์ของ recombinant protein อยู่ในรูป insoluble form ไม่พบแถบโปรตีนใน S และ FT การทำบริสุทธิ์ให้โปรตีนน้อยมากไม่เพียงพอต่อการวิจัยในครั้งนี้ (W=whole, P=pellet, S=supernatant, FT=flow through และ E=eluted fraction โดยที่ E1-E4 แสดงโปรตีนที่ผ่านการชะด้วย imidazole ครั้งที่ 1 ถึง 4)

### 3.1.4 การทดสอบการแสดงออกของยีนและความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ที่ผลิตในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS

ทางผู้วิจัยได้สร้างพลาสมิด pST50Trc2-HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ซึ่งมีส่วนของกรดอะมิโนบนตำแหน่ง N-terminus เพิ่มเติมมาจาก TRIM21 $\Delta$ 2(287-475) และอาจเป็นผลให้กระบวนการพับม้วนของโปรตีนสมบูรณ์ถูกต้องมากขึ้น จึงสังเคราะห์โปรตีนขึ้นด้วยการใช้แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการสังเคราะห์โดยทำการเลี้ยงเซลล์ที่ 37°C ชักนำด้วย 0.2 mM IPTG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 20°C ชักนำด้วย 0.02 mM IPTG เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน จากผลของเจลอเล็กโทรโฟรีซิสพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) มีขนาดประมาณ 25 kDa ดังรูปที่ 3.6 A และ B พบว่าทั้งสองอุณหภูมิให้ปริมาณโปรตีนไม่ต่างกัน จึงทำการทดสอบการละลายและทำบริสุทธิ์โปรตีน ผลการทดลองพบว่าโปรตีนจากการผลิตที่อุณหภูมิ 37°C ไม่ละลายน้ำและทำ



บริสุทธิ์ได้น้อยมากไม่สามารถใช้ในการทดลองต่อไปได้ (รูปที่ 3.6 C) ต่างจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สังเคราะห์จากอุณหภูมิที่ต่ำกว่า คือ 20°C พบว่ามีการละลายน้ำที่ดีกว่าและสามารถทำบริสุทธิ์ได้มากและสามารถนำไปใช้ในการทดลองได้ (รูปที่ 3.6 D)

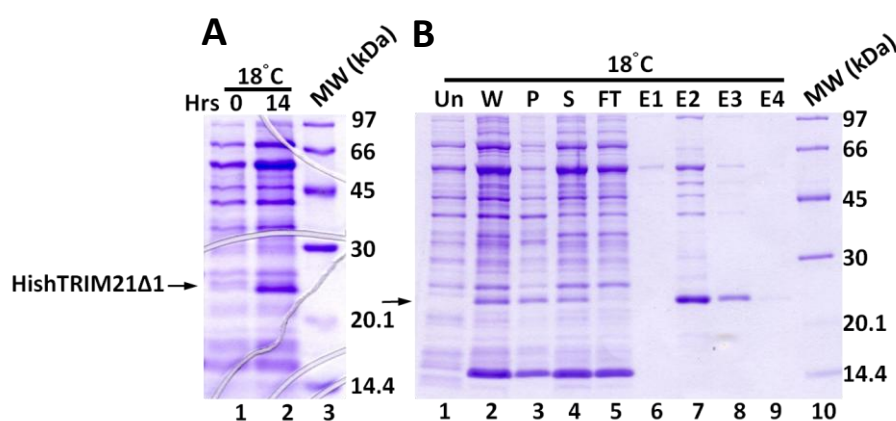


**รูปที่ 3.6** ผลการแสดงออกของยีน และความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21Δ1(275-475) ที่อุณหภูมิ 37 และ 28°C (A) ผลการแสดงออกของยีนในการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21Δ1(275-475) ที่อุณหภูมิ 37°C ที่เวลา 0 ถึง 4 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย 0.2 mM IPTG และ (B) อุณหภูมิ 20°C ที่เวลา 14 ชั่วโมง ด้วย 0.02 mM IPTG (C) ผลการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ที่ 37°C ไม่พบการละลายน้ำของโปรตีนเป้าหมาย และสามารถทำบริสุทธิ์โปรตีนได้เล็กน้อยไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้ทดสอบต่อไปได้ในขณะที่ (D) พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนมีความสามารถในการละลายน้ำได้ประมาณ 20-40% (S fraction แถวที่ 4) และสามารถนำมาทำบริสุทธิ์โปรตีนเพื่อการวิจัยในลำดับต่อไปได้ (W, P, S และ FT แสดงถึง whole, pellet, supernatant, และ flow through fraction ตามลำดับ และ E คือ eluted fraction โดยที่ E1-E4 แสดงโปรตีนที่ผ่านการชะด้วย imidazole ครั้งที่ 1 ถึง 4



### 3.1.5 การทดสอบการแสดงออกของยีนและความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ร่วมกับโปรตีนพี่เลี้ยง (Chaperone protein)

ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ร่วมกับโปรตีนพี่เลี้ยงโดยทำการทดลองเช่นเดียวกับรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ตามข้อที่ 3.1.2 ซึ่งผลการสังเคราะห์โปรตีนที่ได้มีความใกล้เคียงหรือมากกว่าเล็กน้อยกับการสังเคราะห์ใน BL21(DE3)pLysS (รูปที่ 3.7 A) โดยมีอัตราการละลายน้ำประมาณ 50% ซึ่งมากกว่าอัตราการละลายของ HishTRIM21 $\Delta$ 2 เมื่อมีการละลายเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีความเข้มข้นและมากขึ้น ดังรูปที่ 3.7 B (แถวที่ 7 และ 8)



**รูปที่ 3.7** รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) มีการแสดงออกของยีน ความสามารถในการละลาย และการทำบริสุทธิ์โปรตีนได้มากขึ้นด้วยการเลี้ยงที่ 18°C (A) ผลการแสดงออกของยีนในการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ที่อุณหภูมิ 18°C ที่เวลา 14 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย 0.02 mM IPTG และ (B) ผลการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากอุณหภูมิ 18°C พบว่าอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้บางส่วน เมื่อผ่านการตรึงผ่าน Talon affinity column ถูกดูดซับได้สูงเนื่องจากพบการลดลงอย่างมากของแถบโปรตีนเป้าหมายใน Flow through fraction ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการล้าง unbound protein หรือโปรตีนที่ไม่สามารถยึดเกาะเรซินได้ (Un=uninduced, W=whole, P=pellet, S=supernatant, FT=flow through และ E=eluted fraction โดยที่ E1-E4 แสดงแถบโปรตีนที่ผ่านการชะด้วย imidazole ครั้งที่ 1 ถึง 4)

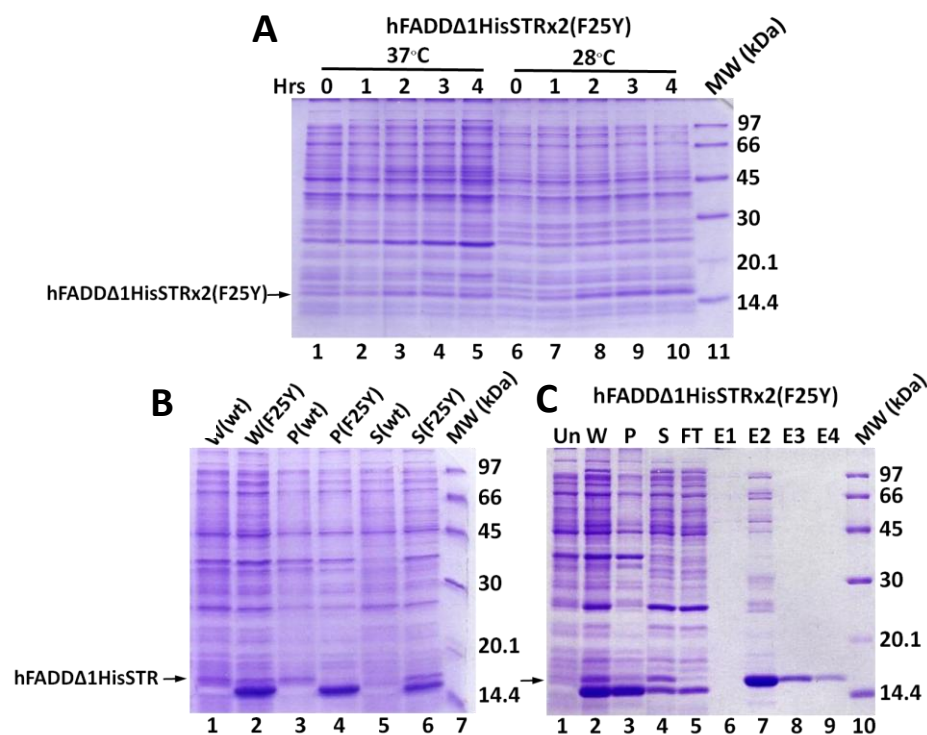
จากการพยายามเพื่อปรับปรุงการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน hTRIM21 พบว่าวิธีที่ดีและสะดวกที่ช่วยเพิ่มอัตราการละลายน้ำของโปรตีนได้มากขึ้น คือ การลดอุณหภูมิของการเลี้ยงลงให้อยู่ระหว่าง 18 ถึง 20°C ส่วนวิธีการอื่นๆ เช่น การเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน

พี่เลี้ยง (chaperone protein) ร่วมกับการสังเคราะห์โปรตีนเป้าหมาย ไม่เพิ่มความสามารถในการสังเคราะห์หรือการละลายของโปรตีนมากขึ้นจากการสังเคราะห์โปรตีนเป้าหมายเพียงอย่างเดียว และการละลายของโปรตีนที่สังเคราะห์ร่วมกับโปรตีนพี่เลี้ยงจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการลดอุณหภูมิการเลี้ยงลงเช่นกัน ส่วนการใช้ SPM นั้นไม่เหมาะสมต่อการทดลองนี้ เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มการสร้างโปรตีนที่ต้องการได้ และค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงสูงขึ้นด้วย จากการทดลองทั้งหมดไม่พบความแตกต่างอย่างสิ้นเชิงของปริมาณการแสดงออกของโปรตีนและความสามารถในการละลาย รวมถึงความสามารถในการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนทั้งสองขนาด โดยที่ HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) อาจให้ปริมาณโปรตีนสูงกว่า HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) เล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นจึงเลือกใช้การลดอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักในการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อการวิจัยต่อไป

### 3.1.6 การสังเคราะห์ การทดสอบความสามารถในการละลาย และการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) ที่ผลิตในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS

จากการทดลองของ Young และคณะในปี 2011 พบว่า FADD DED สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ TRIM21 ได้ (Young *et al.*, 2011) ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการศึกษาปฏิสัมพันธ์นี้จากระบบของแบคทีเรีย ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่า FADD DED ที่ผ่านการสังเคราะห์จากแบคทีเรียขาดคุณสมบัติของการละลายน้ำซึ่งไม่สามารถทำการวิจัยต่อได้ จึงต้องทำการปรับปรุงการสังเคราะห์ FADD DED ตามรายงานการทดลองของ Eberstadt และคณะในปี 1998 ที่แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเป็น F25Y FADD DED สามารถป้องกันการเกิด self-aggregation โดยไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของขนาดเซลล์ กระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) และยังคงรักษาคุณสมบัติในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ caspase 8 (Eberstadt *et al.*, 1998) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงนี้จะไม่ขัดขวางต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ TRIM21 เช่นเดียวกัน โดยผู้วิจัยทำการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(2-90) ซึ่งเป็น DED domain ของ FADD และผ่านการเปลี่ยนกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนที่ตำแหน่ง 25 เป็นไทโรซีน (F25Y) ด้วยการทำ quick change site-directed mutagenesis (SDM) และติดตามการแสดงออกที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2 มีขนาดประมาณ 15 KDa และจากตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมง มีแถบโปรตีนในตำแหน่งที่สนใจและมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามเวลาของการเก็บโดยตัวอย่างที่ 4 ชั่วโมงมีการแสดงออกของโปรตีนมากกว่าชั่วโมงที่ 0 ประมาณ 2 หรือ 3 เท่า (รูปที่ 3.8 A) ซึ่งการทำ SDM นี้ให้ผลสอดคล้องกับ Eberstadt และคณะ ดังผลการทดลองในรูปที่ 3.8 B ที่พบแถบโปรตีน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(2-90) (F25Y FADD DED) ในส่วนของ

supernatant (S(F25Y)) (แถวที่ 6) แสดงถึงความสามารถในการละลายน้ำได้เมื่อเปรียบเทียบกับ wt FADD DED ที่ไม่พบแถบโปรตีนใน supernatant (S(wt)) แต่อยู่ในส่วนของ pellet (P(wt)) และ (แถวที่ 5 และ 3 ตามลำดับ) และ (C) แสดงผลการทำบริสุทธิ์โปรตีน ซึ่งในการทำบริสุทธิ์นั้นใช้สารละลายโปรตีนในส่วนของ supernatant ผ่านคอลัมน์ *Strep-Tactin* affinity resin โดย hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2 จะถูกตรึงไว้กับเรซินผ่าน STR tag ได้ดีและเป็นจำนวนมาก ทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2 คงเหลือในบัฟเฟอร์ที่ผ่านการล้าง non-specific binding protein หรือ flow through (FT) ลดลงเป็นอย่างมาก เมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนตั้งต้นก่อนการผ่านคอลัมน์ หรือ supernatant (S) fraction (แถวที่ 5 และ 4 ตามลำดับ) ทำให้มีโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และพร้อมต่อการทำวิจัยเป็นจำนวนมาก



**รูปที่ 3.8** ผลการสังเคราะห์ hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) และความสามารถในการละลายที่มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ hFADD $\Delta$ 1HisSTRx1(wt) ทำให้สามารถทำบริสุทธิ์โปรตีนได้มาก (A) ผลการแสดงผลของยีนในการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์ hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2 ที่อุณหภูมิ 37 และ 28°C ตามลำดับ ซึ่งให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 15 KDa พบว่าที่อุณหภูมิ 28 °C มีอัตราการสังเคราะห์โปรตีน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2 มากกว่าที่อุณหภูมิ 37°C (B) การเปรียบเทียบผลการละลายหลังการทำ SDM ทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนสามารถละลายน้ำได้ และ (C) ผลการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ที่ 37°C พบว่าอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้สูง และเรซินสามารถตรึงโปรตีนได้มาก ทำให้พบแถบโปรตีนเป้าหมายได้ตั้งแต่ E2-E4

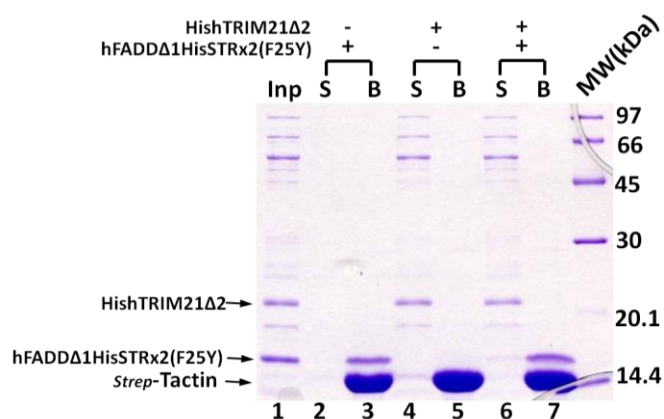
(Un=uninduced, W=whole, P=pellet, S=supernatant, FT=flow through และ E=eluted fraction โดยที่ E1-E4 แสดงโปรตีนที่ผ่านการชะด้วย imidazole ครั้งที่ 1 ถึง 4)

### 3.2 การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ของ FADD และ TRIM21 จากแบคทีเรียด้วย pull down assay

จากการรายงานของ Young และคณะที่พบว่าโปรตีน hFADD และ hTRIM21 สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ต่อกันและส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันตนเอง (Young *et al.*, 2011) เพื่อต้องการทราบตำแหน่งบนโปรตีนที่ใช้ในการเกิดปฏิสัมพันธ์ ผู้วิจัยจึงตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองตามวิธีการที่จะกล่าวในลำดับถัดไป

#### 3.2.1 การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) และ HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ที่ผลิตในแบคทีเรีย

การทดสอบปฏิสัมพันธ์นี้ใช้วิธีการ pull down assay เริ่มต้นจากการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx<sub>2</sub>(F25Y) มาทำการตรึงกับ Strep-tactin resin จากนั้นนำ HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) มาบ่มในสารละลาย beads[hFADD $\Delta$ 1HisSTRx<sub>2</sub>(F25Y)] ที่ 4°C ตามข้อ 2.4.1 และตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่า HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับ beads (แถวที่ 4 และ 5) และ HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ร่วมกับ hFADD $\Delta$ 1HisSTRx<sub>2</sub>(F25Y) ได้ เนื่องจากไม่พบแถบโปรตีนของ HishTRIM21 $\Delta$ 2 ใน beads (hFADD $\Delta$ 1HisSTRx<sub>2</sub>(F25Y)+HishTRIM21 $\Delta$ 2) (รูปที่ 3.9 แถว 7)

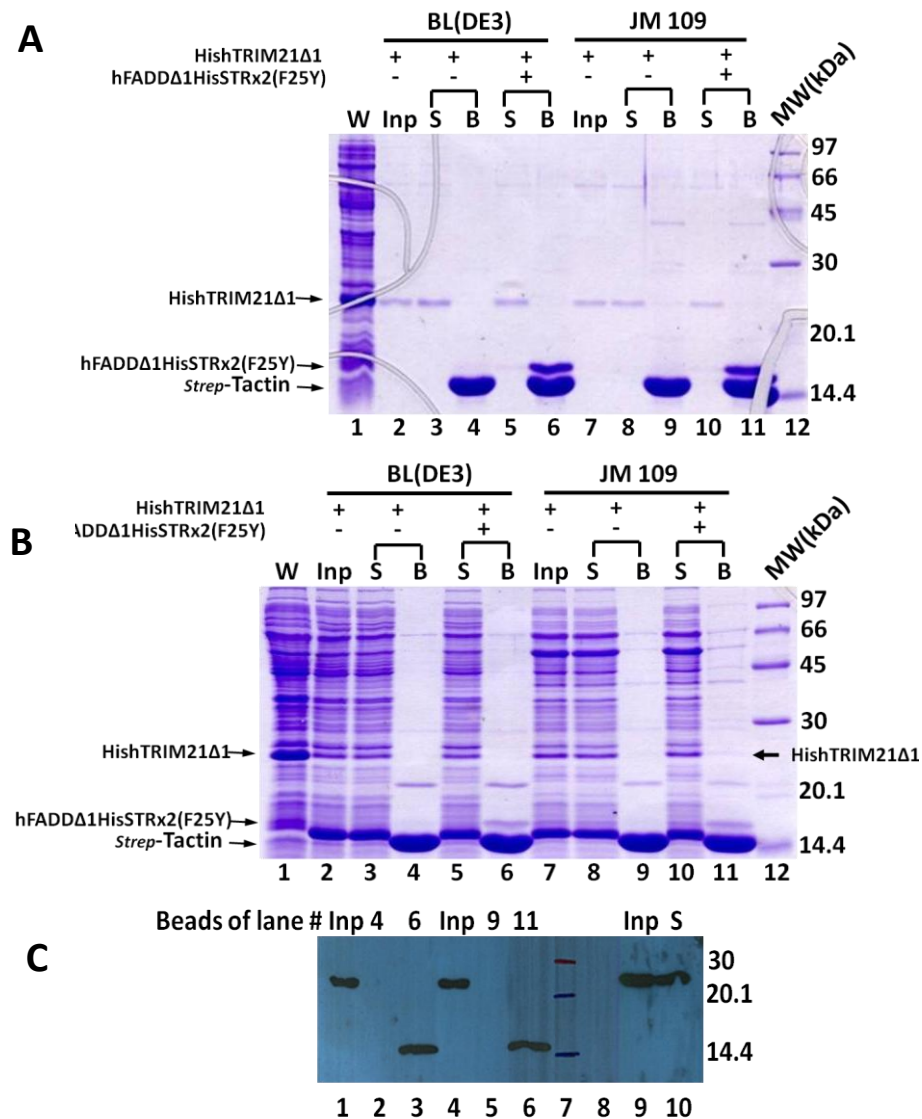


**รูปที่ 3.9** hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ได้ โดยแสดงผลการทำ pull down assay ด้วย Strep-Tactin resin ระหว่าง hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) และ HishTRIM21 $\Delta$ 2 protein จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เฉพาะ B30.2 domain ของ hTRIM21 ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ F25Y ของ DED

domain จาก hFADD ได้ โดย Inp, S และ B แสดงถึง input, supernatant และ beads fraction ตามลำดับ

### 3.2.2 การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) และ HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ที่ผลิตในแบคทีเรีย

เนื่องจากการทดลองตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) และ HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ก่อนหน้าไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบผลระหว่าง hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) และ HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ผลการทดลองที่ได้ยังไม่ปรากฏปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองเช่นเดิม (รูปที่ 3.10 A) นอกจากนี้ผู้วิจัยใช้ crude extract (whole cell extract) เพื่อหลีกเลี่ยงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับโปรตีนที่ต้องการในระหว่างการเก็บรักษาและการทำบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้โปรตีนที่อยู่ในรูปที่ใกล้เคียงกับสภาวะตามธรรมชาติ ซึ่งไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองเช่นกัน ผลที่ได้จาก gel electrophoresis (รูปที่ 3.10 B) พบว่า JM109 cell extract จะมี non specific binding มากกว่า BL21(DE3)pLysS cell extract และปริมาณของ soluble HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) จากทั้งสองเซลล์เท่าหรือใกล้เคียงกัน และในแถว 11 (รูปที่ 3.10 B) ซึ่งเป็น Beads[(hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y)+HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475))] พบแถบโปรตีนบางๆ ของ HishTRIM21 $\Delta$ 1 ที่ไม่พบในแถว 9 ที่เป็น beads[(blank+HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475))] อาจเกิดปฏิสัมพันธ์ต่อกันในระดับต่ำ ซึ่งทดสอบความถูกต้องต่อไปด้วย Western blot analysis (รูปที่ 3.10 C) โดยการนำตัวอย่างจาก pull down assay ใน beads fraction ที่ 2, 4, 6, 7, 9, และ 11 ของรูปที่ 3.10 B มาใช้ในการทดสอบ จากผลของ Western blot พบว่า แถวที่ 2 และ 5 ซึ่งเป็นตัวอย่างจาก beads(HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475)) # 4 และ 9 ไม่พบการแสดงออกโปรตีนทั้งสองชนิด เนื่องจากไม่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) ที่เป็นตัวกลางในการตรึงกับเรซิน ในขณะที่แถวที่ 3 และ 6 เป็นตัวอย่างจาก beads[hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y)+HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475)] # 6 และ 11 พบการแสดงออก hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) เท่านั้น แสดงว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) ได้



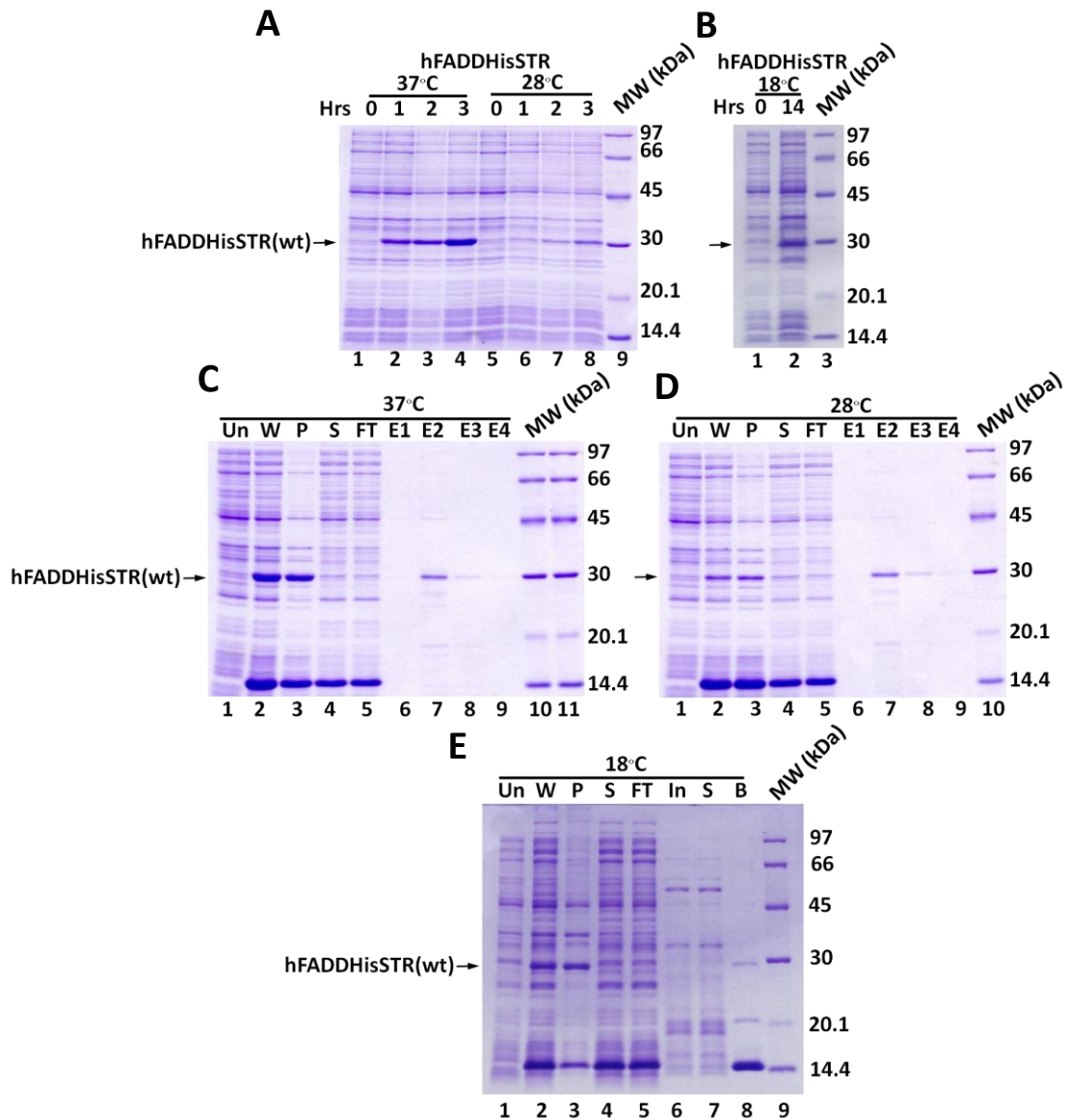
**รูปที่ 3.10** hFADDΔ1HisSTRx2(F25Y) ไม่สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับ HishTRIM21Δ1 ได้ (A) แสดงผลการทำ pull down assay ด้วย Strep-Tactin resin ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ระหว่าง hFaddΔ1HisSTRx2(F25Y) และ HishTRIM21Δ1(275-475) ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ต่อกัน นอกจากนี้ (B) ในการทดลองที่ทำกับ crude extract ในคอลัมน์ของ beads พบแถบโปรตีนเป้าหมายที่ตำแหน่งของ HishTRIM21Δ1 protein จึงได้ทดสอบเพื่อยืนยันผลโปรตีนด้วย Western blot analysis (C) พบว่าโปรตีนดังกล่าวไม่ใช่ HishTRIM21Δ1 เนื่องจากไม่พบรีคอมบิแนนท์ HishTRIM21Δ1(275-475) ใน beads[hFADDΔ1HisSTRx2(F25Y)+HishTRIM21Δ1(275-475)] # 6 และ 11 ดังนั้นการเพิ่มส่วนของ linker ที่มีลำดับเบสก่อน B30.2 domain ของ hTRIM21 ไม่อาจเพิ่ม

ความสามารถในการก่อให้เกิดปฏิสัมพันธ์กับ F25Y ของ DED domain จาก hFADD ได้ โดย Inp, S และ B แสดงถึง input, supernatant และ beads fraction ตามลำดับ

### 3.2.3 การสังเคราะห์ การทดสอบความสามารถในการละลาย และการทำ บริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADHisSTR จากแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS

จากการไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่าง DED domain ของ hFADD และ B30.2 domain ของ hTRIM21 ผู้วิจัยจึงสังเคราะห์ hFADD และ hTRIM21 เส้นเต็ม ในการสังเคราะห์ hFADD(wt) ทำโดยการสร้างพลาสมิด hFADHisSTR(wt) ทำการเลี้ยงที่ 37, 28°C 220 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.2 mM และการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 °C 220 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 3.11 A และ B ตามลำดับ ซึ่งให้ขนาดของโปรตีนบนแผ่นเจลที่ผ่านการทำเจลิเล็กโตรโฟรีซิสได้ขนาด 30 KDa ขนาดที่ได้นี้ไม่ตรงตามขนาดของ hFADD ที่ได้จากทฤษฎีที่ควรได้ประมาณ 25 KDa ซึ่งน่าจะเกิดจากผลรวมของ tag protein และความคลาดเคลื่อนของระบบถึงแม้ว่าทั้ง 6xHistidineg และ Strep-Tactin tag จะถูกยอมรับว่ามีขนาดเล็กไม่มีผลก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยนี้ไม่น่าส่งผลกระทบต่อผลการทดลองเช่นกัน แต่เมื่อนำโปรตีนไปทดสอบการละลายและทำบริสุทธิ์พบว่า wt FADD มีแถบโปรตีนใน W และ P fraction แสดงว่าโปรตีนละลายน้ำได้น้อย ซึ่งการทำบริสุทธิ์ผ่าน Strep-tactin resin สามารถดูดซับโปรตีนได้สูงมาก (รูปที่ 3.11 C-E)





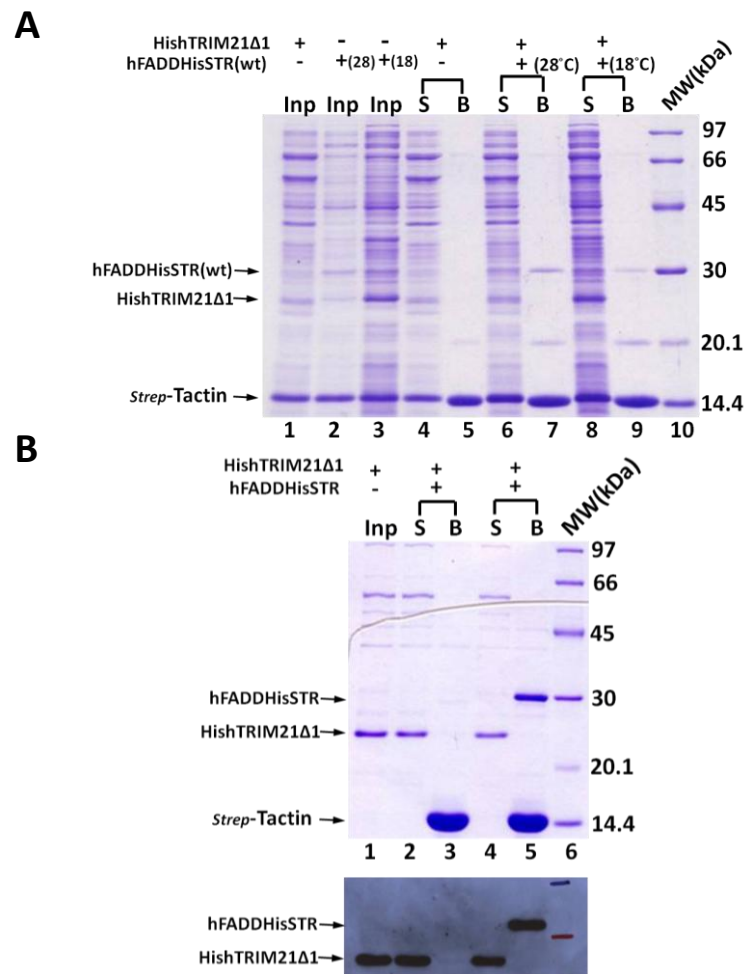
**รูปที่ 3.11** ผลการแสดงผลของยีน ความสามารถในการละลาย และการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADDHisSTR ที่อุณหภูมิ 37, 28 และ 18°C (A) ผลการแสดงผลของยีนในการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADDHisSTR ที่อุณหภูมิ 37 และ 28 °C ที่เวลา 0 ถึง 3 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย 0.2 mM IPTG และ (B) การเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 18°C ที่เวลา 14 ชั่วโมง ด้วย 0.02 mM IPTG พบว่าปริมาณการแสดงผลของยีนที่ 37°C เป็น 4 เท่าการเลี้ยงเซลล์ที่ 28°C ส่วนการแสดงผลของยีนที่ 18°C ใกล้เคียงกับการแสดงผลที่ 28°C (C และ D) ผลการทำบริสุทธิ์ของ recombinant protein ด้วย Talon resin ที่ 37 และ 28°C พบว่าอยู่ในรูปที่ละลายน้ำและทำบริสุทธิ์ได้บางส่วน โดยพบแถบโปรตีนเป้าหมายใน E2 และ E3 fraction และ (E) เป็นการทำบริสุทธิ์ของ recombinant protein ที่ 18°C จากนั้นทำ pull down assay ทันที ในภาพนี้ต้องการแสดงถึงความสามารถในการละลายและการทำบริสุทธิ์ ซึ่งไม่พบ



โปรตีนเป้าหมายใน Supernatant และ Flow through เมื่อผ่านการตรึงด้วยเรซินพบโปรตีนเป้าหมายใน beads fraction เล็กน้อย โดย inp, S และ B แสดงถึง input, supernatant และ beads fraction ตามลำดับ

### 3.2.4 การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADDHisSTR(wt) และ HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ที่ผลิตในแบคทีเรีย

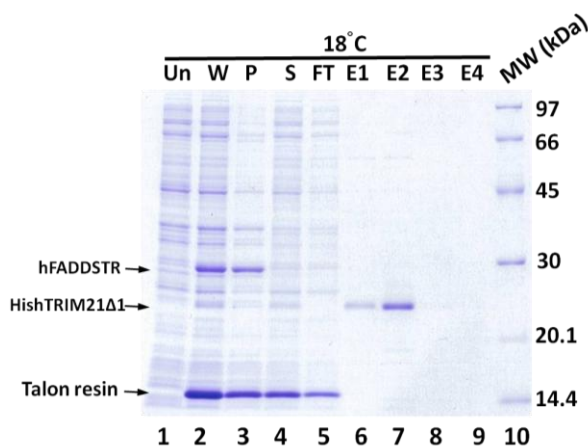
เนื่องจากการทดลองนี้ต้องการทราบตำแหน่งของการเกิดปฏิสัมพันธ์บนโปรตีน hTRIM21 เมื่อไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่าง hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) และ HishTRIM21 $\Delta$ 1 ดังนั้น hFADDHisSTR(wt) ซึ่งเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนเส้นเต็มจากเซลล์ที่ผ่านการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°C 4 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย 0.2 mM IPTG และ 18°C เป็นเวลา 14 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย 0.02 mM IPTG (ซึ่งอยู่ในรูป crude extract เพื่อลดผลกระทบจากกระบวนการทำบริสุทธิ์) จึงถูกนำมาใช้แทน hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2 (F25Y) โดยการยึดกับ *Strep*-tactin resin เพื่อเปรียบเทียบและทำการทดสอบการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 1 จากผลการทดลองพบว่า hFADDHisSTR(wt) จากทั้งสองอุณหภูมิไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ HishTRIM21 $\Delta$ 1 ได้ ในขณะที่ (B) แสดงผลการทดสอบปฏิสัมพันธ์ ระหว่าง hFADDHisSTR(wt) และ HishTRIM21 $\Delta$ 1 ที่อยู่ในรูปที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ทั้งคู่ซึ่งให้ผลเช่นเดิม คือ ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองชนิด นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำ Western blot analysis เพื่อขยายสัญญาณโปรตีนที่อาจมีการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองในระดับต่ำมากๆจนไม่สามารถตรวจพบด้วย gel electrophoresis ซึ่งผลของ Western blot ไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง ดังรูปที่ 3.12 B



**รูปที่ 3.12** HishTRIM21Δ1(275-475) ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ hFADDHisSTR(wt) (A) แสดงผลการทำ pull down assay ด้วย *Strep-Tactin* resin ระหว่าง hFADDHisSTR(wt) โดยใช้ crude extract ส่วนผลจากการทำ pull down assay พบว่า การ hFADD protein เส้นเต็มและอยู่ในรูป wt ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ HishTRIM21Δ1 ได้ รวมทั้ง (B) การทำ pull down assay ด้วยโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองใน crude extract ยืนยันผลด้วยการทำ Western blot analysis อีกครั้ง ซึ่งไม่พบ HishTRIM21Δ1(275-475) ใน beads fraction โดย Inp, S และ B แสดงถึง input, supernatant และ beads fraction ตามลำดับ

### 3.2.5 การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADDSTR(wt) และ HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) จาก co-expression plasmid ที่ผลิตภายในเซลล์เจ้าบ้านเดียวกัน

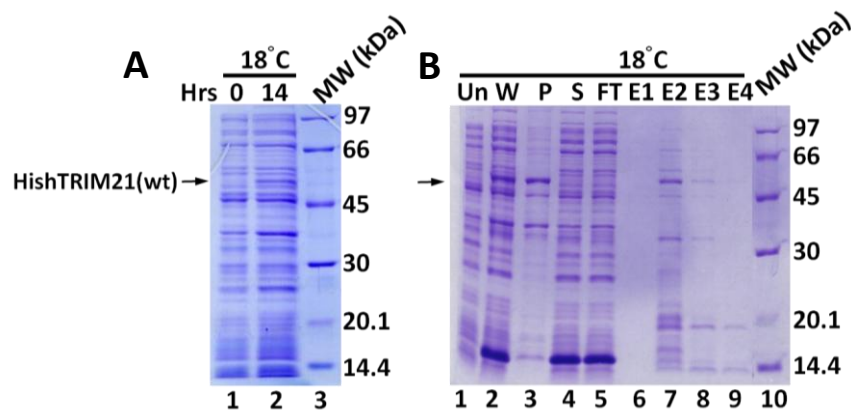
เนื่องด้วยการสังเคราะห์โปรตีนด้วยเซลล์เจ้าบ้านเป็นชนิดเดียว คือ หนึ่งโปรตีนต่อหนึ่งเซลล์ ให้ผลการทดลองที่ไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันระหว่างโปรตีนทั้งสอง จึงได้ทำการทดลองต่อด้วยการสังเคราะห์โปรตีนทั้งสองในเซลล์เจ้าบ้านเดียวกัน ผ่านการสร้างพลาสมิดที่เรียกว่า multi site co-expression vector โดยมีจุดประสงค์เพื่อลดปัจจัยเสี่ยงจากภายนอกเซลล์ที่อาจขัดขวางการเกิดปฏิสัมพันธ์ เช่น สภาวะแวดล้อมนอกเซลล์ที่แตกต่างไป กระบวนการทำบริสุทธิ์ อาจมีผลต่อโครงสร้างของโปรตีนตัวใดตัวหนึ่ง จึงต้องพยายามให้โปรตีนอยู่ใน native form มากที่สุด เช่น การทดลองของ Dzivenu และคณะในปี 2004 พบว่าการสังเคราะห์ nuclease DFF40 เดี่ยวๆ ได้โปรตีนที่พับม้วนผิดปกติไป แต่เมื่อสร้างร่วมกับ DFF45 ในเซลล์เดียวกันพบว่าโปรตีนทั้งสองเกิดปฏิสัมพันธ์เป็น complex แบบ heterodimer (Dzivenu *et al.*, 2004) ในการทำ co-expression อาจใช้หนึ่งพลาสมิดที่มีหลาย open reading frame (ORF) หรือ transform หลายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามการทดลองนี้เลือกใช้หนึ่งพลาสมิด คือ pST44 ในการ transform เข้าสู่เซลล์ *E.coli* BL21(DE3)pLysS ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับการยอมรับและใช้กันทั่วไปและมี T7 promotor ที่ถือว่ามีประสิทธิภาพสูงในการเกาะของโพลีเมอร์เรส เพื่อตรวจสอบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง (Khow & Suntrarachun, 2012; Selleck & Tan, 2001) โดยการใช้หลักการว่า หากโปรตีนทั้งสองถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์เจ้าบ้านเดียวกันและสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันได้ โปรตีนทั้งสองจะอยู่ในรูปที่เป็น complex เมื่อทำให้เซลล์แตก complex ของโปรตีนทั้งสองจะยังคงสภาพการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันไว้ได้ หากโปรตีนหนึ่งในสองตัวนี้ถูกตรึงไว้กับ beads จะพบโปรตีนอีกตัวรวมอยู่ใน complex นี้ด้วย ซึ่งการทดลองนี้ทำขึ้นระหว่าง hFADDSTR(wt) และ HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) จากผลการทดลองพบว่า hFADDSTR(wt) มีการแสดงออกสูงกว่า HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) แต่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ ในขณะที่ HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) อยู่ในรูปที่ละลายน้ำมากกว่า (เปรียบเทียบระหว่าง W, P และ S แถวที่ 2, 3 และ 4) เมื่อนำ crude extract มาทำการบ่มร่วมกับ Talon affinity resin ซึ่งมีโคบอลต์ตรึงบนพื้นผิวเรซิน และสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ His tag บนรีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ได้ดี เมื่อทำการชะโปรตีนด้วย imidazole พบเพียง HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ที่ยังเกาะกับ beads และไม่พบ hFADDSTR(wt) ในสารละลาย eluted fraction แสดงว่า hFADDSTR(wt) ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ HishTRIM21 $\Delta$ (275-475) ได้ ดังรูปที่ 3.13



**รูปที่ 3.13** hFADDSTR(wt) ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์กับ HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) แม้ว่าโปรตีนทั้งสองจะถูกผลิตภายในเซลล์เจ้าบ้าน โดยใช้วิธีเดียวกับการทำบริสุทธิ์โปรตีน เนื่องจากโปรตีนเป้าหมายเกิดจาก co-expression plasmid ภายในเซลล์เจ้าบ้าน แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS ที่เลี้ยงในสภาวะ 18°C และกระตุ้นด้วย 0.02 mM IPTG จากรูปเจลาพบว่าโปรตีน hFADDSTR(wt) มีความสามารถในการแสดงออกมากกว่า HishTRIM21 $\Delta$ 1 ที่พบใน W fraction น้อยมาก แต่สามารถจับกับ Talon resin ได้ดี จากผลการทดลองไม่พบโปรตีน hFADDSTR(wt) ใน bead fraction (Un=uninduced, W=whole, P=pellet, S=supernatant, FT=flow through และ E=eluted fraction โดยที่ E1-E4 แสดงโปรตีนที่ผ่านการชะด้วย imidazole ครั้งที่ 1 ถึง 4)

### 3.2.6 การทดสอบการแสดงออกของยีนความสามารถในการละลาย และการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 ที่ผลิตในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)pLysS

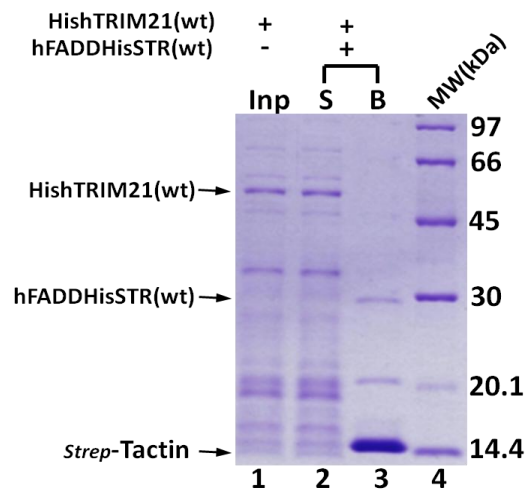
ในการสร้างและทดสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน hTRIM21 ทั้งสองขนาดเพื่อตรวจสอบว่า B30.2 domain จำเป็นและเพียงพอหรือไม่ในการเกิดปฏิสัมพันธ์ ซึ่งผลการทดลองไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ดังกล่าว ทางผู้วิจัยจึงสร้างพลาสมิด HishTRIM21(wt) ซึ่งเป็นโปรตีนเต็มของ hTRIM21 protein โดยการเลี้ยงเซลล์ที่ 18°C ชักนำด้วย 0.02 mM IPTG เป็นเวลา 14 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนที่ได้มีขนาด 54 kDa มีความสามารถในการละลายต่ำ แต่ยังสามารถพบโปรตีนเป้าหมายได้ใน E2 fraction เพียงเล็กน้อย



**รูปที่ 3.14** ผลการแสดงออกของยีน และการทำบริสุทธิ์ด้วย Talon resin ของรีคอมบิแนนท์ HishTRIM21(FL) (A) ผลการแสดงออกของยีนในการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HishTRIM21 ที่อุณหภูมิ 18°C ที่เวลา 14 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย 0.02 mM IPTG (B) ผลการทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ที่ 18°C พบว่าอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้น้อย เนื่องจากพบโปรตีนเป้าหมายใน E2 และ E3 เพียงเล็กน้อย (Un=uninduced, W=whole, P=pellet, S=supernatant, FT=flow through และ E=eluted fraction โดยที่ E1-E4 แสดงโปรตีนที่ผ่านการชะด้วย imidazole ครั้งที่ 1 ถึง 4)

### 3.2.7 การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADHisSTR(wt) และ HishTRIM21(wt) ที่ผลิตในแบคทีเรีย

เนื่องจากการทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADD และ HishTRIM21 ขนาดต่างๆ แต่ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ลองทดสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีคอมบิแนนท์ FADD และ TRIM21 เส้นเต็มที่ผลิตในแบคทีเรีย การทดลองนี้ใช้ hFADHisSTR(wt) ที่ยึดกับ *Strep-Tactin* beads เพื่อป่มกับ Talon purified HishTRIM21 จากการทดสอบพบว่า hFADHisSTR เส้นเต็ม ไม่สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับ HishTRIM21 เส้นเต็มได้ (รูปที่ 3.15) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปว่า โปรตีนทั้งสองที่ผลิตในแบคทีเรียไม่สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กันได้ ซึ่งระบบของแบคทีเรียไม่สามารถพับม้วนโปรตีนทั้งสองได้อย่างถูกต้อง และขาด post-translational modification



รูปที่ 3.15 hFADDHisSTR(wt) ไม่สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับ

HishTRIM21(wt) ได้ แสดงผลการทำ pull down assay ด้วย *Strep-Tactin* resin ระหว่าง hFADDHisSTR(wt) และ HishTRIM21(wt) protein ที่เลี้ยงในสภาวะ 18°C และกระตุ้นด้วย 0.02 mM IPTG จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไม่พบ TRIM21 ใน bead fraction โดย Inp, S และ B แสดงถึง input, supernatant และ beads fraction ตามลำดับ

ระบบของแบคทีเรียจึงไม่เหมาะสมต่อการศึกษากฎสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสอง ผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้ tissue culture แทน และการทดลองนี้เป็นการทดลองที่ทำต่อเนื่องจากงานวิจัยของ Young และคณะในปี 2011 (Young *et al.*, 2011) พบว่ามีการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง

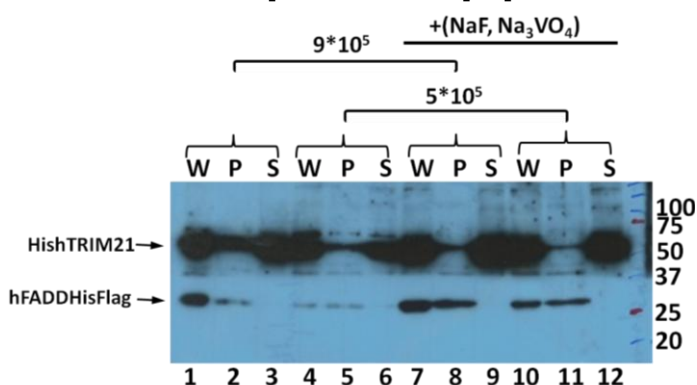
### 3.3 การทดสอบการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการในระบบ *Ex-vivo*

#### 3.3.1 Cell transfection

เนื่องจากการทดลองในแบคทีเรียไม่สามารถจะให้โครงสร้างโปรตีนหรือสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสอง จึงทำการทดลองต่อใน cell line เพื่อประสิทธิภาพของการนำส่งพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ จำเป็นต้องหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมต่อการใส่ ซึ่งจากการทดลองเพื่อหาปริมาณเซลล์ที่ใช้สำหรับสารนำส่ง Lipofectamine™ 2000 พบว่าการเริ่มต้นด้วย 800,000 เซลล์ต่อเพลตให้ผลความหนาแน่นเซลล์ที่ 90% confluent ส่วนปริมาณเซลล์สำหรับการทดลองการใช้ LT1 ต้องการความหนาแน่นที่ 50-60% จึงเริ่มต้นเพลตเซลล์ที่ปริมาณ 400,000 เซลล์ บนเพลตขนาด 6 cm

### 3.3.2 การแสดงออกของ FADD และ TRIM21 ใน HEK293T cells

เนื่องจากการทดลองนี้สังเคราะห์โปรตีนจาก human cell line ที่มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์เท่านั้นจึงต้องใช้ความระมัดระวังในการทำให้เซลล์แตกเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีคุณภาพจากไซโตซอล โดยพบว่าการใช้ NaF ร่วมกับ  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  ซึ่งทำหน้าที่รักษาสภาพโปรตีนที่ถูกฟอสโฟริเลชัน และ cell lysate ใน lysis buffer มีผลให้การแสดงผลของโปรตีนใน cell lysate ดีขึ้น (รูปที่ 3.16 แถวที่ 7-12) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมสารทั้งสองชนิด (รูปที่ 3.16 แถวที่ 1-6) ซึ่งผลการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองเมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติการละลายหรือตำแหน่งของโปรตีนภายในเซลล์ (localization) พบว่า TRIM21 ส่วนใหญ่อยู่ใน fraction ของ supernatant หรืออยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ ส่วน FADD ส่วนใหญ่อยู่ใน pellet หรืออยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ



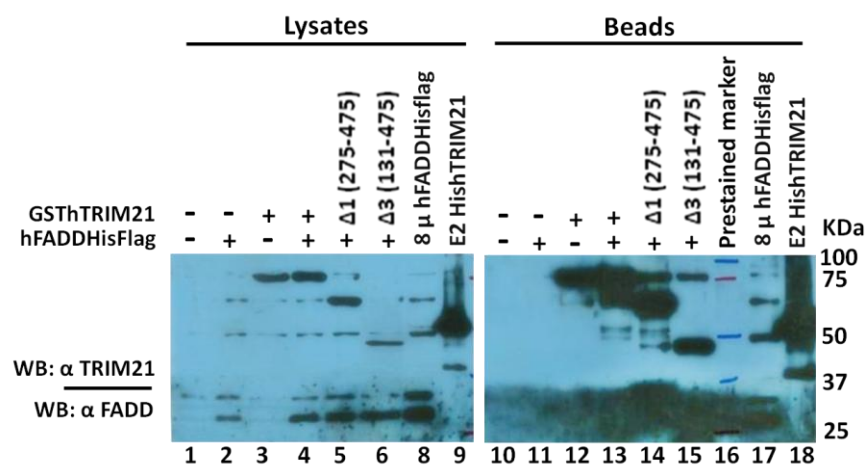
รูปที่ 3.16 ภาพแสดงผลการสังเคราะห์โปรตีน FADD และ TRIM21 ในเซลล์ เริ่มต้นขนาด 500,000 และ 900,000 เซลล์ ซึ่งหากในบัฟเฟอร์มี NaF+  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (แถวที่ 7-12) จะเข้มกว่าโดยเฉพาะที่เพิ่มการแสดงออกได้

### 3.4 การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ของ FADD และ TRIM21 จาก HEK293T cells

#### 3.4.1 GST pull down assay

ทำการเลี้ยงเซลล์ HEK293T cell เพื่อการศึกษาการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน FADD และ TRIM21 โดยการทำให้เซลล์แตกเพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADHisFlag, GSThTRIM21, GSThTRIM21 $\Delta$ 1(275-475), GSThTRIM21 $\Delta$ 2(287-475), GSThTRIM21 $\Delta$ 3(131-475) เนื่องจาก GST protein tag มีขนาด 25 KDa ทำให้ฟิวชันโปรตีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดโมเลกุลเพิ่มขึ้นโดยประมาณเป็น 75, 46 และ 50 KDa ตามลำดับ จากนั้นทำให้เซลล์แตกและนำส่วนของสารละลายเซลล์มาบ่มด้วย Glutathione Sepharose<sup>™</sup> 4B (GE healthcare) ที่อิมมูติด้วยบัฟเฟอร์ เพื่อทำ glutathione S-transferase (GST) pull down assay ตามวิธีการทดลองที่ 2.5.7 และตรวจสอบผลด้วย Western blot (รูปที่ 3.17) จากการทดลอง

พบว่าการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้จาก HEK293T cells ซึ่งเป็นแหล่งของโปรตีนที่ใช้ในการทดลองของ Young และคณะ (Young *et al.*, 2011) ก็ยังคงไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ เนื่องจากไม่พบแถบโปรตีนของ hFADDHisFlag รูป 3.17 แถวที่ 13, 14 และ 15 ตามลำดับ ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด แต่อาจเป็นเพราะขนาดของ tag ที่ใหญ่ ซึ่งอาจมีผลต่อการสร้างปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน ดังนั้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยน GST tag เป็น Strep-Tactin tag และทำ pull down assay



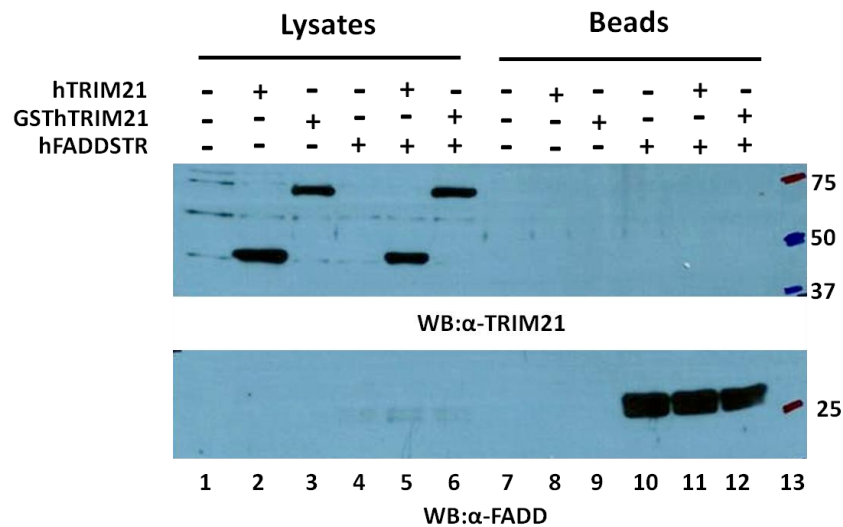
**รูปที่ 3.17** GSThTRIM21 ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ hFADDHisFlag ผลการทำ glutathione S-transferase (GST) pull down assay ระหว่าง hFADDHisFlag และ GSThTRIM21 ที่ขนาดต่างๆ กัน จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแม้จะเป็นการใช้โปรตีนที่ได้จาก human cell line ก็ไม่สามารถส่งเสริมให้เกิดปฏิสัมพันธ์ได้โดยที่ 1-6 แสดงชุดการทดลองของ lysates ส่วนแถวที่ 10-15 เป็น lysate ที่ผ่านการทำ pull down assay

#### 3.4.2 Strep-tactin pull down assay

เนื่องจากผลการทดลองด้วยการใช้ GST pull down ไม่ประสบผลสำเร็จจึงทำการทดลองขั้นต่อไปด้วยการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยการใช้ Strep tag protein (WSHPQFEK) แทนเนื่องจาก Strep-Tag II มีขนาดเล็กไม่มีผลต่อการพับม้วนของโปรตีนตามธรรมชาติ โดยการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADDSTR เพื่อทดสอบปฏิสัมพันธ์ต่อ GSThTRIM21 นอกจากนี้ยังสร้างรีคอมบิแนนท์ untagged hTRIM21 เพื่อทดสอบปฏิสัมพันธ์กับ hFADDSTR เพื่อเปรียบเทียบผลของการมีหรือไม่มี GST tag ซึ่งกระบวนการทดลองได้บ่มชุดทดลอง STR beads[hFADDSTR+GSThTRIM21] และ STR beads[hFADDSTR] ผลจาก Western blot หลังจากผ่านการ pull down ดังรูปที่ 3.18 พบว่าในคอลัมน์ของ STR beads พบ



เพียงรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADDSTR เท่านั้น แสดงถึงการที่ hFADDSTRไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ได้ทั้ง GSThTRIM21 และ hTRIM21TRIM21



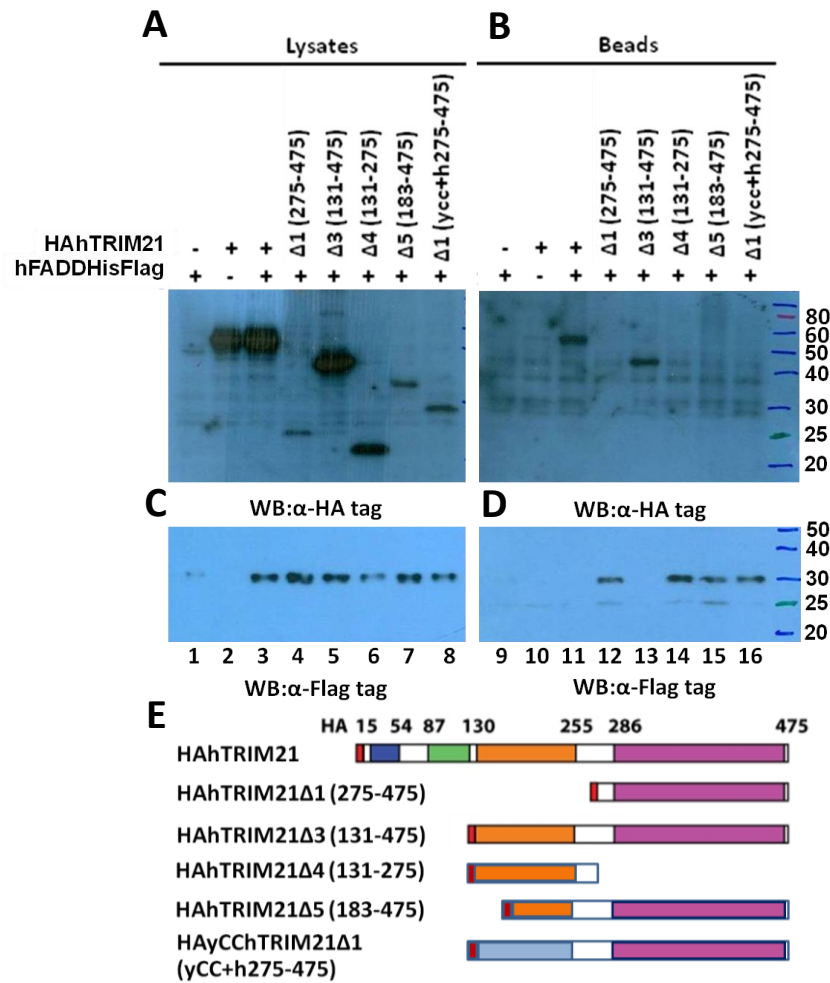
**รูปที่ 3.18** ทั้ง GSThTRIM21 และ hTRIM21 ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ hFADDSTR ได้ ภาพ Western blot แสดงผลการทำ *Strep-Tactin pull down assay* ระหว่าง hFADDSTR(wt) และ GSThTRIM21/hTRIM21(wt) จาก HEK293T cell พบว่า hFADD protein เต็มเต็มและอยู่ในรูป wt ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับทั้ง GSThTRIM21 และ hTRIM21 ได้ เนื่องจากพบเพียง hFADD(wt) protein ใน beads fraction เท่านั้น (แถวที่ 10-12) โดยที่ 1-6 แสดงชุดการทดลองของ lysates ส่วนแถวที่ 7-12 เป็น lysate ที่ผ่านการทำ pull down assay

### 3.4.3 Coimmunoprecipitation

จากการทดลองเพื่อศึกษาการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน FADD และ TRIM21 ด้วยการทำให้ pull down assay ของโปรตีนที่ผลิตทั้งในแบคทีเรียและ mammalian cell line ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง FADD และ TRIM21 ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ด้วยการทำ Co-immunoprecipitation ด้วยการสร้างพลาสมิดเพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADHisSTR และ HAhTRIM21 ขนาดต่างๆ และนำเข้าสู่ HEK293T cell จากนั้นนำสารละลายเซลล์มาป่นร่วมกับ anti-Flag tag M2 antibody เพื่อใช้ในการจับกับ hFADD protein ซึ่งจะเป็น bait แทนการทำบริสุทธิ์โปรตีนแต่ละตัวแยกกัน จากผลการทดลองของ Young และคณะในปี 2010 พบว่า HA-tag จะจับกับ hFADHisFlag ซึ่ง CoIP ครั้งนี้ใช้ และเพื่อทดสอบว่า HAhTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) (B30.2 domain) ของ TRIM21 เพียงพอต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ

FADD หรือจำเป็นต้องมีส่วนอื่นด้วย พลาสมิดจึงถูกสร้างเพิ่มอีก คือ HAhTRIM21 $\Delta$ 3(131-475) ซึ่งมีส่วนของ CC กับ B30.2 domain, HAhTRIM21 $\Delta$ 4(131-275) เป็นส่วนของ CC domain เท่านั้น และ HAhTRIM21 $\Delta$ 5(183-475) เป็นส่วนที่สองของ CC domain กับ B30.2 domain ดังแสดงในรูปที่ 3.19 B ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองเกิดได้ในสองชุดการทดลอง คือ HAhTRIM21 และ HAhTRIM21 $\Delta$ 3 (รูปที่ 3.19 แถวที่ 11 และ 13) ซึ่งสิ่งที่ทั้งสองมีเหมือนกันคือ CC และ B30.2 โดเมน ส่วนการทดลองที่เหลือ ไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ เนื่องจากไม่พบแถบโปรตีนใน beads fraction (รูปที่ 3.19 แถวที่ 13, 15 และ 16) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Young และคณะ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า B30.2 หรือ CC domain เพียงอย่างเดียวนั้นมีความจำเป็นต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์แต่ไม่เพียงพอ (แถวที่ 12 และ 14) ต้องมีควบคู่กันเป็นส่วนหนึ่งของรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยจึงสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ได้ (แถวที่ 13) และจำเป็นต้องใช้ CC domain ทั้งโดเมน หากเป็นเพียงครึ่งโดเมน ไม่เพียงพอต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ได้ (แถวที่ 15)

จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาถึงหน้าที่ของ CC domain ซึ่ง CC domain เกี่ยวข้องกับการเกิด dimerization ในโปรตีนหลายๆ ตัว รวมทั้งโปรตีนในกลุ่ม TRIM family และหนึ่งใน CC domain ที่มีการศึกษากันมาก คือ CC domain จากโปรตีน GCN4 ในยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อการศึกษาหน้าที่ของ CC ให้มากขึ้น ผู้วิจัยได้ทำการทดลองต่อ โดยการสร้าง HAYCChTRIM21 $\Delta$ 1 ที่เกิดจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ Gcn4 ของยีสต์ เข้าเชื่อมต่อกับ hTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) เพื่อแทนที่ CC domain ของ TRIM21 ด้วย GCN4 protein เนื่องจากมีสมมติฐานว่าการทำงานของ CC นั้น เป็น universal protein หรือไม่ ผลการทดลองพบว่าในชุดการทดลองที่ผ่าน CoIP ของ beads[HAYCChTRIM21 $\Delta$ 1(yCC+h275-475) ที่ตำแหน่งโปรตีนเป้าหมายนั้นไม่พบแถบโปรตีนที่สนใจปรากฏอยู่ (แถวที่ 16) แสดงว่า hFADDHisFlag ไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ HAYCChTRIM21 $\Delta$ 1(yCC+h275-475) ได้ โดยสรุปแล้วระบบการทดลองใน mammalian cell เหมาะสมกับการใช้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง อาจเนื่องจากมีโปรตีนตัวหนึ่งหรือทั้งสองตัวต้องการ post-translational modification ในการทำให้ปฏิสัมพันธ์นี้เกิดได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าแค่ B30.2 อย่างเดียวไม่เพียงพอ แต่ต้องการ coiled-coil domain ด้วยเพื่อให้ B30.2 เกิด dimerization ได้ อันจะนำไปสู่การสร้างคอมเพล็กซ์กับ FADD



**รูปที่ 3.19** hFADDHisflag สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ HAhTRIM21 และ HAhTRIM21Δ3(131-475) ได้ ด้วยการทำให้ co-immunoprecipitation พร้อมทั้งแสดงตำแหน่งของโดเมนต่างๆ บนโปรตีนแต่ละเส้น โดยภาพ (A) แสดงผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของ hTRIM21 ที่ขนาดต่างๆ กันรวมทั้งโคเมอริกโปรตีน HAyCChTRIM21Δ1(yCC+h275-475) และ (B) แสดงผลการทำ CoIP ของ hTRIM21 จาก (A) จากผลของ Western blot พบว่ากับ HAhTRIM21 และ HAhTRIM21Δ3(131-475) เท่านั้นที่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ hFADDHisFlag ได้ (แถวที่ 11 และ 13) ขณะที่รีคอมบิแนนท์โปรตีนอื่นไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ต่อกัน รวมทั้ง HAyCChTRIM21Δ1(yCC+h275-475) ซึ่งเป็นโคเมอริกโปรตีนที่ได้จาก GCN4 ของยีสต์ ส่วน (C) และ (D) แสดงผลของการแสดงออกของ hFADDHisFlag และผลที่ได้หลังการทำ CoIP ของการทำ ระหว่าง FADD และ TRIM21 ที่ขนาดต่างๆ กัน โดยที่แผนภูมิ (E) แสดงขนาดของ hTRIM21 protein ที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ทั้งหมด แต่ผลการทดลองระหว่าง HAyCChTRIM21Δ1 (yCC+h275-475) ซึ่งเป็น chimeric protein ที่มี CC domain จากยีสต์ไม่

สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับ recombinant hFADDHisFlag protein เช่นกัน โดยที่ 1-8 แสดงชุดการทดลองของ lysates ส่วนแถวที่ 9-16 เป็น lysate ที่ผ่านการทำ pull down assay

## บทที่ 4

### วิเคราะห์ผลการทดลอง

#### 4.1 การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADD และ hTRIM21 ที่ผลิตในแบคทีเรีย

เนื่องจากการเตรียมโปรตีนจากแหล่งธรรมชาติบางชนิดนั้นทำได้ยาก กระบวนการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนจึงถูกนำมาใช้ในการแก้ปัญหานี้ การใช้ *E.coli* ซึ่งมีพลาสมิดที่ใช้ด้วยกันได้มาก แต่ก็ยังมีโปรตีนบางอย่างที่ไม่สามารถผลิตได้หรือน้อยมาก จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงอีกหลายอย่างเพื่อประสิทธิภาพของการผลิต ไม่ว่าจะเป็นการเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสม ความเสถียรของ mRNA codon bias การเกิดและป้องกัน inclusion body การย่อยสลาย การตัด หรือการผลิตร่วมกัน สำหรับการทดลองผู้วิจัยได้ปรับปรุงการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนหลายวิธี เช่น การลดอุณหภูมิการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียลงมาที่ 20°C การใช้ tag ซึ่งช่วยในการละลายของโปรตีนได้ และทำให้การทำบริสุทธิ์ของโปรตีนดีขึ้นด้วยการใช้ affinity column กระบวนการเพิ่มความเครียดต่อเซลล์เป็นอีกหนึ่งวิธีการที่นิยมใช้ในการปรับปรุงการสังเคราะห์โปรตีน ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ใช้การเลี้ยงใน soluble protein media (SPM) ที่มีการเติม sorbitol และ betaine การสร้างสภาวะเครียดนี้จึงสอดคล้องกับการทดลองที่ทำการสังเคราะห์โปรตีนร่วมกับโปรตีนที่เลี้ยง chaperone โดยระบบนี้ถูกสร้างขึ้นเพื่อเลียนแบบกระบวนการในธรรมชาติเมื่อต้องมีการสร้างโปรตีนในภาวะวิกฤตต่าง ๆ เช่น ความร้อน ความเย็น ความเป็นกรด-ด่าง เกลือ โดยสรุปแล้วหน้าที่ของโปรตีนที่เลี้ยงคือการป้องกันการเกาะกลุ่มของโปรตีน และมีบางชนิดที่มีหน้าที่เฉพาะเพื่อช่วยคลายโปรตีนจากการเกาะกลุ่มและช่วยในการม้วนพับโปรตีนคืนกลับ เช่น GroES และ GroEL ส่วน tag protein ไม่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดหรือไม่เกิดปฏิสัมพันธ์เนื่องจากมีขนาดเล็กมากน้ำหนักโมเลกุลน้อย

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าการทดลองนี้ทำขึ้นเนื่องจากความสนใจในการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADD และ hTRIM21 ที่ผลิตขึ้นในแบคทีเรีย โดยเริ่มต้นด้วยการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) ซึ่งเป็น DED domain กับ HishTRIM21 $\Delta$ 2(287-475) ที่เป็นส่วนของ B30.2 domain และปฏิสัมพันธ์ระหว่าง hFADD $\Delta$ 1HisSTRx2(F25Y) กับ HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ทั้งสองการทดลองไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างชิ้นส่วนของโปรตีนทั้งสอง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเส้นเต็ม hFADHisSTR เพื่อทดสอบปฏิสัมพันธ์ที่มีต่อ HishTRIM21 $\Delta$ 1(275-475) ที่ผลิตทั้งระบบที่มี

และไม่มีโปรตีนพี่เลี้ยง (chaperone protein) รวมทั้งทำการทดสอบจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และ cell supernatant อีกทั้งยังได้ทำการตรวจสอบความถูกต้องเพื่อตรวจสอบสัญญาณที่อาจมีอยู่เพียงเล็กน้อยด้วย Western blot analysis แต่ไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์เช่นเดียวกัน ผู้วิจัยจึงทดสอบต่อด้วยการใช้ co-expression transformation เพื่อทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสองถูกผลิตขึ้นภายในเซลล์เจ้าบ้านเดียวกัน ผลการทดลองที่ได้นั้น ไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง ในลำดับสุดท้ายของการทดลองด้วยแบคทีเรียผู้วิจัยได้ทดสอบการเกิดปฏิสัมพันธ์ด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน hFADDHisSTR และ HishTRIM21 ผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสองไม่สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันได้ ซึ่งจากผลการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่าการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสองในแบคทีเรียไม่สามารถก่อให้เกิดปฏิสัมพันธ์ต่อกันได้ ถึงแม้ผู้วิจัยจะทำการปรับปรุงการแสดงออกด้วยวิธีการต่างๆ แล้วก็ตาม จากการทดลองที่ผ่านมาแล้วอาจกล่าวได้ว่า bacterial system ไม่สามารถผลิต hFADD และ hTRIM21 ที่มี activity เหมาะสมต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสองได้ การเกิดปฏิสัมพันธ์อาจต้องมี post-translational modification เนื่องจากการทดลองใน tissue culture พบว่า โปรตีนทั้งสองเกิดปฏิสัมพันธ์กันได้ (Young *et al.*, 2011) แต่ในแบคทีเรียเซลล์ไม่มีกระบวนการนี้

#### 4.2 การตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ของ FADD และ TRIM21 ที่ผลิตใน HEK293T cells

จากผลการทดลองตามข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ซึ่งเป็นการทำ GST และ *Strep*-tactin pull down assay ซึ่งทั้งสองการทดลองไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองชนิด อาจเนื่องเพราะ GST tag protein มีขนาดใหญ่ถึง 25 KDa ทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน GSThTRIM21 มีขนาดประมาณ 75 KDa นั้น ขนาดใหญ่ที่เกินไปจนอาจไปมีผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน hTRIM21 ตามธรรมชาติ ทำให้เกิดการเปลี่ยน conformation ที่อาจบดบัง binding site หรือทำให้ binding site ทั้งสองไม่สามารถสัมผัสกันได้ ในขณะที่มีการทดลองของ Yang และคณะ 2009 พบว่า TRIM21 $\Delta$ 1 สามารถจับกับ IRF3 (IFN regulatory factor 3) ผ่านการทำ GST pull down assay (Yang *et al.*, 2009) แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัย ไม่สามารถทำการทดลองเพื่อยืนยันผลดังกล่าวได้ และสาเหตุก็ไม่ใช่ที่แน่ชัด ในขณะที่ *Strep*-Tactin pull down ก็ไม่สามารถแสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง FADD และ TRIM21 ได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสรุปว่าไม่สามารถทำ pull down assay ได้ ถึงแม้จะมีการเกิดปฏิสัมพันธ์ภายในเซลล์ (Young *et al.*, 2011) อาจเป็นผลจากสภาวะภายนอกที่เปลี่ยนไปมีผลต่อปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นแล้วภายในเซลล์ หรืออาจมีเหตุผลอื่นใดที่อาจต้องตรวจสอบ และเพื่อยืนยันระบบการทดลองจึงทำ Co-immunoprecipitation ซึ่งด้วยวิธีการนี้ มีการยืนยันผลการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสองไว้แล้ว (Young *et al.*,

2011) ซึ่งในเบื้องต้นผู้วิจัยสามารถใช้เทคนิค co-immunoprecipitation ในการแสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง FADD และ TRIM21 ได้ (ไม่แสดงผล)

FADD อาศัย Death-effector domain ในการสร้างปฏิสัมพันธ์กับ TRIM21 (Young *et al.*, 2011) และโดเมนดังกล่าวของ FADD จำเป็นและเพียงพอต่อปฏิสัมพันธ์นี้ แต่รายงานของ Young และคณะ ยังไม่ชัดเจนว่า DED ของ FADD สร้างปฏิสัมพันธ์อย่างไรกับ TRIM21 ถึงแม้ D74A FADD สามารถมีผลต่อ TRIM21 self ubiquitination แต่ D74A FADD ยังมีปฏิสัมพันธ์ต่อ TRIM21 ที่ดีกว่า wild type FADD (Young *et al.*, 2011) ดังนั้นการค้นหาตำแหน่งบน DED ของ FADD ที่จำเป็นต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ TRIM21 จึงเป็นงานในอนาคตที่น่าศึกษาต่อไป

ในส่วนของ TRIM21 เป็นที่ทราบกันดีว่าส่วนของ B30.2 domain เป็นส่วนที่จำเป็นต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ FADD แต่ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่า โดเมนดังกล่าวเพียงพอต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ FADD หรือไม่ ซึ่งในการศึกษานี้ เป็นครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่า B30.2 domain อย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการสร้างปฏิสัมพันธ์ดังกล่าว ดังรูปที่ 3.19 แถวที่ 12 (Waji *et al.*, 2012) การที่ TRIM21 จะเกิดปฏิสัมพันธ์กับ FADD ได้นั้นต้องอาศัย coiled-coil domain (รูปที่ 3.19 แถวที่ 13)

จากผลการทดลองในรูปที่ 3.19 แถวที่ 16 ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน HAYCChTRIM21 $\Delta$ 1(yCC+h275-475) ซึ่งไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนนี้ที่มีต่อ hFADHisFlag ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองนี้ยังไม่สามารถตอบข้อสงสัยที่ว่าโปรตีนมี conformation ที่ถูกต้องหรือไม่ การทดลองนี้จึงควรมีการทดสอบว่า HAYCChTRIM21 $\Delta$ 1(yCC+h275-475) สามารถสร้าง dimer กับ TRIM21 CC domain ส่งเสริมให้เกิด dimer ใน TRIM21 และอาจจะไม่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิสัมพันธ์โดยตรง (Yang *et al.*, 2009) แต่อาจมีส่วนในการคงรูปโครงสร้างของโปรตีน ส่งเสริมให้เกิดการรวมตัวเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น เช่น การสะสมในไซโตพลาสเป็น cytoplasmic body การสร้าง homodimer (Javanbakht *et al.*, 2006) แต่ถ้าตัด CC domain ออกจะไม่มี self-association เพราะพบ monomer ใน gel filtration การตัดโดเมนอื่นทำให้ปฏิสัมพันธ์ที่เกิดจะลดลงบ้าง การเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนอาจเป็นหน้าที่ของ B30.2 domain มีการตั้งสมมติฐานว่า CC จำเป็นต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ในการ recruit โปรตีนอื่นมาจับกับ B30.2 domain (Li *et al.*, 1994; Reymond *et al.*, 2001.)

จากการทดลองของ Rhodes และคณะในปี 2002 พบว่า รูปร่าง CC ที่ได้เป็น short rod-like structures วางตัวอยู่ได้พลาสมาเมมเบรน ส่วน B-box น่าจะช่วยในการคงความ

เสถียร (Rhodes & Trowsdale, 2007) CC domain มีโครงสร้างทุติยภูมิแบบ left hand helix โดยมี Leucine zipper ที่ตำแหน่ง 211-232 มีกรดอะมิโนลูซีน 4 ตัว มีความเป็น Hydrophobic ที่ทำให้ helix คงรูปได้ ข้างในเกลียวเป็น hydrophobic ที่มีรอบนอกเป็น polar ที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมหรือน้ำด้วย electrostatic interaction โครงสร้าง CC เป็นไปตามรูปข้างล่างนี้ มีความเป็นไปได้ว่าอาจมีการขดพับ (รูปที่ 4.1)

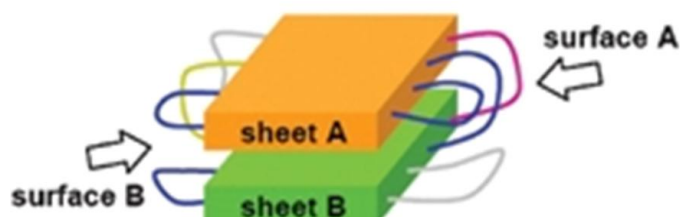


**รูปที่ 4.1** ภาพแสดงโครงสร้างทุติยภูมิของ CC domain ที่มีลักษณะความเป็น  $\alpha$ -helix 2 ช่วงที่คั่นด้วยตำแหน่ง 167-180 ที่มีคุณสมบัติความเป็นเกลียวน้อย (Ottoosson *et al.*, 2006)

จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าปฏิสัมพันธ์นี้จำเป็นต้องมี B30.2 ซึ่ง B30.2 หรือ PRY-SPY domain เป็นโดเมนทางปลายคาร์บอกซิลิกที่มีอยู่ครึ่งหนึ่งในกลุ่มของ TRIM family protein ซึ่งทำหน้าที่ในการเกิดปฏิสัมพันธ์ และไม่เกี่ยวข้องกับการเกิด dimer แต่ B30.2 น่าจะเป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการสร้างปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนอื่น เช่น ในการจับ IgG เช่น B30.2 ของ FMF/TRIM20 จับกับ caspase 1 เพื่อควบคุมการสร้าง IL-1 $\beta$ , (Chae *et al.*, 2006) B30.2 ของ TRIM25 จับ RIG1 (Gack *et al.*, 2007) และ B30.2 ของ TRIM21 จำเป็นและเพียงพอต่อการจับกับ IRF3 และ hlgG (Keeble *et al.*, 2008; Rhodes & Trowsdale, 2007) TRIM5 B30.2 จับ HIV capsid สูดถ่าย PRY-SPY หรือ B20.2 จับโดยตรงกับแคปซิดของเรโทรไวรัส นอกจากนี้การทดลองของ Ottoosson (Ottoosson *et al.*, 2006) กล่าวว่า ตำแหน่งของ B30.2 เพียงอย่างเดียวนั้น สลายได้โดยง่ายทั้งในระหว่างการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์เจ้าบ้านหรือการคืนกลับการพับม้วน มีรายงานการวิจัยหลายชิ้นที่แสดงว่า การเกิดปฏิสัมพันธ์นั้นต้องอาศัย B30.2 domain ตามสมมติฐานหลายข้อ เช่น มีการศึกษาว่าใน TRIM21 นั้นถ้าตัดตัวใดตัวหนึ่งใน RBCC ออก แต่มี B30.2 domain จะยังคงรักษาความสามารถในการเติมฟอสเฟต ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุให้เกิดปฏิสัมพันธ์คงอยู่ แต่หากตัด B30.2 domain ไม่พบการเกิดปฏิสัมพันธ์ เนื่องจากไม่มีการเติมฟอสเฟต ซึ่งมีกรดอะมิโนไทโรซีน 3 ตำแหน่งที่สำคัญ โดย Y393 เมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนทำให้ไม่สามารถเกิดการเติมฟอสเฟต ส่งผลให้ไม่มีปฏิสัมพันธ์กับ IRF3 หากเปลี่ยนที่ตำแหน่ง 343,388 ยังคงรักษาคุณสมบัติการเกิดปฏิสัมพันธ์ได้ (Stacey *et al.*, 2012) ส่วน Yang และคณะกล่าวว่า ส่วนของกรดอะมิโน 250-380 ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้ครอบคลุมอยู่ภายใต้ hTRIM21 $\Delta$ 3(131-475)



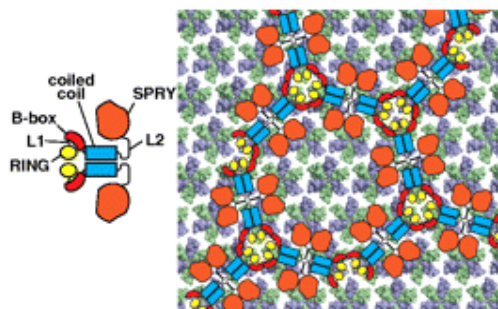
และ hTRIM21 $\Delta$ 1 น่าจะเป็นจุดที่ใช้ในการเกิดปฏิสัมพันธ์ มีรายงานว่าโครงสร้างของ B30.2 เป็น  $\beta$ -sandwich ที่เกิดจาก  $\beta$ -sheet ที่วางตัวในลักษณะตรงข้ามกัน (anti-parallel) และมีกรดอะมิโนต่างๆ กันซึ่งน่าจะเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการจับกันอย่างจำเพาะกับโปรตีนหนึ่งๆ ความสัมพันธ์ระหว่าง A กับ B นั้น เกิดจาก interaction แบบ Hydrophobic โดย helix ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างเพื่อสร้างความเสถียรของรูปร่างมุมโค้งของ  $\beta$ -sandwich โดย helix  $\alpha$ 2 interact กับส่วนปลายของ  $\beta$ -sandwich ช่วงระหว่าง 2  $\beta$ -sheet จะเป็น consensus sequence ของ hydrophobic of GUSTAVAS ซึ่งคล้ายกับ tertiary structure ของ B30.2 ซึ่ง GUSTAVAS (CG2944-PF) เป็นหนึ่งในกลุ่มของโปรตีน ที่พบใน *Drosophila melanogaster* ที่มี B30.2 domain เป็นส่วนประกอบ โดยมี B30.2 domain อยู่ตรงกลางที่มีปลาย N เป็นกรดอะมิโนประมาณ 40 residue และปลาย C เป็น SOCS box ที่เป็นกรดอะมิโนประมาณ 50 residue (Stacey *et al.*, 2012; Woo *et al.*, 2006)



**รูปที่ 4.2** ภาพแสดงโครงสร้างของ B30.2 จาก GUSTAVAS ซึ่งมีลำดับโปรตีนบางส่วนที่เหมือนกับ B30.2 รวมกับ SOCS box ทางปลายคาร์บอกซิลิก (Park *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2006)

ในการทดลองของ Javanbakht และคณะ พบว่า CC domain จาก TRIM5 $\alpha$  อย่างเดียวไม่เกิดการสร้างเป็น oligomer เหมือน TRIM อื่นๆ และพบว่าตัวเชื่อมระหว่าง CC กับ B30.2 มีความจำเป็นสำหรับ trimer ใน TRIM5 $\alpha$  ซึ่งโครงสร้างของ CC เหมือนกันหมด โดยมีการเรียงตัวแบบ abcdefg ที่ตำแหน่ง a และ d เปลี่ยนแล้วมีผลทำให้การเกิด trimer ลดลง มี 3 จุดคือกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 137, 202, และ 223 พบว่าเมื่อเปลี่ยน 202 มีผลกระทบต่อปฏิสัมพันธ์อย่างมาก (Javanbakht *et al.*, 2006) ทั้ง hTRIM21 และ hTRIM5 $\alpha$  น่าจะใกล้เคียงกันมาก เพราะการแทนที่ระหว่างกันก็ให้ผลการเกิดปฏิสัมพันธ์สูง (Li *et al.*, 2006) และยื่นอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 ทั้งคู่ มีตั้งสมมติฐานถึงลักษณะการเกิด conformation ของ rHTRIM5 $\alpha$  ในการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ HIV capsid โดยการเกาะเกี่ยวกันเป็นร่างแห ซึ่งการเรียงตัวนี้แบบนี้ อาจเป็นเหตุผลที่ต้องมี CC domain ในโมเลกุลโปรตีนเพื่อให้การพับม้วนของโปรตีนถูกต้อง คือ CC เป็น helix backbone

เพื่อให้ B30.2 อยู่ในตำแหน่งที่จับกับซับสเตรตได้ รูปที่ 4.3 (Biris *et al.*, 2012) และอาจใช้เป็นเหตุผลของความจำเป็นในการมีของ CC domain ต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ของ hTRIM21 ได้เช่นกัน



**รูปที่ 4.3** ภาพแสดงโครงสร้างการเรียงตัวของ rhTRIM5 $\alpha$  ระหว่างการเกิดปฏิสัมพันธ์กับ HIV capsid (Biris *et al.*, 2012)

ดังนั้นผลงานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษา และหาตำแหน่งของการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่าง hFADDHisFlag และ HishTRIM21 โดยสรุปแล้วระบบการทดลองใน mammalian cell เหมาะสมกับการใช้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง อาจเนื่องจากมีโปรตีนตัวหนึ่งหรือทั้งสองตัวต้องการ post-translation modification ในการทำให้ปฏิสัมพันธ์นี้เกิดได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าแค่ B30.2 อย่างเดียวไม่เพียงพอ แต่ต้องการ coiled-coil domain ด้วยเพื่อให้ B30.2 เกิด dimerization ได้ อันจะนำไปสู่การสร้างคอมเพล็กซ์เพื่อให้กระบวนการเกิดปฏิสัมพันธ์นี้สมบูรณ์

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสรุปได้ว่า

1. ในการวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนทั้งสอง พบว่า การทดสอบในเซลล์แบคทีเรียไม่สามารถแสดงการเกิดปฏิสัมพันธ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน FADD และ TRIM21 ได้ ในขณะที่การทดสอบปฏิสัมพันธ์โดยใช้ tissue culture system ด้วยเทคนิค co-immunoprecipitation สามารถแสดงการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีน FADD และ TRIM21 ได้
2. พบปฏิสัมพันธ์ระหว่าง FADD กับ full length TRIM21 และ FADD กับ TRIM21 $\Delta$ 3 (275-475) ในขณะที่ hTRIM21 $\Delta$ 1 ไม่สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับ hFADD ได้ ดังนั้น B30.2 domain จำเป็นแต่ไม่เพียงพอต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน hFADD

## รายการเอกสารอ้างอิง

- Ackerley, D. F., Caradoc-Davies, T. T., & Lamont, I. L. 2003. Substrate Specificity of the Nonribosomal Peptide Synthetase PvdD from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185(9): 2848-2855.
- Adachi, M., Suematsu, S., Kondo, T., Ogasawara, J., Tanaka, T., Yoshida, N., & Nagata, S. 1995. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. *Nat Genet*, 11: 294 - 300.
- Alappat, E. C., Feig, C., Boyerinas, B., Volkland, J., Samuels, M., Murmann, A. E., Thorburn, A., Kidd, V. J., Slaughter, C. A., Osborn, S. L., Winoto, A., Tang, W.-J., & Peter, M. E. 2005. Phosphorylation of FADD at Serine 194 by CK1 $\alpha$  Regulates Its Nonapoptotic Activities. *Molecular Cell*, 19(3): 321-332.
- Alappat, E. C., Volkland, J., & Peter, M. E. 2003. Cell Cycle Effects by C-FADD Depend on Its C-terminal Phosphorylation Site. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43): 41585-41588.
- Balachandran, S., Thomas, E., & Barber, G. N. 2004. A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature*, 432(7015): 401-405.
- Balachandran, S., Venkataraman, T., Fisher, P. B., & Barber, G. N. 2007. Fas-Associated Death Domain-Containing Protein-Mediated Antiviral Innate Immune Signaling Involves the Regulation of Irf7. *The Journal of Immunology*, 178(4): 2429-2439.
- Beisner, D. R., Ch'en, I. L., Kolla, R. V., Hoffmann, A., & Hedrick, S. M. 2005. Cutting Edge: Innate Immunity Conferred by B Cells Is Regulated by Caspase-8. *The Journal of Immunology*, 175(6): 3469-3473.
- Berghe, T. V., van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., Brouckaert, G., Kalai, M., Declercq, W., & Vandenabeele, P. 2004. Differential Signaling to Apoptotic and Necrotic Cell Death by Fas-associated Death Domain Protein FADD. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9): 7925-7933.
- Berglund, H., Olerenshaw, D., Sankar, A., Federwisch, M., McDonald, N. Q., & Driscoll, P. C. 2000. The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain. *Journal of Molecular Biology*, 302(1): 171-188.

- Biris, N., Yang, Y., Taylor, A. B., Tomashevski, A., Guo, M., Hart, P. J., Diaz-Griffero, F., & Ivanov, D. N. 2012. Structure of the rhesus monkey TRIM5 $\alpha$  PRYSPRY domain, the HIV capsid recognition module. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(33): 13278-13283.
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., & Wallach, D. 1995. A Novel Protein That Interacts with the Death Domain of Fas/APO1 Contains a Sequence Motif Related to the Death Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 270(14): 7795-7798.
- Carrington, P. E., Sandu, C., Wei, Y., Hill, J. M., Morisawa, G., Huang, T., Gavathiotis, E., Wei, Y., & Werner, M. H. 2006. The Structure of FADD and Its Mode of Interaction with Procaspase-8. *Molecular Cell*, 22(5): 599-610.
- Chae, J. J., Wood, G., Masters, S. L., Richard, K., Park, G., Smith, B. J., & Kastner, D. L. 2006. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 $\beta$  production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26): 9982-9987.
- Chan, E. K., Di Donato, F., Hamel, J. C., Tseng, C. E., & Buyon, J. P. 1995. 52-kD SS-A/Ro: genomic structure and identification of an alternatively spliced transcript encoding a novel leucine zipper-minus autoantigen expressed in fetal and adult heart. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(4): 983-992.
- Chan, E. K., Hamel, J. C., Buyon, J. P., & Tan, E. M. 1991. Molecular definition and sequence motifs of the 52-kD component of human SS-A/Ro autoantigen. *The Journal of Clinical Investigation*, 87(1): 68-76.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., & Dixit, V. M. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell*, 81(4): 505-512.
- Chinnaiyan, A. M., Tepper, C. G., Seldin, M. F., O'Rourke, K., Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Krammer, P. H., Peter, M. E., & Dixit, V. M. 1996. FADD/MORT1 Is a Common Mediator of CD95 (Fas/APO-1) and Tumor Necrosis Factor Receptor-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(9): 4961-4965.

- Cooper, D. M., Chamberlain, C. M., & Lowenberger, C. 2009. Aedes FADD: A novel death domain-containing protein required for antibacterial immunity in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(1): 47-54.
- Diaz, A. A., Tomba, E., Lennarson, R., Richard, R., Bagajewicz, M. J., & Harrison, R. G. 2010. Prediction of protein solubility in *Escherichia coli* using logistic regression. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(2): 374-383.
- Dzivenu, O. K., Park, H. H., & Wu, H. 2004. General co-expression vectors for the overexpression of heterodimeric protein complexes in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 38(1): 1-8.
- Eberstadt, M., Huang, B., Chen, Z., Meadows, R. P., Ng, S.-C., Zheng, L., Lenardo, M. J., & Fesik, S. W. 1998. NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature*, 392(6679): 941-945.
- Espinosa, A., Dardalhon, V., Brauner, S., Ambrosi, A., Higgs, R., Quintana, F. J., Sjöstrand, M., Eloranta, M.-L., Ní Gabhann, J., Winqvist, O., Sundelin, B., Jefferies, C. A., Rozell, B., Kuchroo, V. K., & Wahren-Herlenius, M. 2009. Loss of the lupus autoantigen Ro52/TRIM21 induces tissue inflammation and systemic autoimmunity by disregulating the IL-23–Th17 pathway. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(8): 1661-1671.
- Espinosa, A., Oke, V., Elfving, Å., Nyberg, F., Covacu, R., & Wahren-Herlenius, M. 2008. The autoantigen Ro52 is an E3 ligase resident in the cytoplasm but enters the nucleus upon cellular exposure to nitric oxide. *Experimental Cell Research*, 314(20): 3605-3613.
- Espinosa, A., Zhou, W., Ek, M., Hedlund, M., Brauner, S., Popovic, K., Horvath, L., Wallerskog, T., Oukka, M., Nyberg, F., Kuchroo, V. K., & Wahren-Herlenius, M. 2006. The Sjögren's Syndrome-Associated Autoantigen Ro52 Is an E3 Ligase That Regulates Proliferation and Cell Death. *The Journal of Immunology*, 176(10): 6277-6285.

- Gack, M. U., Shin, Y. C., Joo, C.-H., Urano, T., Liang, C., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S., Chen, Z., Inoue, S., & Jung, J. U. 2007. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*, 446(7138): 916-920.
- Hartmann, A., Mouatt-Prigent, A., Faucheux, B. A., Agid, Y., & Hirsch, E. C. 2002. FADD: A link between TNF family receptors and caspases in Parkinson's disease. *Neurology*, 58(2): 308-310.
- Higgs, R., Gabhann, J. N., Larbi, N. B., Breen, E. P., Fitzgerald, K. A., & Jefferies, C. A. 2008. The E3 Ubiquitin Ligase Ro52 Negatively Regulates IFN- $\beta$  Production Post-Pathogen Recognition by Polyubiquitin-Mediated Degradation of IRF3. *The Journal of Immunology*, 181(3): 1780-1786.
- Ho, C. C.-Y., Rideout, H. J., Ribe, E., Troy, C. M., & Dauer, W. T. 2009. The Parkinson Disease Protein Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Transduces Death Signals via Fas-Associated Protein with Death Domain and Caspase-8 in a Cellular Model of Neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*, 29(4): 1011-1016.
- Hope, I. A., & Struhl, K. 1985. GCN4 protein, synthesized in vitro, binds HIS3 regulatory sequences: Implications for general control of amino acid biosynthetic genes in yeast. *Cell*, 43(1): 177-188.
- Hua, Z. C., Sohn, S. J., Kang, C., Cado, D., & Winoto, A. 2003. A Function of Fas-Associated Death Domain Protein in Cell Cycle Progression Localized to a Single Amino Acid at Its C-Terminal Region. *Immunity*, 18(4): 513-521.
- Imtiyaz, H. Z., Rosenberg, S., Zhang, Y., Rahman, Z. S. M., Hou, Y.-J., Manser, T., & Zhang, J. 2006. The Fas-Associated Death Domain Protein Is Required in Apoptosis and TLR-Induced Proliferative Responses in B Cells. *The Journal of Immunology*, 176(11): 6852-6861.
- Itoh, K., Itoh, Y., & Frank, M. B. 1991. Protein heterogeneity in the human Ro/SSA ribonucleoproteins. The 52- and 60-kD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes. *The Journal of Clinical Investigation*, 87(1): 177-186.
- Javanbakht, H., Yuan, W., Yeung, D. F., Song, B., Diaz-Griffero, F., Li, Y., Li, X., Stremlau, M., & Sodroski, J. 2006. Characterization of TRIM5 $\alpha$  trimerization and

- its contribution to human immunodeficiency virus capsid binding. *Virology*, 353(1): 234-246.
- Jeong, E.-J., Bang, S., Lee, T. H., Park, Y. I., Sim, W.-S., & Kim, K.-S. 1999. The Solution Structure of FADD Death Domain: STRUCTURAL BASIS OF DEATH DOMAIN INTERACTIONS OF Fas AND FADD. *Journal of Biological Chemistry*, 274(23): 16337-16342.
- Kabra, N. H., Kang, C., Hsing, L. C., Zhang, J., & Winoto, A. 2001. T cell-specific FADD-deficient mice: FADD is required for early T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11): 6307-6312.
- Kai, L., Dötsch, V., Kaldenhoff, R., & Bernhard, F. 2013. Artificial Environments for the Co-Translational Stabilization of Cell-Free Expressed Proteins. *PLoS One*, 8(2): e56637.
- Keeble, A. H., Khan, Z., Forster, A., & James, L. C. 2008. TRIM21 is an IgG receptor that is structurally, thermodynamically, and kinetically conserved. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(16): 6045-6050.
- Kim, P. K., Dutra, A. S., Chandrasekharappa, S. C., & Puck, J. M. 1996. Genomic structure and mapping of human FADD, an intracellular mediator of lymphocyte apoptosis. *The Journal of Immunology*, 157(12): 5461-5466.
- Khaw, O., & Suntrarachun, S. 2012. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2): 159-162.
- Li, X., Li, Y., Stremlau, M., Yuan, W., Song, B., Perron, M., & Sodroski, J. 2006. Functional Replacement of the RING, B-Box 2, and Coiled-Coil Domains of Tripartite Motif 5 $\alpha$  (TRIM5 $\alpha$ ) by Heterologous TRIM Domains. *Journal of Virology*, 80(13): 6198-6206.
- Li, X., Shou, W., Kloc, M., Reddy, B. A., & Etkin, L. D. 1994. The Association of Xenopus Nuclear Factor 7 with Subcellular Structures Is Dependent upon Phosphorylation and Specific Domains. *Experimental Cell Research*, 213(2): 473-481.



- MacKenzie A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R.A., Surprenant, A. 2001. Rapid Secretion of Interleukin-1 by Microvesicle Shedding. *Immunity*, 8: 825–835.
- McNab, F. W., Rajsbaum, R., Stoye, J. P., & O'Garra, A. 2011. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Current Opinion in Immunology*, 23(1): 46-56.
- Meury, J., Bahloul, A., & Kohiyama, M. 1993. Impairment of nucleoid segregation and cell division at high osmolarity in a strain of *Escherichia coli* overproducing the chaperone DnaK. *FEMS Microbiology Letters*, 113(1): 93-99.
- Meury, J., & Kohiyama, M. 1991. Role of heat shock protein DnaK in osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 173(14): 4404-4410.
- Mizuno, T., Okamoto, T., Yokoi, M., Izumi, M., Kobayashi, A., Hachiya, T., Tamai, K., Inoue, T., & Hanaoka, F. 1996. Identification of the nuclear localization signal of mouse DNA primase: nuclear transport of p46 subunit is facilitated by interaction with p54 subunit. *Journal of Cell Science*, 109(11): 2627-2636.
- Mujacic, M., Cooper, K., & Baneyx, F. 1999. Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene*, 238: 325 - 332.
- Muppidi, J. R., Lobito, A. A., Ramaswamy, M., Yang, J. K., Wang, L., Wu, H., & Siegel, R. M. 2006. Homotypic FADD interactions through a conserved RXDLL motif are required for death receptor-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 13(10): 1641-1650.
- Naitza, S., Rossé, C., Kappler, C., Georgel, P., Belvin, M., Gubb, D., Camonis, J., Hoffmann, J. A., & Reichhart, J.-M. 2002. The *Drosophila* Immune Defense against Gram-Negative Infection Requires the Death Protein dFADD. *Immunity*, 17(5): 575-581.
- Nisole, S., Stoye, J. P., & Saib, A. 2005. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Micro*, 3(10): 799-808.
- Oke, V., & Wahren-Herlenius, M. 2012. The immunobiology of Ro52 (TRIM21) in autoimmunity: A critical review. *Journal of Autoimmunity*, 39(1–2): 77-82.

- Osborn, S. L., Diehl, G., Han, S.-J., Xue, L., Kurd, N., Hsieh, K., Cado, D., Robey, E. A., & Winoto, A. 2010. Fas-associated death domain (FADD) is a negative regulator of T-cell receptor-mediated necroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(29): 13034-13039.
- Osborn, S. L., Sohn, S. J., & Winoto, A. 2007. Constitutive Phosphorylation Mutation in Fas-associated Death Domain (FADD) Results in Early Cell Cycle Defects. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31): 22786-22792.
- Ottosson, L., Hennig, J., Espinosa, A., Brauner, S., Wahren-Herlenius, M., & Sunnerhagen, M. 2006. Structural, functional and immunologic characterization of folded subdomains in the Ro52 protein targeted in Sjögren's syndrome. *Molecular Immunology*, 43(6): 588-598.
- Papoff, G., Trivieri, N., Crielesi, R., Ruberti, F., Marsilio, S., & Ruberti, G. 2010. FADD-calmodulin interaction: A novel player in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(8): 898-911.
- Park, E. Y., Kwon, O.-B., Jeong, B.-C., Yi, J.-S., Lee, C. S., Ko, Y.-G., & Song, H. K. 2010. Crystal structure of PRY-SPRY domain of human TRIM72. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(3): 790-795.
- Pryor, K. D., & Leiting, B. 1997. High-Level Expression of Soluble Protein in Escherichia coli Using a His6-Tag and Maltose-Binding-Protein Double-Affinity Fusion System. *Protein Expression and Purification*, 10(3): 309-319.
- Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., Guffanti, A., Minucci, S., Pelicci, P. G., & Ballabio, A. 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J*, 20(9): 2140-2151.
- Rhodes, D. A., Ihrke, G., Reinicke, A. T., Malcherek, G., Towey, M., Isenberg, D. A., & Trowsdale, J. 2002. The 52 000 MW Ro/SS-A autoantigen in Sjögren's syndrome/systemic lupus erythematosus (Ro52) is an interferon- $\gamma$  inducible tripartite motif protein associated with membrane proximal structures. *Immunology*, 106(2): 246-256.

- Rhodes, D. A., & Trowsdale, J. 2007. TRIM21 is a trimeric protein that binds IgG Fc via the B30.2 domain. *Molecular Immunology*, 44(9): 2406-2414.
- Sandee, D., Tungpradabkul, S., Tsukio, M., Imanaka, T., & Takagi, M. 2002. Construction and high cytoplasmic expression of a tumoricidal single-chain antibody against hepatocellular carcinoma. *BMC biotechnology*, 2: 16.
- Sandu, C., Morisawa, G., Wegorzewska, I., Huang, T., Arechiga, A. F., Hill, J. M., Kim, T., Walsh, C. M., & Werner, M. H. 2006. FADD self-association is required for stable interaction with an activated death receptor. *Cell Death Differ*, 13(12): 2052-2061.
- Schein, C. H., & Noteborn, M. H. M. 1988. Formation of Soluble Recombinant Proteins in Escherichia Coli is Favored by Lower Growth Temperature. *Nat Biotech*, 6(3): 291-294.
- Selleck, W. and Tan, S. Recombinant protein complex expression in *E. coli*. 2008. *Curr Protoc Protein Sci*. CHAPTER: Unit-5.21
- Siegel, R. M., Martin, D. A., Zheng, L., Ng, S. Y., Bertin, J., Cohen, J., & Lenardo, M. J. 1998. Death-effector Filaments: Novel Cytoplasmic Structures that Recruit Caspases and Trigger Apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 141(5): 1243-1253.
- Siegmund, D., Mauri, D., Peters, N., Juo, P., Thome, M., Reichwein, M., Blenis, J., Scheurich, P., Tschopp, J., & Wajant, H. 2001. Fas-associated Death Domain Protein (FADD) and Caspase-8 Mediate Up-regulation of c-Fos by Fas Ligand and Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) via a FLICE Inhibitory Protein (FLIP)-regulated Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35): 32585-32590.
- Sorensen, H., & Mortensen, K. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. *Microbial Cell Factories*, 4(1): 1.
- Spencer, D. M., Belshaw, P. J., Chen, L., Ho, S. N., Randazzo, F., Crabtree, G. R., & Schreiber, S. L. 1996. Functional analysis of Fas signaling in vivo using synthetic inducers of dimerization. *Current Biology*, 6(7): 839-847.

- Stacey, K. B., Breen, E., & Jefferies, C. A. 2012. Tyrosine Phosphorylation of the E3 Ubiquitin Ligase TRIM21 Positively Regulates Interaction with IRF3 and Hence TRIM21 Activity. *PLoS ONE*, 7(3): e34041.
- Steward, A., McDowell, G. S., & Clarke, J. 2009. Topology is the Principal Determinant in the Folding of a Complex All-alpha Greek Key Death Domain from Human FADD. *Journal of Molecular Biology*, 389(2): 425-437.
- Stremlau, M., Owens, C. M., Perron, M. J., Kiessling, M., Autissier, P., & Sodroski, J. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5[alpha] restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 427(6977): 848-853.
- Swartz, J. R. 2001. Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2): 195-201.
- Tourneur, L., Buzyn, A., & Chiocchia, G. 2005. FADD adaptor in cancer. *Medical Immunology*, 4(1): 1.
- Tourneur, L., & Chiocchia, G. 2010. FADD: a regulator of life and death. *Trends in Immunology*, 31(7): 260-269.
- Tourneur, L., Mistou, S., Michiels, F., Devauchelle, V., Renia, L., Feunteun, J., & Chiocchia, G. 2003. Loss of FADD protein expression results in a biased Fas-signaling pathway and correlates with the development of tumoral status in thyroid follicular cells. *Oncogene*, 22: 2795 - 2804.
- Tourneur, L., Mistou, S., Schmitt, A., & Chiocchia, G. 2008. Adenosine Receptors Control a New Pathway of Fas-associated Death Domain Protein Expression Regulation by Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26): 17929-17938.
- Waji, N., Sermwittayawong, D., Hutadilok-Towatana, N. 2011. For the 3<sup>rd</sup> BMB International Conference: From Basic to Translational Research For a Better Life. April 6-8 2011 at The Empress Convention Center, Chiang Mai, Thailand.
- Waji, N., Sermwittayawong, D., Hutadilok-Towatana, N. 2012. Characterization of the Interaction between Fas-Associate Death Domain (FADD) and Tripartite Motif-Containing 21 (TRIM21) Proteins. October 17-19 2012 at The Empress Convention Center, Chiang Mai, Thailand.

- Wilson, N. S., Dixit, V., & Ashkenazi, A. 2009. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol*, 10(4): 348-355.
- Woo, J.-S., Imm, J.-H., Min, C.-K., Kim, K.-J., Cha, S.-S., & Oh, B.-H. 2006. Structural and functional insights into the B30.2/SPRY domain. *EMBO J*, 25(6): 1353-1363.
- Yoshimi, R., Chang, T.-H., Wang, H., Atsumi, T., Morse, H. C., & Ozato, K. 2009. Gene Disruption Study Reveals a Nonredundant Role for TRIM21/Ro52 in NF- $\kappa$ B-Dependent Cytokine Expression in Fibroblasts. *The Journal of Immunology*, 182(12): 7527-7538.
- Yang, K., Shi, H.-X., Liu, X.-Y., Shan, Y.-F., Wei, B., Chen, S., & Wang, C. 2009. TRIM21 Is Essential to Sustain IFN Regulatory Factor 3 Activation during Antiviral Response. *The Journal of Immunology*, 182(6): 3782-3792.
- Young, J. A., Sermwittayawong, D., Kim, H. J., Nandu, S., An, N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Coscoy, L., & Winoto, A. 2011. Fas-associated death domain (FADD) and the E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21 interact to negatively regulate virus-induced interferon production. *J Biol Chem*, 286(8): 6521-6531.
- Yu, Y., Wang, S. E., & Hayward, G. S. 2005. The KSHV Immediate-Early Transcription Factor RTA Encodes Ubiquitin E3 Ligase Activity that Targets IRF7 for Proteasome-Mediated Degradation. *Immunity*, 22(1): 59-70.
- Zhuang, H., Gan, Z., Jiang, W., Zhang, X., & Hua, Z.-C. 2013. Functional specific roles of FADD: comparative proteomic analyses from knockout cell lines. *Molecular BioSystems*, 9(8): 2063-2078.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H., & Winoto, A. 1998b. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature*, 392(6673): 296-300.
- Zhang, J., Kabra, N. H., Cado, D., Kang, C., & Winoto, A. 2001. FADD-deficient T Cells Exhibit a Disaccord in Regulation of the Cell Cycle Machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32): 29815-29818.

Zhang, J., & Winoto, A. 1996. A mouse Fas-associated protein with homology to the human Mort1/FADD protein is essential for Fas-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6): 2756-2763.

Zhang, J., Zhang, D., & Hua, Z. 2004. FADD and its Phosphorylation. *IUBMB Life*, 56(7): 395-401.

## ภาคผนวก

### 1. การสร้างแอนติบอดี

สร้างแอนติบอดี 2 ชนิด คือ anti-DED ของ hFADD และ anti-hTRIM21 โดยใช้ กระต่ายสองตัวอายุ 2-3 เดือน น้ำหนักประมาณ 2-3 kg ก่อนทำการฉีดประมาณ 3 วันเก็บเลือด pre-immune เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิง โดยเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณกลางใบหูกระต่าย ปริมาตร 5 ml ด้วยเข็มขนาด 21 จากนั้นปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่ 4°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ใช้ พาสเจอร์ริบเปตเขี่ยเลือดที่แข็งตัว ข้างหลอดออกแล้วปั่นที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที 15 นาที เพื่อเก็บซีรัมซึ่งเป็นส่วนใสด้านบนไว้ในหลอดใหม่ที่ -20°C เพื่อการทดลองครั้งต่อไป

ทำบริสุทธิ์โปรตีน hFADDt1HisSTRx2 (1-95 มีมิวเตชันที่ F25Y) ด้วย Talon metal affinity (clontech) และ *Strep-Tactin* Sepharose (IBA) เก็บในบัฟเฟอร์ TG150 (20mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1mM benzamidine และ 10 % glycerol) นำ สารละลายโปรตีน 500 µl ที่มีโปรตีนประมาณ 180 µg ผสมกับ complete Freund's adjuvant ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) เป็นสองจุดที่บริเวณหัวไหล่ หลังจากนั้น 21 วันทำการฉีด กระตุ้นครั้งที่ 1 ด้วยโปรตีนปริมาณ 50-100 µg ที่ผสมกับ incomplete Freund adjuvant ในอัตรา 1:1 จากนั้นอีก 21 วันจึงฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำเป็นครั้งที่ 2 ด้วยสารละลายเหมือนการกระตุ้นซ้ำ ครั้งแรก หลังการกระตุ้นซ้ำครั้งที่ 2 อีก 14 วัน ดูดเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณกลางใบหู กระต่ายประมาณ 20-30 ml ทำการทดสอบว่าในซีรัมมี anti-FADD หรือไม่ หากมีแอนติบอดีที่ต้องการ จึงเก็บเลือดเพิ่มอีก 30-40 ml

สำหรับการสร้าง anti-HishTRIM21 ใช้กระต่ายอีกหนึ่งตัว ทำเช่นเดียวกันต่างที่ ขั้นตอนเตรียมโปรตีนเนื่องจากโปรตีนเส้นเต็มของ HishTRIM21 อยู่ในรูปที่ไม่ละลาย จึงทำให้ บริสุทธิ์บางส่วนด้วย Talon metal affinity ตามข้อ 2.3.5 ให้ได้ eluate ปริมาตร 1 ml มาทำ SDS-PAGE ด้วย 8 หรือ 10% acrylamide โดยให้ stacking gel มีความสูง 0.5 cm และไมล์หวี นำ สารละลายโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วผสมกับ 2xPGLB โดยหยอดโปรตีนให้เท่ากันทั่วทั้งแผ่น ครั้งละ 200 µl เหนือ stacking gel จากนั้นทำ gel electrophoresis ภายใต้อุณหภูมิ 4°C ความต่างศักย์ 180 โวลต์ ต่อ 2 เจล ประมาณ 1 ชั่วโมง ตัดส่วนหนึ่งจากข้างเจลไปย้อมสีเพื่อหาตำแหน่งของโปรตีน HishTRIM21 ระหว่างการย้อมเก็บเจลอีกส่วนไว้ในน้ำกลั่น เมื่อเห็นแถบโปรตีนในเจลที่ผ่านการ ย้อมจึงนำมาเทียบกับคู่มือที่เก็บไว้แล้วใช้มีดตัดแถบเจลโปรตีนตามแนวแถบที่ผ่านการย้อม นำ strip ที่ได้ เก็บสะสมไว้ใน running buffer เมื่อทำครบทั้งแปดเจลบาน strip ที่ได้มาทำ electroelution ตามภาคผนวก 2. แล้วผสม complete Freund adjuvant ในอัตรา 1:1 ฉีดเข้าชั้น

ใต้ผิวหนังของกระต่าย จากนั้นจึงฉีดกระตุ้นครั้งที่ 1 และ 2 และเก็บเลือดตัวอย่างเช่นเดียวกับอีก การทดลองหนึ่ง

## 2. การทำ electroelution

นำ strip ทั้งแปดใส่ใน dialysis tube ที่มี running buffer จากนั้นทำ horizontal gel electrophoresis ใน protein running buffer ด้วยเครื่อง DNA gel electrophoresis apparatus ที่ 4°C หรือ cold room เพื่อกันโปรตีนเสื่อมสภาพหรือถูกทำลาย โดยวาง strip ให้อยู่ทางขั้วบวกเพื่อที่โปรตีนจะถูก elude ไปทางขั้วลบและอยู่ใน running buffer ภายในถุง นำหลอดทดลองขนาด 15 ml ที่มีน้ำวางทับไว้เพื่อป้องกัน dialysis เคลื่อนที่ ปล่อยให้กระแสที่ 25 mA 18 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำ running buffer ในถุงออกมาเพื่อทำให้โปรตีนที่ได้เข้มข้นขึ้นด้วย CM cellulose (AquaSorb) ให้ได้ปริมาตรเหลือประมาณ 1.2 ml จาก 10.5 ml นำโปรตีนที่ผ่านการทำให้เข้มข้นไปทำ SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบและวัดปริมาณที่ได้ เก็บโปรตีนที่ได้ที่ -20°C เพื่อใช้ในการกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีตามภาคผนวก 1. ต่อไป

## 3. การสกัด polyclonal antibody

เจาะเลือดจากไขกระดูกครั้งละประมาณ 30 ml แบ่งใส่หลอดทดลองพลาสติก ขนาด 15 ml สองหลอด เก็บที่ 4°C ประมาณ 4-15 ชั่วโมง เลือดจะแข็งตัวและหดยาวเป็นก้อนทรง กระเพาะ ใช้หลอดหยดปลายแหลมแยกส่วนของเลือดที่แข็งตัวออกจากขอบหลอดทดลอง เพื่อปล่อยซีรัมได้มากขึ้นบนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดซีรัมแยกออกมาใส่หลอดทดลองใหม่ เก็บที่ 4 หรือ -20°C

ในการสกัดอิมมูโนโกลบูลินหรือส่วนของ IgG ใส่ 1 M Tris-Cl pH 8.0 ปริมาตร 1 ในส่วน 10 ของซีรัมที่ได้เพื่อรักษาระดับ pH ของซีรัม ค่อยๆ เติมน้ำละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิม ตัวตามภาคผนวก 4. ซ้ำๆ ตามปริมาตรที่ผ่านการคำนวณเพื่อให้ความเข้มข้นของโปรตีนอยู่ที่ 45% (v/v) พร้อมกับคนสารละลายในภาชนะตลอดเวลาเพื่อป้องกันการเกิดความเป็นบางจุด ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ตกตะกอนโปรตีนด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดสารละลายส่วนใสออก ล้างตะกอนด้วย Solution A (45% saturated ammonium sulfate in MilliQ H<sub>2</sub>O) ด้วยวิธีการละลายและหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย Tris buffer (20 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.01 M EDTA) จากนั้นนำไป dialysis ใน Tris buffer อย่างน้อย 4 ครั้ง เพื่อเอาเกลือออกจากสารละลาย ปริมาตรของสารจะเพิ่มเป็นเท่าตัวหลังการ dialysis ทำให้ปริมาณของอิมมูโนโกลบูลินที่ได้เข้มข้นขึ้นด้วย



การใช้สาร CM cellulose ดึงน้ำจากสารละลายในถุงไดอะไลซิส เก็บสารละลาย IgG หรือ แอนติบอดีที่ได้ที่ 4°C หรือ -20°C ซึ่งสามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอิมมูโนโกลบูลินที่ได้ด้วยการทำ SDS-PAGE และตรวจสอบประสิทธิภาพด้วย Western blot ตามข้อ 2.5.8 ต่อไป

#### 4. การตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

ก่อนการตกตะกอนหนึ่งวันต้องทำการเตรียมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว โดยการละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 100 กรัมต่อน้ำ MilliQ 100 มิลลิลิตร ซึ่งต้องใช้ความร้อนในการช่วยให้ละลาย กรองแล้วทิ้งให้สารละลายเย็นตัวลงช้าๆที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน