

บทวิจารณ์

จากการศึกษาเพื่อหายีนที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของไวรัสไข้หวัดนก(H5N1) ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนั้นพบว่า จากแผนการทดลองในตอนแรกได้วางแผนที่จะศึกษาโดยการสร้างไวรัสของ wild type H5N1 และ H5N1 ts20 (mutant) ทั้ง 8 genes และ single reassortant virus ที่มียีนของ H5N1 ts20 หนึ่งยีนร่วมกับ wild type virus อีก 7 ยีน (7+1) ด้วยวิธี reverse genetic เพื่อใช้ในการศึกษา phenotype ของไวรัสนั้นพบว่า ไวรัสทั้งหมด (8 ยีน และ 7+1) ดังกล่าวไม่สามารถสร้างได้ด้วยวิธี reverse genetic ดังนั้นผู้วิจัยได้ทำการสร้าง single reassortant virus ใน PR8 backbone ทดแทนและนำไวรัสลูกผสมกับ PR8 มาใช้ศึกษา phenotype

จากการศึกษา Genetic determinant ของ H5N1 gene ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่ายีนที่ส่งผลต่อการเป็น temperature sensitive (ts) mutant คือ NP gene ซึ่ง mutation ที่มีความสำคัญต่อการมีลักษณะเป็น ts คือ serine 314 asparagine โดยจากการศึกษา kinetic growth curve ของไวรัส rNPwt-PR8 และ rNPts20-PR8 พบว่า ไวรัสดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีทั้งอุณหภูมิ 33 และ 37 องศาเซลเซียส แต่ไวรัส rNPts20-PR8 จะมีความบกพร่องในการเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสใน mammalian cell เท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า mutation ที่พบในยีน NP ดังกล่าวน่าจะเป็นการแสดงออกแบบ cell type specific ซึ่งลักษณะดังกล่าวสัมพันธ์กับแนวคิดที่ว่า ไวรัสจะมีการสะสม mutation ที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆโดยที่จะไม่มีผลกระทบต่อ viral fitness ของ natural host (Gabriel, Herwig et al. 2008)

จากการศึกษาที่ผ่านมา นักวิจัยได้มีการรายงาน ts loci หลายตำแหน่งในยีน NP (Krug, Ueda et al. 1975; Shapiro and Krug 1988; Mandler and Scholtissek 1989; Medcalf, Poole et al. 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ NP ในหลายขั้นตอนใน virus life cycle เช่น มีความสำคัญในขบวนการ RNA synthesis, RNA trafficking, และ posttranscriptional steps (Bullido, Gomez-Puertas et al. 2000; Noton, Simpson-Holley et al. 2009) โดยที่โปรตีน NP มี functional domain หลาย domain ที่สามารถ bind ได้กับ macromolecule อื่นๆของไวรัสและโปรตีนจาก

เซลล์ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งทำให้มีเหตุผลที่จะเชื่อได้ว่าหน้าที่ที่สำคัญต่างๆของโปรตีน NP นั้นสัมพันธ์กับการเกิด interaction ระหว่างโปรตีน NP กับ macromolecule ต่างๆเหล่านี้

ตารางที่ 6 Macromolecules bound by influenza virus nucleoprotein (Noton, Simpson-Holley et al. 2009)

Macromolecule	Function	Reference
Viral		
ssRNA	RNP structure	Pons <i>et al.</i> (1969) Baudin <i>et al.</i> (1994)
NP	RNP structure	Pons <i>et al.</i> (1969) Ruigrok & Baudin (1995) Elton <i>et al.</i> (1999a)
PB1	Transcription?	Biswas <i>et al.</i> (1998) Metcalf <i>et al.</i> (1999)
PB2	Transcription?	Biswas <i>et al.</i> (1998) Metcalf <i>et al.</i> (1999)
M1	Transcription inhibition	Zvonarjev & Ghendon (1980)
	Nuclear export	Martin & Helenius (1991)
	Assembly?	
Cellular		
Importin α	Nuclear import	O'Neill & Palese (1995) O'Neill <i>et al.</i> (1995)
F-actin	Cytoplasmic retention?	Digard <i>et al.</i> (1999)
CRM1/exportin-1	Nuclear export?	Elton <i>et al.</i> (2001)
BAT1/UAP56	Transcription?	Momose <i>et al.</i> (2001)

โดยมาก NP ts mutant ที่มีการศึกษาที่ผ่านมาล้วนแล้วแต่เป็น mutant ที่ทำให้เกิดความบกพร่องในการสร้าง viral RNA ที่ nonpermissive temperature ซึ่งมีความเชื่อว่าบทบาทที่สำคัญของโปรตีน NP นั้นคือการ switch จากขั้นตอน mRNA transcription ไปสู่ขั้นตอน genome replication ของไวรัส จากการศึกษาที่ผ่านมาพบ mutation ในยีน NP ในไวรัส A/WSN/33 ts56 (NP S314N) และ A/FPV/Rostock/34/Giessen tsG81 (NP A332T) (Metcalf, Poole et al. 1999) ซึ่งทั้งสอง mutation ต่างก็มีความบกพร่องในขั้นตอน replicative transcription ซึ่งทำให้ส่งผลกระทบกับ RNP-binding activity ของโปรตีน NP ดังนั้นแสดงว่า NP-RNA interaction จำเป็นสำหรับการสนับสนุน genome replication แต่จากการศึกษานี้ไม่ได้แสดงว่า NP มีความบกพร่องต่อการขนส่งโปรตีน NP เข้าสู่ nucleus

ซึ่งต่างจากการทดลองของผู้วิจัยในการศึกษานี้ที่แสดงให้เห็นว่า NP (S 314 N) ของไวรัส H5N1 SP83ts20 มีความบกพร่องในขบวนการดังกล่าว ความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากสองการศึกษาอาจเนื่องมาจาก origin ของ NP (human and avian viruses), ชนิดของ transfected cell (BHK and 293T cells), ปริมาณของ NP plasmid (3 or 300 ng and 1 µg), เวลาที่ใช้ในการ incubate (4 and 48 hours), และอุณหภูมิที่ใช้ในการ incubation (31 or 37°C and 33 or 40°C) ดังนั้นจากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า mutation ดังกล่าวน่าจะมีผลกระทบต่อขบวนการ RNA trafficking และการขนส่งโปรตีน NP เข้าสู่ nucleus ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่โปรตีน NP น่าจะมีความบกพร่องต่อการจับกับ cellular factor (Karyopherin alpha 1) ที่สำคัญต่อขบวนการดังกล่าวนั่นเอง

โดยสรุปจากการศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้นี้ยังไม่สามารถค้นพบยีนของไวรัสไข้หวัดนกที่เป็น Thermal tropism ที่ 40 องศาเซลเซียสที่ชัดเจน แต่จากผลการทดลองนั้นแสดงให้เห็นว่ายีนที่จะส่งผลต่อการเป็น Thermal tropism ที่ 40 องศาเซลเซียส น่าจะประกอบด้วยยีนของไวรัสหลายชิ้นซึ่งจะตอบคำถามวิจัยให้ชัดเจนได้นั้นจะต้องสามารถสร้าง reassortant virus ใน back bone ของไวรัส H5N1 ได้ทั้ง 8 ยีนซึ่งต้องพัฒนาต่อไป

อย่างไรก็ตามผู้วิจัยสามารถศึกษาพบไวรัสที่มีลักษณะเป็น temperature sensitive mutant ของไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ที่มีความสามารถเจริญได้ดีที่ 33 และ 37 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 40 องศาเซลเซียส (ts) โดยที่ mutation S314N ในโปรตีน NP นี้เป็น genetic marker ของ ts lesion ทั้งในไวรัสของมนุษย์และสัตว์ปีก นอกจากนี้ความรู้ในการศึกษา ts lesion ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อทำความเข้าใจในการศึกษา life cycle ของไวรัสและยังสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาสำหรับสร้าง attenuated influenza vaccine อีกด้วย