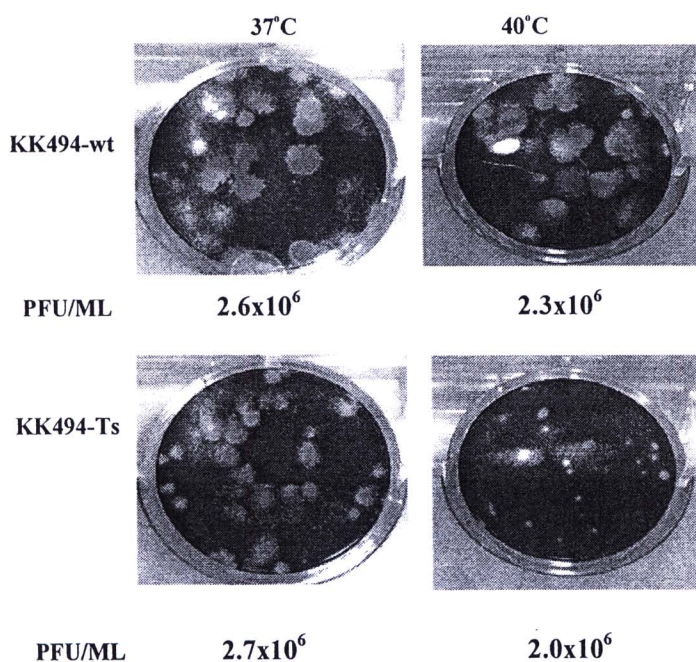


## ผลการทดลอง

### 1. การคัดเลือกไวรัส H5N1 ให้มีความบกพร่องในการเจริญเติบโต ณ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากการศึกษานี้ได้ทำการเลี้ยงไวรัส H5N1 (A/Thailand/5(KK-494)/2004(H5N1) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์มาจากแลปของอาจารย์ พิไลพันธ์ พุฒวันนะ ให้เจริญใน MDCK ณ อุณหภูมิ 33 °C (อุณหภูมิในโพรงจุก) หลายๆ passage ตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้นและตั้งแสดงรายละเอียดในรูปที่ 1 เพื่อให้ได้ไวรัสที่เมื่อเทียบกับ wild type (KK494) แล้วเป็นไวรัสที่มี plaque ขนาดเล็กลง ที่ 40 °C แต่มี plaque ขนาดเท่ากับ wild type ที่ 37 °C ซึ่งจากวิธีการดังกล่าวหลังจากทำการเลี้ยงไวรัสไปได้ 5 passages ทำให้สามารถคัดเลือกไวรัสที่มีลักษณะตามที่ต้องการดังแสดงในรูปที่ 5

#### Plaque of KK494 (H5N1) wt and Ts



รูปที่ 5 ภาพแสดงการเปรียบเทียบขนาดของ plaque ของไวรัส KK494- wt และ

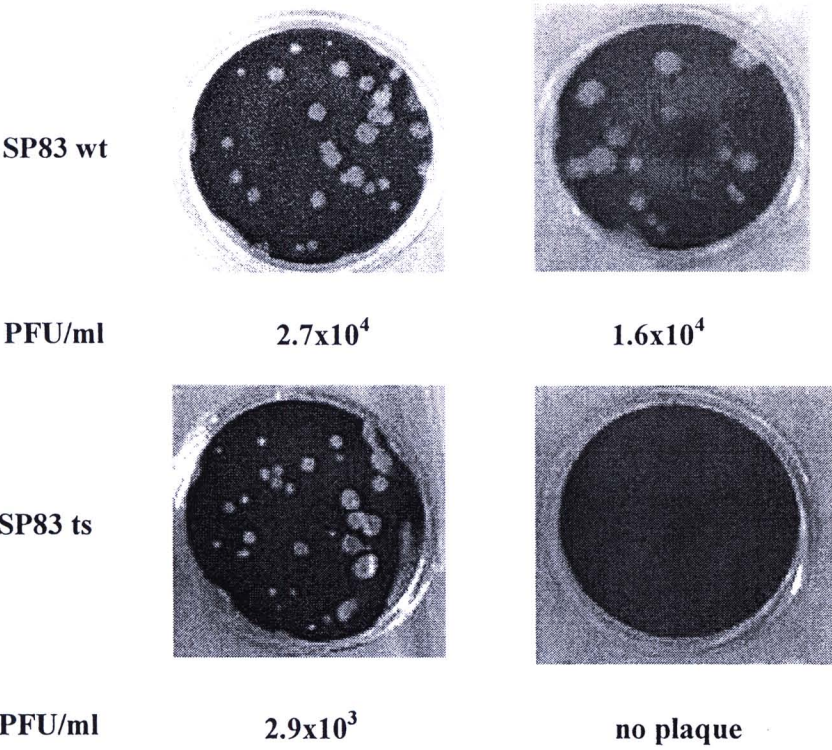
KK494-ts ณ อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C, (PFU/ML : Plaque Forming Unit/ ml)

นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบ growth kinetics ของ Temperature sensitive mutation (KK-Ts) ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C พบว่า ไวรัสที่คัดเลือกมา (KK-Ts) สามารถเจริญเติบโต ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้น้อยกว่า 37 องศาเซลเซียส ถึง 2 เท่า (37C มี HA titer = 256, 40°C มี HA titer =

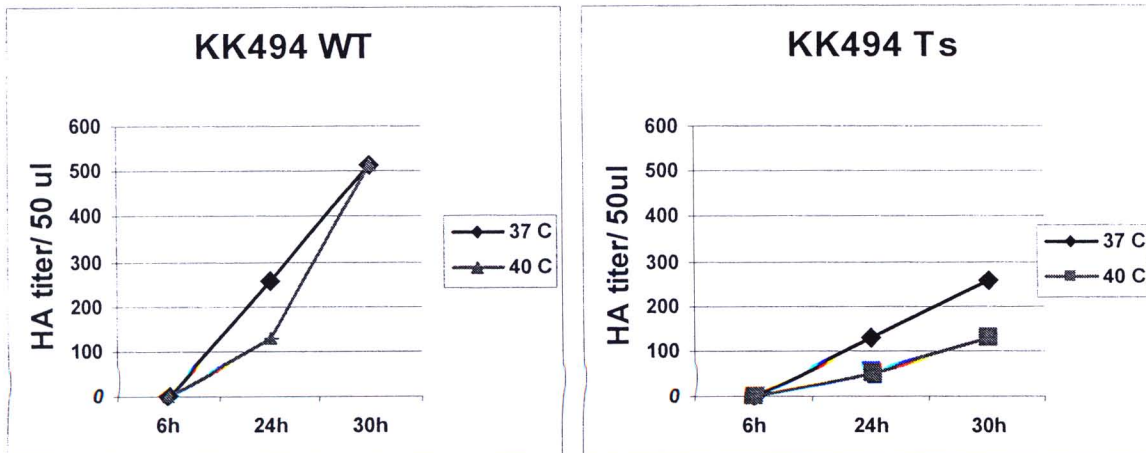
128) และเมื่อเทียบ KK-Ts กับ KK-wild type พบว่า Ts โตที่ อุณหภูมิ 37 °C ได้ช้ากว่า wild type ประมาณ 2 เท่า (Ts มี HA titer = 256, WT มี HA titer = 512 ) และเจริญเติบโตได้น้อยลงที่อุณหภูมิ 40 °C (ซึ่งเป็นลักษณะที่พบใน human influenza virus) ถึง 4 เท่า (Ts มี HA titer = 128, WT มี HA titer = 512 ) ณ 30 ชั่วโมงหลัง infection ในขณะที่ KK-WT โตได้พอกันทั้งสองอุณหภูมิ ดังแสดงในรูปที่ 7

มีปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างทำการทดลองคือ ตู้เย็นที่ทำการเก็บเชื้อไวรัส KK-Ts เสียเนื่องจากไฟตกทำให้เมื่อนำไวรัสชุดเดิมมาทดสอบ kinetic growth curve ใหม่พบว่า ลักษณะ phenotype ของไวรัส KK-Ts ไม่เหมือนเดิม เมื่อศึกษา kinetic growth curve ของ KK-WT เทียบกับ KK-Ts พบว่า KK-WT ยังคงมีความสามารถในการเจริญเติบโตที่ 40°C ได้ดีกว่าที่ 37 °C แต่ KK-Ts ไม่มีความต่างในการเจริญเติบโตของทั้งสองอุณหภูมิ ดังแสดงในรูปที่ 8 และเมื่อทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยการเลี้ยงไวรัส KK-Ts (P5) ต่อไปอีกจนได้ passage 5 ครั้งที่ 2 (P5.2) และ passage 10 (P10) ก็พบว่าลักษณะ phenotype ของไวรัสดังกล่าวในการเจริญที่ 37 °C และ 40 °C ก็ไม่แตกต่างกันเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 9 ดังนั้นผู้วิจัยได้เลี้ยงไวรัสอีกตัวหนึ่ง A/Thailand 3/SP83/2004(H5N1) ณ อุณหภูมิ 30 °C 5 passage 27 °C 9 passage และ 25 °C 6 passage ใน MDCK cell ตามที่แสดงในรูปที่ 2 ซึ่งไวรัสดังกล่าวถูกเรียกชื่อว่า **SP83 ts20** ซึ่งไวรัสนี้ไม่มีการ form plaque เลขที่ 40 °C แต่ยังสามารถเจริญได้ที่ 37 °C (รูปที่ 6) จากนั้นไวรัสดังกล่าวได้ถูกนำไปศึกษา kinetic growth curve เทียบกับ SP83 WT ณ อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C โดยใช้ปริมาณไวรัส moi เท่ากับ 0.0001 infect เชื้อใน MDCK cell ซึ่งจากผลการทดลองทั้งจากการทำ HA assay และ plaque assay พบว่า SP83ts20 เจริญได้ช้ากว่า SP83 WT ที่ 37 °C ประมาณ 0.5- 1 log และเจริญไม่ได้เลย ณ 40 °C ซึ่งต่างจาก SP83 WT ถึง 4-6 log ดังแสดงในรูปที่ 10 ซึ่งจะเห็นว่าไวรัสดังกล่าวมีลักษณะ phenotype เป็น temperature sensitive (Ts) mutant ที่ชัดเจนกว่า KK494Ts ดังนั้นไวรัส SP83 WT และ SP83ts20 จะถูกนำมา cloning ยีนทั้งหมดเพื่อใช้ศึกษา ยีนที่มีส่วนสำคัญต่อการแสดงออกของลักษณะ phenotype ของการเจริญที่ 40°C

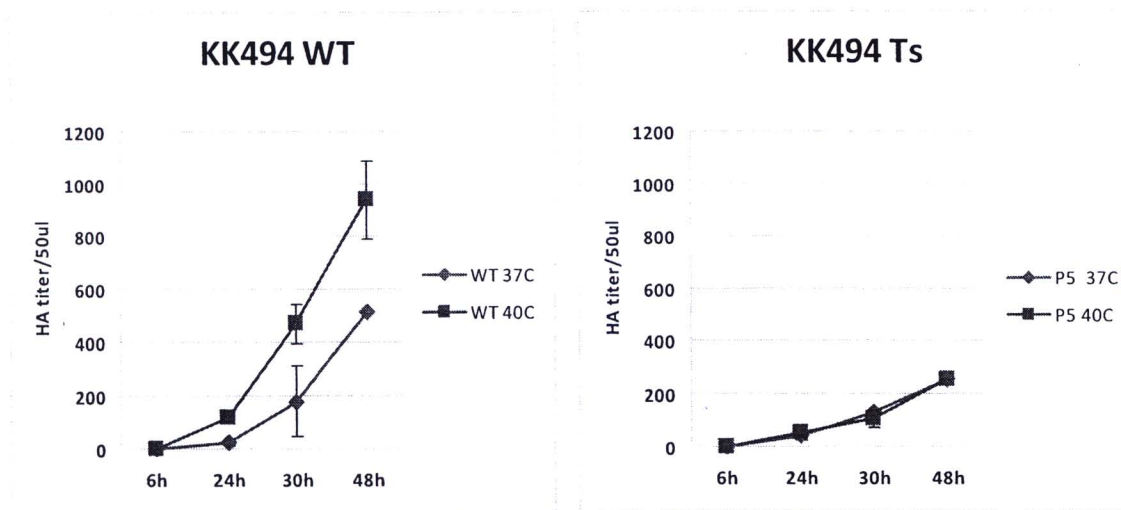
Plaque of SP83 (H5N1) wt and Ts  
37 °C                      40 °C



รูปที่6 ภาพแสดงการเปรียบเทียบขนาดของ plaque ของไวรัส SP83- wt และ SP83-ts ณ อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C, (PFU/ML : Plaque Forming Unit/ ml)

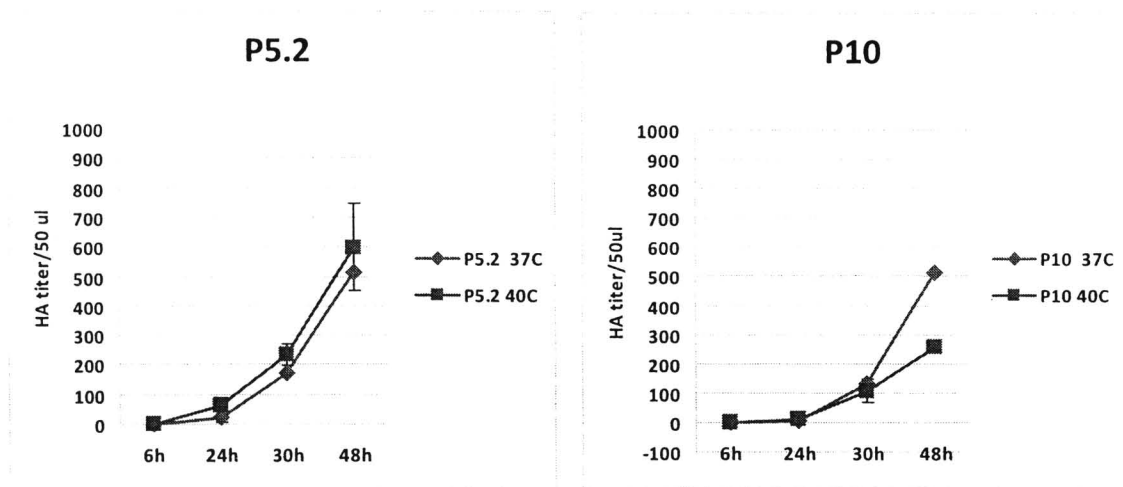


รูปที่7 ภาพแสดงการเปรียบเทียบ kinetic growth curve ระหว่างไวรัส KK494- wt และ KK494-Ts ณ อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C การทดลองที่ 1 โดยแสดงปริมาณเป็นHA titer/50 ul ซึ่งค่าที่แสดงได้มาจากการทำซ้ำกัน 3 ครั้ง

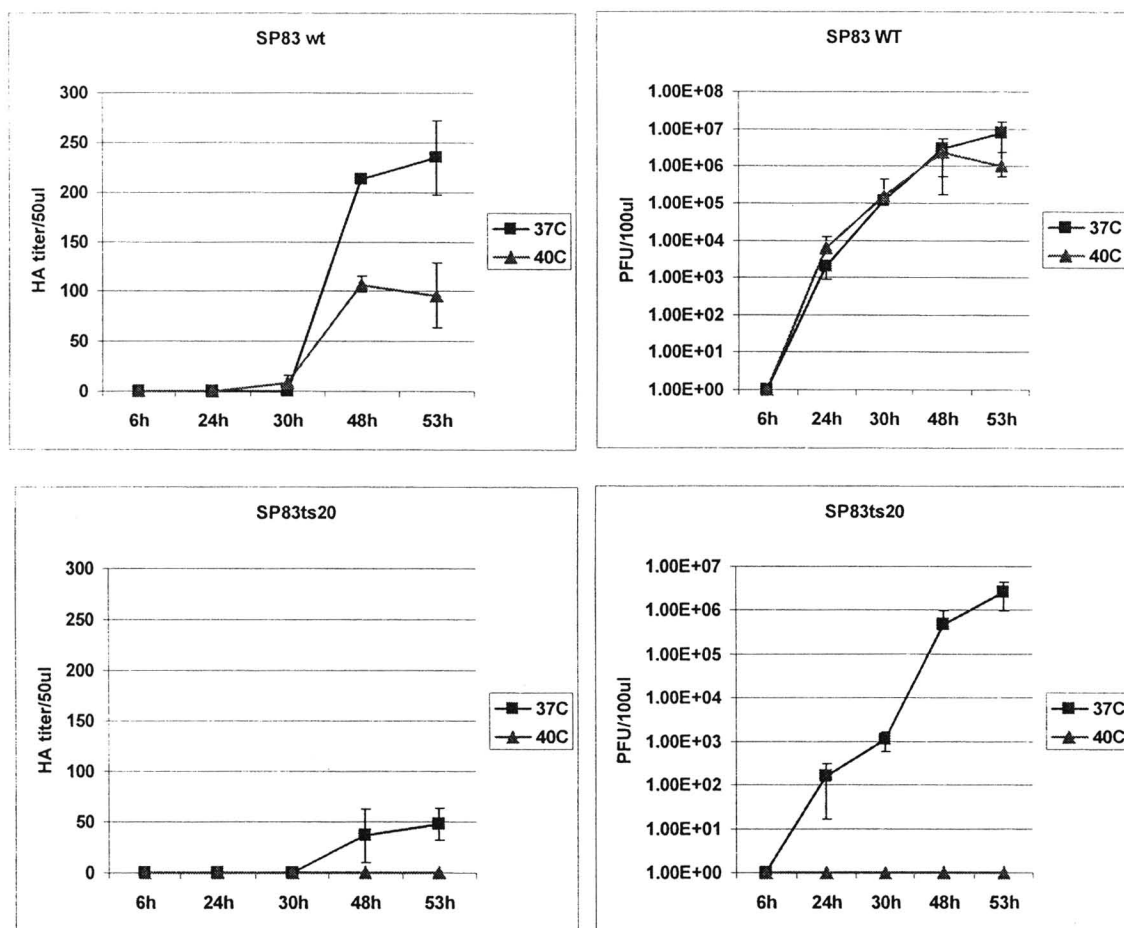


รูปที่8 ภาพแสดงการเปรียบเทียบ kinetic growth curve ระหว่างไวรัส KK494- wt และ KK494-Ts ใน MDCK cell ณ อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C การทดลองที่ 2 โดยแสดงปริมาณเป็นHA titer/50 ul ซึ่งค่าที่แสดงได้มาจากการทำซ้ำกัน 3 ครั้ง





รูปที่ 9 ภาพแสดงการเปรียบเทียบ kinetic growth curve ไวรัส KK494-Ts passage ที่ 5 ครั้งที่ 2 (P5.2) และ passage 10 (P10) ใน MDCK cell ณ อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C โดยแสดงปริมาณเป็น HA titer/50 ul ซึ่งค่าที่แสดงได้มาจากการทำซ้ำกัน 3 ครั้ง



รูปที่ 10 ภาพแสดงการเปรียบเทียบ kinetic growth curve ระหว่างไวรัส SP83 WT และ SPts20 ใน MDCK cell ณ อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C โดยแสดงปริมาณเป็น HA titer/50 ul และ PFU/100 ul ซึ่งค่าที่แสดงได้มาจากการทำซ้ำกัน 3 ครั้ง

2. การศึกษาหายีนและตำแหน่ง point mutation ในยีนโนมของไวรัสไข้หวัดนกที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตที่ 40 องศาเซลเซียส

จากการศึกษา nucleotide sequence และ amino acid sequence จากไวรัส SP83 wild type และ temperature sensitive (Ts) virus พบว่า mutation ที่พบล้วนเป็นส่วนประกอบของ polymerase complex ของไวรัสทั้งสี่ ซึ่งได้แก่ PB2 3 ตำแหน่ง, PB1, PA และ NP ยีนละ 1 ตำแหน่ง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 2 และ 3 ดังนั้นยีนและตำแหน่ง point mutation ต่างๆเหล่านี้น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ ณ อุณหภูมิ 40 °C

ตารางที่ 4 แสดงตำแหน่ง nucleotide mutation ของ SP83 temperature sensitive (Ts) phenotype เปรียบเทียบกับ (H5N1) wild type

| gene | nucleotide position | Wild type (WT) | Temperature sensitive (Ts) |
|------|---------------------|----------------|----------------------------|
| PB2  | 582                 | A              | T                          |
|      | 583                 | G              | T                          |
|      | 1772                | A              | G                          |
| PB1  | 1660                | G              | A                          |
| PA   | 1343                | C              | A                          |
| NP   | 941                 | G              | A                          |
| gene | nucleotide position | Wild type (WT) | Temperature sensitive (Ts) |
| HA   | -                   | -              | -                          |
| NA   | -                   | -              | -                          |
| M    | -                   | -              | -                          |
| NS   | -                   | -              | -                          |

ตารางที่ 5 แสดงตำแหน่ง amino acid mutation ของ SP83 temperature sensitive (Ts) phenotype เปรียบเทียบกับ (H5N1) wild type

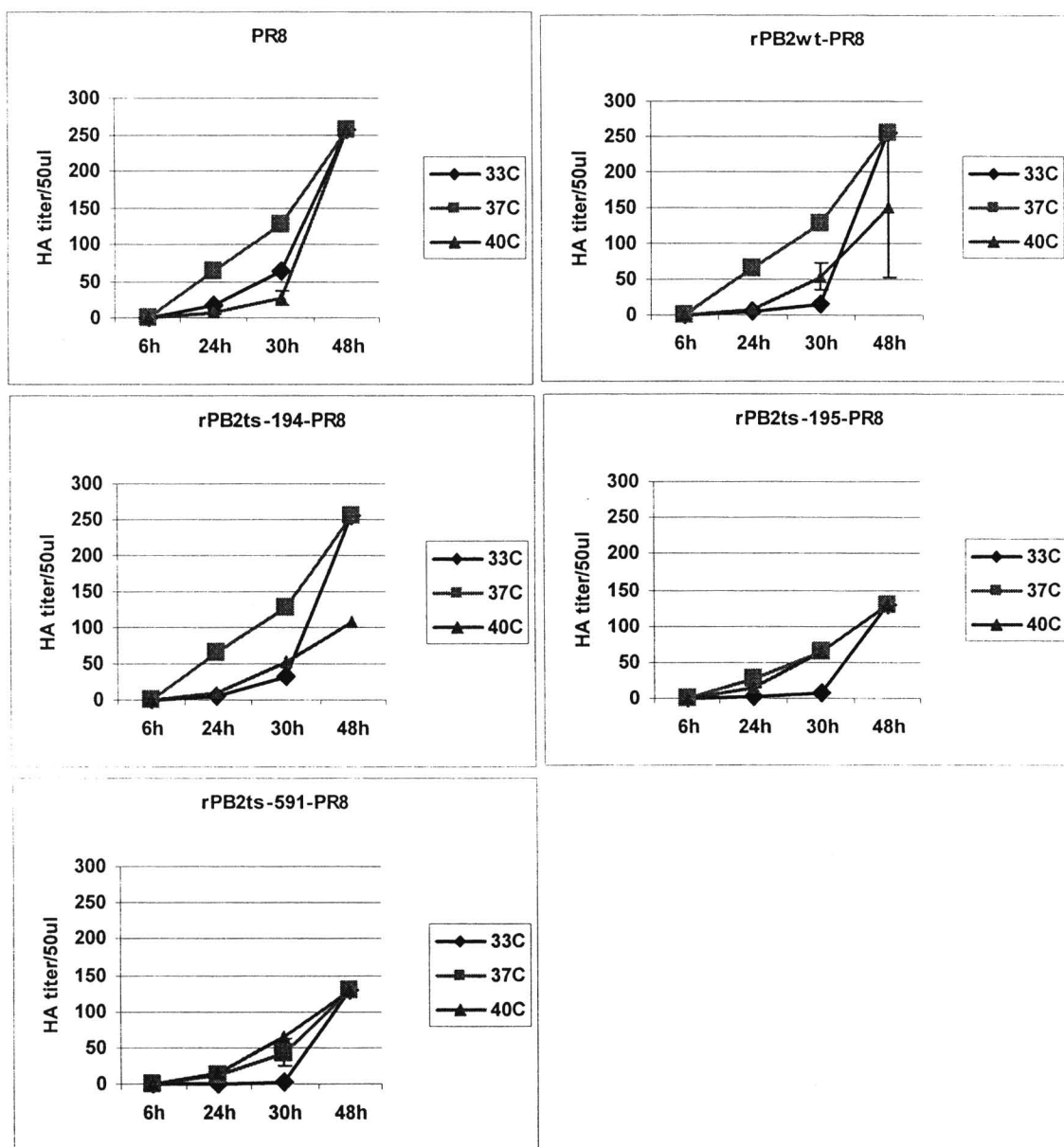
| gene | Amino acid position | Wild type (WT)    | Temperature sensitive (Ts) |
|------|---------------------|-------------------|----------------------------|
| PB2  | 194                 | Glutamine (Q)     | Histidine (H)              |
|      | 195                 | Aspartic acid (D) | Tyrosine (Y)               |
|      | 591                 | Glutamine (Q)     | Arginine (R)               |
| PB1  | 554                 | Aspartic acid (D) | Asparagine (N)             |
| PA   | 448                 | Alanine (A)       | Glutamic acid (E)          |
| NP   | 314                 | Serine (S)        | Asparagine (N)             |
| HA   | -                   | -                 | -                          |
| NA   | -                   | -                 | -                          |
| M    | -                   | -                 | -                          |
| NS   | -                   | -                 | -                          |

3. การศึกษา genetic determinant ของไวรัส SPts20 ต่อการเจริญเติบโตที่ 40 °C

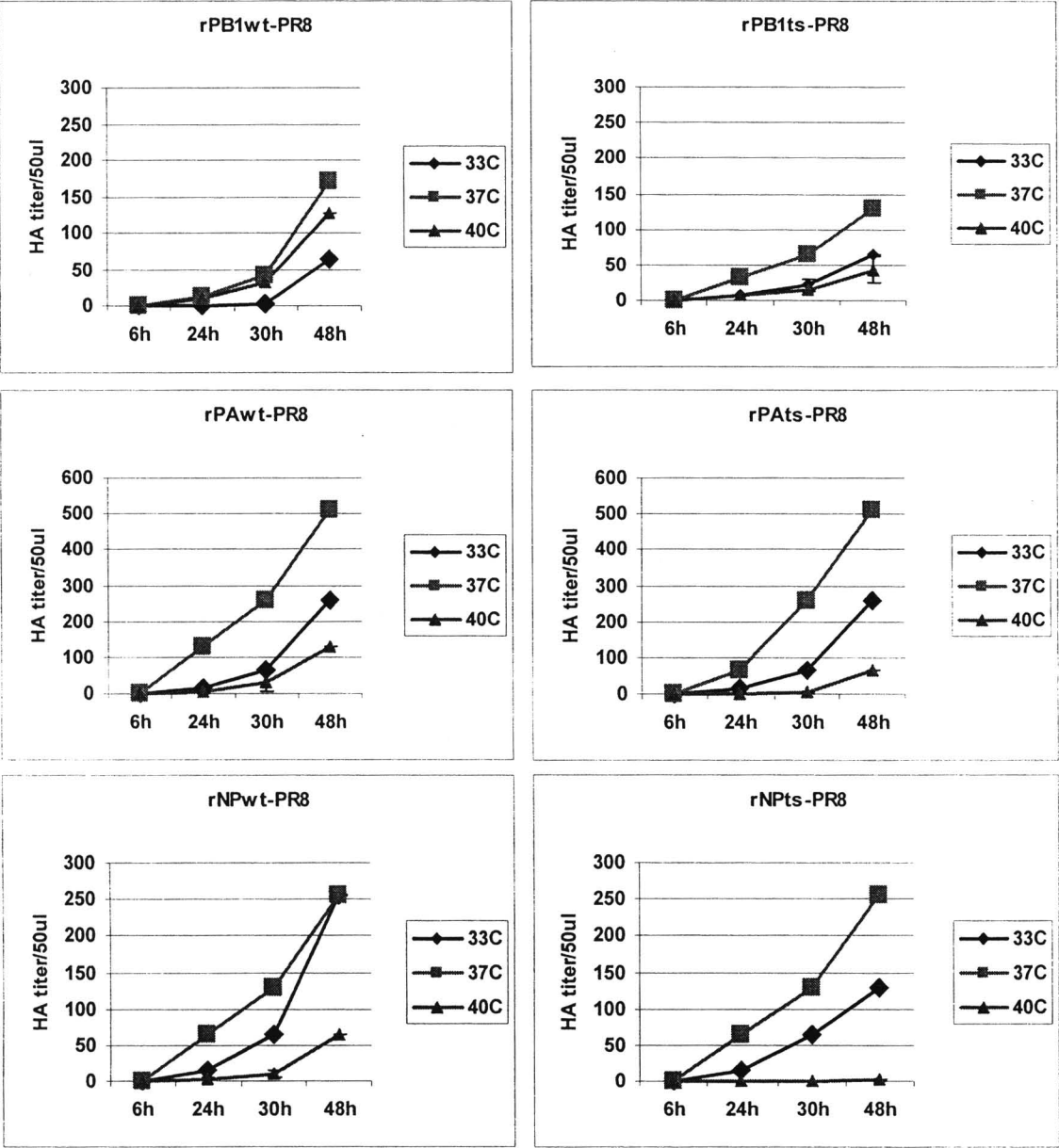
จากการศึกษา nucleotide และ amino acid sequence ของเชื้อSP83 ทั้ง wild type และ ts พบว่า ยีนและตำแหน่งที่น่าจะเป็น genetic determinant ที่สำคัญสำหรับการเจริญที่ 40 °C นั้นพบใน polymerase complex เท่านั้น ดังนั้นในการสร้างไวรัสเพื่อนำมาทดสอบ phenotype ของไวรัสเพื่อตอบคำถามวิจัยจึงทำการสร้าง reassortant ไวรัสที่มียีนของ SP83 ts แต่ละชิ้นร่วมกับไวรัส SP83 wt แต่เนื่องจากการศึกษานี้ได้ทดลองสร้างไวรัส H5N1 ทั้ง 8 gene ด้วยวิธี reverse genetic ไม่สำเร็จทำให้ต้องทำการสร้าง reassortant ไวรัส โดยผสมยีน PB2,PB1,PA,NP ของทั้ง SP83 wild type และ SP83ts20 ร่วมกับ HA, NA, M, NS ของ PR8 ไวรัส แทน ดังแสดงรายชื่อในตารางที่ 2 นอกจากนี้ในยีน PB2 ของไวรัส SP83ts20 มี amino acid sequence ต่างจาก wild type 3 ตำแหน่งดังแสดงในตารางที่ 3 ดังนั้นในการทดลองได้ทำการสร้าง reassortant ไวรัส ที่มี single point mutation ในยีน PB2 ของ SP83-WT ให้มี amino acid sequence เหมือน SP83ts20 ร่วมกับ 7 ยีนของ PR8 ไวรัส เพื่อนำมาศึกษาลักษณะ phenotype ในการเจริญที่ 33 °C, 37 °C และ 40 °C ใน MDCK cell (ทำการศึกษาการเจริญเติบโตที่ 33°C เพิ่มเติมด้วยเนื่องจาก reassortant ไวรัสมิ permissive temperature ณ อุณหภูมินี้) จากการศึกษา

kinetic growth curve ของ reassortant ไวรัสยีนชนิดต่างๆของ SP83 (H5N1) ไวรัส ใน back bone PR8 ได้แก่ PB2 (rPB2wt-PR8, rPB2ts-194, rPB2ts-195, rPB2ts-591-PR8), PB1 (rPB1wt-PR8, rPBts-PR8), และ PA (rPAwt-PR8, rPAts-PR8) พบว่าไวรัสทั้งหมดดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนได้ดีที่ อุณหภูมิ 40 °C ดังแสดงในรูปที่ 11.1-11.2 สำหรับไวรัสที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตที่ 40 °C อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ wild type virus ได้แก่ ไวรัสที่มี NP gene ของ SP83ts20 (rNPts-PR8) เนื่องจากไวรัสดังกล่าวลดความสามารถในการเพิ่มจำนวน ณ อุณหภูมิ 40 °C ลงถึง 64 เท่า หรือ 2-3 logs เมื่อเปรียบเทียบกับ rNPwt-PR8 (ณ 48 ชั่วโมง post infection ณ อุณหภูมิ 33 หรือ 37 °C) ดังแสดงในรูปที่ 11.2 (HA titer) และรูปที่ 12 (TCID50) ซึ่งลักษณะ phenotype ดังกล่าวนี้นี้เป็นลักษณะเฉพาะที่พบใน MDCK cell (mammalian cell) แต่ไม่พบความแตกต่างของความสามารถในการเจริญ ณ อุณหภูมิ ต่างๆใน chicken embryo fibroblast (CEF; avian cell) ดังแสดงในรูปที่ 13 (HA titer) และ 14 (TCID50) ซึ่งพบว่าไวรัส rNPwt-PR8 และ rNPts-PR8 สามารถเจริญเติบโตได้ไม่แตกต่างกันทั้งอุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C

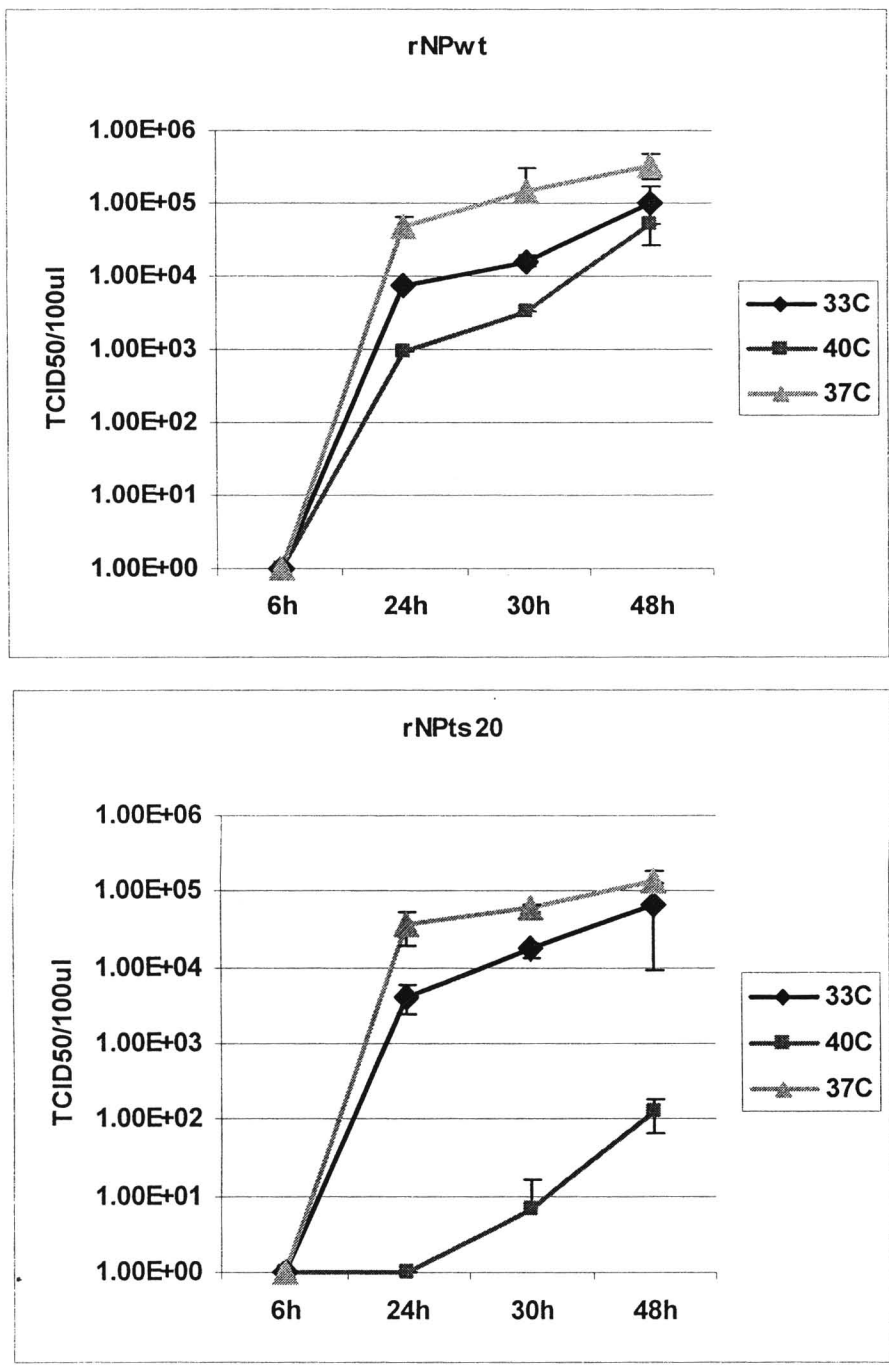




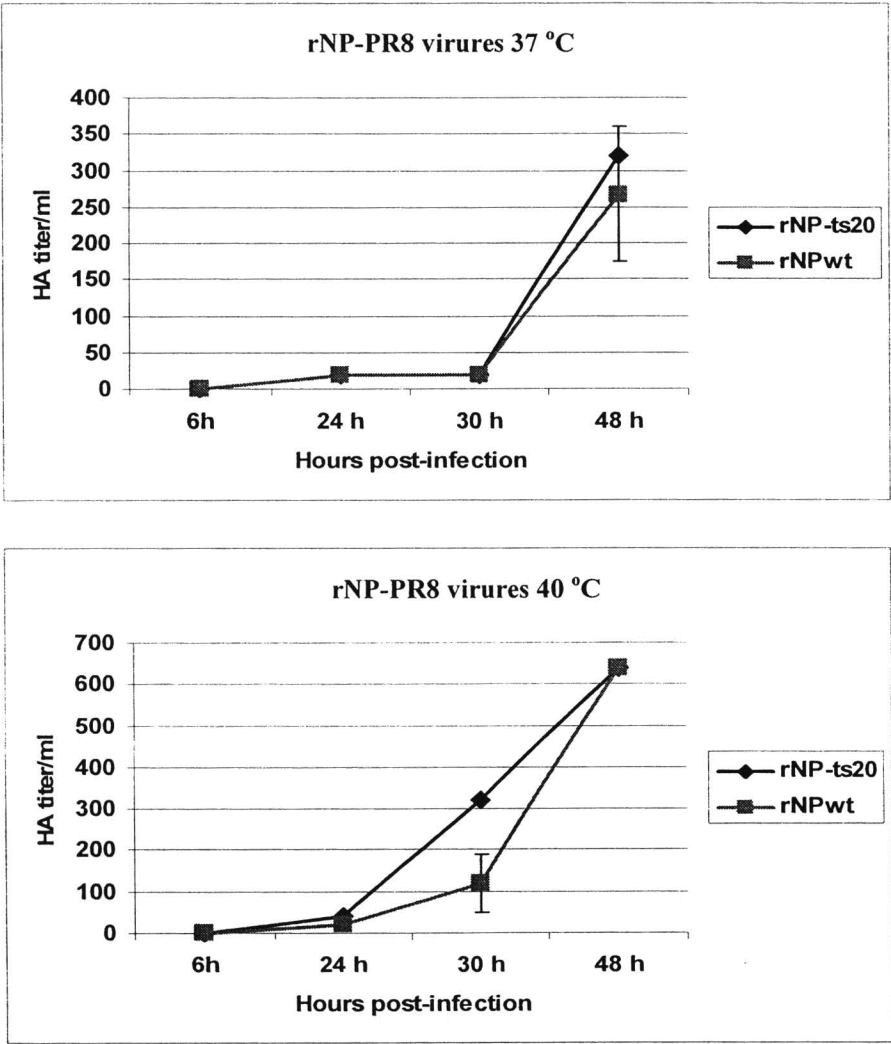
รูปที่ 11.1 ภาพแสดงการเปรียบเทียบ kinetic growth curve ระหว่าง wild type PR8 และ PB2wt, PB2ts-194, PB2 ts-195, PB2ts-591-PR8 reverse genetic virus ใน MDCK cell ณ อุณหภูมิ 33 °C, 37 °C และ 40 °C โดยแสดงปริมาณเป็น HA titer/ml ซึ่งค่าที่แสดงได้มาจากการทำซ้ำกัน 3 ครั้ง



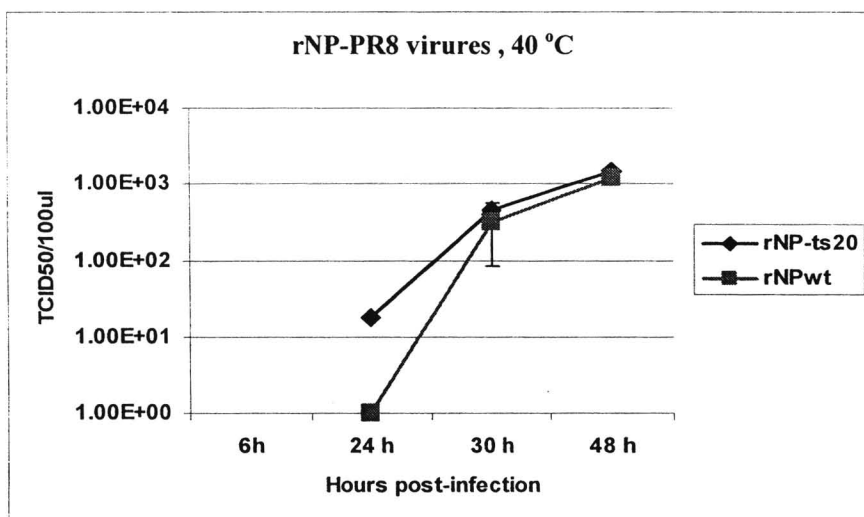
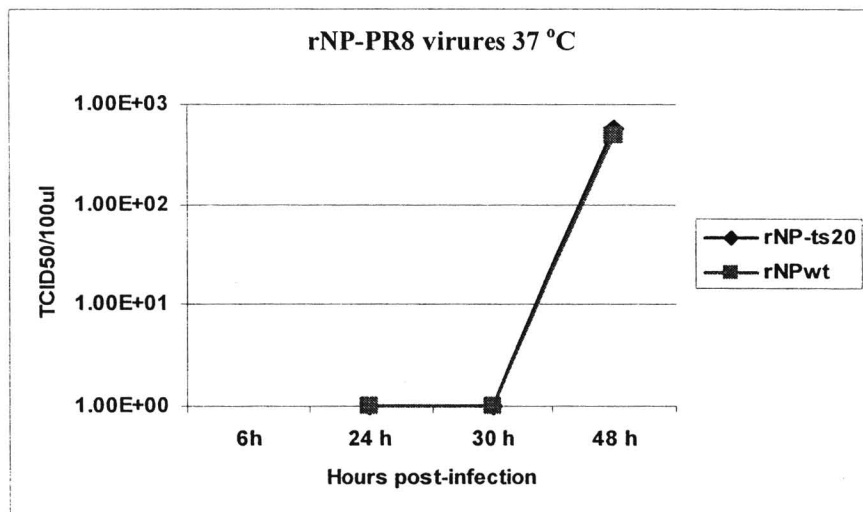
รูปที่ 11.2 ภาพแสดงการเปรียบเทียบ kinetic growth curve ระหว่าง wild type PR8 และ PB1wt, PB1ts, PAwt, Pats, NPwt, NPts-PR8 reverse genetic virus ใน MDCK cell ณ อุณหภูมิ 33 °C, 37 °C และ 40 °C โดยแสดงปริมาณเป็น HA titer/50ul ซึ่งค่าที่แสดงได้มาจากการทำซ้ำกัน 3 ครั้ง



รูปที่ 12 ภาพแสดงการเปรียบเทียบ kinetic growth curve ใน MDCK cell ระหว่างไวรัส rNPwt-PR8 และ rNPts-PR8 reverse genetic virus ใน MDCK cell ณ อุณหภูมิ 33 °C ,37 °C และ 40 °C โดยแสดงปริมาณเป็น TCID50/100ul ซึ่งค่าที่แสดงได้มาจากการทำซ้ำกัน 3 ครั้ง



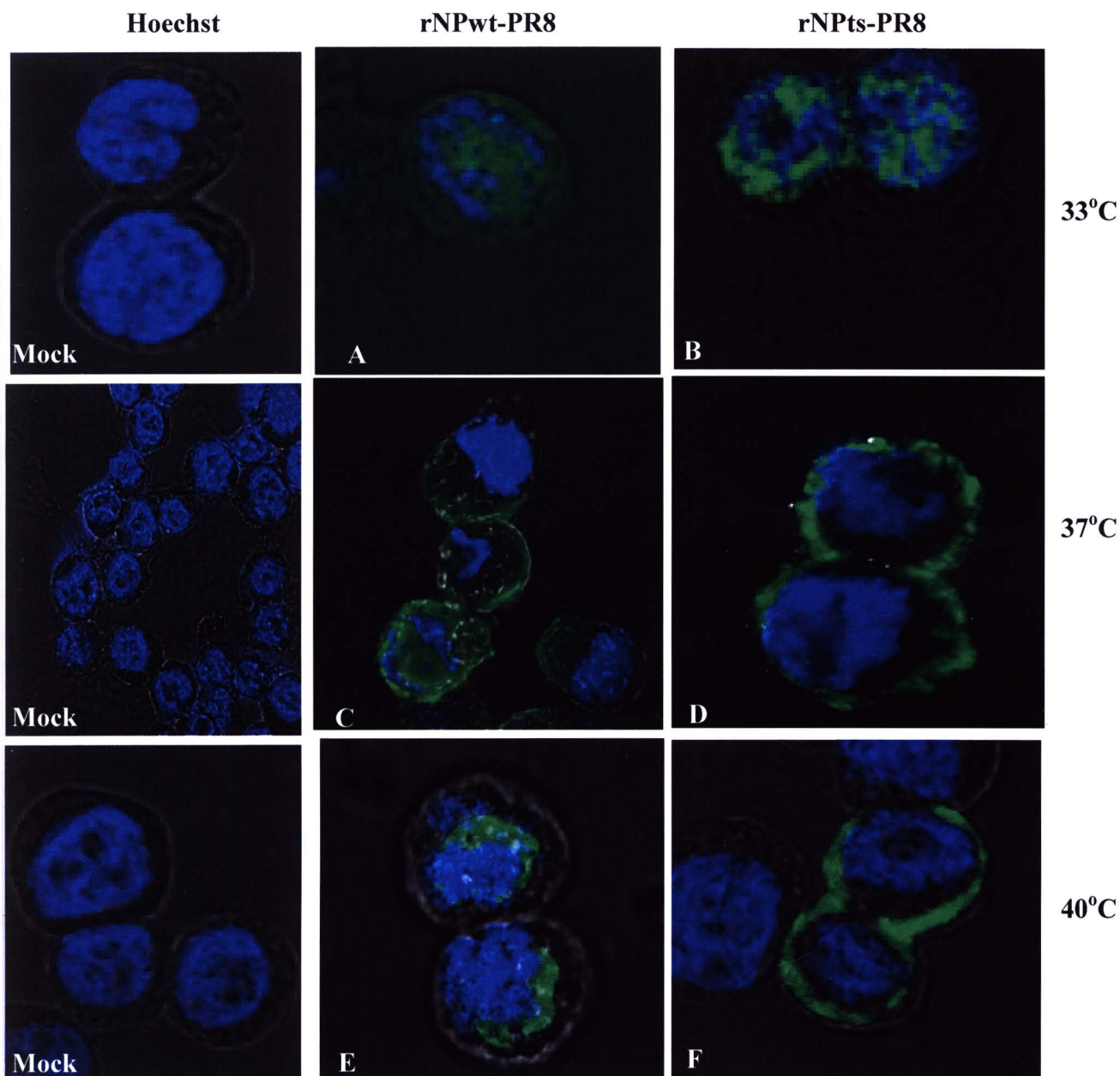
รูปที่ 13 ภาพแสดงการเปรียบเทียบ kinetic growth curve ระหว่างไวรัส rNPwt-PR8 และ rNP-PR8 reverse genetic virus ใน chicken embryo fibroblast (CEF) cell ณ อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C โดยแสดงปริมาณเป็น HA titer/ml ซึ่งค่าที่แสดงได้มาจากการทำซ้ำกัน 3 ครั้ง



รูปที่ 14 ภาพแสดงการเปรียบเทียบ kinetic growth curve ระหว่างไวรัส rNPwt-PR8 และ rNPts-PR8 reverse genetic virus ใน chicken embryo fibroblast (CEF) cell ณ อุณหภูมิ 37 °C และ 40 °C โดยแสดงปริมาณเป็น TCID50/100ul ซึ่งค่าที่แสดงได้มาจากการทำซ้ำกัน 3 ครั้ง

#### 4. NP mutation S314N มีผลต่อการขนส่ง NP protein เข้าสู่ nucleus

NP เป็นโปรตีนที่ประกอบอยู่ใน viral ribonucleoprotein (vRNP) complex ซึ่งจะถูกลำเลียงเข้าสู่ nucleus โดยโปรตีน importin  $\alpha$  จากการศึกษา nuclear localization ของ NP wild type เทียบกับ NPTs20 พบว่า การที่ amino acid เปลี่ยนจาก Serine (S) เป็น Asparagine (N) นั้นมีผลกระทบกับการขนส่ง NP เข้าสู่ nucleus ณ อุณหภูมิที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดย NP จะค้างอยู่ที่บริเวณ cytoplasm เท่านั้น ในขณะที่การกระจายตัวของ NP ของทั้ง wild type และ NPTs20 ณ อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสนั้น กระจายตัวดีทั้งใน nucleus และ cytoplasm ดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 การศึกษา Localization ของโปรตีน NP ใน 293T cells ณ อุณหภูมิ 33°C (A,B), 37°C (C,D) และ 40°C (E,F) plasmid 1 µg ถูก tranfect เข้าใน 293T cells ซึ่งโปรตีน NP ถูกวัดด้วยวิธี indirect immunofluorescence assay โดยย้อมด้วย specific antibody และ FITC conjugate , สำหรับ nucleus ของ Cell ถูกย้อมด้วยสี Hoechst.

