

GENETIC DETERMINANTS OF TEMPERATURE SENSITIVITY OF H5N1 AVIAN INFLUENZA VIRUS

NATTAMON SIBOONNAN 5136640 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PRASERT AUEWARAKUL, M.D., Dr.med., PILAIPAN PUTHAVATHANA, Ph.D., SUDA LOUISIRIROTCHANAKUL, Ph.D.

ABSTRACT

The ability of H5N1 virus to grow at high temperatures is an important feature for viral pathogenesis in human. It has previously been reported that this ability is associated with the viral polymerase function. Mutations occurring in the viral genome, which are a result of the error prone nature of RNA polymerase, also play an important role in determining the viral phenotype and pathogenesis.

This study aimed to identify the genetic determinants of temperature sensitivity of H5N1 avian influenza virus. The temperature sensitive (*ts*) mutant virus (SP83ts20) was generated from the wild type A/Thailand/3(SP-83)/2004 virus (SP83wt) by serial adaptation at low temperature. After 20 passages, it was confirmed that the virus showed temperature sensitive phenotype, and did not grow at 40°C. Making use of a reverse genetic system, ten reassortant viruses were constructed. Each virus contained one mutated gene from SP83ts20 or wild type gene from SP83wt in a backbone derived from mouse adapted influenza virus, A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). These viruses were determined for their *ts* phenotype by kinetic growth curve at 33 and 40°C. The NP gene derived from SP83ts20 exhibited temperature sensitive phenotype in mammalian cells, but not in avian cells. It was found that NP of *ts* mutant virus contained only one point mutation: serine to asparagine at position 314 (S314N).

The NP protein plays a role in many steps of the viral life cycle, including nuclear transport mechanism. To test whether NP S314N mutation affected the nuclear transporting system, an indirect immunofluorescence assay was conducted to detect the NP subcellular localization. NP possessing S314N mutation exhibited a defect in nuclear uptake when compared with wild type NP protein at high temperature. These results suggest that NP S314N in SP83ts20 virus was responsible for temperature sensitive phenotype, and the lack of ability to replicate at high temperature involved a defect in interaction with cellular factors for its importation into the nucleus of infected cells.

KEY WORDS: H5N1 VIRUS/ TEMPERATURE SENSITIVE/ NP PROTEIN/
REVERSE GENETICS/ NUCLEAR TRANSPORT

117 pages

ตัวกำหนดทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ที่ตอบสนองต่อความไวต่ออุณหภูมิสูง
GENETIC DETERMINANTS OF TEMPERATURE SENSITIVITY OF H5N1 AVIAN INFLUENZA
VIRUS

ณัฐมน ศิบุญนันท์ 5136640 SIMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ประเสริฐ เอื้อวรากุล, พ.บ., Dr. med., พิไลพันธ์ พุทธวัฒนะ, Ph.D.,
สุดา ลุยศิริโรจนกุล, Ph.D.

บทคัดย่อ

ความชอบต่ออุณหภูมิสูงของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 นั้น เป็นปัจจัยสำคัญต่อการก่อ
พยาธิสภาพในคน เนื่องจากคุณสมบัติของเอนไซม์ RNA polymerase ในการสังเคราะห์รหัสพันธุกรรมมีความ
ผิดพลาดสูง ดังนั้นจึงมีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นได้ง่าย ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกำหนดลักษณะของการแสดงออก
ของไวรัส

จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ก็เพื่อหาตัวกำหนดทางพันธุกรรมที่มีผลต่อความไวต่ออุณหภูมิสูง
ของไวรัสไข้หวัดนก SP83ts20 ซึ่งเป็นไวรัสที่แสดงออกถึงความไวต่ออุณหภูมิสูง โดยถูกสร้างจากไวรัสไข้หวัด
นก H5N1 สายพันธุ์ A/Thailand/3 (SP-83)/2004 virus (SP83wt) ซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 20 passages จนได้
ไวรัส SP83ts20 ที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 40°C งานวิจัยนี้สามารถสร้างไวรัสลูกผสมได้ 10 แบบโดย
วิธี reverse genetics ภายในตัวไวรัสที่ประกอบด้วย หนึ่งในยีนจากตัวไวรัส SP83ts20 ที่พบว่ามีอาการกลายพันธุ์
เกิดขึ้นในลำดับเบส หรือยีนเดียวกันจากไวรัส SP83wt และยีนที่เหลือมาจากไข้หวัดใหญ่สายพันธุ์ A/Puerto
Rico/8/34 (H1N1) ไวรัสที่ได้จะถูกนำไปทดสอบดูว่ายีนใดที่เป็นตัวกำหนดลักษณะความไวต่ออุณหภูมิ ซึ่งศึกษา
โดยการเจริญเติบโตของไวรัสแต่ละตัวที่อุณหภูมิ 33 และ 40°C ผลการศึกษาพบว่า ยีน NP ของไวรัส SP83ts20
เป็นตัวที่แสดงออกของลักษณะดังกล่าวเฉพาะในเซลล์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่ไม่พบการแสดงออกนี้ในเซลล์
จากสัตว์ปีก นอกจากนี้ตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนั้นมีเพียงตำแหน่งเดียวคือที่ 314 โดยเปลี่ยนจาก serine
(S) ไปเป็น asparagines (N)

โปรตีน NP นั้นมีความเกี่ยวข้องในหลายขั้นตอนของวงจรชีวิตของไวรัสซึ่งรวมถึง กลไกในการ
ขนส่ง vRNPs เข้าสู่เซลล์ด้วย เพื่อเป็นการทดสอบดูผลจากกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง S314N ว่ามีผลต่อกลไก
ดังกล่าวหรือไม่ ผู้ทำการวิจัยจึงใช้วิธี indirect immunofluorescence เพื่อหาตำแหน่งที่อยู่ภายในเซลล์ของโปรตีน
NP ผลปรากฏว่า เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิสูง โปรตีน NP ที่มีการกลายพันธุ์ของตำแหน่ง 314 นั้น ทำให้กลไกในการ
เข้าสู่เซลล์มีความบกพร่องเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ไม่มีการกลายพันธุ์ และจากผลการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็น
ให้เห็นถึงความสำคัญของ NP S314N ต่อการเป็นตัวกำหนดลักษณะความไวต่ออุณหภูมิสูง และการที่ไวรัสไม่
สามารถเจริญเติบโตได้ในที่มีอุณหภูมิสูงก็เกี่ยวข้องกับความบกพร่องต่อการกระทำระหว่างโปรตีน NP กับโปรตีน
ภายในเซลล์ที่ใช้ในกระบวนการนำโปรตีนเข้าสู่เซลล์