

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การวิเคราะห์หาโปรตีนตัวรับของเชื้อไวรัส H5N1 บนผิวเซลล์ประสาทของคนโดยใช้
เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์

โดย

รศ.ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร

ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ

มิถุนายน พ.ศ. 2555

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่ได้อนุมัติทุนวิจัยสำหรับการวิเคราะห์หาโปรตีนตัวรับของเชื้อไวรัส H5N1 บนผิวเซลล์ประสาทของคนโดยใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ ทำให้โครงการวิจัยดังกล่าวสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย การวิเคราะห์หาโปรตีนตัวรับของเชื้อไวรัส H5N1 บนผิวเซลล์ประสาท
ของมนุษย์ใช้เทคนิคทางโปรติโอมิกส์

ชื่อผู้วิจัย รศ.ดร.พุดลาภ ชีพสุนทร ศ.นพ.ยง ภูววรรณ

เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ พฤษภาคม พ.ศ. 2555

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ตรวจสอบความสามารถในการติดเชื้อไวรัส H5N1 สายพันธุ์ A/Thailand/ NK165/2005 ในเซลล์ประสาท SH-SY5Y โดยที่ไวรัสสายพันธุ์นี้ถูกแยกมาจากพลาสมาของผู้ป่วยติดเชื้อในช่วงที่มีการระบาดระลอกที่สามในประเทศไทย เนื่องจากจนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงความสามารถในการติดเชื้อของไวรัสสายพันธุ์นี้ในระบบประสาทของคน ผลการศึกษาพบว่า การติดเชื้อไวรัส NK165 ทำให้เซลล์ประสาทคนมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจากเดิม (CPEs) สามารถตรวจพบ hemagglutinin ที่จำเพาะต่อ H5N1 ในบางเซลล์หลังจากได้รับเชื้อไปแล้ว 12 ชั่วโมง ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ทุกเซลล์จะติดเชื้อหมด ผลที่ได้สอดคล้องกับลำดับการเกิด CPEs และปริมาณไวรัสที่ถูกผลิตออกมาจากเซลล์ที่ติดเชื้อ ภายในเวลา 72 ชั่วโมง เซลล์ที่ติดเชื้อจะถูกทำลายจนหมด นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ใช้ไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวในการวิเคราะห์หาโปรตีนตัวรับของไวรัส H5N1 บนผิวเซลล์ประสาทโดยใช้เทคนิค ID-VOPBA ควบคู่ไปกับการวิเคราะห์ผลโดยใช้เครื่อง LC-MS/MS โดยพบว่า RACK1 และ prohibitin เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกจริงในเซลล์ประสาทที่ใช้ศึกษาและการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองตัวนี้จะลดลงหลังจากที่เกิดการติดเชื้อ จึงเป็นไปได้ว่า RACK1 และ prohibitin อาจจะเป็นโปรตีนที่จับกับไวรัสและมีส่วนร่วมในการเข้าของไวรัสสู่เซลล์ประสาท อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาในเชิงลึกเพื่อยืนยันบทบาทดังกล่าวของโปรตีนทั้งสองตัวต่อไป ซึ่งผลของการศึกษาที่ได้จะทำให้เกิดความเข้าใจในเชิงลึกต่อการติดเชื้อไวรัส H5N1 ในระบบประสาทและอาจนำไปสู่การพัฒนาการป้องกันและรักษาการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในระบบประสาทของคนต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project title	Identification of receptors for H5N1 virus on human nerve cells using proteomics-based approaches
Investigators	Assoc. Prof. Poonlarp Cheepsunthorn, Ph.D., Prof. Yong Poovorawan, MD.
Year	May 2012

Abstract

In this study, we investigated neuroinfectious capacity of H5N1 (A/Thailand/ NK165/2005) isolated from plasma of infected individual during the third wave of Thailand outbreaks using human neuroblastoma SH-SY5Y cells. This was due to lack of information regarding neuroinfectivity of this variant. Results demonstrated that H5N1/NK165 induced severe CPEs in these neuronal cells. H5N1-specific hemagglutinin was found in the cytoplasm of the infected cells as early as 12 h post-infection. By 24 h post-infection, all cells in the cultures were infected. These findings coincided with time course of CPEs and the presence of virus progeny in the culture medium of infected cells. Virus titer increased exponentially overtime. After 24 h post-infection, viability of the infected cell began to decline. By 72 h, only cellular debris remained in the infected cultures. Moreover, with this isolate we identified host cell proteins that might be involved in H5N1 entry to nerve cells using 1D-VOPBA coupled with LC-MS/MS analysis. RACK1 and prohibitin were identified as potential receptor for H5N1. Expression of RACK1 and prohibitin was confirmed by western blot analysis. There was a significant decrease in expression of RACK1 and prohibitin proteins compared with mock-infected cells, suggesting that both RACK1 and prohibitin might be involved in the initial step of H5N1 binding to the neuronal cell membrane and/or internalization. further studies are needed to explore whether both RACK1 and prohibitin are actual receptors for H5N1. This will ultimately lead to improved therapeutics and provide an insight into neuronal mechanism of H5N1 infection.

Table of Contents

	Page
1. Acknowledgement	II
2. Thai abstract	III
3. English abstract	IV
4. List of tables	VI
5. List of figures	VII
6. Introduction	1
7. Survey of related literatures	2
8. Procedure	3
9. Results	8
10. Discussion	18
11. Conclusion	20
12. References	20

List of Tables

	Page
1. Table 1. CPE score of H5N1-infected SH-SY5Y cells at different time points post-infection	12
2. Table 2. Candidates of H5N1 virus-binding proteins on SH-SY5Y cells identified by LC-MS/MS.	16

List of Figures

	Page
1. Figure 1. Cytopathic effects (CPE) of SH-SY5Y cells infected with influenza A H5N1 virus (Thailand/NK165/05)	11
2. Figure 2. Immunofluorescence staining of SH-SY5Y cells infected with H5N1 virus	13
3. Figure 3. Virus production and susceptibility of SH-SY5Y cells to H5N1 infection	14
4. Figure 4. Virus overlay protein binding assay (VOPBA) reveals H5N1 virus-binding proteins on SH-SY5Y cells.	15
5. Figure 5. Western blot analysis of RACK1 and prohibitin expression in mock and H5N1-infected SH-SY5Y cells	17