เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อได้ทั้งในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่าง ๆ ซึ่งในแต่ละปีจะพบการระบาดของเชื้อไวรัสซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก งานวิจัยนี้ มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ปัจจัยทางด้านไวรัสที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคชนิดรุนแรงของเชื้อ influenza A virus โดย สามารถแบ่งออกเป็น 4 ส่วนใหญ่ ๆ ดังนี้

ส่วนแรกได้ทำการพัฒนาเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน Non-coding regions ของเชื้อ influenza A virus โดยการแก้ไขข้อจำกัดต่าง ๆ ที่พบในอดีต จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้หาลำดับเบสในส่วนของ non-coding regions ได้สะดวกและมีประสิทธิภาพมากขึ้น จากการวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบระหว่างเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่และไข้หวัดนกพบว่า ที่ตำแหน่งที่ 4 จากปลายด้าน 3'-NCR ของยีน PB2, PB1 และ PA ที่พบในเชื้อไวรัสไข้หวัดนกจะเป็นเบส G ในขณะที่ไวรัสไข้หวัดใหญ่เป็นเบส A ในยีน PB2 และ PA ซึ่งอาจส่งผลให้ไวรัสไข้หวัดนกมีความสามารถในการ replication สูงกว่า จึงทำให้มีความรุนแรงมากกว่า นอกจากนี้ ยังพบความแตกต่างที่บริเวณปลายด้าน 3'-NCR ดังนี้ ยีน PB2 (ตำแหน่ง 17), PA (ตำแหน่ง 20), NP (ตำแหน่ง 29), NA (ตำแหน่ง 17), M (ตำแหน่ง 18) และ NS (ตำแหน่ง 16 และ 21) ส่วนปลายด้าน 5'-NCR มีความแตกต่างกันดังนี้ ยีน PB2 (ตำแหน่ง 25 และ 26) และ PB1 (ตำแหน่ง 24) เป็นต้น แต่ความแตกต่างดังกล่าวยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน แต่ก็มีแนวโน้มที่อาจจะเกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงของโรค ซึ่งควรจะต้องทำการศึกษาต่อไป

ส่วนที่สองเป็นการศึกษา วิเคราะห์ความเปลี่ยนแปลงส่วน coding region หรือเฝ้าระวังการเกิดการกลายพันธุ์ยีนทั้ง 8 ยีน ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่ระบาดในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2547-2551 การวิเคราะห์ ในส่วนของยีน HA ยังคงพบลักษณะ multiple insertion of basic amino acids เช่นเดียวกับเชื้อที่มีการระบาดตั้งแต่ในปี พ.ศ. 2547 มาก่อน ส่วนของลำดับกรดอะมิโนที่ receptor binding site ที่พบจะเหมือนกันทุกตัวอย่าง ลักษณะทางพันธุกรรมอื่นที่สำคัญ ได้แก่ ยีน Neuraminidase ยังคงพบ 20 amino acid deletion ในบริเวณของ stalk region (ตำแหน่ง 49-68) ส่วนที่มีผลดื้อต่อยา Oseltamivir นั้นเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง histidine (H) เป็น tyrosine (Y) ในตำแหน่งที่ 274 ของ

Neuraminidase การวิจัยในครั้งนี้ไม่พบกรดอะมิโนที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยา Oseltamivir การวิเคราะห์กรดอะมิโนตำแหน่ง 627 ของ Polymerase basic 2 (PB2) โดย การเปลี่ยนแปลงจาก glutamic acid (E) เป็น lysine (K) จะทำให้เชื้อก่อความรุนแรงในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงเป็น lysine (K) ในไวรัสในสัตว์ปีกซึ่งเป็นไวรัสที่พบในปี พ.ศ. 2548 แต่ยังไม่พบรายงานการแพร่กระจายจากสัตว์ปีกสู่คนแต่อย่างใด การศึกษาวิวัฒนาการและการพัฒนาสายพันธุ์ของเชื้อไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในครั้งนี้ทำให้สามารถพบว่า เชื้อใน clade 1 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการระบาดมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 มีลักษณะการวิวัฒนาการ ออกเป็น 3 กลุ่ม นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อในแต่ละกลุ่มนั้นสามารถเกิดการ reassortment ขึ้นได้ ซึ่งอาจเกิดจากพื้นที่ที่เกิดการระบาดนั้นมี เชื้อไวรัส 2 กลุ่ม อยู่ด้วยกัน ทำให้อาจเกิดการ reassortment ขึ้นได้ โดยการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงวิวัฒนาการการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ที่พบในประเทศไทย ซึ่งมีความสำคัญและสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อใช้ในการเตรียมตัวป้องกันการติดเชื้อ การพัฒนาการตรวจวินิจฉัย และการรักษาต่อไปในอนาคต

ส่วนที่สามเป็นการศึกษาทำนายความรุนแรงของเชื้อไวรัสโดยศึกษาคุณสมบัติในส่วน cleavage site ของ hemagglutinin สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยการคำนวณค่าอันตรกิริยาระหว่างแต่ละกรดอะมิโนของ HA กับ binding pocket ของฟูริน (Decomposition Energy, DC) โดยพบว่าระบบ FR-H5Sq1(RERRRKKR) ที่ตำแหน่ง S1, S4 และ S6 มีอันตรกิริยาที่แข็งแรงกับฟูริน ส่วนระบบ FR-H5Sq2(RERKRKKR) ตำแน่ง S1, S4 และ S6 ก็เกิดอันตรกิริยาที่แข็งแรงกับฟูรินเช่นกันแต่ตำแหน่ง S5 ของระบบนี้เป็น lysine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มี side chain สั้นกว่า arginine ทำให้อันตรกิริยาที่ตำแหน่งนี้น้อยกว่าระบบแรก และ ระบบ FR-H5Sq3(REKRRKKR) เกิดอันตรกิริยาที่แข็งแรงกับฟูรินที่ตำแหน่ง S1 และ S4 ส่วนที่ตำแหน่ง S6 นั้นเป็น lysine จึงเกิดอันตรกิริยากับฟูรินน้อยกว่าระบบ FR-H5Sq1 และ FR-H5Sq2 แต่ที่ตำแหน่ง S5 ของระบบ FR-H5Sq3 เกิดอันตรกิริยากับฟูรินมากกว่าสองระบบดังกล่าวทำให้ binding free energy ของระบบ FR-H5Sq3 ไม่แตกต่างกับระบบ FR-H5Sq2 ในขณะที่ระบบ FR-H5Sq4(RERRR-KR) ที่มีค่า binding free energy น้อยที่สุดซึ่งระบบนี้มี deletion ของ K ที่ตำแหน่ง S3 ทำให้ระบบนี้ fit ไม่ดีกับ binding pocket ของฟูริน ซึ่งเมื่อดูผลการคำนวณอันตรกิริยาระหว่างแต่ละกรดอะมิโนกับเอ็นไซม์ฟูริน ก็พบว่า ตำแน่ง S1 และ S4 เกิดอันตรกิริยาที่แข็งแรงกับฟูรินทำให้ระบบนี้ยึดจับกับฟูรินได้น้อยกว่าทั้งสามระบบดังกล่าว ซึ่งข้อสรุปนี้ก็สอดคล้องเป็นอย่างดีกับการคำนวณ binding free energies และ การคำนวณระยะทางที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตัดพันธะของ HA โดยเอ็นไซม์ฟูริน

สำหรับส่วนสุดท้าย เป็นการศึกษาในส่วน cleavage site ของ hemagglutinin สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันผลที่ได้ทางทฤษฎี จากผลการทดลองพบว่าสามารถเตรียม Expression Vector (pPICZaA) ที่มีชิ้นส่วนของยีน Hemagglutinin จากเชื้อไวรัส H5N1 influenza ทั้ง 4 สายพันธุ์ และนำเข้าสู่ *Pichia pastoris* ได้ แต่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน hemagglutinin ดังกล่าวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เนื่องจาก *Pichia pastoris* อาจเป็นระบบที่ไม่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีนนี้ จากผลดังกล่าวจึงไม่สามารถนำโปรตีน Hemagglutinin มาศึกษาคุณสมบัติในส่วนบริเวณ cleavage site ที่แตกต่างกัน โดยใช้เอนไซม์ Furin หรือเอนไซม์ Protease อื่น ๆ ได้

213732

โดยสรุปการศึกษาวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นโดยมุ่งเน้นศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก ทั้งในส่วนของ Non-coding region ซึ่งเป็นส่วนที่มีผลถึงความสามารถในการก่อโรคของเชื้อไวรัสด้วย และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในส่วนของ Coding region ของ ยีนต่างๆ โดยศึกษาในเชิงของวิวัฒนาการและการกลายพันธุ์ที่อาจส่งผลต่อความรุนแรงของเชื้อไวรัส นอกจากนี้ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ HA ยีน ส่งผลให้นำไปสู่ การศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างและสมบัติไดนามิกส์บริเวณ cleavage site ของ hemagglutinin (HA) สายพันธ์ต่าง ๆ ทั้งสี่แบบที่พบในประเทศไทย เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์และอธิบายการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับโมเลกุลโดยวิธี พลวัตเชิงโมเลกุล (molecular dynamics, MD) ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะทำให้เข้าใจถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคชนิดรุนแรงของเชื้อ influenza A virus

213732

Avian influenza A virus have an ability to infect various species of avian and mammalian hosts. The outbreaks of the virus in each year cause major economic lost and public health problems worldwide. The objective of this research is to investigate the viral factors involving in the high pathogenesis of influenza A virus. The research contents can be divided into 4 major parts as the following.

The first part is about the development of a practical method for determination of nucleotide sequences within the non-coding regions of influenza A virus. The developed method was improved to overcome several limitations in the previous protocols, more efficient and practical for sequence determination. According to the non-coding sequences comparison between human influenza and avian influenza, a nucleotide variation was observed within the fourth position of 3' non-coding region on PB2 and PA genes (avian influenza contain base G whereas human influenza contains base A). This variation may influence the higher rate of viral replication in avian influenza and thus more highly pathogenesis than human influenza. Moreover, other variations of the 3' non-coding region were found within PB2 (position 17th), PA (position 20th), NP (position 29th), NA (position 17th), M (position 18th) and NS (position 16th and 21st). Furthermore, the 5' non-coding region were also contain a few variations in PB2 (position 25th and 26th) and PB1 (position 24th). However, it is still unclear about the influence of these nucleotide polymorphisms which should be further investigated.

The second part involves the characterization and monitoring the mutation and polymorphism within the coding regions of 8 segmented genes of the H5N1 influenza A viruses isolated in Thailand during 2004-2008. Sequences analysis revealed that the current virus strains still have characteristics of receptor binding and multiple basic amino acids insertion within the cleavage site of hemagglutinin (HA) similar to those found in the previous strains (isolated in 2004). Moreover, the 20 amino acids deletion within the stalk region (position 49^{th}-68^{th}) of neuraminidase (NA) gene was still observed. All of the viral strains analyzed contained histidine (H) in the position 274^{th} of the neuraminidase, implying that they were sensitive to oseltamivir treatment. In addition, the analysis within the position 627^{th} of the Polymerase basic 2 (PB2) for the amino acid change from glutamic acid (E) to lysine (K) which responsible for higher viral replication rate and more virulence in mammalian hosts. The results revealed that changing from glutamic acid to lysine was observed in some strains of viruses isolated in 2005 but there was still no report of cross-infection from avian to mammalian species. From the evolution study, the viruses isolated since 2004 can be classified into 3 subgroups of clade 1. The reassortment of viral segment RNA can be occurred between viruses from different subgroups that epidemic in the same area. The evolution of H5N1 influenza in Thailand provided important information for outbreak prevention, viral diagnosis and treatment in the future.

The next part is the virulence determination and prediction by analysis of decomposition energy (DC) and interaction between amino acid residues within the cleavage site of hemagglutinin and binding pocket of furin enzyme. The result showed that FR-H5Sq1 (RERRRKKR) in the position S1, S4 and S6 yielded strong binding free energy with furin. The FR-H5Sq2 (RERKRKKR) also had strong association of the position S1, S4 and S6 with furin. However, the FR-H5Sq2 contained lysine (shorter side chain) instead of arginine in S5, thus the binding free energy was a little weaker than those found in FR-H5Sq1. Furthermore, the FR-H5Sq3 (REKRRKKR) contained lysine in S6 residue instead of argnine, leading to its interaction with furin was weaker than FR-H5Sq1 but comparable to those found in FR-H5Sq2. The FR-H5Sq4 (RERRR-KR) yielded the lowest binding free energy with furin due to 1 amino acid (lysine) deletion within the S3 residue resulting in lower fitness to the binding pocket of furin. The results were concordant with the calculation of binding free energies and atomic distances involved with the cleavability of hemagglutinin by furin enzyme.

The final part involves experimental characterization of cleavability within the cleavage site of hemagglutinin by furin or trypsin enzyme. The result revealed that the expression vectors (pPICZαA) containing 4 patterns of cleavage site within the hemagglutinin gene can be constructed and introduced into *Pichia pastoris*. However, the expression of recombinant hemagglutinin protein couldn't be detected in both intracellular and extracellular forms. This implied that the *Pichia pastoris* expression system may not suitable for this protein. Therefore, there was no expressed hemagglutinin available for further investigation.

In conclusion, this research project focused on the analysis of genetic variation within the non-coding and coding regions in terms of evolution and mutation which may involve in the pathogenesis of the virus. In addition, the 4 patterns of the cleavage site within the hemagglutinin (HA) found in different viral strains in Thailand were also characterized in terms of structural chemistry and molecular dynamics. Therefore, the results obtained from this study provide more information about the factors involving in the pathogenesis of influenza A virus.