ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาและเซลล์เทคโนโลยี

ความสำคัญและที่มา

เชื้อไวรัสอุบัติใหม่ก่อให้เกิดปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขและสุขภาพสัตว์มาเป็นเวลานาน ในช่วง 2-

ไวรัสในตระกูล orthomyxovirus (ไวรัสไข้หวัดใหญ่-หวัดนก), paramyxovirus (ไวรัสโรคนิวคาสเซิล), coronavirus (ไวรัสที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียรุนแรงในลูกสุกร), rhabdovirus (ไวรัสวีเอสวี), and arterivirus (ไวรัสพีอาร์อาร์เอส) โดยเครื่องมือสำคัญที่จะใช้ศึกษาไวรัสเหล่านี้คือเทคโนโลยีการสร้างอนุภาคไวรัสในหลอดทดลองหรือ รีเวอร์ส เจเนติกส์ ซึ่งเทคโนโลยีดังกล่าวนอกจากจะช่วยให้เราเข้าใจชีววิทยาของไวรัสในด้านต่างดีขึ้น เช่น กลไกการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์เจ้าบ้าน และ ปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสกับเซลล์เจ้าบ้านแล้ว ยังเป็นเทคโนโลยีฐานที่สามารถนำมาใช้สร้างไวรัสต้นแบบสำหรับพัฒนาเป็นวัคซีน หรือ กระบวนการค้นหายาต้านไวรัสนั้นๆต่อไป

สถานภาพปัจจุบัน

1) การพัฒนาระบบรีเวอร์ส เจเนติกส์สำหรับสร้างอนุภาคไวรัสชนิดต่างๆในหลอดทดลอง

นักวิจัยของห้องปฏิบัติการ AVCT สามารถสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีการแสดงออกของยีโนมของไวรัส (infectious clone) ชนิดต่างๆได้และสามารถนำไปใช้สร้างอนุภาคไวรัสในหลอดทดลองได้สำเร็จ โดยไวรัสที่สร้างขึ้นบางส่วนได้ถูกนำไปทดสอบประสิทธิภาพของการใช้เป็นวัคซีนในสัตว์ปีก ปัจจุบันนักวิจัยของห้องปฏิบัติการกำลังทำการพัฒนา infectious clone ของไวรัสตระกูล อาเทอรี่ไวรัส และ โคโลน่าไวรัสซึ่งเป็นไวรัสที่มีขนาดยีโนมใหญ่ที่สุด ซึ่งถ้าสำเร็จจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่องานวิจัยเกี่ยวกับไวรัสก่อโรคในสุกรในประเทศไทย

2) การศึกษาเพื่อเข้าใจกลไกการก่อโรคของไวรัส

การศึกษาเพื่อเข้าใจกลไกการก่อเกิดโรคของไวรัสเป็นหนึ่งในจุดมุ่งหมายสำคัญของงานวิจัยในห้องปฏิบัติการ โดยคำถามที่นักวิจัยมีความสนใจในขณะนี้คือ กระบวนการในระดับโมเลกุลที่ไวรัสใช้ในการจำลองตัวเอง ปฏิสัมพันธุ์ระหว่างไวรัสกับเซลล์เจ้าบ้านโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่ของระบบภูมิคุ้มกันชนิด อิมมูนธรรมชาติของโฮสต์ที่มีต่อไวรัส นอกจากนี้เรายังนำองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาสร้างวัคซีนต้านไวรัส และ หาเป้าหมายสำหรับพัฒนายาต้านไวรัสตัวใหม่

3) การพัฒนาสร้างเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อใช้ในการเลี้ยงไวรัสและผลิตโปรตีน

นักวิจัยของห้องปฏิบัติการ AVCT ได้ใช้เทคโนโลยีของ Retrovirus ในการสร้างเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่างๆอย่างถาวร โดยเซลล์เหล่านั้นได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ต่างๆหลายด้าน เช่น เซลล์ที่ถูกเพิ่มการแสดงออกของ receptor ของไวรัสได้นำมาใช้ประโยชน์ในการแยกเชื้อหรือ เลี้ยงไวรัสให้มีปริมาณสูงขึ้น หรือ นำมาใช้สร้างไวรัสต้นแบบที่มีคุณสมบัติโตดีในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเซลล์ให้มีการสร้างโปรตีนของไวรัสสำหรับไปใช้ประโยชน์ต่อไป

งานวิจัยที่ประสบความสำเร็จ ปี 2555-2556

การพัฒนาวัคซีนสัตว์ปีกป้องกันโรคไวรัสนิวคาสเซิลสายพันธุ์รุนแรงโดยเทคโนโลยีรีเวอร์สเจเนติกส์ของไวรัสวีเอสวี

การระบาดของโรคนิวคาสเซิลสายพันธุ์รุนแรง (NDV VII) ก่อให้เกิดผลเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงสัตว์ปีกที่เพิ่มขึ้น และ การใช้วัคซีนในสัตว์ปีกอย่างแพร่หลายทำให้ไวรัสมีการกลายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ซึ่งพบได้ว่า การระบาดของ NDV VII พบได้ในสัตว์ปีกถึงแม้ว่าสัตว์ปีกเหล่านั้นได้รับวัคซีนแบบดั้งเดิมชนิด LaSota อยู่ตลอดเวลาซึ่งบ่งชี้ว่าวัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันใช้ไม่ได้ผล นักวิจัยของห้องปฏิบัติการ AVCT ได้รับการสนับสุนทุนวิจัยจากเครือเจริญโภคภัณฑ์โดยมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวัคซีนต้าน NDV VII ชนิดใหม่สำหรับใช้ในฟาร์มไก่ ด้วยเทคโนโลยีรีเวอร์สเจเนติกส์นักวิจัยได้สร้างไวรัสวีเอสวีที่มีการแสดงออกของโปรตีน F หรือ HN ของ NDV VII บนอนุภาคได้สำเร็จ โดยไวรัสที่สร้างขึ้นสามารถเจริญเติบโตในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ดี และ การแสดงออกของโปรตีน F และ HN มีความเสถียรเมื่อไวรัสถูกเลี้ยงไปหลายๆรอบ นอกจากนี้ผลการทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในสัตว์ทดลองพบว่า เมื่อนำไวรัสดังกล่าวไปฉีดไก่ทดลอง ไม่พบอาการป่วยตายแสดงว่าวัคซีนมีความปลอดภัยในสัตว์ปีก และที่สำคัญไก่ทดลองเหล่านั้นมีภูมิคุ้มกันต้านการติดเชื้อ NDV VII ดีกว่าวัคซีนที่ใช้อยู่ในปัจจุบันอย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และ B

การศึกษาเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A และ B มีมากว่า 60 ปีแล้ว โดยผลการศึกษาจากการนำไวรัสทั้งสองชนิดมาติดเชื้อร่วมในเซลล์เจ้าบ้านนอกจากจะบ่งชี้ว่า ไวรัสไม่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนทางพันธุกรรมกัน แต่ยังแสดงว่าไวรัสชนิด B ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสชนิด A ได้อย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้ว่าจะมีข้อมูลสนับสนุนว่าไวรัสชนิดB จะขัดขวางการสร้างmRNA ของไวรัสชนิดA แต่ไม่มีข้อมูลสนับสนุนในปัจจุบันเกี่ยวกับโปรตีนชนิดใดของไวรัสชนิดบีที่ส่งผลดังกล่าวเราจึงมีแนวคิดว่าโปรตีนที่มีความจำพาะเจาะจงต่อไวรัสชนิดB น่าจะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลิเมอเรสของไวรัสชนิดเอในระหว่างการสร้าง mRNA ของไวรัสชนิด A จากการศึกษาดูคุณสมบัติของโปรตีนต่างๆของไวรัสชนิดB พบว่าโปรตีนนิวคลีโอโปรตีนสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสชนิด A ได้อย่างมีนัยสำคัญ งานวิจัยดังกล่าวได้ตีพิมพ์ภายใต้ชื่อ Wanitchang, A., Narkpuk, J., Jaru-ampornpan, P., Jengarn, J., and Jongkaewwattana, A. (2012). Inhibition of influenza A virus replication by influenza B virus nucleoprotein: an insight into interference between influenza A and B viruses ในวารสาร *Virology* 432(1), 194-203.

การศึกษากลไกการเข้าสู่นิวเคลียสของนิวคลีโอโปรตีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด B

ถึงแม้ว่าจะมีงานวิจัยแสดงชัดเจนว่านิวคลีโอโปรตีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ชนิด A จะเคลื่อนตัวเข้าสู่นิวเคลียสโดยอาศัยกลุ่มของกรดอะมิโนบนตัวโปรตีนชื่อว่า nuclear localization signal (NLS) กลไกดังกล่าวในนิวคลีโอโปรตีนของไวรัสชนิดบี (BNP) ยังไม่มีผู้ศึกษาเท่าที่ควร ในงานวิจัยชิ้นนี้เราแสดงว่าโปรตีนเรืองแสงที่มีการเชื่อมกับส่วน N terminus ของนิวคลีโอโปรตีนของBNP (N70-GFP) จะมีการแสดงออกในนิวเคลียส และ เราสามารถแสดงให้เห็นว่า กลุ่มของกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 44-47 ทำหน้าที่เป็น NLS ของ BNP นอกจากนี้ เราได้แสดงว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 3-15 ของ BNP ยังมีความสำคัญต่อการเข้าสู่นิวเคลียสถึงแม้ว่าจะไม่มีคุณสมบัติของการเป็น NLS ก็ตาม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ตำแหน่งดังกล่าวอาจทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ส่วนของ N terminus ของ BNP จะถูกตัดออกโดยเอนไซม์โปรติเอสในเซลล์ ดังนั้นเราจึงสรุปผลงานวิจัยว่า ส่วนของ N-terminus ของ BNP มีความจำเป็นต่อการเข้าสู่นิวเคลียสโดยใช้กระบวนการของ NLS และ ป้องกันการทำลายโปรตีนโดยโปรติเอสได้ กล่าวโดยสรุปคืองานวิจัยชิ้นนี้สร้างองค์ความรู้สำคัญสองประการ หนึ่งคือการแสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง N terminal ของ BNP มีความจำเป็นต่อ

Virology and Cell Technology Laboratory

Overview

Emerging viruses have posed a long-standing threat to public health and agriculture. In recent years, catastrophic outbreaks of numerous viral diseases have been reported in Thai livestock, particularly in swine and poultry populations. Research in the virology and cell technology laboratory (AVCT) involves studying the pathogenesis of major RNA viruses known to cause major diseases in chickens and pigs including orthomyxovirus (influenza viruses), paramyxovirus (Newcastle Disease virus), coronavirus (Porcine epidemic diarrhea virus), rhabdovirus (Vesicular Stomatitis virus), and arterivirus (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus). Of particular interest to researchers at AVCT is development of reverse genetics system of each type of virus to recover viral progeny *in vitro*. Not only does the technology enable us to better understand various aspects of viral biology including, but not limited to, its replication as well as interaction with the host, but it also serves as a powerful platform for generating vaccines and means to screen for novel antiviral agents.

Current Status

1) Development of reverse genetics system of key pathogenic viruses

A number of infectious clones of RNA viruses (Influenza, Newcastle Disease, and vesicular stomatitis viruses) have been successfully used to rescue infectious viruses in the laboratory. A number of recombinant viruses are being tested for their efficacy as agriculture vaccines in the field. Currently, the attempt has been made to construct infectious clones of coronavirus and arterivirus.

2) Understanding molecular basis of viral pathogenesis

One of the long-standing research goals at AVCT is to understand the pathogenic mechanisms of various RNA viruses. Our current work focuses on questions pertaining to the molecular basis of virus replication, virus-host interaction with special emphasis on host's innate responses to viral infection. We also work towards applying insights learned from basic research to the development of novel vaccines and strategies to identify key antiviral proteins.

3) Engineering mammalian cells to support viral isolation and protein production

Using a retrovirus-based system, we have engineered various mammalian cell lines to stably expressing proteins of interest. The modified cells are further used for a number of downstream applications including to aid in isolation and propagation of viruses that cannot be propagated using traditional cells, to optimize the yield of seed vaccines, and to express high-valued proteins.

Achievement 2012-2013

Development of recombinant vesicular stomatitis virus (VSV)-expressing key antigens of highly virulent Newcastle Disease Virus as novel poultry vaccines

Outbreaks of highly virulent Newcastle disease (ND) have resulted in severe economic losses. Increasing poultry production and more selective immune pressure

from hosts could enhance the evolutionary process of NDV. Outbreaks of highly virulent have continuously been reported in poultry vaccinated with the lentogenic LaSota vaccines indicating that the currently used vaccines are not effective. In collaboration with CPF group, we have developed a new chicken vaccine based on the VSV system. Through reverse genetics system, we successfully constructed recombinant VSV expressing fusion (F) and hemagglutinin-neuraminidase (HN) proteins of highly virulent NDV. Not only do the viruses grow well in cell cultures, their genetic stability is also well tolerated upon several passages. Most importantly, preliminary vaccines testing in chickens revealed that the vaccines are not only innocuous to chickens, but also able to elicit protective immune response against virulent NDV.

Elucidating the mechanism underlying the interference between influenza A and B viruses

The intrinsic interference between influenza A and B viruses (FluA and FluB) was first described almost 60 years ago. Results from a number of studies using various strains of viruses demonstrated that co-infection of mammalian or avian cells with comparable titers not only failed to generate intertypic reassortants, but also showed significant suppression of FluA growth, thereby indicating a competitive interference between them. Although FluB-mediated inhibition of FluA growth has been shown to be at the level of viral transcription, it is not known whether FluB proteins are involved in this inhibitory effect. We thus speculate that, upon co-infection of FluA and FluB, particular FluB proteins might be able to block polymerase activity of FluA, leading to suppression of FluA replication. In view of this hypothesis, we investigated whether there exist FluB proteins that can interfere with the replication of FluA. In a series of experiments, we discovered that FluB nucleoprotein plays a key role in FluB-mediated inhibition of FluA replication in co-infected cells.

Reference:

Wanitchang, A., Narkpuk, J., Jaru-ampornpan, P., Jengarn, J., and Jongkaewwattana, A. (2012). Inhibition of influenza A virus replication by influenza B virus nucleoprotein: an insight into interference between influenza A and B viruses. Virology 432(1), 194-203.

Identification of the mechanism by which BNP is imported into the nucleus

Although it is well known that nucleoprotein of Flu A enters the nucleus during virus replication via well-defined nuclear localization signals (NLS), the mechanism underlying the nuclear import of that of FluB (BNP) has been poorly defined. In this study, we showed that the fusion protein bearing the BNP N terminus fused with GFP (N70-GFP) is exclusively nuclear, and identified a highly conserved KRXR motif spanning residues 44-47 as a putative NLS. In addition, we demonstrated that residues 3-15 of BNP, though not an NLS, are also crucial for nuclear import. Results from mutational analyses of N70-GFP and the full-length BNP suggest that this region may be required for protection of the N terminus from proteolytic cleavage. We thus propose that the N-terminal region of BNP contains the NLS and cleavage-protection motif, which together drive its nuclear localization. In summary, this study makes two contributions to our knowledge of FluB replication. The first is the demonstration that the N-terminal region of BNP plays an essential

role in BNP nuclear import. The second contribution addresses a new role of a so-called cleavage-protection domain encompassing the first 15 residues of BNP, which is remarkably distinct from the mechanism mediated by the unconventional NLS of ANP proposed previously. The association between BNP cleavage and the inability to access the nucleus may foster future studies aimed at identifying new antiviral targets.

The work has been published in Virology entitled "Nuclear import of influenza B virus nucleoprotein: Involvement of an N-terminal nuclear localization signal and a cleavage-protection motif" by Asawin Wanitchang, Jaraspim Narkpuk and Anan Jongkaewwattana (DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.025)