

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BRG5780006

ชื่อโครงการ : การศึกษากลไกการนำเข้าและการเคลื่อนที่ของไวรัสหัวเหลืองในกุ้ง

(Dissecting the cell entry and trafficking pathways of yellow head virus infection in shrimp)

หัวหน้าโครงการ : รศ. ดร. เฉลิมพร องค์กรโสภณ

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: chalernporn.ong@mahidol.ac.th.

ระยะเวลาโครงการ : 31 กรกฎาคม 2557 ถึง 30 กรกฎาคม 2560

ไวรัสหัวเหลืองเป็นเชื้อก่อโรครุนแรงในกุ้งกุลาดำ ทำให้กุ้งตายอย่างรุนแรงทั้งบ่อได้ภายใน 2-3 วันหลังติดเชื้อ เพื่อที่จะเข้าใจกลไกในระดับโมเลกุลของการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง งานวิจัยนี้ จึงได้ทำการโคลนโปรตีนหลักที่เกี่ยวข้องกับการเข้าเซลล์และการเคลื่อนที่ภายในเซลล์ของไวรัสหัวเหลืองและศึกษาการทำงานของโปรตีนเหล่านั้น โดยใช้เทคโนโลยีอาร์เอ็นเอไอ เพื่อที่จะศึกษากระบวนการเข้าเซลล์ของไวรัสหัวเหลือง จึงได้ทำการวิจัยโดยศึกษาผลของยาที่ยับยั้งการเข้าเซลล์ เช่น คลอไพราซีน อะมิโลราฟ และ เมททิวเบตาไซโคลเดกซ์ทริน ในกุ้งที่ติดไวรัส จากการศึกษพบว่า การฉีดคลอไพราซีน ซึ่งทำหน้าที่ในการยับยั้งกระบวนการเอนโดไซโตซิสแบบคลาทรินก่อนการติดเชื้อไวรัสในกุ้ง พบว่าระดับไวรัสหัวเหลืองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงได้ทำการโคลนและศึกษาโปรตีนหลักของกระบวนการนี้ เช่น คลาทรินเฮฟวีเชน (PmCHC) พบว่าไวรัสหัวเหลือง ใช้โปรตีน PmCHC ในกระบวนการเอนโดไซโตซิสแบบคลาทรินในการเข้าเซลล์กุ้ง เมื่อไวรัสหัวเหลืองเข้าเซลล์แล้ว จะใช้โปรตีน Rab ชนิดต่าง ๆ และโปรตีนที่จับกับโปรตีน Rab ในการเป็นตัวควบคุมหลักในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการเอนโดไซโตซิส จากการศึกษพบว่า PmRab5 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมเอนโดโซมส่วนต้น และยังจับกับโปรตีนเออี-เอนโดโซมอล-แอนติเจน-1 (PmEEA1) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของไวรัสหัวเหลืองไปยังเอนโดโซมส่วนต้น แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนแรกของการติดเชื้อไวรัส เมื่อไวรัสจำลองตัวเองและสร้างโปรตีนชนิดต่าง ๆ เกิดการรวมตัวกันเป็นไวรัส (virion) และขนส่งไปยังพลาสมาเมมเบรนเพื่อออกนอกเซลล์ ซึ่งกระบวนการนี้ควบคุมโดย PmRab11 องค์ความรู้ที่ได้นี้ทำให้เข้าใจกลไกในระดับโมเลกุลที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง และอาจส่งผลให้ได้ยีนเป้าหมายใหม่ในการเป็นสารต้านไวรัส

คำหลัก: ไวรัสหัวเหลือง; เอนโดไซโตซิส; อาร์เอ็นเอสายคู่; อาร์เอ็นเอไอ; กุ้งกุลาดำ; เอ็กโซไซโตซิส; รีไซคลิง เอนโดโซม

Abstract

Project Code: BRG5780006

Project Title: Dissecting the cell entry and trafficking pathways of yellow head virus infection in shrimp

Project Head: Chalernporn Ongvarrasopone, Ph.D., Assoc. Prof.

Institute of Molecular Biosciences,

Mahidol University (Salaya Campus), Nakhon Pathom, Thailand

E-mail Address: chalernporn.ong@mahidol.ac.th.

Project Period: 31 July 2557 – 30 July 2560

Yellow head virus (YHV) is a virulent pathogen in black tiger shrimp. It causes high mortality within a few days after infection. In order to understand the molecular mechanism of YHV infection, molecular cloning of the major protein components involved in YHV entry and intracellular trafficking of YHV were performed and their functions were characterized by RNA interference technology. To dissect the YHV internalization process, effects of drug inhibitors; chlorpromazine (CPZ), amiloride and methyl- β -cyclodextrin were used. Only the YHV-infected shrimp pretreated with CPZ (which inhibited the clathrin mediated endocytosis) showed a significant reduction of YHV levels. Characterization of the major component of clathrin, *Penaeus monodon* clathrin heavy chain (*PmCHC*) demonstrated that YHV utilized *PmCHC* via clathrin dependent endocytosis as a route of entry into shrimp cells. Once YHV enters into shrimp cells, Rab proteins and their interacting proteins which are the key regulators of the endocytosis pathway were characterized. These studies indicated that *PmRab5*, an early endosomal marker and its interacting protein, early endosome antigen 1 (*PmEEA1*) were involved in YHV early endosomal trafficking, suggesting their roles in the early step of infection. In addition, the transportation of YHV to deliver the assembling virions to plasma membrane requires *PmRab11*. These knowledges provide insights of the key molecular mechanism underlying YHV infection and possibly uncover novel targets for antiviral agents.

Keyword: yellow head virus; endocytosis; double stranded RNA; RNAi; Black tiger shrimp; exocytosis; recycling endosome