รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “Study of *in vivo* gene expression profiles for identification of determinant(s) involved in neuropathogenicity of enterovirus-71 infection”

โดย อาจารย์ ดร.จีระพงษ์ ทะนงศักดิ์ศรีกุล

พฤษภาคม 2559

สัญญาเลขที่ MRG5680105

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “Study of *in vivo* gene expression profiles for identification of determinant(s) involved in neuropathogenicity of enterovirus-71 infection”

อาจารย์ ดร.จีระพงษ์ ทะนงศักดิ์ศรีกุล
บัณฑิตศึกษา ชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

เอกสารปกปิด ห้ามเผยแพร่ก่อนได้รับอนุญาต

สัญญาเลขที่ MRG5680105

โครงการ: Study of *in vivo* gene expression profiles for identification of determinant(s) involved in neuropathogenicity of enterovirus-71 infection

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ Study of *in vivo* gene expression profiles for identification of determinant(s) involved in neuropathogenicity of enterovirus-71 infection

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี (พ.ศ. 2556-2558)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : อาจารย์ ดร. จีระพงษ์ ทะนงศักดิ์ศรีกุล

บัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวชศาตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

E mail address: jeeraphong.t@allied.tu.ac.th และ gskmu@hotmail.com

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา : ศ.ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา และ ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน 2556 ถึงวันที่ 31 พฤษภาคม 2559

บทคัดย่อ

Enterovirus 71 เป็นไวรัสที่มักติดเชื้อในเซลล์ประสาท เป็นสาเหตุของโรคมือเท้าปาก (HFMD) ที่มีภาวะแทรกซ้อนของระบบประสาทส่วนกลาง เชื้อ EV71 เป็นเชื้อสาเหตุของการแพร่ระบาดของโรคมือเท้าปากในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิกรวมทั้งประเทศไทยด้วย เป็นเพราะยังขาดสัตว์ทดลองขนาดเล็กที่เหมาะสมไว้ศึกษาโรคมือเท้า ส่งผลให้ความคืบหน้าในทางชีววิทยาของการติดเชื้อ EV71 จึงยังไม่ก้าวหน้ามากนัก เป็นผลให้มีความล่าช้าในการพัฒนายารักษาและการฉีดวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในปัจจุบัน ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน (transcriptome) ที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อสมองของหนูทดลองอันเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อการติดเชื้อ EV71 เพื่อทำความเข้าใจกลไกการเกิดโรค การทดลองเบื้องตอนคือการสร้างเชื้อ EV71 สายพันธุ์ที่ก่อโรคในหนูทดลองโดยการฉีดเชื้อ EV71 เข้าไปในร่างกายของหนูทดลองเพื่อให้เชื้อไวรัสคนปรับตัวเข้ากับสมองของหนูแล้วเพิ่มจำนวน จากนั้นสกัดไวรัสออกมาจากสมองแล้วนำฉีดกลับไปให้หนูทดลองอีกตัวถัดไป ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ (serially brain passage) จนกระทั่งได้สายพันธุ์ที่ก่อโรคในหนู แต่ก็พบว่าเชื้อยังคงไม่สามารถปรับตัวเข้ากับหนูได้ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยปรับแผนการทดลองโดยเปลี่ยนมาใช้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงของมนุษย์ซึ่งไวต่อการติดเชื้อ EV71 สำหรับการศึกษา transcriptome โดยวิธี RNA next-generation sequencing (RNA-Seq) พบว่าในบรรดาชนิดของเซลล์ที่เลือกใช้ เซลล์ SK-M-NC แสดงให้เห็นถึงรูปแบบปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสและเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นเอกลักษณ์กล่าวคือสามารถยับยั้งการแบ่งจำนวนของเชื้อ EV71 ได้ และผล RNA-Seq แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงออกของยีนในระดับที่แตกต่างกันระหว่างเซลล์ SK-N-MC ที่ติดเชื้อ EV71 กับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ โดยพบว่าชุดของยีนที่มีระดับการแสดงออกที่สูงขึ้นมีจำนวน 4,533 ยีน และที่มีระดับการแสดงออกลดลงมีจำนวน 4,916 ยีน ในจำนวนนี้มี 2,028 ยีนที่เป็นยีนใหม่ยังไม่เคยถูกกำหนดชื่อและหน้าที่มาก่อน รายการชื่อของยีนเหล่านี้ได้นำไปวิเคราะห์เพื่อจัดหมวดหมู่และหาความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกันในกระบวนการต่างๆ ทางชีววิทยา ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้อาจเปิดเผยชีววิทยาของการติดเชื้อ EV71 ในเซลล์ประสาทซึ่งต้องการการยืนยันด้วยผลการทดลองต่อไป ความรู้ที่ได้รับจากงานวิจัยชิ้นนี้ได้จุดประกายการศึกษาวิจัยกลไกในก่อพยาธิสภาพต่อเซลล์ประสาทระดับโมเลกุลของเชื้อ EV71 ต่อไปในอนาคต ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาต่อยอดวิธีการรักษาและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพรวมทั้งนำไปสู่การค้นพบตัวบ่งชี้ชีวภาพสำหรับการวินิจฉัยหรือการติดตามโรคดังกล่าวได้

คำสำคัญ: ไวรัสเอนเทอร์โร ๗๑ โรคมือเท้าปาก การแสดงออกยีนภายในร่างกาย ภาวะแทรกซ้อนทางระบบประสาท ทรานสคริปโตมิคส์

Abstract

Enterovirus 71 is a neurotropic virus that causing hand, foot, and mouth disease (HFMD) with occasional complications of central nervous system. The EV71 have been responsible for several HFMD outbreaks in Asia-Pacific region including Thailand. Because lacking of a suitable small animal model, the progress in infection biology of EV71 is still limited. This leads to dampening of the development of effective drugs and vaccines. Therefore, this research project has been aimed to study gene expression profile; transcriptome, in brain tissue of mouse model in response to EV71 infection to gain insight the pathogenesis mechanism. Preliminary, there were several attempts to generate mouse-adapted EV71 strain by serially mouse brain passage but they were found to fail. However; instead of the mouse model, it had been shifted to employ human neuronal cell lines which susceptible to EV71 infection for studying transcriptome using RNA next-generation sequencing (RNA-Seq). Among the selected cell lines, SK-M-NC showed a distinct virus-host interaction by suppressing EV71 replication. The RNA-Seq results demonstrated differentially expressed genes between EV71-infected SK-N-MC transcriptome and non-infected SK-N-MC transcriptome. There were up-expressed 4,533 genes/transcripts and down-expressed 4,916 genes/transcripts. Among these, 2,028 transcripts were novel. The gene lists were subjected to gene ontology analysis in order to categorize and correlate them into the involving biological pathways. The data obtained from this study potentially reveal the infection biology of EV71 in a neuronal cell which needs experimental validation. The gained knowledge shed light on the study of molecular mechanism of EV71 neuropathogenesis which leading to the development of effective treatments and vaccine as well as the discovery of a biomarker for diagnosis or monitoring.

Keywords: enterovirus: 71 (EV71), hand, foot, and mouth disease (HFMD), in vivo gene expression, neurological complications, transcriptomics

Executive summary

Enterovirus 71 เป็นเชื้อไวรัสก่อโรคมือเท้าปากในมนุษย์ ที่มีอาการแทรกซ้อนทางระบบประสาทส่วนกลาง ที่เป็นปัญหาสาธารณสุขสำคัญในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก ในปัจจุบันยังไม่มียารักษาโรคและวัคซีนสำหรับโรคนี้ เนื่องจากยังขาดองค์ความรู้เกี่ยวกับพยาธิกำเนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตอบสนองของเซลล์ประสาทต่อการติดเชื้อ EV71 ดังนั้นการศึกษาวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อหายีนและ/หรือโปรตีนที่แสดงออกในสมองหนูทดลองซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดพยาธิกำเนิดของภาวะแทรกซ้อนของเนื้อเยื้อระบบประสาทส่วนกลางอันเป็นผลมาจากการติดเชื้อไวรัสเอนเทอโร 71 โดยการฉีดเชื้อ EV71 เข้าไปในร่างกายของหนูทดลองเพื่อให้เชื้อไวรัสคนปรับตัวเข้ากับสมองของหนูแล้วเพิ่มจำนวน จากนั้นสกัดไวรัสออกมาจากสมองแล้วนำฉีดกลับไปให้หนูทดลองอีกตัวถัดไป ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ (serially brain passage) จนกระทั่งได้สายพันธุ์ที่ก่อโรคในหนู (mouse-adapted virulent strain) จากนั้นจะได้นำเชื้อมาศึกษาภาพรวมของการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA (transcriptome) อันเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อการติดเชื้อ EV71 ที่เกิดขึ้นในเซลล์ประสาทหนู แต่ผู้วิจัยไม่สามารถเหนี่ยวนำ EV71 ให้เป็น mouse-adapted virulent strain ได้ จึงได้ตัดสินใจเปลี่ยนมาศึกษา transcriptome ในเซลล์ประสาทมนุษย์ชนิดเพาะเลี้ยง (human neuronal cell lines) แทน อีกทั้งยังได้ใช้เทคโนโลยี RNA next-generation sequencing (RNA-Seq) ซึ่งมีความละเอียดสูงสำหรับถอดรหัส mRNA และตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ EV71 ที่เกิดขึ้นในเซลล์ประสาท ผู้วิจัยพบว่าในเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y neuroblastoma เชื้อไวรัส EV71 แบ่งตัวได้ดีและก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์ประสาทดังกล่าว ในขณะที่การติดเชื้อในเซลล์ประสาทชนิด SK-N-MC ให้ผลตรงกันข้ามคือสามารถตรวจพบ EV71 RNA ใน SK-N-MC neuroepithelioma แต่ไม่พบ replication และไม่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อเซลล์ ผลการวิเคราะห์ด้วย RNA-Seq พบว่า transcriptome ของเซลล์ SK-N-MC ที่ติดเชื้อEV71 มีความแตกต่างจาก transcriptome ของเซลล์ SK-N-MC ปรกติที่ไม่ติดเชื้อ โดยรายชื่อของยีนเหล่านี้มีทั้งที่ระดับแสดงออกสูงขึ้นและต่ำลงอันเป็นผลมาจากการติดเชื้อ EV71 รายชื่อยีนเหล่านี้ได้ถูกวิเคราะห์หน้าที่และจำแนกตามบทบาทในกระบวนการทางชีววิทยาต่างๆ ในเซลล์ และรูปแบบของระดับการแสดงออกของยีน

คลังข้อมูลของยีนที่ได้จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้อาจมีความเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของภาวะแทรกซ้อนของเนื้อเยื้อระบบประสาทส่วนกลางอันเป็นผลมาจากการติดเชื้อ EV71 ซึ่งจะนำไปสู่การเริ่มต้นการศึกษากลไกการเกิดก่อให้เกิดพยาธิกำเนิดของภาวะแทรกซ้อนของเนื้อเยื้อระบบประสาทส่วนกลางต่อไป ทำให้สามารถสร้างองค์ความรู้ใหม่ๆ ที่เกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อไวรัส EV71 ได้ ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัยนี้นอกเหนือไปจากการเผยแพร่ความรู้ในรูปแบบต่างๆ แล้ว ยังสามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดเพื่อการพยากรณ์โรค และการวินิจฉัยอาการแทรกซ้อนทางสมองจากการติดเชื้อก่อโรค หรือหายาหรือรูปแบบการรักษาอื่นรวมถึงวัคซีนได้ในอนาคต

เนื้อหางานวิจัย

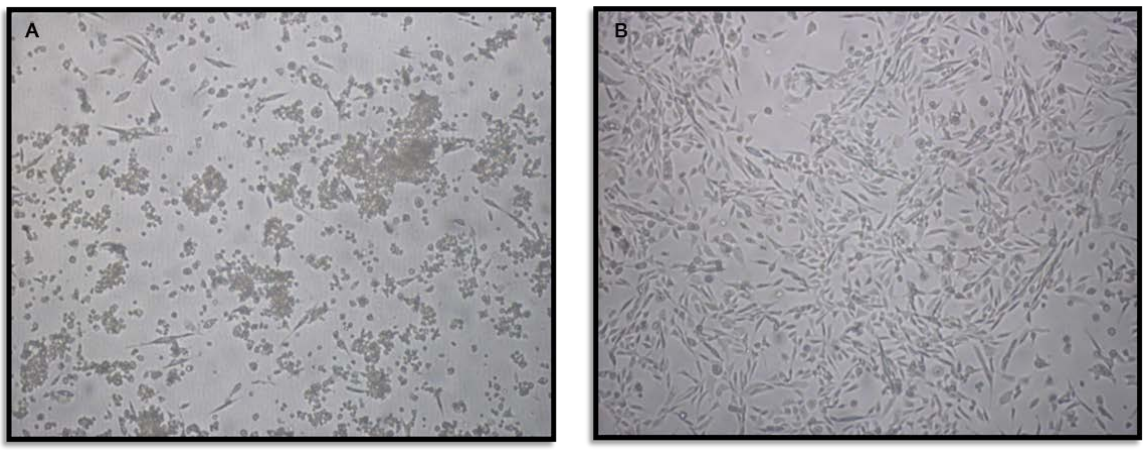
1. จุดประสงค์หลัก

เพื่อหายีนและหรือโปรตีนที่แสดงออกในสมองหนูทดลอง ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดพยาธิกำเนิดของภาวะแทรกซ้อนของเนื้อเยื่อระบบประสาทส่วนกลางอันเป็นผลมาจากการติดเชื้อไวรัสเอนเทอโร 71

2. วิธีทดลอง ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

2.1 การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อ EV71

ทำการสั่งซื้อเชื้อ EV71 genotype A สายพันธุ์ BrCr หมายเลข VR-1775 มาจาก American Type Culture Collection (ATCC) และได้ขอเชื้อ EV71 genotype B5 ซึ่งได้ความอนุเคราะห์จาก ศ.นพ.ยง ภู่วรรวรรณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการเพาะเลี้ยง EV71 ทั้งสอง genotypes ในเซลล์ human rhabdomyosarcoma (RD) หมายเลข ATCC/CCL-136 ภายใต้ standard operating protocol ตามที่ WHO ได้แนะนำไว้ (ความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 2) เมื่อเซลล์ติดเชื้อเกิดพยาธิสภาพ (cytopathic effect; CPE) มากกว่า 90% (รูปที่ 1) จึงทำการเก็บ culture supernatant โดยนำไปปั่นให้เซลล์ตกที่ความเร็วรอบ 12,000 *x g* เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำของเหลวส่วนใสมาแบ่งเก็บใส่หลอด microtubes แล้วนำไปเก็บที่ -80 °C สำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 1 (A) ลักษณะ Cytopathic effects (CPE) ของ RD cells ที่ติดเชื้อ EV71 genotype A, strain BrCr ได้แก่ cell aggregation and detachment. (B) RD cells ปรกติที่ไม่ติดเชื้อมีลักษณะเป็นรูปกระสวย
รูปถ่ายจากกล้อง inverted light microscope ที่กำลังขยายเริ่มต้น 50 เท่า

2.2 การตรวจวัดปริมาณเชื้อ EV71

ทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ EV71 สองวิธีคือ การตรวจหาจำนวน copy numbers ของสารพันธุกรรม EV71 ด้วย qRT-PCR และการตรวจวัด infectivity ของเชื้อด้วยวิธีการหา median cell culture infectious dose ($CCID_{50}$)

2.2.1 EV71 qRT-PCR

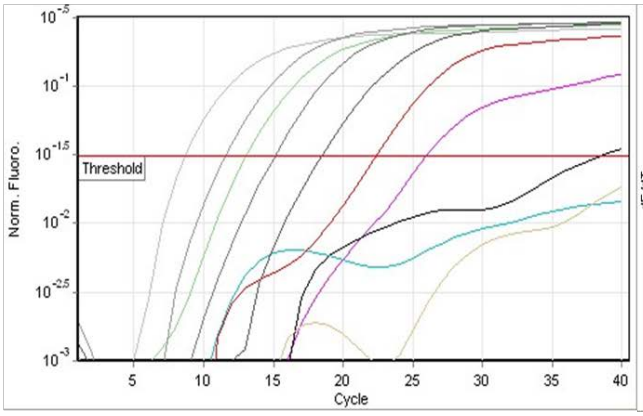
ทำการสร้างสารพันธุกรรมมาตรฐานชนิด Recombinant plasmid ที่มี cDNA ของ *VP1* encoding sequence ซึ่งเป็น EV71 capsid subunit protein เชื่อมติดอยู่ ขอเรียกว่า pTZ5R::EV71-*VP1* plasmid นำ pTZ5R::EV71-*VP1* ที่รู้ค่าความเข้มข้นไปทำ 10-fold serial dilutions จากนั้นนำไปผสมกับ master mixture: EV71 primers [ออกแบบโดย J. Puenpa, et al. Arch Virol (2011) 156:2007–2013] One-step Brilliant SYBR Green RT-qPCR kit (Stratagene) นำเข้าเครื่อง real-time PCR (Rotor gene และ Excycler) ตั้งโปรแกรม PCR พร้อม Melting curve analysis (**รูปที่ 2**)

Reverse transcription	42 °C, 60 min
Initial denaturation	95 °C, 10 min
Thermal cycle	40 cycles of Step 1; 95 °C, 60 sec Step 2; 55°C, 60 sec Step 3; 72°C, 45 sec Acquiring fluorescent signals at step 3
Melting curve analysis	From 60 to 95 °C, 1 °C increment, Hold 45 sec

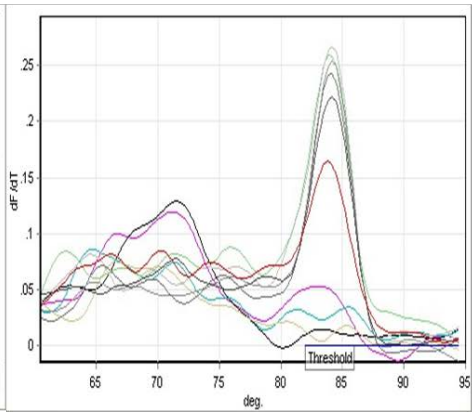
รูปที่ 2 โปรแกรม Thermocycling พร้อม Melting curve analysis ของการวิเคราะห์หาปริมาณสารพันธุกรรม EV71 โดยวิธี One-step qRT-PCR (EV71 qRT-PCR)

นำค่า threshold cycle (C_t) ที่ได้จาก amplification plot กับปริมาณ copy numbers ของ pTZ5R::EV71-*VP1* ซึ่งคำนวณจาก predicted molecular weight ได้ จากนั้นนำแต่ละคู่ลำดับของ C_t และ ค่าคำนวณ copy number ไปสร้าง standard curve ของ EV71 qRT-PCR พบว่าค่า C_t ของ pTZ5R::EV71-*VP1* ที่ dilutions ต่างๆ มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงเชิงผกผันกับค่าคำนวณ copy number (R^2 = 0.9985) โดย reaction efficiency (accuracy and precision) เท่ากับ 94% (**รูปที่ 3**) จึงสามารถนำเอาสมการเส้นตรงที่ได้ไปใช้คำนวณย้อนกลับเพื่อหาปริมาณตั้งต้นสุทธิ (absolute count) ของสารพันธุกรรมเป้าหมายในสิ่งส่งตรวจได้ (copies/mL) เริ่มต้นจาก การสกัด EV71 RNA จาก culture supernatant ด้วย TRIzol™ reagent (Invitrogen™) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต จากการนำ RNA ไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณ copy numbers ด้วยวิธี EV71 qRT-PCR ดังกล่าว พบว่า ตัวอย่างที่นำมาตรวจหา EV71 มีปริมาณสารพันธุกรรมไวรัสเท่ากับ 2.8 x 10^5 copies/mL ปริมาณสารพันธุกรรมไวรัส EV71 ต่ำที่สุดที่วัดได้คือ 6.6 x 10^2 copies/mL

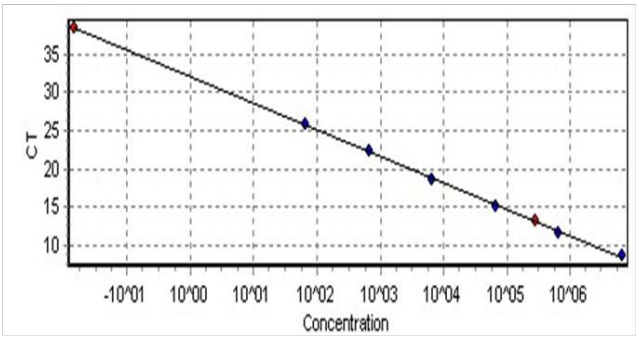
A



B



C



D

Colour	Name	Peak 1	C_t	Copies
	pTA::VP1 10^-1	84.2	8.64	6.6×10^6
	pTA::VP1 10^-2	84.2	11.55	6.6×10^5
	pTA::VP1 10^-3	84	15.08	6.6×10^4
	pTA::VP1 10^-4	84	18.47	6.6×10^3
	pTA::VP1 10^-5	83.8	22.36	6.6×10^2
	pTA::VP1 10^-6	N/A	25.94	66
	EV71 BrCr	84	13.05	282,697.54
	NTC	N/A	38.50	0.01

รูปที่ 3 ผล EV71 qRT-PCR ด้วยเครื่อง Rotor geneเพื่อสร้าง standard curve จากค่า threshold cycle (C_t) ที่ได้จาก 10-fold serial dilutions ของ pTZ5R::EV71-*VP1* กับค่าคำนวณ copy number และผล EV71 qRT-PCR ของ EV71 stock

A, Log-plot amplification curve

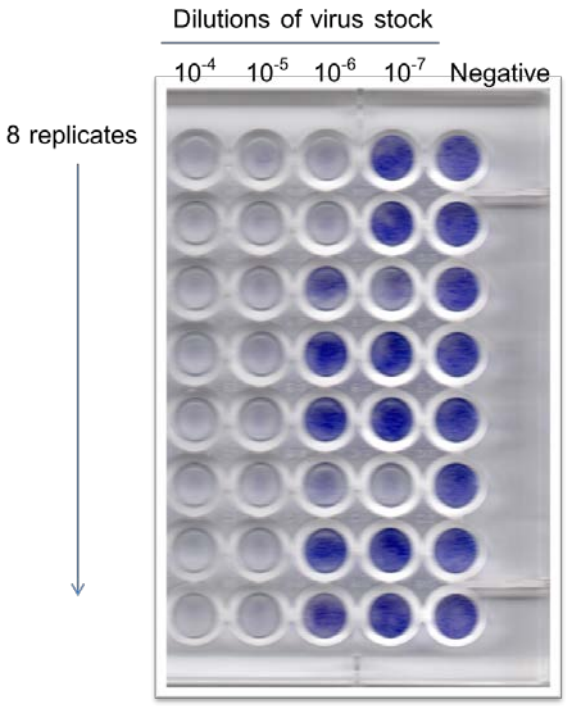
B, Melting curve ($-\Delta F/\Delta T$)

C, EV71 qRT-PCR standard curve

D, ตารางสรุปค่า C_t, melting temperature ของ PCR products และค่า copy numbers

2.2.2 Median cell culture infectious dose ($CCID_{50}$)

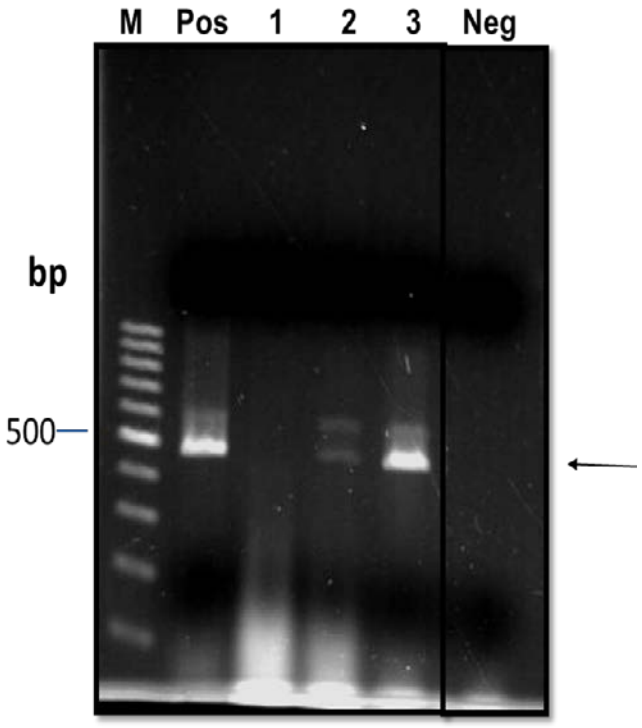
ได้ทำการวัดปริมาณ EV71 โดยวัด infectivity dose กับ RD cell monolayers ตามวิธีแนะนำของ WHO (Polio Laboratory Manual; WHO/IVB/04.10) เริ่มต้นจากเตรียม 10-fold serial dilutions ของ EV71 stocks จากนั้นนำแต่ละ virus dilutions ปริมาตร 100 µL ไปเติมลงในหลุมของ 96-well tissue microplate จำนวน 8-10 หลุมในแต่ละแถว (8-10 replicates ของแต่ละ dilution) จากนั้นเติม RD cell suspension (1-3 x 10^5 cells/100 µL) ลงในแต่ละหลุม โดยมีหลุมที่เติม culture medium กับ RD cells เป็น negative control จากนั้นนำเพลทไปเก็บที่ 37 °C CO_2 incubator เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ล้างเซลล์ด้วย sterile PBS แล้วเติม ice-cold methanol เพื่อ fix เซลล์ เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์แล้วย้อมด้วยสี crystal violet (0.01%) เพื่อสังเกต CPE คือมีการลอกหลุดของเซลล์ออกจากหลุมเมื่อเปรียบเทียบกับ negative control นับจำนวนหลุมที่เกิด CPE แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา $CCID_{50}$ ตามวิธีของ Kärber พบว่า EV71 stock ที่นำมาทดสอบมีปริมาณไวรัส $10^{6.25}$ $CCID_{50}$/0.1 mL **(รูปที่ 4)**



รูปที่ 4 ปริมาณไวรัส EV71 ที่วัดด้วยวิธีหา $CCID_{50}$ ใน Rhabdomyosarcoma (RD) monolayer cells เซลล์ในหลุมที่เกิด CPE เนื่องมาจากการติดเชื้อ EV71 จะหลุดร่อนจากก้นหลุมทำให้เกิดเป็นช่องว่างภายหลังย้อมด้วยสี crystal violet ในขณะที่เซลล์ไม่ติดเชื้อ (หลุม negative) เติบโตเป็นปรกติทำให้ย้อมติดสีทั่วทั้งหลุม

2.3 การสร้าง เชื้อ EV71สายพันธุ์ mouse-adapted strain โดยวิธี serially brain passage

นำ culture supernatant ของ RD cells ที่มี EV71 genotype A ปริมาณ $10^{4.9}$ $CCID_{50}$ ฉีดให้หนูทดลอง 1-day BALB/c mice ซึ่งมีรายงานว่า susceptible ต่อการติดเชื้อ EV71 (Liu M-L., et al. J. Gen. Virol. 2005; 86: 3263–69) โดยฉีดให้เชื้อเข้าทาง intramuscular แล้วเดินทางแบบ axonal retrograde (Chen C-S., et al. J Virol 2007; 81: 8996–9003) เข้าสู้สมองเพื่อทำให้ non-virulent parental EV71 ปรับตัวเข้ากับ brain tissue ของหนูทดลองและมีความรุนแรงในการก่อโรคในหนูทดลองเพิ่มขึ้น (Wang YF., et al. J. Virol. 2004; 78: 7916-24) จากนั้นสกัด RNA จาก brain lysate ด้วย TRIzol™ reagent เพื่อนำไปตรวจสอบหาสารพันธุกรรมของเชื้อ EV71 โดยวิธี qRT-PCR และหา cell culture infection dose 50 ($CCID_{50}$) พบว่าเชื้อที่ฉีดเข้าทาง intramuscular สามารถเดินทางขึ้นสมองและตรวจพบได้ตั้งแต่วันที่ 5 และ 7 หลังการฉีด (post inoculation) และเริ่มตรวจไม่พบในวันที่ 14 post inoculation (**รูปที่ 5**) จากนั้นนำ brain lysate ดังกล่าวไป innoculate ลง RD cells เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อจาก brain passage ที่ 1 ก่อนฉีดให้หนูทดลองต่ออีก 3 passages โดยใช้เชื้อของ passage ก่อนหน้าที่เพาะจาก RD cells ฉีดให้หนูใน passage ถัดไป พบว่าในทุก passage เชื้อยังคง non-virulent ต่อหนูทดลองคือหนูทดลองที่ได้รับเชื้อไม่แสดงอาการทางระบบประสาทใดๆเลย แต่เชื้อ EV71 ดังกล่าวยังคง virulent ใน RD cells อยู่ ซึ่งทราบได้จากการที่ $CCID_{50}$ ของเชื้อต่อ RD cells ยังคงไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้พบว่า ตั้งแต่ passage ที่ 4 เป็นต้นไป เชื้อ EV71 ที่ฉีดเข้าทาง intramuscular ไม่เดินทางขึ้นสมองเลย ผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนมาใช้หนู nude mice/BALB/c ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความบกพร่องของภูมิคุ้มกันชนิด T และ B cell responses โดยเริ่มต้นจากสั่งหนู nude mice/BALB/c อายุ 3 สัปดาห์มาจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา มาพักและเลี้ยงที่ศูนย์สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์เป็นเวลา 1 อาทิตย์ จากนั้นป้อนให้กินยา cyclosporin ปริมาณ 1 mg ติดต่อกันเป็นเวลาสามวันเพื่อกดภูมิคุ้มกันหนูซึ่งจะส่งผลลดการกำจัดเชื้อออกจากร่างกายทำให้ติดเชื้อง่ายขึ้น (Sazaki K., et al. Microbiol. Immunol. 1992; 36: 1061-75) จากนั้นฉีดให้เชื้อ EV71 brain passage ที่ 3 ปริมาณ $10^{4.9}$ $CCID_{50}$ เข้าทาง intracerebral หลังจากให้เชื้อไปแล้วหนึ่งวัน วันที่ 2 และ 3 ทำการฉีดเชื้อ EV71 ปริมาณ $10^{5.9}$ $CCID_{50}$ เข้าทาง tail vain พร้อมกับป้อนให้กินยา cyclosporin สังเกตอาการเป็นเวลาห้าวันหลังจากให้เชื้อครั้งแรก จากนั้นทำการแยกเชื้อจาก brain lysate, hind limb muscle lysate และ heart lysate โดยการ inoculate ลง RD cells โดยที่พบว่าไม่สามารถแยกเชื้อออกมาได้เลยซึ่งสอดคล้องกับผล EV71 qRT-PCR ที่ให้ผลลบ



รูปที่ 5 EV71 qRT-PCR products (ลูกศรชี้) จาก brain lysate สกัดจาก infected 1-day BALB/c mice ตรวจสอบด้วย Agarose gel electrophoresis

Lane 1, EV71 qRT-PCR products จาก brain lysate สกัดจากสมองหนูภายหลังฉีด EV71 เข้าทางกล้ามเนื้อ (*i.m.)* แล้ว 3 วัน

Lane 2; EV71 qRT-PCR products จาก brain lysate สกัดจากสมองหนูภายหลังฉีด EV71 เข้าทางกล้ามเนื้อ (*i.m.)* แล้ว 5 วัน

Lane 3; EV71 qRT-PCR products จาก brain lysate สกัดจากสมองหนูภายหลังฉีด EV71 เข้าทางกล้ามเนื้อ (*i.m.)* แล้ว 7 วัน

Pos; Positive control

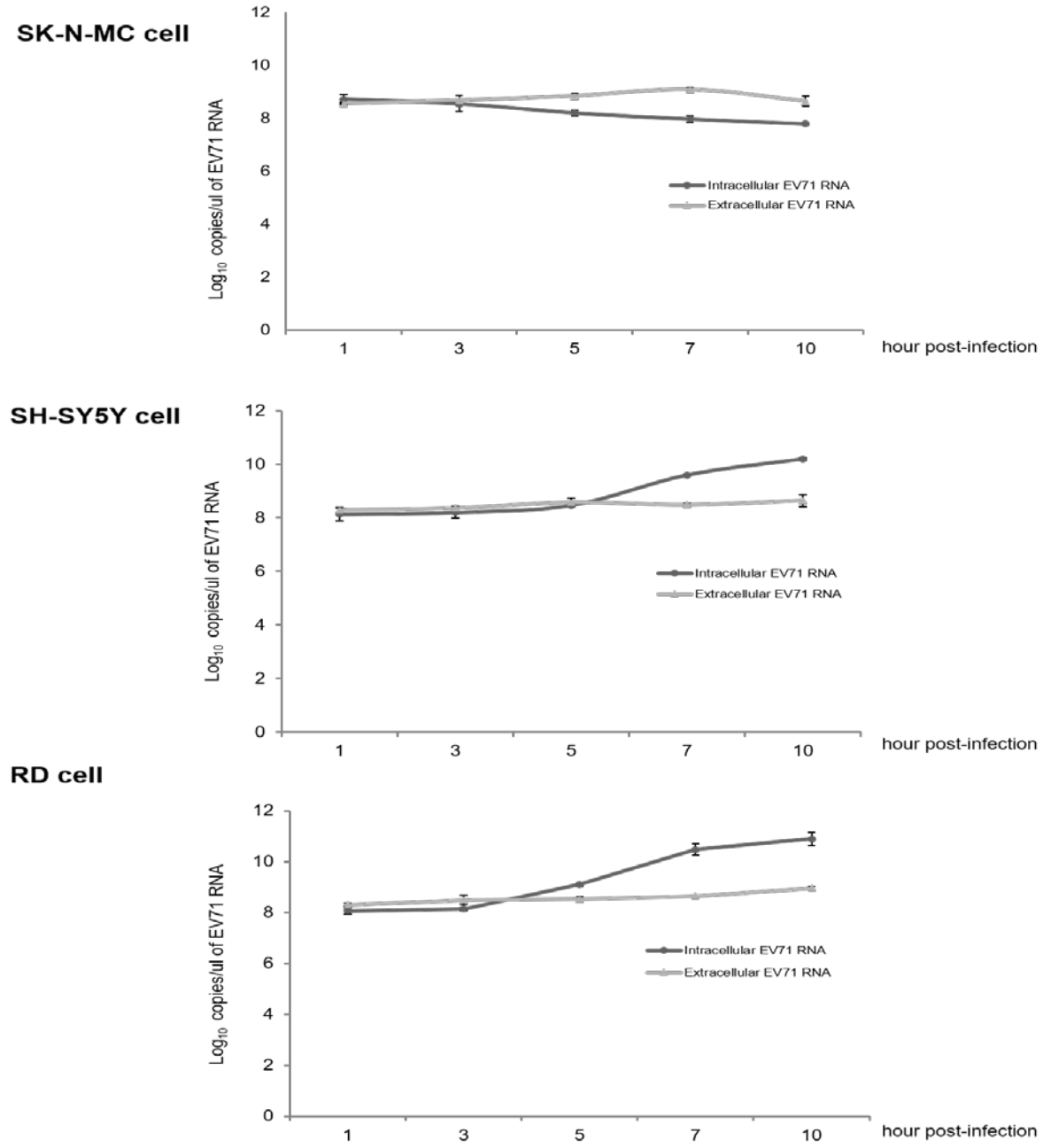
Neg; Negative control

M; 100-bp DNA ladder (base pairs; bp)

2.4 การศึกษาความสามารถและรูปแบบในการ Replication ของเชื้อ EV71 ใน human neuronal cell lines

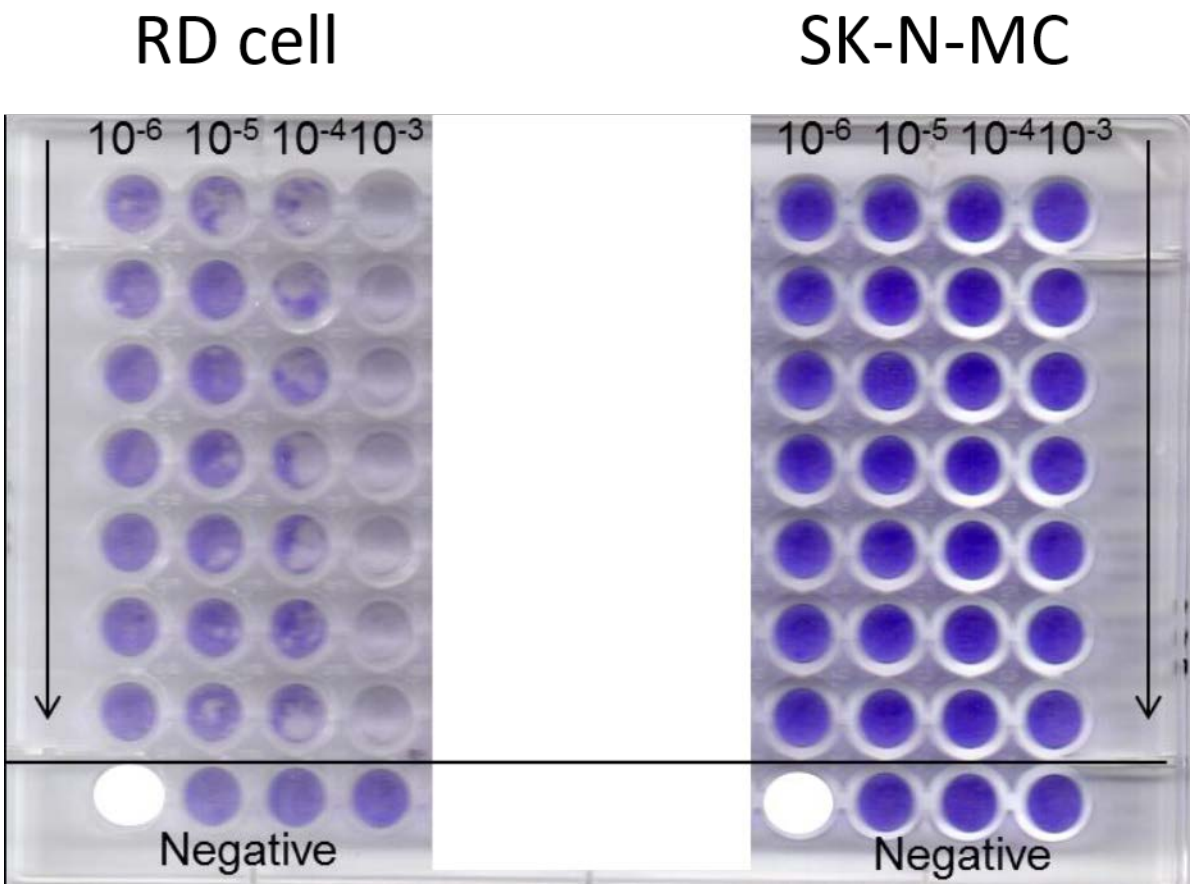
เนื่องจากไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อ EV71 genotype A สายพันธุ์ BrCr ปรับตัวและก่อโรคในหนูทดลองได้ ทางผู้วิจัยจึงตัดสินใจเปลี่ยนมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนระดับ mRNA (transcriptome) อันเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อการติดเชื้อ EV71 ที่เกิดขึ้นในเซลล์ประสาทมนุษย์ชนิดเพาะเลี้ยง (human neuronal cell lines) SK-N-MC neuroepithelioma และ SH-SY5Y neuroblastoma เพื่อให้เข้าใจกระบวนการพยาธิกำเนิดของเนื้อเยื่อระบบประสาทส่วนกลางอันเป็นผลมาจากการติดเชื้อไวรัสเอนเทอโร 71 โดยได้เปลี่ยนมาใช้เชื้อ **EV71 genotype B5** ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกเพาะเลี้ยงมาจากสิ่งส่งตรวจของคนไข้เชื้อชาติไทยที่มีอาการทางระบบประสาทส่วนกลางร่วมกับโรคมือเท้าปาก (ข้อมูลจาก ศ.นพ. ยง ภู่วรวรรณ) อีกทั้งยังได้เปลี่ยนมาใช้เทคโนโลยีขั้นสูงกว่า microarray คือ **RNA next-generation sequencing (RNA-Seq)** ในการศึกษา transcriptome เบื้องต้นจึงได้ทำการศึกษา replication kinetics ที่ช่วงเวลาต่างๆ ของเชื้อ EV71 ใน human neuronal cell lines ดังกล่าวเทียบกับ RD cell (positive replication control) โดยเพื่อให้ทราบข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นเกี่ยวกับพฤติกรรมของเชื้อ EV71 ในเซลล์ดังกล่าวเพื่อการตัดสินในวางแผนการทดลองในขั้นต่อไป

เริ่มต้นจากทำการเลี้ยง SK-N-MC SH-SY5Y และ RD cell monolayers ในหลุม 24-well cell culture plate จนได้ความหนาแน่นจำนวนเซลล์ต่อพื้นที่ประมาณ 80-90% จากนั้นทำให้เซลล์ติดเชื้อจำนวน 1 multiplicity of infection (MOI) โดยการ incubate กับเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูด inoculum ดังกล่าวทิ้ง ล้างไวรัสส่วนที่ไม่ได้ adsorb อยู่กับเซลล์ออกไปโดยการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS จำนวน 2 ครั้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์กลับเข้าไปในหลุมเพื่อให้ไวรัสที่เข้าเซลล์ไปแล้ว replicate ไปพร้อมกันกับเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเป็นระยะเวลา 1 3 5 7 และ 10 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ (hour post-infection; hpi) โดยจะเริ่มทำการติดเชื้อเซลล์หลุม 10 hpi ก่อน จากนั้นตามมาด้วยหลุม 7 hpi 5 hpi 3 hpi และ 1 hpi ตามลำดับ โดยจะยุติการติดเชื้อของทุกหลุมทุกช่วงเวลาพร้อม จากนั้นเก็บ cell culture supernatant ผสมกับ TRIZol reagent เพื่อสกัด EV71 RNA จาก released virions สำหรับตรวจวัดปริมาณ extracellular EV71 RNA copy numbers ด้วยวิธี qRT-PCR ดังที่ได้กล่าวในหัวข้อ **2.2.1** ส่วน cell monolayers นั้นก็เช่นกัน ทำการล้างด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นใส่ TRIZol reagent เพื่อสกัด total cellular RNA เพื่อตรวจวัดปริมาณ intracellular EV71 RNA copy numbers หรือ host gene expression level ด้วยวิธี semi qRT-PCR จากนั้นนำค่า mean ± standard deviation ของ log10 copies/µl of viral RNA ณ ช่วงต่างๆ ที่คำนวณจาก standard curve มา plot viral growth curve ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel (**รูปที่ 6**) พบว่ารูปแบบในการ replication ของเชื้อ EV71 ใน SH-SY5Y neuroblastoma cell มีรูปแบบที่คล้ายคลึงกับใน RD cells กล่าวคือ intracellular viral RNA จะเริ่ม replication ในช่วงเวลา 5 hpi และ 3 hpi ตามลำดับ จากนั้นในช่วงเวลา 10 hpi และ 7 hpi จะตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ extracellular viral RNA ปล่อยออกมาจาก SH-SY5Y cell และ RD cell ตามลำดับ และให้ผล CPE ด้วย ในขณะที่สามารถตรวจพบ EV71 RNA ใน SK-N-MC cell แต่ไม่พบ replication เลย และตรวจไม่พบ CPE (**รูปที่ 7**) ซึ่งบ่งชี้ virus-host interactions ที่แตกต่างไปจาก SH-SY5Y และ RD cells ส่งผลให้มีการลดลงของ viral replication เฉพาะใน SK-N-MC cell ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกศึกษา transcriptome ใน EV71-infected SK-N-MC cell ด้วยวิธี RNA-Seq เพื่อค้นหา candidate genes ที่มีผล protective role ต่อการควบคุมการติดเชื้อ EV71 ทั้งยังสามารถทำการศึกษาเปรียบเทียบกับ SH-SY5Y และ RD เพื่อค้นหา candidate genes ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ neuropathology ใน permissive cells ต่อไปในอนาคต



รูปที่ 6 รูปแบบ replication kinetics ของเชื้อ EV71 ณ ช่วงระยะเวลาต่างๆ ภายหลังการติดเชื้อ (hour post-infection) ใน SK-N-MC SH-SY5Y และ RD cells โดยการตรวจสอบปริมาณสารพันธุกรรมไวรัส (log_{10} of viral RNA copies/μl) ในส่วนที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular) และจาก total cellular RNA (intracellular) ด้วยวิธี qRT-PCR

ค่า mean ± standard deviation ของ log_{10} copies/μl of viral RNA ได้มาจาก 2 duplicate qRT-PCR tubes จาก 2 independent experiments



รูปที่ 7 การตรวจสอบ CPE โดยวิธี $CCID_{50}$ (เช่นเดียวกับในหัวข้อ **2.2.2**) ในเซลล์ SK-N-MC ที่ติดเชื้อ EV71 เปรียบเทียบกับ RD cell

ตัวเลขด้านบน คือ dilutions ต่างๆ ของ stock เชื้อ EV71 (ปริมาณเริ่มต้น $10^{5.25}$ $CCID_{50}$) โดยแต่ละ dilution ทำซ้ำ 7 หลุม (7 replicates)

Negative คือ cell monolayers ที่ไม่ได้ใส่เชื้อไวรัส ทำซ้ำ 3 หลุม

2.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนระดับ mRNA (transcriptome) อันเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อการติดเชื้อ EV71 ใน SK-N-MC cells ด้ววิธี RNA next-generation sequencing (RNA-Seq)

จากผลการทดลองหัวข้อ **2.4** พบว่าระยะเวลา 7 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ EV71 ในเซลล์ SK-N-MC เป็นระยะเวลาที่ปริมาณ viral RNA ทั้งส่วน intracellular และ extracellular ลดลง ซึ่งบ่งชี้ว่ามีกระบวนการควบคุม viral replication จึงน่าสนใจที่จะศึกษา transcriptome เพื่อหา candidate genes ด้วยวิธี RNA-Seq

เตรียมตัวอย่าง RNA จากเซลล์ติดเชื้อ EV71 สายพันธุ์ B5 MOI เท่ากับ 1 ระยะเวลาติดเชื้อ 7 ชั่วโมง (7 hpi) และจาก cells ที่ incubate กับอาหารเลี้ยงเซลล์อย่างเดียว (mock control) ด้วยชุดสกัด RNA สำเร็จรูป RNAeasy kit (QAIGEN) จากนั้นวัดความเข้มข้นและคุณภาพของ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) ตัวอย่าง RNA สกัดจาก mock SK-N-MC control (ขอเรียกว่า JT1) มีความเข้มข้น 29.6 ng/µl (ปริมาณรวม 1.48 µg) มีความบริสุทธิ์สูง (ratio OD260/280 nm = 2.27 และ ratio OD260/230 nm = 2.88) ส่วนตัวอย่าง RNA สกัดจาก EV71-infected SK-N-MC (ขอเรียกว่า JT2) มีความเข้มข้น 15.6 ng/µl (ปริมาณรวม 0.78 µg) มีความบริสุทธิ์สูง (ratio OD260/280 nm = 2.27 และ ratio OD260/230 nm = 1.64) โดยทั้งสองตัวอย่างมีคุณสมบัติเบื้องต้นเหมาะสมที่จะทำการวิเคราะห์ gene expression profile (transcriptome) ด้วยวิธี RNA-Seq ต่อไป

ส่งตัวอย่าง RNA เข้ารับบริการ RNA-Seq ที่หน่วย Clinical Microarray Core, University of California, Los Angeles (UCLA) ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์คร่าวๆ ดังนี้

1. สร้างคลัง complementary DNA (cDNA) โดยเปลี่ยนจาก mRNA พร้อมกับเชื่อมติด sequencing adaptors ที่ปลาย 5′ และ 3′ ของ cDNA โดยใช้ KAPA Stranded mRNA-Seq Kit Illumina® platform (Kapa Biosystems) ระหว่างขั้นตอน cDNA synthesis มีการเติม dUTPs เข้าไปในสาย 2nd strand ของ cDNA เพื่อ marking strand

2. เพิ่มปริมาณ cDNA ด้วย PCR โดยใช้ high fidelity Taq DNA polymerase ซึ่งเพิ่มปริมาณลำดับเบสเฉพาะสายที่ไม่ได้ marking strand ดังนั้นจะมีแค่สาย 1st strand เท่านั้นที่จะถูกถอดรหัสลำดับเบส

3. ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของคลัง cDNA จากตัวอย่าง JT1 และ JT2 โดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Illumina™ HiSeq 2500 system ลักษณะการวิเคราะห์คืออ่าน cDNA ให้ได้ความยาวสูงสุด 50 base-pair (bp) โดยถอดรหัสลำดับเบสเฉพาะสาย 1st strand เท่านั้น (single-end read) รวมเรียกว่า 1 x 50 sequencing protocol

4. ทำการ pre-QC คุณภาพ RNA reads ที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Illumina™ โดยการคัด high noise, sequencing adaptor, high represented sequences ทิ้ง จากนั้น trim adaptor sequences ออกจาก RNA reads แล้วจึงนำส่ง FASTQ files ที่บรรจุข้อมูล sequences ของ short RNA reads จำนวนมากกว่า 10^8 sequences ต่อหนึ่งตัวอย่าง RNA กลับมายังผู้วิจัย

เมื่อผู้วิจัยได้รับ FASTQ files ของตัวอย่าง JT1 และ JT2 ได้ทำการทวนสอบคุณภาพ RNA reads อีกครั้งด้วย open-source cloud-based program ที่ชื่อว่า FASTQC เป็น free-program บริการโดย BasSpace Labs App ซึ่งใช้บริการได้เฉพาะข้อมูล RNA-Seq ที่ได้จากโดยเครื่อง Illumina™

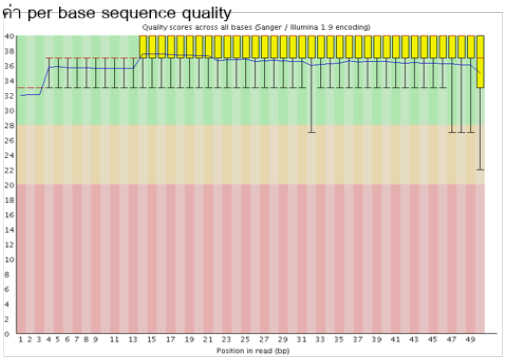
จากการทวนสอบคุณภาพ RNA reads จากทั้งสองตัวอย่างพบว่ามีคุณภาพดีเหมาะสมที่จะดำเนินการวิเคราะห์ต่อไปกล่าวคือ มีค่า per base sequence quality (คุณภาพของแต่ละนิวคลิโอไทด์ที่ถอดรหัสได้) และ per sequence quality score (คุณภาพของแต่ละลำดับกรดนิวคลิอิกที่ถอดรหัสได้) ที่สูง แต่มีค่า per sequence N content (จำนวนนิวคลิโอไทด์ต่อลำดับกรดนิวคลิอิกที่ถอดรหัสไม่ได้) ที่ต่ำ อีกทั้ง RNA reads ส่วนใหญ่มีความยาวของลำดับนิวคลิโอไทด์

(distribution of read length) 50 base pairs (**รูปที่ 8**) จำนวน RNA reads ที่มีคุณภาพผ่านการคัดกรอง (pass-filter reads) ที่ได้จากตัวอย่าง RNA JT1 และ JT2 มีจำนวน 17,109,820 และ 10,163,309 ตามลำดับ จากนั้นใช้โปรแกรม Cufflinks Assembly & DE application (BaseSpace apps TopHat Alignment and Cufflinks Assembly and Differential Expression) เพื่อประกอบ RNA pass-filter reads ที่เป็น over lapping sequences ที่มาจาก transcript เดียวกันรวมเข้าเป็น RNA contigs เดียวกัน (assembly) โดยวิธี alignment เทียบกับ reference human genome sequence Homo sapiens UCSC hg19 (GRCh37) กับทุกๆ ตำแหน่งบนทุก chromosome ทั้งบน splice sites, introns, intergenic regions และ exons ทั้งสาย sense และ antisense strands เพื่อกำหนด (annotation) เป็นชื่อ gene หรือ transcript ได้อย่างแม่นยำ ในกรณีที่ contigs ใดๆไม่สามารถกำหนดชื่อ gene หรือ transcript ได้นั้นมีสาเหตุมาจาก (1) มี splice sites ที่ใช้ร่วมมากกว่า 1 ตำแหน่ง (2) ถูกนำไปเทียบ (mapped) บนตำแหน่ง unknown intergenic region บน reference chromosome (3) มี exon ที่overlap กับ sense (non-template) strand (4) ตำแหน่งที่นำไปเทียบเป็น unknown ซึ่ง contigs เหล่านี้จะจัดเป็น novel mRNA/transcript จากนั้นนำ mapped gene หรือ transcript ทั้งหมดจาก JT1 และ JT2 มาผสานเข้าด้วยกัน (merge) เพื่อสร้างเป็น gene expression profile ของ SK-N-MC (transcriptome) ซึ่งขอเรียกว่า merged SK-N-MC transcriptome พบว่า RNA pass-filter reads จาก JT1 และ JT2 จำนวน 17,109,820 และ 10,163,309 reads สามารถ assemble ได้เป็น 26,265 และ 25,428 known genes และ 47,699 และ 46,498 transcripts ตามลำดับ และ merged SK-N-MC transcriptome ประกอบด้วย 26,426 known genes และ 48,053 transcripts โดยในจำนวนนี้เป็น 4,559 novel transcripts (**ตารางที่ 1**) จากนั้นใช้โปรแกรม Cufflinks Assembly & DE application คำนวณหาระดับการแสดงออกของ gene หรือ transcript โดยโปรแกรมจะนำจำนวน RNA reads ของ gene หรือ transcript นั้นๆ จากของ JT1 และ JT2 ไปเทียบกับจำนวนความยาวของ exons (kilobase) คู่เทียบซึ่งอยู่บน merged SK-N-MC transcriptome ต่อ 10^6 read fragments ที่นำมาเทียบ (mapped) กับ exon นั้นๆ เรียกว่า FPKM method (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) ซึ่งเป็นการ normalization ค่าวัดระดับการแสดงออกของยีน ซึ่งจะแสดงออกมาเป็นค่า log2 FPKM ต่อมาทำการเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน (differential gene expression) ระหว่าง EV71-infetced SK-N-MC transcriptome (JT2) เทียบกับ un-infected SK-N-MC transcriptome (JT1) ซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อการติดเชื้อ EV71 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SK-N-MC โดยนำค่า log2 FPKM ของ gene หรือ transcript นั้นๆ จาก JT2 (comparison) ไปเทียบกับของ JT1 (control) จะได้ค่า ratio log2 (JT2 หารด้วย JT1) FPKM ซึ่งเป็นค่า fold-change ของ gene expression โดยค่าบวก (+) บ่งชี้ up-expression ค่าลบ (-) down-expression ค่า 0 คือ unchanged พบว่ามี 8,836 candidates ใน JT2 ที่ให้ผลระดับการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันไปจาก JT1 จำแนกออกเป็น up-expression list จำนวน 4,533 และ down-expression list จำนวน 4,916 (**ตารางที่ 2**) โดยแบ่งออกได้เป็น 3,860 known genes และ 673 novel transcripts จาก up-expression list ส่วน down-expression list มี 3,561 known genes และ 1,365 novel transcripts

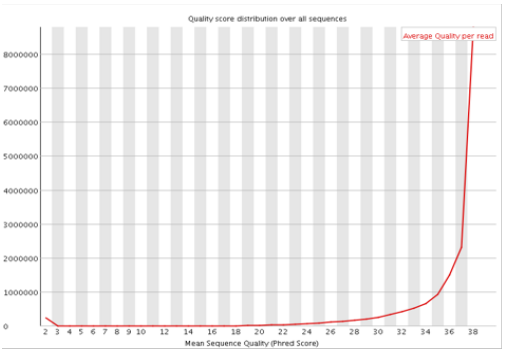
สรุปได้ว่า การติดเชื้อ EV71 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SK-N-MC ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงต่อระดับการแสดงออกของยีน ซึ่งต้องการการศึกษาต่อไปเพื่อค้นหา candidates ที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดจากการติดเชื้อที่ระบบประสาทส่วนกลางและใช้สำหรับค้นหา biomarkers เพื่อประโยชน์ต่อการติดตามการรักษา พยากรณ์โรค และการวินิจฉัยอาการแทรกซ้อนทางสมองจากการติดเชื้อก่อโรคมือเท้าปาก

JT1 sample

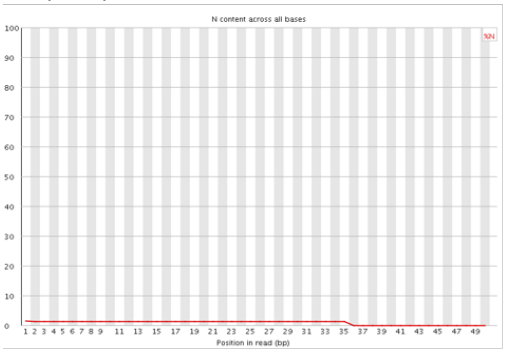
ค่า per base sequence quality



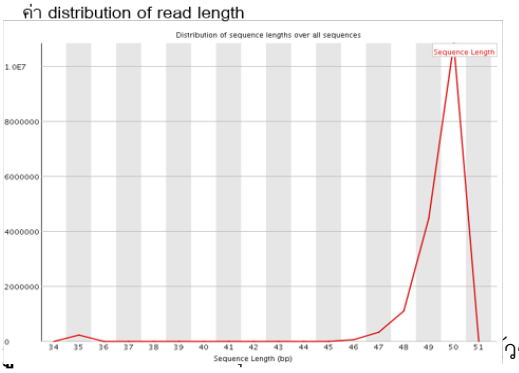
ค่า per sequence quality score



ค่า per sequence N content

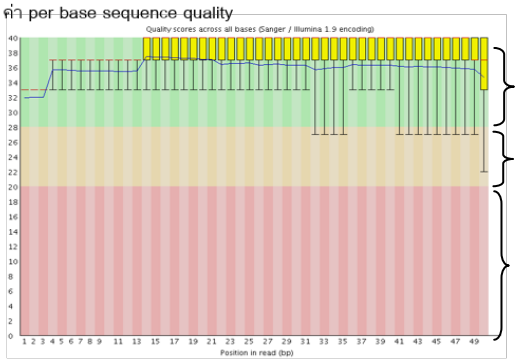


ค่า distribution of read length



JT2 sample

ค่า per base sequence quality

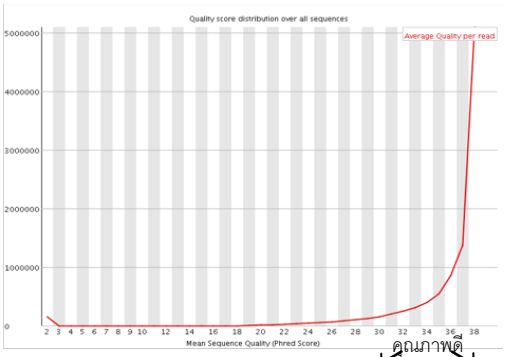


คุณภาพดี

คุณภาพปานกลาง

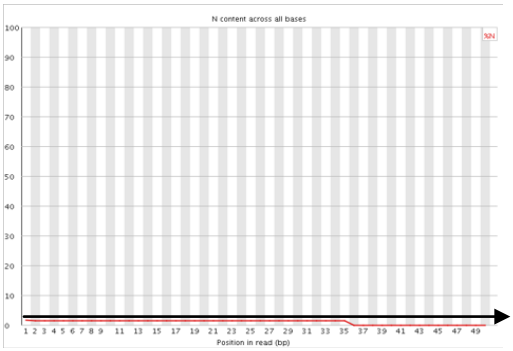
คุณภาพต่ำ

ค่า per sequence quality score



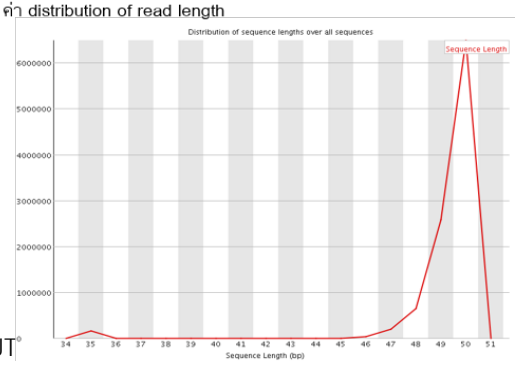
คุณภาพดี

ค่า per sequence N content



คุณภาพดี

ค่า distribution of read length



ตัวอย่าง RNA JT

ตารางที่ 1 สรุปผลการวิเคราะห์ transcriptome ของ SK-N-MC

Quantity	JT1 transcriptome	JT2 transcriptome	Merged SK-N-MC transcriptome
Known genes	26,265	25,428	26,461
Transcripts	47,699	46,498	48,053
known	43,493	43,492	43,494
novel	4,206	3,006	4,559
Total	73,964	71,962	74,514

ตารางที่ 2 สรุปผลการวิเคราะห์จำนวน differentially expressed gene ใน SK-N-MC ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ EV71 (JT2 transcriptome)

Amount of differentially expressed genes/transcripts	Fold-change pattern	
	Up-expression	Down-expression
Known genes/transcripts	3,860	3,561
Novel transcripts	673	1,355
Total	4,533	4,916

2.6 การศึกษา Gene ontology ของ differentially expressed genes ที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ EV71 จาก SK-N-MC transcriptome

เพื่อให้เข้าใจถึงสภาวะที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ประสาท SK-N-MC อันเป็นผลจากการตอบสนองต่อการติดเชื้อ EV71 ผู้วิจัยได้นำรายชื่อ (list) ของ annotated genes/transcripts จากทั้งกลุ่มที่มีระดับการแสดงแบบ up-expression และ down-expression (**ตารางที่ 3**) ที่วิเคราะห์ได้จาก SK-N-MC JT2 transcriptome มาศึกษา gene ontology และวิเคราะห์หา biological processes ที่เกี่ยวข้องด้วย PANTHER gene list analysis tool (http://www.pantherdb.org/)

จากการวิเคราะห์ความเกี่ยวข้องของ annotated gene/transcript lists ของกลุ่มที่มีระดับการแสดงออกแบบ up-expression และ down-expression กับ cellular biological processes ต่างๆ พบว่าทั้งสอง gene/transcript lists มีรูปแบบการกระจายตัวของจำนวนยีนในแต่ละ biological process ที่คล้ายๆกัน ยกเว้นที่ว่า genes ที่เกี่ยวข้องกับ cellular component organization or biogenesis และ growth processes พบเฉพาะใน genes/transcripts ที่อยู่ใน up-expression list เท่านั้น ทั้งนี้ภายหลังจากที่จัดกลุ่ม genes/transcripts ของ differentially expressed gene candidates ตาม biological processes แล้วยังคงต้องศึกษาเพื่อพิสูจน์บทบาทและหน้าที่ของ candidates เหล่านี้ว่ามีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อ EV71 ในเซลล์ประสาทอย่างไร ต่อไปในอนาคต รวมทั้งหาความสัมพันธ์ใน pathways ต่างๆ โดยอาศัย KEEG analysis tools เป็นต้น ร่วมกับผลการทดลองเพื่อพิสูจน์ยืนยันต่อไป ประโยชน์ที่ได้รับก็คือการนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดหายาหรือรูปแบบการรักษาอื่นรวมถึงวัคซีนที่สามารถรักษาหรือป้องกันการติดเชื้อ EV71และอาการแทรกซ้อนทางประสาทได้

อนึ่งผู้วิจัยได้ใช้ฐานข้อมูล Interferome ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ transcriptome ของกลุ่ม genes ที่เกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไวรัสชนิดติดตัวมาแต่กำเนิด (anti-virus innate immunity) ชนิด type I interferon (IFN) มาวิเคราะห์ differentially expressed gene list เพื่อดูการตอบสนองของ type I IFN ในเซลล์ประสาท SK-N-MC ต่อการติดเชื้อ EV71 พบว่า ไวรัส EV71 มีความสามารถในการกดการแสดงออกของยีนใน type I IFN pathway ใน SK-N-MC ได้เกือบทั้งหมด แต่ถึงกระนั้น SK-N-MC ก็ยังมี alternative activation pathway ที่ใช้กดการ replication ของ EV71 ได้ โดยได้ทำการทวนสอบผล RNA-Seq ด้วยการตรวจวัดระดับการแสดงออกของ candidate genes ในเซลล์ SK-N-MC ที่ติดเชื้อ EV71 (MOI of 1) ที่ช่วงระยะเวลาต่างๆ ด้วย qRT-PCR ซึ่งให้ผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกันกับผล RNA-Seq ซึ่งผลงานวิจัยชิ้นนี้ผู้วิจัยได้จัดเตรียมนิพนธ์ต้นฉบับชื่อเรื่อง “RNA Sequencing-Based Transcriptome Reveals Type I Interferon Responses in Enterovirus 71-Infected Human Neuroepithelioma Cell Line” สำหรับขอพิจารณาเพื่อตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ Journal of Innate Immunity ซึ่งจัดอยู่ใน Quartile ที่ 1 (Q1) ในฐานข้อมูล SCImago มีค่า Impact factor เท่ากับ 4.352 ซึ่งหากมีความคืบหน้าในส่วนของการตีพิมพ์จะแจ้งให้ทาง สกว. ทราบในโอกาสต่อไป

ตารางที่ 3 สรุปผลการวิเคราะห์ Gene ontology และ biological processes ของกลุ่ม genes/transcripts จาก EV71-infected SK-N-MC JT2 transcriptome ที่ให้ผล up-expression และ down-expression เมื่อเปรียบเทียบกับ un-infected SK-N-MC JT1 transcriptome

Biological process (gene ontology; GO, accession number)	Number of genes (percentage of gene hits against the total number of genes in the list)	
	up-expression list	down-expression list
apoptotic process (GO:0006915)	103 (2.7)	73 (2.1)
biological adhesion (GO:0022610)	70 (1.8)	60 (1.7)
biological regulation (GO:0065007)	717 (18.8)	608 (17.2)
cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	353 (9.2)	Nil
cellular process (GO:0009987)	1,289 (33.7)	1,115 (32.6)
developmental process (GO:0032502)	396 (10.4)	308 (8.7)
growth (GO:0040007)	2 (0.1)	Nil
immune system process (GO:0002376)	131 (3.4)	122 (3.4)
localization (GO:0051179)	466 (12.2)	500 (14.4)
locomotion (GO:0040011)	11 (0.3)	10 (0.3)
metabolic process (GO:0008152)	1905 (49.8)	1842 (52.0)
multicellular organismal process (GO:0032501)	180 (4.7)	148 (4.2)
reproduction (GO:0000003)	54 (1.4)	55 (1.6)
response to stimulus (GO:0050896)	273 (7.1)	248 (7.0)

Output **จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.**

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
    - นิพนธ์ต้นฉบับชื่อเรื่อง “RNA Sequencing-Based Transcriptome Reveals Type I Interferon Responses in Enterovirus 71-Infected Human Neuroepithelioma Cell Line” สำหรับขอพิจารณาเพื่อตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ Journal of Innate Immunity ซึ่งจัดอยู่ใน Quartile ที่ 1 (Q1) ในฐานข้อมูล SCImago มีค่า Impact factor เท่ากับ 4.352
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

    - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)

    - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)

    - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)

    - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
        - ได้รับนักศึกษาระดับปริญญาเอกจำนวน 1 คน และระดับปริญญาโทจำนวน 1 คน เข้าศึกษาในหลักสูตรชีวเวชศาสตร์ (นานาชาติ) บัณฑิตศึกษา สาขาชีวเวชศาสตร์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เพื่อทำการวิจัยต่อยอดองค์ความรู้จากโครงการวิจัยนี้
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)