

Abstract

Project Code : RSA5480024

Project Title : Human Host Cellular Protein System Interacting with the Dengue Virus NS1 Protein

Investigator : Dr. Sansanee Noisakran (Principle Investigator), Medical Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
 Assoc. Prof. Dr. Thawornchai Limjindaporn, Department of Anatomy, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University
 Prof. Dr. Pa-thai Yenchitsomanus, Division of Molecular Medicine, Office for Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University.

E-mail Address : snoisakran@yahoo.com, sansanee@biotec.or.th; limjindaporn@yahoo.com; pathai.yen@mahidol.ac.th

Project Period : 3 years (15 June 2011 – 14 June 2014)

Dengue virus (DENV) is the important causative agent of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome that are potentially life-threatening diseases affecting human population globally. At present, the underlying mechanism of dengue diseases remains unclear and no dengue vaccine is commercially available. One of the crucial viral products conceivably involved in DENV production and dengue pathogenesis is the nonstructural protein 1 (NS1). The NS1 protein expresses in multiple forms in different cellular compartments with possibly distinct functions. This study was carried out to identify host cellular proteins interacting with cell-associated NS1 in both DENV infection and NS1 transfection systems and to investigate their interactive roles in DENV life cycle and host response against DENV infection by using biochemical and proteomic approaches. As evidenced by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC MS/MS), two separate groups of novel host cellular proteins have been identified from DENV-infected HepG2 cells and NS1-expressing Huh7 cells to be potential NS1-interacting partners. Some of the selected proteins have been confirmed for their association with DENV NS1 in virus-infected cells by co-immunoprecipitation assay. Additionally, hnRNP C1/C2 were found to interact with DENV NS1 and viral RNA and moderately influence DENV life cycle at the steps of viral RNA replication and viral protein synthesis. GRP78 was also another host cellular protein interacting with DENV NS1 and likely played a role in viral protein processing. Taken together, our study provided new evidence for potential DENV NS1-interacting host cellular proteins in DENV-infected hepatocyte cells and addressed certain aspects of host protein and DENV NS1 association in DENV life cycle. Further investigation on detailed molecular mechanisms required for their specific interactions would be needed to pave the way for future research on anti-viral drug development.

Keywords : Dengue virus, NS1, interaction, LC MS/MS, siRNA-mediated gene knockdown

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5480024

ชื่อโครงการ : ระบบโปรตีนของเซลล์มนุษย์ที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน NS1 ของเชื้อไวรัสเด็งกี

ชื่อหลักวิจัย : ดร. ศันสนีย์ น้อยสคราน (หัวหน้าโครงการ) หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
รศ. ดร. นพ. ถาวรชัย ลิ้มจินดาพร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. ดร. เพท่าย เยนจิตโสมนัส หน่วยอณูเวชศาสตร์ สถานส่งเสริมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ม. มหิดล

อีเมล : snoisakran@yahoo.com, sansanee@biotec.or.th; limjindaporn@yahoo.com; pathai.yen@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (15 มิถุนายน 2554 ถึง 14 มิถุนายน 2557)

เชื้อไวรัสเด็งกีเป็นต้นเหตุสำคัญของโรคไข้เลือดออกเด็งกีและไข้เลือดออกเด็งกีที่มีภาวะช็อคซึ่งเป็นโรคที่อาจก่อให้เกิดอันตรายถึงชีวิตที่มีผลกระทบต่อประชากรมนุษย์ทั่วโลก ในปัจจุบันนี้กลไกการเกิดโรคไข้เลือดออกเด็งกียังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและยังไม่มีวัคซีนป้องกันโรควางจำหน่าย โปรตีนที่สำคัญตัวหนึ่งของเชื้อไวรัสเด็งกีที่เชื่อว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเชื้อไวรัสและการเกิดพยาธิสภาพของโรคไข้เลือดออกเด็งกีคือโปรตีนที่ไม่ใช่ส่วนโครงสร้างของเชื้อไวรัสที่เรียกว่าโปรตีน NS1 โปรตีนตัวนี้ถูกสร้างได้หลายรูปแบบในบริเวณที่ต่างกันของเซลล์และอาจทำหน้าที่ได้แตกต่างกัน งานวิจัยนี้ได้ถูกทำขึ้นเพื่อค้นหาโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน NS1 ในระบบของเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกีและในเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 และเพื่อศึกษาบทบาทของปฏิสัมพันธ์เหล่านั้นที่มีต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสและการตอบสนองของเซลล์ที่มีต่อการติดเชื้อโดยอาศัยวิธีการทางชีวเคมีและโปรตีโอมิกส์ จากหลักฐานการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องแอลซี เอ็มเอส เอ็มเอส พบว่ามีโปรตีนกลุ่มใหม่ที่แตกต่างกันจำนวน 2 กลุ่มจากเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกีและเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 ที่อาจเป็นโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน NS1 ของเชื้อไวรัสเด็งกี โปรตีนเหล่านี้บางตัวถูกยืนยันว่ามีปฏิสัมพันธ์กันจริงกับโปรตีน NS1 โดยวิธีการตกตะกอนทางอิมมูโนวิทยาาร่วมกัน นอกจากนี้โปรตีน hnRNP C1/C2 ยังถูกพบว่า มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน NS1 และสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสและมีอิทธิพลปานกลางต่อวงจรชีวิตของเชื้อไวรัสในขั้นตอนของการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมและการสร้างโปรตีนของเชื้อไวรัส โปรตีน GRP78 ยังเป็นโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านอีกหนึ่งตัวที่ถูกพบว่าจับกับโปรตีน NS1 และมีแนวโน้มว่ามีส่วนเกี่ยวกับกระบวนการสร้างโปรตีนของไวรัส โดยสรุปงานวิจัยนี้ได้นำเสนอหลักฐานใหม่เกี่ยวกับกลุ่มโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านที่อาจมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน NS1 ของเชื้อไวรัสเด็งกีและทดสอบบางแง่มุมของปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นซึ่งอาจมีผลต่อวงจรชีวิตของเชื้อไวรัส การศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกทางอณูวิทยาในเชิงละเอียดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิสัมพันธ์ที่จำเพาะของโปรตีนจะช่วยนำทางไปสู่การค้นคว้าวิจัยหายาด้านไวรัสเด็งกีได้ในอนาคต

คำหลัก : ไวรัสเด็งกี, เอ็นเอสวัน, ปฏิสัมพันธ์, แอลซี เอ็มเอส เอ็มเอส, การลดการแสดงออกของยีนโดยใช้เอสไออาร์เอ็นเอ