IDENTIFICATION OF HOST CELLULAR PROTEINS INTERACTING WITH DENGUE VIRAL NONSTRUCTURAL PROTEIN 1 IN DENGUE VIRUS-INFECTED HUMAN KIDNEY CELL LINE

SUCHADA SENGSAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2006

ISBN 974-04-7796-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การวินิจฉัยโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน NS1 ของไวรัสเด็งกี่ในเซลล์ไตของมนุษย์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ (IDENTIFICATION OF HOST CELLULAR PROTEINS INTERACTING WITH DENGUE VIRAL NONSTRUCTURAL PROTEIN 1 IN DENGUE VIRUS-INFECTED HUMAN KIDNEY CELL LINE)

สุชาดา เสียงใส 4636405 SIIM/M

วท.ม. (วิทยาภูมิคุ้มกัน)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : เพทาย เย็นจิตโสมนัส, Ph.D., ศันสนีย น้อยสคราญ, Ph.D.

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสเด็งกี่ก่อให้เกิดโรคในคนโดยมียุงเป็นพาหะและเป็นสาเหตุของโรคไข้เดงกี (DF) ไข้เลือดออก (DHF) และไข้เลือดออกที่มีภาวะช็อคร่วมด้วย (DSS) พยาธิกำเนิดของโรค DHF/DSS ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เชื่อว่าโปรตีนที่ไม่เป็นส่วนโครงสร้างของตัวไวรัส (NS1) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการก่อโรค NS1 เป็นไกลโคโปรตีนที่พบได้หลายรูปแบบในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ มีหลักฐานบ่งชี้ว่า NS1 มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของไวรัส การส่งสัญญาณภายในเซลล์ และการกระตุ้นระบบ complement ในปัจจุบันนี้ ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าโปรตีน NS1 ของไวรัสเด็งกี่มีความสัมพันธ์กับโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านและเหนี่ยวนำให้มีการติดเชื้อไวรัสและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของมนุษย์ได้อย่างไร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะหาโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านที่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน NS1 ในเซลล์ไตของคนที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่โดยวิธี coimmunoprecipitation, 2D gel electrophoresis และ mass spectrometry ผลของ 2D gel พบว่าแอนติบอดีต่อ NS1 สามารถ immunoprecipitate 8 isoforms ของ NS1 และโปรตีนที่มีขนาด 40 kDa ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ได้อย่างจำเพาะ โปรตีนชนิดหลังนี้ได้ถูกวิเคราะห์ต่อโดย mass spectrometry และพบ peptide 5 ชิ้นที่เป็นส่วนประกอบของ heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) C1/C2 ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง hnRNP C1/C2 และ NS1 ถูกยืนยันโดยการทำ coimmunoprecipitation ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะ ผลพบว่า แอนติบอดีต่อ NS1 สามารถดึงได้ทั้ง hnRNP C1/C2 และ NS1 จาก Lysates ของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส แต่แอนติบอดีต่อ hnRNP C1/C2 ไม่ให้ผลอย่างเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ hnRNP C1/C2 มีหลายหน้าที่และมีเพียงส่วนน้อยที่สามารถมีปฏิสัมพันธ์กับ NS1 ได้ การทำ sub-cellular fractionation ยังพบด้วยว่าปฏิสัมพันธ์ของโปรตีนทั้งสองนี้พบในนิวเคลียสมากกว่าในไซโตพลาสซึม ดังนั้นแนวโน้มการเกิดปฏิสัมพันธ์ของทั้งสองโปรตีนน่าจะเกิดในส่วนประกอบของเซลล์ที่ใกล้ชิดกับนิวเคลียสเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับผลของ double immunofluorescence ที่พบการ co-localization ของ hnRNP C1/C2 และ NS1 ที่บริเวณรอบๆนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ ผลที่คล้ายคลึงกันของทั้ง coimmunoprecipitation และ co-localization นอกจากจะพบในเซลล์ไตแล้ว ยังพบใน cell lines อื่นๆ ได้แก่ HepG2, HF, Eahy 926 และเซลล์ปฐมภูมิของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดด้วย นอกจากนี้ complex ของ hnRNP C1/C2 และ NS1 ยังพบว่ามีปฏิสัมพันธ์กับ RNA ของไวรัสเด็งกี่โดยการทำ RT-PCR ต่อชิ้นส่วนของไวรัสหลังจากทำ immunoprecipitation ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ถือเป็นครั้งแรกของการพบปฏิสัมพันธ์ของ NS1 และ hnRNP C1/C2 ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ และปฏิสัมพันธ์นี้พบได้ในเซลล์หลายชนิดและอาจจะมีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนไวรัส.

129 หน้า ISBN 974-04-7796-8

IDENTIFICATION OF HOST CELLULAR PROTEINS INTERACTING WITH DENGUE VIRAL NONSTRUCTURAL PROTEIN 1 IN DENGUE VIRUS-INFECTED HUMAN KIDNEY CELL LINE

SUCHADA SENGSAI 4636405 SIIM/M

M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORS : PA-THAI YENCHITSOMANUS, Ph.D., SANSANEE NOISAKRAN, Ph.D.

ABSTRACT

Dengue virus is a mosquito-borne human pathogen causing dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). The mechanisms of the pathogenesis of DHF/DSS are not clearly understood but dengue viral nonstructural protein 1 (NS1) is potentially involved. The NS1 is a glycoprotein existing in multiple forms in dengue virus-infected cells with unclear function. Several lines of evidence suggest its involvement in virus replication, signal transduction, and complement activation. At present, very little is known on how dengue NS1 associates with host cellular proteins and contributes to virus infection and host responses. This study, therefore, aimed to investigate host cellular proteins interacting with dengue NS1 in virus-infected human kidney epithelial (HEK-293T) cell line by coimmunoprecipitation, two-dimensional (2D) gel electrophoresis, and mass spectrometry. The results showed that anti-NS1 monoclonal antibody specifically precipitated eight isoforms of NS1 and an unknown 40-kDa protein from virus-infected cell lysate. Analysis of the latter protein by mass spectrometry identified five peptides which matched to human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) C1/C2. The interaction between hnRNP C1/C2 and dengue NS1 in virus-infected cells was confirmed by coimmunoprecipitation using specific antibodies. Anti-NS1 antibody could precipitate both hnRNP C1/C2 and dengue NS1 from virus-infected cell lysate; however, a similar outcome was not observed with anti-hnRNP C1/C2 antibody possibly due to only a small fraction of the multi-functional hnRNP C1/C2 associating with dengue NS1. Further investigation by sub-cellular fractionation of virus-infected cells demonstrated co-immunoprecipitation of the two proteins predominantly in the nuclear, but not the cytoplasmic fraction, thus suggesting their potential interaction in the nucleus-associated cellular compartments. Consistently, double immunofluorescence revealed partial co-localization of the two proteins in perinuclear regions of virus-infected cells. The similar results of co-immunoprecipitation and co-localization were also observed in other human target cell lines (HepG2, HF, and Eahy 926) and primary human endothelial cells (HUVEC). Furthermore, the hnRNP C1/C2 and dengue NS1 complexes seemed likely to associate with dengue viral RNA as evidenced by RT-PCR of viral fragments following immunoprecipitation. Taken together, this study demonstrated for the first time the interaction of NS1 and hnRNP C1/C2 in dengue virus-infected cells. This association was not cell-type specific and may be involved in the process of dengue virus production.

KEY WORDS : DENGUE VIRUS, NONSTRUCTURAL PROTEIN 1, HETEROGENEOUS RIBONUCLEOPROTEIN C1/C2

129 P. ISBN 974-04-7796-8