

**INTERPLAY BETWEEN B CELLS AND HIGHLY PATHOGENIC
AVIAN INFLUENZA H5N1 VIRUS (HPAI H5N1)**



PRASIT NA-EK

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2014

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

INTERPLAY BETWEEN B CELLS AND HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA H5N1 VIRUS (HPAI H5N1)

PRASIT NA-EK 5037153 SCMI/D

Ph.D. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: ARUNEE THITITHANYANONT, M.D., PRASERT AUEWARAKUL, M.D., Ph.D., SATHIT PICHYANGKUL, Ph.D., PONGSAK UTHAISINCHAROEN, Ph.D.

ABSTRACT

Major complications of avian influenza A H5N1 virus (HPAI H5N1) infection are with the systemic organs spreading. Mostly the severe cases have hematopoietic abnormality and viremia. Many types of immune cells have been reported to be targets of this virus. However, there is limited information available about B cells susceptibility. Our preliminary results demonstrated that HPAI H5N1 could infect B cells in PBMCs with much higher degree as compared with purified B-cells. The data also supported that B cells must interact with monocytes in PBMCs to increase the susceptibility to HPAI H5N1. In this study we explored the interaction of B cells and monocytes and their roles for enhancing susceptibility of B cells to this virus. After 12 hours post infection (hpi), we demonstrated that B-cells in B cells and monocytes (B/M) co-cultures and B cells in PBMCs had $36.73 \pm 29.03\%$ and $68.87 \pm 17.44\%$ of infected cells, which was significantly higher than purified B cells alone, $4.59 \pm 2.55\%$. We studied further on the presence of a sialic acid receptor on the HPAI H5N1 infected B cells, and found that the number of $\alpha(2,3)$ SA receptor positive on B cells were significantly increased from $0.72 \pm 0.08\%$ in B cells alone to $53.87 \pm 13.20\%$ in B cells in B/M co-cultures. We also demonstrated a positive correlation between numbers of cells with $\alpha(2,3)$ SA receptor and numbers of B cells with HPAI H5N1 infection in B/M co-culture, with the correlation equal to $R^2=0.98$. Moreover, we observed that the enhancement of HPAI H5N1 infection and the increasing of $\alpha(2,3)$ SA receptor on B cells in B/M co-culture required direct cell contact between monocytes and B cells. We examined that total B cells, memory B cells, and naïve B cells were susceptible to HPAI H5N1 with $33.8 \pm 2.96\%$, $29.29 \pm 2.10\%$, and $40.42 \pm 3.42\%$, respectively. The percentages of infected naïve B cells and the number of $\alpha(2,3)$ SA positive cells in naïve B cells were significantly higher than memory B cells at $48.74 \pm 14.17\%$, and $37.07 \pm 6.54\%$, respectively. These findings provide a better understanding of tropism of HPAI H5N1 to B cells and the interplay of monocytes and B cells in the viral pathogenesis.

KEY WORDS: H5N1/HPAI/ DC-SIGN/SIALIC ACID

83 pages

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างบีเซลล์ของมนุษย์และเชื้อไข้หวัดนก

INTERPLAY BETWEEN B CELLS AND HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA H5N1 VIRUS (HPAI H5N1)

ประสิทธิ์ นานอก 5037153 SCMI/D

ปร.ด. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อรุณี ธิติชัยญานนท์ , M.D., ประเสริฐ เอื้อวารกุล , M.D., Ph.D., สาธิต พิษยางกูร, Ph.D., พงศ์ศักดิ์ อุทัยสินธุเจริญ, Ph.D.

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (HPAI H5N1) สามารถทำให้เกิดการกระจายเป็นเชื้อไปในหลายเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย ในผู้ป่วยที่พบการติดเชื้อที่รุนแรงมักจะพบความผิดปกติในไขกระดูกและพบไวรัสในเลือด มีรายงานว่าเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิดสามารถติดเชื้อได้ อย่างไรก็ตามมีข้อมูลน้อยมากเกี่ยวกับการติดเชื้อในเซลล์บีลิ้มโฟไซด์ ผลการทดลองก่อนหน้านี้นี้พบว่าเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสามารถติดเชื้อในเซลล์บีลิ้มโฟไซด์เมื่ออยู่ร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาวในเลือด (PBMC) ได้ในระดับที่สูงกว่าเซลล์บีลิ้มโฟไซด์ที่แยกออกมา นอกจากนี้พบว่าเซลล์บีลิ้มโฟไซด์ต้องการปฏิสัมพันธ์กับเซลล์โมโนไซต์ใน PBMC เพื่อเพิ่มความไวในการติดเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษากันและกันระหว่างเซลล์บีลิ้มโฟไซด์และเซลล์โมโนไซต์ในการเพิ่มความไวในการติดเชื้อ ผลจากการติดเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมงพบว่าเซลล์บีลิ้มโฟไซด์มีการติดเชื้อ $36.73 \pm 29.03\%$ ในเซลล์บีลิ้มโฟไซด์ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์โมโนไซต์ $68.87 \pm 17.44\%$ ในเซลล์บีลิ้มโฟไซด์ที่อยู่ใน PBMC ซึ่งสูงมากอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ $4.59 \pm 2.55\%$ ในเซลล์บีลิ้มโฟไซด์ชนิดเดียว คณะผู้วิจัยจึงศึกษาต่อไปพบว่าปริมาณของ $\alpha(2,3)SA$ receptor บนเซลล์บีลิ้มโฟไซด์มีการเพิ่มขึ้นจากเดิม $0.72 \pm 0.08\%$ อย่างมีนัยสำคัญเป็น $53.87 \pm 13.20\%$ เมื่อเลี้ยงร่วมกับเซลล์โมโนไซต์ ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ในการติดเชื้อในเซลล์บีลิ้มโฟไซด์และปริมาณของ $\alpha(2,3)SA$ receptor มีการเพิ่มขึ้นเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ค่า $R^2=0.98$ มากไปกว่านั้นคณะผู้วิจัยพบว่าผลการศึกษาดังกล่าวต้องการการสัมผัสกันโดยตรงระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิด นอกจากนี้ระดับของการติดเชื้อ H5N1 ในเซลล์บีลิ้มโฟไซด์ชนิดต่างๆใน PBMC ยังมีความแตกต่างกันคือ $33.8 \pm 2.96\%$ ในเซลล์บีลิ้มโฟไซด์ทุกชนิด $29.29 \pm 2.10\%$ ใน memory B cells และ $40.42 \pm 3.42\%$ ใน naïve B cells คณะผู้วิจัยได้พิสูจน์ว่า naïve B cells มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณของ $\alpha(2,3)SA$ receptor $48.74 \pm 14.17\%$ ซึ่งสูงกว่า memory B cells คือ $37.07 \pm 6.54\%$ อย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้ช่วยให้เข้าใจการติดเชื้อไวรัส H5N1 ในเซลล์บีลิ้มโฟไซด์และปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์บีลิ้มโฟไซด์และเซลล์โมโนไซต์ในการก่อโรคของไวรัสชนิดนี้มากยิ่งขึ้น