Thesis Title Effect of Site-Directed Mutagenesis at the Amino Acid Positions 204 and 205 of Dengue Serotype 2 Virus prM Protein on Virus Replication

Author Mr. Kridsda Chaichoun

M. S. Microbiology

Examining Committee:

Assoc. Prof. Dr. Nopporn	Sittisombut	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Niwat	Maneekarn	Member
Assoc. Prof. Dr. Watchara	Kasinrerk	Member
Dr. Poonsook	Keelapang	Member

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

Abstract

Dengue virus, a member of genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae*, is responsible for frequent epidemics of dengue fever and dengue hemorrhagic fever in many parts of the world. A single-stranded RNA genome of dengue virus encodes a long polyprotein, which is cleaved co-translationally into three viral structural proteins and seven non-structural proteins. The immature virions of dengue contain three structural proteins: C, prM, and E, whereas mature virions that contain C, M, and E structural proteins are much more infectious than immature ones. During virion assembly and transport out of infected cells, the pr peptide is cleaved off the prM protein at a specific cleavage site with highly conserved amino acid sequence, -Arg(P4)-Xaa(P3)-Arg/Lys(P2)-Arg(P1)↓-, by the action of subtilisin-like proprotein convertase enzymes in the acidic post-Golgi vesicles, leaving M protein attached to

the virions. Previous glycine-scanning mutagenesis study of dengue prM-M cleavage junction revealed that when three basic amino acid residues at the positions 202(P4), 204(P2) and 205(P1) were replaced by glycine, virus replication in a mosquito cell line, C6/36, was markedly reduced.

To further explore the requirement for conserved basic amino acid residues at P1 and P2 positions of the prM-M cleavage site for efficient multiplication of dengue virus in C6/36 cell line, five full-length mutant cDNA clones of a dengue serotype 2 virus (strain 16681) were constructed for each position. Mutations were introduced by PCR-based site-directed mutagenesis and subsequent construction of mutant full-length cDNA clones was performed in *E. coli*. The P2 residue of the prM-M cleavage site, lysine (amino acid residue 204 of polyprotein) was replaced with alanine (K204A), arginine (K204R), aspartic acid (K204D), histidine (K204H), or serine (K204S), respectively. Similarly, arginine at the P1 position (amino acid residue 205 of polyprotein) was mutated to alanine (R205A), aspartic acid (R205D), histidine (R205H), lysine (R205K), and serine (R205S), respectively. Following verification of the mutated sequences in all full-length cDNA clones by nucleotide sequence analysis and/or restriction enzyme digestion, linearized full-length cDNA clones were transcribed *in vitro* in the presence of cap analog using SP6 RNA polymerase. RNA transcripts were transfected into C6/36 cell line and production of infectious viruses was monitored on days 4, 7, 11, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 after transfection by using dot blot immunoassay and virus titration with a porcine kidney cell line (PS clone D).

Among five P2 mutants, only the K204R mutant was viable. The replication profile of the K204R mutant and its burst size were similar to the parental virus. This mutant was detected as early as day 11 after transfection (2.73×10^4 ffu/mL) and its titer reached peak level in the second week (2.64×10^7 ffu/mL). The K204R mutant displayed only large foci from the beginning (day 11) to the end of the two-month

observation period. Among five P1 mutants, only the R205K mutant was detected but with quite distinct replication pattern. The R205K mutant was first detected on day 14 after transfection at a very low titer (4.00 $x10^1$ ffu/mL); subsequently its titer remains almost the same on days 14, 21 and 28 (4.00 $x10^1$ to 1.36 $x10^2$ ffu/mL). During this time the burst size of the R205K mutant was reduced by 33 folds when compared with the parent virus. On days 35, 42, 49 and 56 after transfection, its titers rose to high level (2.18 $x10^4$ to 1.27 $x10^7$ ffu/mL). The acquisition of high titer in the R205K culture corresponded with the appearance of viruses capable of generating large infected foci in porcine kidney cells. Nucleotide sequence analysis of the prM-M region of R205K mutant viruses collected on days 14, 21, 35, and 42 post transfection revealed the presence of a revertant virus containing the back mutation at the nucleotide position 710 (adenine to guanine) which was first detected on day 35 after transfection; the revertant completely replaced the original R205K mutant by day 42. This reversion resulted in the amino acid arginine at the P1 position instead of the intended lysine. Of the remaining eight mutants, infectious virus was not detected by titration in porcine kidney cells for at least 8 weeks after transfection of *in vitro* mutant transcripts into C6/36 cells.

The results indicate the requirement for strongly basic amino acid (arginine or lysine) at the amino acid positions 204 of dengue polyprotein (P2 position of the prM-M cleavage junction) for virus multiplication in mosquito cells. However, there appears to be a strict requirement for arginine at the P1 position because the R205K mutant was not efficient in its replication in C6/36 cells. Multiplication could reach a high level only when the R205K mutant reverted. These results agree well with the consensus sequence of the prM-M junction of flaviviruses found in nature.

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 204 และ 205 ของโปรตีน prM ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ ซีโรทัยป์ 2

ผู้เขียน นาย กฤษฎา ใจชื้น

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์:

รศ. นพ. นพพร	สิทธิสมบัติ	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. นิวัตน์	มณีกาญจน์	กรรมการ
รศ. ดร. วัชระ	กสิณฤกษ์	กรรมการ
ดร. พูนสุข	กีฬาแปง	กรรมการ

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสเด็งกี่เป็นเชื้อไวรัสในสกุล *Flavivirus* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ *Flaviviridae* การระบาดของเชื้อไวรัสเด็งกี่พบได้บ่อยในหลายภูมิภาคของโลกและเป็นสาเหตุของโรคไข้เด็งกี่ และ โรคไข้เลือดออกเด็งกี่ เชื้อไวรัสชนิดนี้มีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยวจำนวนหนึ่งเส้นและถูกใช้เป็นแม่แบบสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนขนาดยาว (polyprotein) หนึ่งชนิดซึ่งภายหลังถูกตัดย่อยได้เป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) 3 ชนิด และโปรตีนที่มิได้เป็นองค์ประกอบของอนุภาคไวรัส (non-structural protein) อีก 7 ชนิด อนุภาคไวรัสเด็งกี่ในรูปแบบที่ยังไม่จัดเรียงโปรตีนในอนุภาคอย่างสมบูรณ์ (immature virion) ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 3 ชนิดคือ โปรตีน C, โปรตีน prM และ โปรตีน E ขณะที่อนุภาคไวรัสในรูปแบบที่พร้อมจะ

เข้าติดต่อสู่เซลล์ (mature virion) มีโปรตีนโครงสร้างเป็น โปรตีน C, โปรตีน M และโปรตีน E การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของอนุภาคไวรัสเกิดขึ้นในขั้นตอนการประกอบตัวของอนุภาคและในระหว่างขั้นตอนการส่งอนุภาคไวรัสออกนอกเซลล์ที่ติดเชื้อ การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการตัดโปรตีน prM ในบริเวณลำดับกรดอะมิโน –Arg(P4)-Xaa(P3)-Arg/Lys(P2)-Arg(P1)↓- ที่เป็นเป้าหมายของการตัดโดยเอนไซม์กลุ่ม subtilisin-like proprotein convertase และผลจากการตัดโดยเอนไซม์กลุ่มนี้ทำให้ pr peptide ถูกตัดออกไปและได้โปรตีน M คงอยู่ที่อนุภาคไวรัส ก่อนหน้านี้ มีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบริเวณที่ถูกตัดในโปรตีน prM โดยได้เปลี่ยนกรดอะมิโนจากเดิมเป็น glycine ทีละตำแหน่ง และพบว่าการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่มีประจุบวกใน 3 ตำแหน่งคือ กรดอะมิโนที่ 202(P4), 204(P2) และ 205(P1) มีผลกระทบต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่อย่างมากจนตรวจไม่พบการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งดังกล่าวได้

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความต้องการกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (basic amino acid) ในตำแหน่ง P1 และ P2 ของส่วนที่ถูกตัดของโปรตีน prM และผลของการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งทั้งสองต่อความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ในเซลล์ยุง C6/36 โดยได้ดำเนินการสร้าง full-length cDNA clone ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ ซีโรทัยป์ 2 (สายพันธุ์ 16681) ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่ง P2 และ P1 ของโปรตีน prM ส่วนที่ถูกตัดตำแหน่งละ 5 รูปแบบ การสร้าง full-length cDNA clone ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งทั้งสองเหล่านี้ ใช้วิธี PCR-based site-directed mutagenesis และเทคนิคการตัดต่อยีนภายใน พลาสมิดตลอดจนอาศัยการเพิ่มจำนวนพลาสมิดในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง P2 (กรดอะมิโนที่ 204) ซึ่งแต่เดิมเป็น lysine ได้ถูกเปลี่ยนเป็น alanine (K204A), aspartic acid (K204D), histidine (K204H), arginine (K204R) และ serine (K204S) ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน ตำแหน่ง P1 (กรดอะมิโนที่ 205) ซึ่งแต่เดิมเป็น arginine ได้ถูกเปลี่ยนเป็น alanine (R205A), aspartic acid (R205D), histidine (R205H), lysine (R205K) และ serine (R205S) ตามลำดับ ลำดับเบสที่ถูกเปลี่ยนในขั้นการสร้าง mutant full-length cDNA นั้น ถูกตรวจสอบโดย

การวิเคราะห์ลำดับเบสร่วมกับการย่อยด้วย restriction enzyme ที่จำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบนั้นๆ จากนั้นใช้ linearized full-length cDNA เป็นแม่แบบของการสร้าง genomic-length RNA ในหลอดทดลองโดยเอนไซม์ SP6 RNA polymerase และนำเข้าสู่เซลล์ยุง C6/36 เพื่อให้มีการสร้างโปรตีนของเชื้อไวรัสแล้วประกอบกันเข้าเป็นอนุภาคไวรัส เชื้อไวรัสที่สร้างขึ้นจากเซลล์ C6/36 ภายหลังจากนำ RNA เข้าสู่เซลล์ในวันที่ 4, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 และวันที่ 56 ถูกตรวจหาโดยวิธี dot immunoassay และวัดปริมาณเชื้อไวรัสโดยวิธี focus immunoassay โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้จากไตสุกร (PS clone D cell line)

ผลการตรวจหาเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่ง P2 (กรดอะมิโนที่ 204) พบว่าสามารถตรวจพบเฉพาะเพียงเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ K204R ซึ่งมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและมีขนาด focus ในเซลล์ PS clone D ใหญ่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสต้นตอ เชื้อไวรัส K204R ถูกตรวจพบครั้งแรกในวันที่ 11 หลังจากนำ RNA เข้าเซลล์ที่ความเข้มข้น 2.73 $x10^4$ ffu/mL และพบความเข้มข้นของไวรัสสูงสุดที่ 2.64 x 10^7 ffu/mL ในวันที่ 14 หลังจากนำ RNA เข้าเซลล์ ลักษณะกลุ่มเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ (focus) โดยเชื้อไวรัส K204R มีขนาดใหญ่ตั้งแต่ช่วงต้นและพบลักษณะเช่นนี้จนถึงช่วงท้ายตลอดระยะเวลา 2 เดือนของการติดตามผล ส่วนการตรวจหาเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง P1 (กรดอะมิโนที่ 205) พบว่าสามารถตรวจพบได้เพียง เชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบ R205K ซึ่งตรวจพบครั้งแรกในวันที่ 14 หลังจากนำ RNA เข้าเซลล์ ที่ปริมาณ 4.00 $x10^1$ ffu/mL พบว่าเชื้อไวรัส R205K ที่ได้ในวันที่ 14, 24 และวันที่ 28 หลังการนำ RNA เข้าสู่เซลล์มีความสามารถในการเพิ่มอยู่ในระดับต่ำ (4.00 $x10^1$ ถึง 1.36 $x10^2$ ffu/mL) และลักษณะกลุ่มเซลล์ที่ถูกติดเชื้อ (focus) โดยเชื้อไวรัสนี้มีขนาดลดลง 33 เท่าเมื่อเทียบกับไวรัสต้นตอ แต่ภายหลังจากวันที่ 35 จนถึงวันที่ 56 พบว่าเชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ในระดับสูง (2.18 $x10^4$ ถึง 1.27 $x10^7$ ffu/mL) ซึ่งสัมพันธ์กับการเปลี่ยนขนาด focus ของเชื้อนี้ การตรวจสอบลำดับเบสของเชื้อไวรัส R205K ที่ได้ในวันที่ 14, 21, 35 และวันที่ 42 พบการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมที่ลำดับเบสที่ 710 จาก adenine เป็น guanine ซึ่งพบครั้งแรกในเชื้อ R205K ที่เก็บจากวันที่ 35 และพบการเปลี่ยนของลำดับเบสนี้โดยสมบูรณ์ในเชื้อ

R205K ที่เก็บได้ในวันที่ 42 หลังการนำ RNA เข้าสู่เซลล์ การเปลี่ยนรหัสพันธุกรรมในลำดับเบสที่ 710 จาก adenine เป็น guanine นี้ทำให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนกลับจาก lysine เป็น arginine เหมือนเชื้อไวรัสต้นตอ ส่วนการเปลี่ยนแปลงในโปรตีน prM อีก 8 แบบนั้นไม่พบการเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัสในช่วง 8 สัปดาห์หลังจากนำ RNA เข้าสู่เซลล์ C6/36 และหาปริมาณเชื้อไวรัสโดยวิธี focus immunoassayในเซลล์ PS clone D

ผลการทดลองแสดงว่า ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 204 ใน polyprotein ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ (ตำแหน่ง P2 ของบริเวณที่ถูกตัดโดยกลุ่มเอนไซม์ proprotein convertase) จำเป็นต้องมีกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (strongly basic amino acid) ซึ่งได้แก่ arginine และ lysine แต่เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งก็ได้สำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ในเซลล์ยุง C6/36 ในระดับสูง ในขณะที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 205 ใน polyproteinของเชื้อ ไวรัสเด็งกี่ (ตำแหน่ง P1 ของบริเวณที่ถูกตัดโดยกลุ่มเอนไซม์ proprotein convertase) ต้องเป็นกรดอะมิโน arginine เท่านั้น จึงจะส่งผลให้ เชื้อไวรัสเด็งกี่เพิ่มจำนวนในเซลล์ยุง C6/36 ได้เป็นอย่างดี ซึ่งเห็นได้จากเชื้อไวรัส R205K ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ แต่อยู่ในระดับต่ำ แต่เมื่อเชื้อ ไวรัสมีการเปลี่ยนกลับ (reversion) ของกรดอะมิโนที่ 205 นี้เป็น arginine จึงจะทำให้เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ในระดับสูง ผลการศึกษาในตำแหน่ง P1 และ P2 นี้สอดคล้องกับลำดับกรดอะมิโนบริเวณที่ถูกตัดในโปรตีน prM ของเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆในกลุ่ม flavivirus ที่พบในธรรมชาติ