Thesis Title Effect of the Amino Acid Replacement at the Positions 201(P5) and 202(P4) of PrM-M Junction on Dengue Virus Replication

Author Miss Prakaimuk Saraithong

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

Abstract

Dengue virus causes dengue fever and the severe disease of dengue hemorrhagic fever, which are of increasing concern in many parts of the world. This virus is arthropod-borne pathogens of genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. In common with other flaviviruses, dengue viruses contain an 11-kb single-stranded RNA genome of positive polarity encoding a polyprotein in an open reading frame. The polyprotein is cleaved by host- and virus-encoded proteases to three structural and seven nonstructural proteins. Immature dengue virions contain three structural proteins, designated C (capsid), E (envelope) and prM (precursor M protein). PrM protein is cleaved to M by subtilisin-like proprotein convertase(s) in the trans-Golgi network to generate mature virions. This cleavage occurs after the amino acid sequence Arg^{P4}-X^{P3}-Arg/Lys^{P2}-Arg^{P1} (X, any amino acids). A previous glycine-scanning mutagenesis study of the amino acid positions 199 to 206 at dengue prM-M

junction revealed viable viruses with mutations at each of the following five amino acid positions; 199(P7), 200(P6), 201(P5), 203(P3) and 206(P1'), whereas mutant viruses could not be detected at other three amino acid positions: 202(P4), 204(P2) and 205(P1).

The purpose of this study is to determine the importance of basic amino acid residues at the positions 201(P5) and 202(P4) in the prM-M junction of dengue serotype 2 (strain 16681) for efficient multiplication of dengue virus in the C6/36 mosquito cell line. Two arginine residues at the positions 201(P5) and 202(P4) of the wild type genome were alternately mutated into five different amino acids; lysine, histidine, serine, alanine and aspartic acid to generate ten different mutant viruses. The construction of mutant full-length cDNA clones was conducted by replacing the 13-residue wild type sequence with specifically designed oligonucleotides, and performing subsequent ligation steps to generate mutant full-length plasmid clones in *E. coli*. Restriction enzyme digestion and/or nucleotide sequence analysis was used on mutated sequences of these cDNA clones for proving that they were mutated. The linearized plasmids were then used as templates for the production of mutant genome-length capped RNA by *in vitro* transcription. Following transfection of capped *in vitro* transcripts into C6/36 mosquito cell line, the culture media was tested for the presence of viral proteins and infectious mutant dengue viruses, respectively, by dot blot immunoassay and focus immunoassay.

In a transfection experiment employing *in vitro* transcripts containing mutations at the position R201(P5), all five new mutant viruses (R201K, R201H, R201S, R201A and R201D) were recovered, although the R201D virus replicated to a lower level than the others. The four mutant viruses (R201K, R201H, R201S and R201A) were detected in the culture media on day 4 after transfection and their highest titer was greater than or equal to 10^5 FFU/ml, which was similar to the level obtained from transfection with the wild type dengue RNA transcript. The R201D

virus was detected late on day 11 after transfection at a very low level of about 10 FFU/ml; this level was maintained for two weeks. In the transfection experiment employing *in vitro* transcripts with mutations at the position R202(P4), only three mutant viruses (R202K, R202H and R202A) were recovered and their infectious titers were less than those observed with the wild type transcript. On day 11 after transfection, the R202K virus was detected by focus immunoassay; its highest titer was 4.14×10^4 FFU/ml. On day 14 after transfection, the R202H virus was detected by the same method at the comparable highest titer of 4.50×10^4 FFU/ml. In contrast the R202A virus was detected on day 28 of transfection, although its highest titer was also similar to the other two mutant viruses (5.10×10^4 FFU/ml). Intended mutations in these eight mutant viruses were confirmed by restriction enzyme digestion or nucleotide sequence analysis of their reverse transcriptase-polymerase chain reaction products.

The results indicate that efficient multiplication of dengue virus occur with many types of amino acid side chain at the position 201(P5) of its prM-M junction, with an exception of the negatively charged side chain. In contrast, efficient dengue replication requires strongly basic side chain, especially arginine, at the position 202 (P4) of the prM-M junction. It is possible that the negatively charged side chains at the position 201(P5) and many amino acids lacking strongly dissociating basic side chains at the position 202(P4) of dengue prM-M junction render this junction unsuitable for cleavage by mosquito proprotein convertase, thereby reducing the maturation and subsequent releasing of dengue virus out of infected cells. Based on these results, it is likely that substrate requirements at the P4 and P5 positions for mosquito proprotein convertases are similar to their homologs in many other animals.

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 201(P5) และ 202(P4) ของ PrM-M junction ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่

ผู้เขียน นางสาว ประกายมุกด์ สาหร่ายทอง

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์:

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

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสเด็งกี่เป็นสาเหตุของโรคไข้เด็งกี่และโรคไข้เลือดออกที่รุนแรงซึ่งพบระบาดในหลายภูมิภาคของโลก เชื้อไวรัสชนิดนี้มีแมลงเป็นพาหะจัดอยู่ในสกุล *Flavivirus* ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ *Flaviviridae* เชื้อไวรัสเด็งกี่เหมือนกับเชื้อในกลุ่ม flavivirus อื่น ๆ คือมีสารพันธุกรรมขนาดประมาณ 11 kb ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอสายบวกจำนวนหนึ่งเส้นและจะถูกใช้เป็นแม่แบบสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนขนาดยาว (polyprotein) จากหนึ่ง open reading frame ต่อมาโปรตีนสายยาวนี้จะถูกตัดออกได้เป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) 3 ชนิดและโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างของอนุภาคไวรัส (nonstructural protein) อีก 7 ชนิดโดยอาศัยเอนไซม์ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อหรือเอนไซม์ของเชื้อไวรัสเอง อนุภาคของเชื้อไวรัสที่ยังไม่สมบูรณ์ (immature virion) ประกอบด้วยโปรตีนโครงสร้าง 3 ชนิดได้แก่ โปรตีน C, โปรตีน E และโปรตีน prM ซึ่งโปรตีนในส่วน prM จะถูกตัดออกเหลือแต่โปรตีน M โดยเอนไซม์ในกลุ่ม subtilisin-like proprotein convertase ใน

trans-Golgi network เพื่อให้ได้เป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ (mature virion) โดยจะทำการตัดหลังลำดับกรดอะมิโน Arg^{P4}-X^{P3}-Arg/Lys^{P2}-Arg^{P1} (X, กรดอะมิโนอื่นๆ) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบริเวณที่ถูกตัดระหว่าง prM-M junction โดยทำการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ตำแหน่งกรดอะมิโน 199 ถึง 206 ให้เป็น glycine ทีละตำแหน่ง พบว่าการเปลี่ยนแปลง 5 ตำแหน่งได้แก่ตำแหน่งกรดอะมิโน 199(P7), 200 (P6), 201(P5), 203(P3) และ 206(P1') สามารถที่จะตรวจพบเชื้อไวรัสใหม่ได้ แต่การเปลี่ยนแปลงอีก 3 ตำแหน่งได้แก่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 202(P4), 204(P2) และ 206(P1) ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสใหม่

ในการศึกษาครั้งนี้วัตถุประสงค์คือเพื่อศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (basic amino acid) ในตำแหน่งกรดอะมิโน 201(P5) และ 202(P4) ของส่วนตัดระหว่าง prM-M junction ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 ขณะที่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ในเซลล์ยุง C6/36 โดยกรดอะมิโน arginine ที่พบในทั้งสองตำแหน่งเดิมจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นกรดอะมิโนอื่นๆ อีก 5 ชนิดได้แก่ lysine, histidine, serine, alanine และ aspartic acid รวมทั้งสิ้น 10 แบบ โดยเริ่มจากการสร้าง mutant full-length cDNA clone ซึ่งใช้วิธีการสังเคราะห์ชิ้นนิวคลิโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่ต้องการเข้ามาใส่แทนที่กรดอะมิโนเดิมของเชื้อไวรัสต้นตอรวม 13 ตำแหน่งโดยใช้เทคนิคการตัดต่อยีนภายในพลาสมิดรวมทั้งอาศัยการเพิ่มจำนวนในเชื้อแบคทีเรีย (*E. coli*) และมีการตรวจสอบตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ด้วยการตัดด้วย restriction enzyme และ/หรือการวิเคราะห์ลำดับเบส ต่อมา linearized plasmid ถูกนำไปใช้เป็นแม่แบบในการสร้าง mutant genome-length RNA ในหลอดทดลองและถูกนำเข้าสู่เซลล์ยุง C6/36 หลังจากนั้นจึงนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบหาโปรตีนของเชื้อไวรัสเด็งกี่โดยวิธี dot blot immunoassay และการวัดปริมาณเชื้อไวรัสโดยใช้วิธี focus immunoassay

การทดลองในการนำ *in vitro* transcripts ที่มีการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 201(P5) เข้าสู่เซลล์ยุง สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้ง 5 ชนิด (R201K, R201H, R201S, R201A และ R201D) แต่พบว่าความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส R201D ต่ำกว่าเชื้อไวรัสตัวอื่น ๆ โดยเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลง

ทั้ง 4 แบบ (R201K, R201H, R201S และ R201A) สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในวันที่ 4 หลังจากนำอาร์เอ็นเอเข้าสู่เซลล์ยุงและปริมาณของเชื้อไวรัสสูงสุดอยู่ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 10^5 FFU/ml ซึ่งให้ผลคล้ายกับการนำ genomic RNA เชื้อไวรัสต้นตอเข้าสู่เซลล์ยุง ส่วนเชื้อไวรัส R201D ถูกตรวจพบได้ช้าในวันที่ 11 และปริมาณของเชื้อไวรัสอยู่ที่ 10 FFU/ml ตลอดสองสัปดาห์ ส่วนการทดลองในการนำ *in vitro* transcripts ที่มีการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 202(P4) เข้าสู่เซลล์ยุงสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลง 3 แบบคือ R202K, R202H และ R202A ซึ่งเชื้อไวรัสใหม่ทั้ง 3 ชนิดมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสต่ำกว่าเชื้อไวรัสต้นตอ โดยเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลง R202K สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสด้วยวิธี focus immunoassay ได้ในวันที่ 11 และปริมาณเชื้อไวรัสสูงสุดที่อยู่ที่ 4.14×10^4 FFU/ml ส่วนเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลง R202H สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสด้วยวิธีเดียวกันได้ในวันที่ 14 ซึ่งปริมาณเชื้อไวรัสสูงสุดอยู่ที่ 4.50×10^4 FFU/ml และเชื้อไวรัสที่มีการเปลี่ยนแปลง R202A สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในวันที่ 28 ซึ่งปริมาณเชื้อที่สูงสุดคล้ายกับเชื้อไวรัสสองตัวแรกคือ 5.10×10^4 FFU/ml เชื้อไวรัสใหม่ทั้ง 8 ชนิดได้ถูกพิสูจน์ยืนยันว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่กรดอะมิโนตามตำแหน่งที่ต้องการจริงโดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction แล้วย่อยด้วย restriction enzyme หรือการวิเคราะห์ลำดับเบส

ผลการทดลองนี้แสดงว่าตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 201(P5) บริเวณ prM-M junction ของเชื้อไวรัสเด็งกี่สามารถถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนอื่นๆได้ยกเว้นกรดอะมิโนที่มีประจุลบ ส่วนที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 202(P4) บริเวณ prM-M junction ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ค่อนข้างจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (strongly basic amino acid) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโน arginine คาดว่าเมื่อทั้งสองตำแหน่งถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากนี้อาจทำให้เอนไซม์กลุ่ม proprotein convertase ของยุงไม่สามารถตัดตรงตำแหน่งนี้ได้และส่งผลลดการพัฒนาอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์รวมถึงการปล่อยอนุภาคไวรัสเด็งกี่ออกจากเซลล์ยุง ผลการศึกษาในครั้งนี้บ่งชี้ว่าความต้องการกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง P4 และ P5 ของเอนไซม์ในกลุ่ม proprotein convertase ของยุงคล้ายคลึงกับความจำเพาะของเอนไซม์กลุ่มเดียวกันนี้ในสิ่งมีชีวิตอื่นหลายชนิด