Thesis Title Effect of Changing Positively-charged and Negatively-charged Amino Acid Sequences Proximal to Pr-M Cleavage Junction on Replication of Dengue Virus

Author Mr. Adisak Songjaeng

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee:

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

ABSTRACT

Dengue virus, the causative agent of dengue fever and dengue hemorrhagic fever, belongs to the genus *Flavivirus*. Replication of flaviviruses occurs in the cytoplasm of infected cells and virions are exported via the secretory pathway. During transport, a virion protein, prM, is proteolytically cleaved by furin. Cleavage of prM allows rearrangement of another envelope protein, E, into homodimer, resulting in the mature virion morphology with high infectivity. Unlike many flaviviruses, not all prM molecules on dengue virions is cleaved, possibly due to the differences in amino acid sequence at the pr-M junction. In a previous study on the influence of the 13-amino acid region at the pr-M junction on prM cleavage efficiency, the JEVpr/16681 mutant was constructed by replacing with the homologous region derived from Japanese encephalitis virus. Cleavage of prM was greater in JEVpr/16681 than the parent strain; but, unexpectedly, its replication was reduced. It is not yet clear which of the three types of amino acid differences (the two uncharged residues at the positions P6 and P9, an absence of two negative charges at

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

the positions P3 and P7, or the presence of three additional positive charges at the positions P8, P10, P13) of the pr-M junction is responsible for enhanced prM cleavage and the altered virus phenotype of JEVpr/16681. To answer this question, the effect of having different uncharged residues at positions P6 and P9 was investigated by constructing the mutant 16681pr(+7, -0) by substituting serine (P6) and threonine (P9) in JEVpr/16681 with methionine and histidine, respectively, as in the parent strain. The mutant 16681pr(+7, -0) was viable after transfection of capped RNA transcripts into C6/36 cells. When compared with the parent strain, the virus titer, focus size and kinetics of infection observed in 16681pr(+7, -0) were not distinguishable from JEVpr/16681. This result indicates that the two uncharged residues at P6 and P9 are not involved in reducing the replication of JEVpr/16681. The effect of an absence of two negative charges at P3 and P7 was next examined by constructing the mutant 16681pr(+4, -0) in which the two glutamic acid residues present in the parent virus were substituted with histidine and serine, respectively, as in JEVpr/16681. The mutant 16681pr(+4, -0) replicated as efficiently in C6/36 cells as the parent strain; however, its focus size and the kinetics of infection in PS cells were lower than the parent virus, but not to the same extent as JEVpr/16681. This result indicates that an absence of two negative charges at P3 and P7 of pr-M cleavage junction causes some reduction in the replicative ability of dengue virus. Similar effect was observed with the mutant 16681pr(+7, -2), which was constructed by substituting the three uncharged residues at the positions P8, P10 and P13 with arginine as occurred in JEVpr/16681. Therefore, the reduction of replication as detected in JEVpr/16681 was likely to be due to the combination of the absence of two negative charges and an increase of three positive charges in the pr-M junction proximal region. In addition, the mutant 16681pr(+9, -0) was constructed by changing five uncharged residues at the positions P7, P8, P10, P11, and P13 of the parent virus into arginine. The mutant 16681pr(+9, -0) was viable in capped RNA- transfected C6/36 cells. The virus titer, focus size and kinetics of infection of 16681pr(+9, -0) were clearly reduced from those of JEVpr/16681 and other mutants. Therefore, a further increase in the positive charge content in the 13-amino acid region proximal to the pr-M cleavage junction from that of JEVpr/16681 can still affect dengue virus replication in both PS and C6/36 cells.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนที่มีประจุบวกและประจุลบบริเวณรอยต่อของโปรตีน PrM ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่

ผู้เขียน นายอดิศักดิ์ ส่งแจ้ง

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. นพพร	สิทธิสมบัติ	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. นิวัตน์	มณีกาญจน์	กรรมการ
รศ. ดร. วัชระ	กสินฤกษ์	กรรมการ
อ. ดร. พูนสุข	กีฬาแปง	กรรมการ

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสเด็งกี่ เป็นสาเหตุของโรคไข้เด็งกี่ และโรคไข้เลือดออก จัดอยู่ใน genus *Flavivirus* เพิ่มจำนวนได้ใน cytoplasm ของเซลล์ที่ติดเชื้อ โดยที่อนุภาคไวรัสเกิดใหม่จะถูกส่งผ่านระบบ secretory pathway ออกสู่นอกเซลล์ ในระหว่างการส่ง โปรตีน prM บนผิวอนุภาคจะถูกตัด โดยเอนไซม์กลุ่ม proprotein convertase ชนิด furin ส่งผลให้มีการจับตัวของโปรตีน E เป็นคู่ และพัฒนาไปเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์ที่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ใหม่ได้ ในเชื้อไวรัสเด็งกี่ การตัดโปรตีน prM ไม่ได้เกิดขึ้นกับโปรตีน prM ทุกโมเลกุลดังเช่นเชื้อในกลุ่ม Flavivirus หลายชนิด ซึ่งคาดว่าเป็นเพราะลำดับกรดอะมิโนบริเวณรอยต่อของเชื้อไวรัสเด็งกี่แตกต่างไปจากเชื้อ Flavivirus ชนิดอื่น ก่อนหน้านี้ได้มีการศึกษาอิทธิพลของลำดับกรดอะมิโนบริเวณรอยต่อ โดยสร้างเชื้อไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ JEVpr/16681 ขึ้นให้ลำดับกรดอะมิโน 13 ตำแหน่งบริเวณรอยต่อที่จะถูกตัดของโปรตีน prM ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ถูกแทนที่ด้วยลำดับกรดอะมิโนจากเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ (Japanese encephalitis virus, JEV) พบว่า โปรตีน prM ของเชื้อไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ JEVpr/16681 ถูกตัดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน แต่การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสนี้กลับลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับเชื้อไวรัสเด็งกี่ต้นตอสายพันธุ์ 16681 จึงเกิดข้อสงสัยว่า การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ JEVpr/16681 ที่เปลี่ยนไป เป็นผลจากความแตกต่างกันอย่างไรในลำดับกรดอะมิโน 13 ตำแหน่งบริเวณรอยต่อระหว่างเชื้อไวรัสเด็งกี่และเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบ เช่น ความแตกต่างของกรดอะมิโนที่ไม่มีประจุ 2 ตำแหน่ง (P6 และ P9) หรือ การเปลี่ยนกรดอะมิโนที่มีประจุลบ 2 ตำแหน่ง (P3 และ P7) เป็นชนิดที่ไม่มีประจุ หรือ การเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ไม่มีประจุ 3 ตำแหน่ง (P8, P10 และ P13) ให้เป็นชนิดที่มีประจุบวก เพื่อศึกษาผลของความแตกต่างดังกล่าวต่อคุณสมบัติของเชื้อไวรัสเด็งกี่ จึงได้ทำการสร้างเชื้อไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ 16681pr(+7,-0) ขึ้นในหลอดทดลองให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ไม่มีประจุ Serine (P6) และ Threonine (P9) ในเชื้อสายพันธุ์ JEVpr/16681 ไปเป็นกรดอะมิโน Methionine และ Histidine ตามลำดับเหมือนกับเชื้อไวรัสเด็งกี่ต้นตอ แต่ยังคงกรดอะมิโนอื่นๆเหมือนกับเชื้อ JEVpr/16681 พบว่า เชื้อไวรัสเด็งกี่กลายพันธุ์ 16681pr(+7,-0) เพิ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนได้ไม่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์ JEVpr/16681 ทั้งในเซลล์ C6/36 และ PS ซึ่งบ่งชี้ว่าความแตกต่างของกรดอะมิโนที่ไม่มีประจุดังกล่าวไม่เกี่ยวข้องกับการลดลงของเชื้อไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ JEVpr/16681 ในการศึกษาต่อมา ได้สร้างเชื้อไวรัสเด็งกี่กลายพันธุ์ 16681pr(+4,-0) โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนที่มีประจุลบที่ตำแหน่ง P3 และ P7 ของเชื้อต้นตอ ให้เป็นชนิดที่ไม่มีประจุเหมือนในสายพันธุ์ JEVpr/16681 และคงลำดับกรดอะมิโนอื่นเหมือนเชื้อต้นตอ พบว่าเชื้อไวรัส 16681pr(+4,-0) สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ C6/36 ได้ใกล้เคียงกับเชื้อต้นตอและยังสูงกว่าที่พบในสายพันธุ์ JEVpr/16681 อย่างชัดเจน แม้ว่าขนาด focus และอัตราการเพิ่มจำนวนในเซลล์ PS ของเชื้อไวรัสกลายพันธุ์นี้จะต่ำกว่าเชื้อต้นตอก็ตาม ดังนั้น การลดลงของกรดอะมิโนที่มีประจุลบที่ตำแหน่ง P3 และ P7 ของบริเวณรอยต่อของโปรตีน prM มีผลกระทบการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ให้ลดลงได้บางส่วน แต่ไม่มากเท่าที่พบในสายพันธุ์ JEVpr/16681 ในทำนองเดียวกันเชื้อไวรัสเด็งกี่กลายพันธุ์ 16681pr(+7,-2) ที่ถูกสร้างขึ้นให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง P8, P10 และ P13 บริเวณรอยต่อของโปรตีน prM ให้เป็นกรดอะมิโนที่มีประจุบวก สามารถเพิ่มจำนวนทั้งในเซลล์ C6/36 และ PS ได้สูงกว่าเชื้อสายพันธุ์ JEVpr/16681 แต่ก็ต่ำกว่าเชื้อต้นตอ ข้อมูลที่ได้บ่งชี้ว่า การเพิ่มกรดอะมิโนที่มีประจุบวก 3 ตำแหน่งบริเวณรอยต่อของโปรตีน prM ส่งผลให้การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสลดลงได้บางส่วนไม่มากเท่าที่พบในสายพันธุ์ JEVpr/16681 ในการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อไวรัสเด็งกี่กลายพันธุ์ 16681pr(+4,-0) และ 16681pr(+7,-2) นี้ จึงสรุปได้ว่า การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่กลายพันธุ์ JEVpr/16681 ที่ลดลง น่าจะเป็นผลจากการลดลงของกรดอะมิโนที่มีประจุลบร่วมกับการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนที่มีประจุบวกในบริเวณรอยต่อที่จะถูกตัดของโปรตีน prM นอกจากนี้ ยังได้สร้างเชื้อไวรัสเด็งกี่กลายพันธุ์ 16681pr(+9,-0) ให้มีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกบริเวณรอยต่อของโปรตีน prM เพิ่มขึ้นอีกเป็น 5 ตำแหน่ง (P7, P8, P10, P11 และ P13) และพบว่า เชื้อไวรัสกลายพันธุ์นี้ยังสามารถเพิ่มจำนวนได้แต่ระดับไวรัสสูงสุด ขนาด focus และอัตราการเพิ่มจำนวนลดลงต่ำกว่าสายพันธุ์ JEVpr/16681 อย่างชัดเจน แสดงว่าการเพิ่มลำดับกรดอะมิโนที่มีประจุบวกบริเวณรอยต่อของโปรตีน prM มากขึ้นกว่าที่มีในสายพันธุ์ JEVpr/16681 ส่งผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ให้ลดลงยิ่งขึ้นอีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved