Thesis Title Amino Acid Changes in the pr-M Junction that Affect Release of Dengue Virus Particles

Author Mr. Matthawee Lausumpao

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisor Assoc. Prof. Dr. Nopporn Sittisombut, M.D.

ABSTRACT

Dengue virus infection is a major global public health problem since half a million DHF cases are annually reported around the world. Dengue virus belongs to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. A dengue virion contains a single-stranded RNA genome about 11 kb containing one long open reading frame which serves as a template for the translation of three structural proteins (C, prM and E) and seven nonstructural proteins. The virion assembles at the ER membrane and an immature virion is then released into the ER lumen and transported through the secretory pathway. Shortly before the particle release, prM protein on the surface of immature particle is cleaved at the furin consensus sequence located at the pr-M junction by furin, leaving the M portion on the particle and allowing maturation of the virion to occur.

While similar furin consensus sequences are found in many other flaviviruses, the efficiency of cleavage of dengue virus prM has been shown to be lower than other flaviviruses. When the 13-amino acid sequence just proximal to the pr-M junction of a dengue serotype 2 virus, strain 16681, was replaced with a homologous sequence from Japanese encephalitis virus (JEV), the level of prM cleavage was enhanced, but there was a delayed export of infectious virus particles out of the infected cells (Keelapang et al., 2004).

A comparison of amino acid residues in the replaced region of the JEVpr/16681 virus and the parental strain reveals three types of amino acid substitutions: 1) the substitution of uncharged residues at positions P8, P10 and P13

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

with arginine, 2) the substitution of glutamic acid at positions P3 and P7 with uncharged residues, and 3) the substitution of two uncharged residues at positions P6 and P9 with other uncharged residues. Which of these changes is(are) responsible for the enhanced pr-M cleavage and delay of particle export found in JEVpr/16681 virus remains unclear. Therefore, three mutant viruses, 16681pr(+7,-2), 16681pr(+4,-0)HS and 16681pr(+7,-0) that had been generated by Songjaeng (2004) to contain each type of the substitutions at the pr-M junction, were chosen for the assessments of prM cleavage and kinetics of virus export. Enhanced cleavage of prM was detected in 16681pr(+4,-0)HS, 16681pr(+7,-0), but not 16681pr(+7,-2), indicating that the acidic residues at positions P3 and/or P7 down modulated the cleavage at dengue virus pr-M junction. Using the single-step replication kinetics model, it was found that the export of infectious viral particles was affected in 16681pr(+7,-2), which contained arginine residues at positions P8, P10 and P13. In the other mutant virus, 16681pr(+4,-0)HS, export of the particles was similar to that of the parent virus. To dissect in more details the role of the arginine substitution at positions P8, P10, and P13 in influencing the export of infectious particles, three additional mutants were constructed containing a pair of arginine substitutions at these positions: 16681pr(+6,-2)P8,10+, 16681pr(+6,-2)P8,13+, and 16681pr(+6,-2)P10,13+. When these mutants were characterized in the single–step replication kinetics assay, the results suggested that either the combination of the arginine residues at positions P8 and P10, or P10 and P13 sufficiently delayed the particle export. However, the triple arginine substitution in 16681pr(+7,-2) had a stronger affect than any of the double arginine substitutions.

In conclusion, the amino acid residues responsible for delaying the export of the JEVpr/16681 particle were delineated. The presence of arginine residues at the positions P8, P10 and P13 results in the delay of infectious particle export. The mechanism underlying this phenomenon is still unclear. Further studies on the co-localization of the viral structural protein with markers of the components of the secretory pathway should help in clarifying the effect of the introduced mutations at various subcellular organelles along the secretory pathway.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบริเวณจุดตัด pr-M ที่ส่งผลกระทบต่อการปล่อยอนุภาคไวรัสเด็งกี่

ผู้เขียน นายมาธวี เหลือสำเภา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. นพ. นพพร สิทธิสมบัติ

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อไวรัสเด็งกี่เป็นปัญหาหลักทางการสาธารณสุขทั่วโลก ในแต่ละปีมีรายงานพบผู้ป่วยไข้เลือดออก 5 แสนรายทั่วโลก เชื้อไวรัสเด็งกี่จัดอยู่ในสกุล *Flavivirus* วงศ์ *Flaviviridae* อนุภาคไวรัสประกอบด้วยสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายบวกขนาดประมาณ 11 kb ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) 3 ชนิด ได้แก่ โปรตีนแคปสิด (C) โปรตีนพีอาร์เอ็ม (prM) โปรตีนอี (E) และโปรตีนอื่น (nonstructural protein) 7 ชนิด การประกอบอนุภาคไวรัสเกิดบนเยื่อหุ้มอีอาร์ (ER membrane) อนุภาคที่ได้เป็นอนุภาคชนิด immature อยู่ภายในอีอาร์ จากนั้นจึงส่งอนุภาคไวรัสออกนอกเซลล์โดยขบวนการหลั่งออกนอกเซลล์ (secretory pathway) ก่อนที่อนุภาคไวรัสจะถูกปล่อยออกนอกเซลล์ โปรตีนพีอาร์เอ็มจะถูกตัดในลำดับกรดอะมิโนบริเวณจุดตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มโดยเอนไซม์ฟิวริน (furin) การตัดโปรตีนนี้มีผลให้มีการจัดเรียงตัวใหม่ของโปรตีนอีบนอนุภาคไวรัสกลายเป็นอนุภาคที่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ใหม่ได้ (mature particle)

ถึงแม้ว่าลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ต่อเอนไซม์ฟิวรินพบได้บนโปรตีนพีอาร์เอ็มของเชื้อในสกุล *Flavivirus* แต่จากการศึกษาระดับการตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มของเชื้อไวรัสในสกุลนี้ พบว่าเชื้อไวรัสเด็งกี่ ซีโรไทป์ 2 สายพันธุ์ 16681 มีระดับการตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มต่ำกว่า เชื้อไวรัสอื่นในสกุลเดียวกัน เมื่อทำการแลกชิ้นส่วน 13 กรดอะมิโนในบริเวณจุดตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มของเชื้อไวรัสเด็งกี่กับบริเวณเดียวกันของเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบชนิด Japanese encephalitis virus พบว่าเชื้อไวรัสเด็งกี่ JEVpr/16681 เพิ่มระดับการตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มมากขึ้นแต่กลับปล่อยอนุภาคออกนอกเซลล์ติดเชื้อช้าลง (Keelapang et al., 2004)

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ 13 กรดอะมิโนหน้าจุดตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มของเชื้อไวรัสเด็ง JEVpr/16681 กับลำดับกรดอะมิโนนี้ในไวรัสเด็งสายพันธุ์แม่พบว่า สามารถ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำแนกการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนออกเป็น 3 ชนิดได้แก่ 1) การแทนที่กรดอะมิโนชนิดไร้ประจุ (uncharged) ในตำแหน่ง P8 P10 และ P13 เป็นกรดอะมิโนอาร์จินิน (arginine) 2) การแทนที่กรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid) ด้วยกรดอะมิโนชนิดไร้ประจุในตำแหน่ง P3 และ P7 3) การแทนที่กรดอะมิโนชนิดไร้ประจุในตำแหน่ง P6 และ P9 เป็นกรดอะมิโนชนิดไร้ประจุตัวอื่น

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น กรดอะมิโนที่เป็นสาเหตุทำให้เพิ่มระดับการตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มและปล่อยอนุภาคออกนอกเซลล์ติดเชื้อช้าซึ่งพบในเชื้อไวรัสเด็งกี่ JEVpr/16681 ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นำไปสู่จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ เพื่อจำแนกชนิดของกรดอะมิโนที่ทำให้เชื้อไวรัสเด็งกี่ JEVpr/16681 ปล่อยอนุภาคออกนอกเซลล์ติดเชื้อช้าลง โดยทำการตรวจวัดระดับการตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มและการปล่อยอนุภาคไวรัสออกนอกเซลล์ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่กลายพันธุ์ ที่มีการแทนที่กรดอะมิโนเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งดังกล่าวข้างต้น ได้แก่ 16681pr(+4,-0)HS 16681pr(+7,-0) และ 16681pr(+7,-2) (Songjaeng, 2004) ผลการตรวจวัดระดับการตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มของเชื้อไวรัสกลายพันธุ์แต่ละชนิดข้างต้น พบว่ากรดอะมิโนกลูตามิกตำแหน่ง P3 และ(หรือ) P7 ในจุดตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มลดระดับการตัดโปรตีนนี้ เมื่อศึกษาการปล่อยอนุภาคไวรัสกลายพันธุ์ด้วยวิธี single-step kinetics พบว่าเชื้อไวรัสเด็งกี่กลายพันธุ์ 16681pr(+7,-2) ซึ่งมีกรดอะมิโนอาร์จินินในตำแหน่ง P8 P10 และ P13 ปล่อยอนุภาคออกนอกเซลล์ติดเชื้อช้าลง จากนั้นได้การศึกษาต่อไปเพื่อหาตำแหน่งของกรดอะมิโนอาร์จินินที่มีผลให้ปล่อยอนุภาคออกนอกเซลล์ติดเชื้อไวรัสช้าลง โดยสร้างเชื้อไวรัสเด็งกี่กลายพันธุ์ที่มีกรดอะมิโนอาร์จินินเพียงสองตำแหน่งทั้งสิ้นสามตัวได้แก่ 16681pr(+6,-2)P8,10+ 16681pr(+6,-2)P8,13+ และ 16681pr(+6,-2)P10,13+ เมื่อนำเชื้อไวรัสกลายพันธุ์นี้ไปทดสอบการปล่อยอนุภาคไวรัสออกนอกเซลล์ พบว่าเชื้อไวรัสที่มีกรดอะมิโนอาร์จินินในตำแหน่ง P8 ร่วมกับ P10 หรือ P10 ร่วมกับ P13 ปล่อยอนุภาคไวรัสออกนอกเซลล์ติดเชื้อช้าลง อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสกลายพันธุ์ 16681pr(+7,-2) ซึ่งมีกรดอะมิโนอาร์จินินทั้งสามตำแหน่ง ปล่อยอนุภาคไวรัสออกนอกเซลล์ติดเชื้อไวรัสช้าลงมากกว่าเชื้อไวรัสเด็งกี่ที่มีกรดอะมิโนอาร์จินินเพียงสองตำแหน่ง

การศึกษานี้อธิบายถึงกรดอะมิโนที่ทำให้เชื้อไวรัสเด็งกี่ JEVpr/16681 ปล่อยอนุภาคไวรัสออกนอกเซลล์ติดเชื้อช้าลงและกล่าวได้ว่ากรดอะมิโนอาร์จินินในตำแหน่ง P8 P10 และ P13 มีผลให้ปล่อยอนุภาคไวรัสเด็งกี่ออกนอกเซลล์ติดเชื้อช้าลง กลไกของกรดอะมิโนอาร์จินินที่ทำให้ปล่อยอนุภาคไวรัสช้านั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การหาตำแหน่งโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อไวรัสในจุดต่าง ๆ ร่วมกับโปรตีนจำเพาะภายในขบวนการหลั่งของเซลล์ (protein co-localization experiment) อาจใช้ในการศึกษากลไกดังกล่าวต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved