

Thesis Title	Modulation of prM Cleavage, Proportion of Extracellular Particles and Virus Replication by Charged Residues at Non-Furin Consensus Positions of the Dengue Virus pr-M Junction	
Author	Miss Jiraphan Junjhon	
Degree	Doctor of Philosophy (Microbiology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Nopporn Sittisombut	Chairperson
	Dr. Poonsook Keelapang	Member
	Dr. Amornrat O'Brien	Member
	Prof. Dr. Richard J. Kuhn	Member

ABSTRACT

During the replication of flaviviruses, the virus maturation process mediated by a cellular proprotein convertase, furin, is required for the acquisition of infectivity. Furin cleaves an envelope glycoprotein, prM, on the surface of immature viral particles via the specific recognition of the furin consensus sequence, Arg(P4)-Xaa(P3)-Lys/Arg (P2)-Arg(P1), where Xaa is any amino acid, just proximal to the pr-M cleavage junction. While all flaviviruses share the basic residues at the cleavage positions P1, P2 and P4 at the pr-M junction recognized by furin, it is intriguing that, unlike those of other flaviviruses, cleavage of dengue virus prM is incomplete in many infected cell lines. The molecular basis for partial cleavage of dengue virus prM was not known. In this study, the role of amino acid residues located at furin non-consensus positions of the pr-M junction in modulating the level of prM cleavage was examined by employing the alanine-scanning and other multiple-point mutant

viruses, which were previously generated by employing a dengue virus background that exhibited 60-70% prM cleavage and the preponderance of virion-sized extracellular particles. Comparison of the levels of prM and its cleavage products in the extracellular particles of the parent virus and the viable mutants revealed a strong cleavage suppressive effect of the conserved P3 Glu residue of the pr-M junction. Unexpectedly, the cleavage augmenting effect of the P5 Arg and P6 His residues were also detected, indicating an interplay between opposing modulatory influences mediated by the charged residues at these furin non-consensus positions on the cleavage of prM of dengue virus. Changes in the extent of prM cleavage in the mutant viruses were associated with altered proportions of extracellular virion-sized particles and subviral particles. The mutants with reduced prM cleavage were enriched with subviral particles and the prM-containing virion-sized particles, whereas the mutant with enhanced prM cleavage consisted mainly of the mature virion-sized particles. Further characterization of the virion-sized particles by cryo-electron microscopy revealed the third type of viral particles, the partially mature particles, which exhibited morphologic features of the immature particle and the mature particle on the same particles. The partially mature particles constituted a large fraction of the extracellular prM-containing virion-sized particles in the parent dengue virus; its existence was compatible with a model suggesting the progressive mode of prM cleavage. The dynamic shifts in the proportion of the three types of particles among dengue viruses with different prM cleavage levels suggested that the partially mature particles represented an intermediate stage of the virus particles in the maturation pathway. Reduction of the virus multiplication was detected in mutants with reduced prM cleavage, and correlated with their low specific infectivities. These findings: 1) define the functional roles of charged residues located adjacent to the furin consensus sequence in the cleavage of dengue virus prM, 2) provide plausible mechanisms by which the reduction of pr-M junction cleavability may affect dengue virus replication, and 3) present the morphologic evidence for a new type of virion-sized particles of dengue virus and the underlying mode of prM cleavage.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การปรับระดับการตัดโปรตีน prM, สัดส่วนของอนุภาคไวรัสนอกเซลล์และความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกีโดยกรดอะมิโนชนิดมีประจุในตำแหน่งที่ไม่จำเพาะต่อ furin ที่บริเวณส่วนต่อระหว่าง pr และ M	
ผู้เขียน	นางสาวจิรพันธุ์ จันทร์จร	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. นพพร สิริสมบัติ อ. ดร. พูนสุข กีฬาแปง อ. ดร. อมรรัตน์ โอไบรอัน ศ. ดร. ริชาร์ด เจ. คูนท์	ประธานกรรมการ กรรมการ กรรมการ กรรมการ
	บทคัดย่อ	

กระบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อในกลุ่ม flaviviruses ต้องอาศัยการทำงานของ furin ซึ่งเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ในการเปลี่ยนอนุภาคเชื้อไวรัสให้มีความสามารถในการเข้าเพิ่มจำนวนในเซลล์ เอนไซม์ furin ตัดโปรตีน prM ที่อยู่บนผิวอนุภาคไวรัสโดยจดจำลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะ Arg(P4)-Xaa(P3)-Lys/Arg(P2)-Arg(P1) ที่บริเวณส่วนต่อ pr และ M โดยที่ Xaa เป็นกรดอะมิโนได้ทุกชนิด แม้ว่าเชื้อในกลุ่ม flaviviruses จะมีกรดอะมิโนชนิดประจุบวกที่ตำแหน่ง P1, P2 และ P4 ซึ่งถูกจดจำด้วย furin ได้มีรายงานการตัดโปรตีน prM ของเชื้อไวรัสเด็งกีเกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ในเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดโดยไม่ทราบถึงกลไกที่เป็นสาเหตุแน่ชัด การศึกษานี้ได้ศึกษาถึงบทบาทของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ไม่จำเพาะต่อ furin ที่บริเวณส่วนต่อ pr และ M ต่อระดับการตัดโปรตีน prM โดยใช้เชื้อไวรัสเด็งกีกลายพันธุ์ที่มีการแทนที่ด้วยกรดอะมิโน alanine และการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอื่นมากกว่าหนึ่งตำแหน่งหน้าต่อตำแหน่งตัดที่จำเพาะของ furin ในโครงสร้างเชื้อไวรัสเด็งกีที่มีระดับการตัดโปรตีน prM ร้อยละ 60-70 และปล่อยอนุภาคชนิด

virion-sized particles ออกนอกเซลล์เป็นส่วนใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบระดับโปรตีน prM และโปรตีนที่เป็นผลจากการตัด prM ของ เชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ต้นตอเทียบกับเชื้อไวรัสกลายพันธุ์พบว่ากรดอะมิโน glutamic ที่ตำแหน่ง P3 ยับยั้งการตัดโปรตีน prM ในขณะที่กรดอะมิโน arginine ที่ตำแหน่ง P5 และ histidine ที่ตำแหน่ง P6 ส่งเสริมการตัดโปรตีน prM ผลการศึกษานี้แสดงถึงบทบาทตรงข้ามของกรดอะมิโนชนิดมีประจุในตำแหน่งที่ไม่จำเพาะต่อเอนไซม์ furin ต่อการตัดโปรตีน prM ของเชื้อไวรัสเด็งกี นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการตัดโปรตีน prM ที่เปลี่ยนไปสัมพันธ์กับสัดส่วนการปล่อย virion-sized particles และ subviral particles ออกนอกเซลล์ โดยเชื้อไวรัสที่มีระดับการตัดโปรตีน prM ถูกตัดลดลงสามารถตรวจพบ subviral particles และ prM-containing particles ภายนอกเซลล์เพาะเลี้ยงในปริมาณมากขึ้น ในขณะที่เชื้อไวรัสที่โปรตีน prM ถูกตัดในระดับเพิ่มขึ้นมีการปล่อย subviral particles ออกมาน้อยลง เมื่อศึกษาถึงลักษณะของ virion-sized particles ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์ศาสตร์ cryo-electron ได้ตรวจพบอนุภาคชนิด partially mature particles ที่มีลักษณะร่วมระหว่างอนุภาคชนิด mature และ immature โดยอนุภาคชนิด partially mature particles นี้พบเป็นสัดส่วนใหญ่ในกลุ่มอนุภาคนอกเซลล์ชนิด prM-containing particles ของเชื้อไวรัสเด็งกีสายพันธุ์ต้นตอ ซึ่งเข้าได้กับสมมุติฐานของการตัดโปรตีน prM แบบ progressive สัดส่วนอนุภาคไวรัสทั้งสามชนิดที่เปลี่ยนไปในเชื้อไวรัสเด็งกีกลายพันธุ์ที่มีการปรับเปลี่ยนระดับการตัดโปรตีน prM แสดงถึงคุณลักษณะตัวกลางของอนุภาคชนิด partially mature particles ในขั้นตอนการเปลี่ยนอนุภาคไวรัสให้มีความสามารถในการเข้าเพิ่มจำนวนในเซลล์ ค่า specific infectivity ที่ลดลงซึ่งตรวจพบในเชื้อที่มีการตัดโปรตีน prM ในระดับต่ำสัมพันธ์กับความสามารถในการเพิ่มจำนวนที่ลดลงของเชื้อไวรัส การศึกษานี้ได้แสดงถึง 1) บทบาทกรดอะมิโนในตำแหน่งใกล้จุดตัดจำเพาะต่อ furin ต่อการตัดโปรตีน prM ของเชื้อไวรัสเด็งกี 2) แสดงถึงกลไกที่อาจส่งผลต่อการลดลงของ specific infectivity ของเชื้อไวรัสที่มีการตัดโปรตีน prM ลดลงและ 3) แสดงลักษณะอนุภาคแบบใหม่ชนิด partially mature particle ที่บ่งชี้ถึงรูปแบบการตัดโปรตีน prM ของเชื้อไวรัสเด็งกี