Thesis Title Effect of the prM-E203A Mutation on Replication and Immunogenicity of Dengue Virus

Author Miss Jittra Hachaibhum

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisor Assoc. Prof. Dr. Nopporn Sittisombut

ABSTRACT

Dengue virus causes dengue fever and the severe disease of dengue hemorrhagic fever. This virus is arthropod-borne pathogens of genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. Dengue viruses contain an 11-kb single-stranded RNA genome of positive polarity encoding a polyprotein in an open reading frame. The polyprotein is processed into three structural proteins and seven nonstructural proteins by host- and virus-encoded proteases. Shortly before viral particles release, furin cleaves an envelope glycoprotein, prM, on the surface of immature virions 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, triggers the conversion of the immature virions into slightly smaller mature particles with smooth surfaces and high infectivity. Partial cleavage of dengue virus prM was detected in particles released from infected cells. Up-modulation of prM cleavage enhancement was found in the dengue mutant virus which was the substitution mutation at P3 position of the pr-M junction, prE203A. The goal of this study purposed to test whether the prE203A mutation could influence the immunogenicity of dengue viruses when assessed using the three virulence-attenuating genetic backgrounds (16681-3′utrΔ30, 16681-3pm and 16681-prR201H).

A comparison of the prE203A-containing mutants with the corresponding parental strains revealed that the presence of the prE203A mutation was associated

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

with an enhanced prM cleavage of the extracellular virus particles. Determination of viral properties such as virus titers and focus size revealed that the prE203A mutation did not alter the infectious virus titers in both C6/36 cells and Vero cells of strain 16681Nde(+), 16681-3′utrΔ30, and 16681-prR201H comparing with their prE203A-containing counterparts but enhanced virus titers of 16681-3pm. Analysis of the focus size revealed that the presence of the prE203A mutation increased focus size of three attenuating viruses, 16681-3′utrΔ30, 16681-3pm, and 16681-prR201H. These results indicated that the prE203A mutation had a modest effect on focus size and the titers of amplified viruses. The study on viral replication of dengue viruses in an *in vitro*-cultured cell lines (C6/36, PS and Vero) showed the similarity in the infectious virus titers of the mutant viruses and their prE203A-containing derivatives. These results revealed that the prE203A did not strongly affect the replication of mutant viruses in cell lines. On the other hand, a kinetic study of replication in human monocyte-derived dendritic cells revealed small and variable effects of the prE203A mutation on virus titers. The results showed that there were minimal differences between 16681Nde(+) and 16681-3′utrΔ30 with their prE203A derivatives. In the other two backgrounds, the presence of prE203A mutation associated with reduced titers in the 16681-3pm, but with increased titers in the 16681-prR201H. A major goal of this study was to investigate whether the high proportion of the mature particles of the prE203A-containing viruses would enable them to be more efficient in the stimulation of dengue virus-specific neutralizing antibody than wild type virus in mice. When mice were injected with dengue virus at 1.25×10^4 FFU, intraperitoneal route, to examine the influence of the prE203A mutation on the levels of neutralizing antibody production employing with two virus pairs. In two groups of four mice, 16681-3pm injection showed that two mice produced detectable levels of neutralizing antibody on day 14 and increased by two folds in day 28. In the 16681-prR201H injection group, two and three mice contained detectable levels of neutralizing antibody on day 14 and there were two folds increase in titers on day 28. The prE203A mutation reduced the titers of neutralizing antibody against the homologous strain 16681 in sera of immunized mice when the focus reduction neutralization test was used. These indicated that the prE203A did not enhance the production of neutralizing antibody of the dengue virus strain that were employed (16681-3pm and 16681-prR201H).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

In conclusion, the presence of the prE203A mutation exerted a modest effect on an infectious virus titers, focus size, and viral replication kinetics in several cell lines (C6/36, PS, and Vero) but displayed a variable effect on viral replication kinetics in monocyte-derived dendritic cells. Nevertheless, determination of neutralizing antibody production in immunized mice did not reveal the enhancing effect of the prE203A mutation.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลกระทบของการกลายพันธุ์แบบ E203A บริเวณโปรตีน prM ต่อการเพิ่มจำนวนและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเชื้อไวรัสเด็งกี่

ผู้เขียน นางสาวจิตรา หาชัยภูมิ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดร. นพพร สิทธิสมบัติ

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสเด็งกี่เป็นสาเหตุของโรคไข้เด็งกี่และโรคไข้เลือดออกที่รุนแรง เชื้อไวรัสชนิดนี้มีแมลงเป็นพาหะจัดอยู่ในสกุล *Flavivirus* วงศ์ *Flaviviridae* เชื้อไวรัสเด็งกี่มีสารพันธุกรรมขนาดประมาณ 11 กิโลเบส ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอสายบวกจำนวนหนึ่งเส้นและจะถูกใช้เป็นแม่แบบสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนขนาดยาว (polyprotein) จากหนึ่ง open reading frame ต่อมาโปรตีนสายยาวนี้จะถูกตัดออกได้เป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) 3 ชนิดและโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างของอนุภาคไวรัส (nonstructural protein) อีก 7 ชนิด โดยอาศัยเอ็นไซม์ภายในเซลล์ที่ติดเชื้อและเอ็นไซม์ของตัวไวรัสเอง ช่วงเวลาสั้นๆก่อนที่อนุภาคไวรัสจะถูกปล่อยสู่ภายนอก โปรตีนพีอาร์เอ็มที่อยู่บนผิวอนุภาคจะถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ฟิวริน (furin) โดยจดจำลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะที่บริเวณส่วนต่อ Arg(P4)-Xaa(P3)-Lys/Arg(P2)-Arg(P1) โดยที่ Xaa เป็นกรดอะมิโนได้ทุกชนิด ซึ่งจะทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของอนุภาคที่ยังไม่สมบูรณ์ (immature virions) เป็นอนุภาคที่สมบูรณ์ (mature virions) ซึ่งมีขนาดอนุภาคเล็กลง มีผิวอนุภาคเรียบขึ้นและมีความสามารถในการเพิ่มจำนวนในเซลล์ใหม่ได้ อนุภาคที่ปล่อยจากเซลล์ติดเชื้อไวรัสมีการตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มไม่สมบูรณ์จากการศึกษาการเปลี่ยนกรดอะมิโนบริเวณจุดตัดของโปรตีนพีอาร์เอ็มที่ตำแหน่ง P3 จากกรดอะมิโนกลูตามิกเป็นกรดอะมิโนอะลานีน (prE203A) พบว่าเพิ่มการตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มได้ดีขึ้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อจะศึกษาผลกระทบของการกลายพันธุ์ชนิด prE203A ร่วมกับการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ชนิดอ่อนฤทธิ์ 3 แบบ (16681-3'utrΔ30, 16681-3pm และ 16681-prR201H) ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการเปรียบเทียบการตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มของอนุภาคไวรัส พบว่าเชื้อไวรัสที่มีการกลายพันธุ์แบบ prE203A ร่วมด้วย เพิ่มการตัดโปรตีนพีอาร์เอ็มได้ดีขึ้นเมื่อเทียบกับไวรัสแม่แบบ การตรวจวัดคุณสมบัติของเชื้อไวรัสได้แก่ การเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสและขนาดของโฟกัส (focus size) พบว่าการกลายพันธุ์แบบ prE203A ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงปริมาณไวรัสที่เลี้ยงในเซลล์ยุง (C6/36) และเซลล์ไตลิง (Vero) ของเชื้อแม่แบบชนิด 16681Nde(+), 16681-3'utrΔ30 และ 16681-prR201H แต่ส่งผลในการเพิ่มปริมาณไวรัสของเชื้อแม่แบบ 3pm การกลายพันธุ์แบบ prE203A ร่วมกับการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ชนิดอ่อนฤทธิ์มีแนวโน้มในการลดขนาดของโฟกัสของเชื้อไวรัสชนิดอ่อนฤทธิ์ทั้ง 3 แบบ แสดงว่าการกลายพันธุ์แบบ prE203A มีผลในการเปลี่ยนแปลงของขนาดโฟกัสและปริมาณไวรัสที่เพิ่มจำนวนในเซลล์เพาะเลี้ยงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเชื้อไวรัสแม่แบบ การศึกษาการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ในเซลล์เพาะเลี้ยง 3 ชนิดได้แก่ เซลล์ยุง เซลล์ไตหมูและเซลล์ไตลิงของเชื้อไวรัสชนิดอ่อนฤทธิ์ หรือเชื้อไวรัสชนิดอ่อนฤทธิ์ร่วมกับการกลายพันธุ์แบบ prE203A ให้ผลใกล้เคียงกัน แสดงว่าการกลายพันธุ์แบบ prE203A ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ในเซลล์เพาะเลี้ยง ในทางกลับกันการกลายพันธุ์แบบ prE203A ส่งผลหลากหลายแบบในการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ในเซลล์เดนดริติค โดยส่งผลเล็กน้อยในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ 16681Nde(+) และ 16681-3'utrΔ30 การกลายพันธุ์แบบ prE203A ลดการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส 16681-3pm แต่เพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส 16681-prR201H วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาครั้งนี้คือการทดสอบว่าเชื้อไวรัสที่มีการกลายพันธุ์แบบ prE203A ซึ่งมีสัดส่วนของอนุภาคที่สมบูรณ์จำนวนมากน่าจะมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นสัตว์ทดลองให้มีการสร้างภูมิคุ้มกันชนิด neutralizing antibody ได้ดีกว่าเชื้อไวรัสแม่แบบ จึงทำการทดลองโดยใช้เชื้อแม่แบบซึ่งเป็นไวรัสกลายพันธุ์ชนิดอ่อนฤทธิ์ 16681-3pm และ 16681-prR201H ร่วมกับการกลายพันธุ์แบบ prE203A ฉีดหนูทดลองด้วยปริมาณเชื้อ $1.25x10^4$ FFU เข้าทางช่องท้องเพื่อตรวจวัดปริมาณการสร้าง neutralizing antibody เมื่อทำการตรวจวัดซีรัมหนูด้วยวิธี focus reduction neutralization พบว่าหนู 2 ใน 4 ตัวที่ฉีดด้วย 16681-3pm ตรวจพบการสร้าง neutralizing antibody ในวันที่ 14 และค่า titer เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในวันที่ 28 สำหรับหนูที่ฉีดด้วย 16681-prR201H พบว่าหนู 2 ใน 4 ตัวตรวจพบการสร้าง neutralizing antibody ในวันที่ 14 และเพิ่มเป็น 3 ตัวในวันที่ 28 โดยมีค่า titer เพิ่มเป็นสองเท่าเช่นกัน การตรวจวัดในไวรัสที่มีการกลายพันธุ์แบบ prE203A ร่วมกับเชื้อแม่แบบพบว่าส่งผลให้การสร้างภูมิคุ้มกันชนิด neutralizing antibody ลดลง

โดยสรุปแล้วการกลายพันธุ์แบบ prE203A ส่งผลเพียงเล็กน้อยต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไวรัส ขนาดของโฟกัสและการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 3 แบบ แต่ให้ผลหลายรูปแบบในการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์เดนดริติค นอกจากนั้นยังพบว่าการกลายพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบบ prE203A ร่วมกับการกลายพันธุ์ของเชื้อไวรัสชนิดอ่อนฤทธิ์ไม่มีผลในการเพิ่มการสร้างภูมิคุ้มกันชนิด neutralizing antibody ต่อเชื้อไวรัสเด็งกี่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved