Thesis Title Effect of Amino Acid Substitutions at the NS2B/NS3 Junction on Replication of Dengue Virus Serotype 2

Author Miss Phornphan Sornchuer

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisor Dr. Amornrat Kanjanahaluethai

ABSTRACT

A viral genome of dengue virus (DENV) is a single positive-stranded RNA that encodes a long polyprotein. This polyprotein is processed into three structural proteins and seven nonstructural proteins (NS) by a host protease and a viral protease (a NS3 protease and a NS2B cofactor). Proteolytic processing of the viral polyprotein is required for viral replication. This study purposed to determine effects of mutations in the viral protease focusing in the NS2B/NS3 junction on a DENV-2 replication. Mutant viruses were generated by a reverse genetic technique using two recombinant plasmids, a subclone plasmid ($pCMV_{\beta}$-NS2B/NS3-ΔKpn908-Nhe4543^{+}) and a DENV-2 full-length cDNA plasmid [pBK(S1SP6-10723)Δ402*Pst*#5.14]. Regions encoding intended mutations at this cleavage site were excised from the subclone plasmids and ligated into the full-length cDNA plasmid at the corresponding region to generate mutant NS2B/NS3 full-length DENV-2 cDNA clones. Seven mutant RNA transcripts encoding alanine substitutions at amino acid positions P6, P5, P4, P3, P2, P1 and P1+P3, and an alanine-to-serine substitution at the P1′ position of the NS2B/NS3 junction, were transfected into mosquito C6/36 cells to produce infectious viruses. Results showed that cultured supernatants harvested from cells transfected with six mutants P6A, P5A, P4A, P3A, P2A and P1′S yield infectious viruses, whereas two mutants, P1A and P1A+P3A, failed for recovery of virus. In addition, sequencing analysis revealed that the infectious virus harvested from cultured

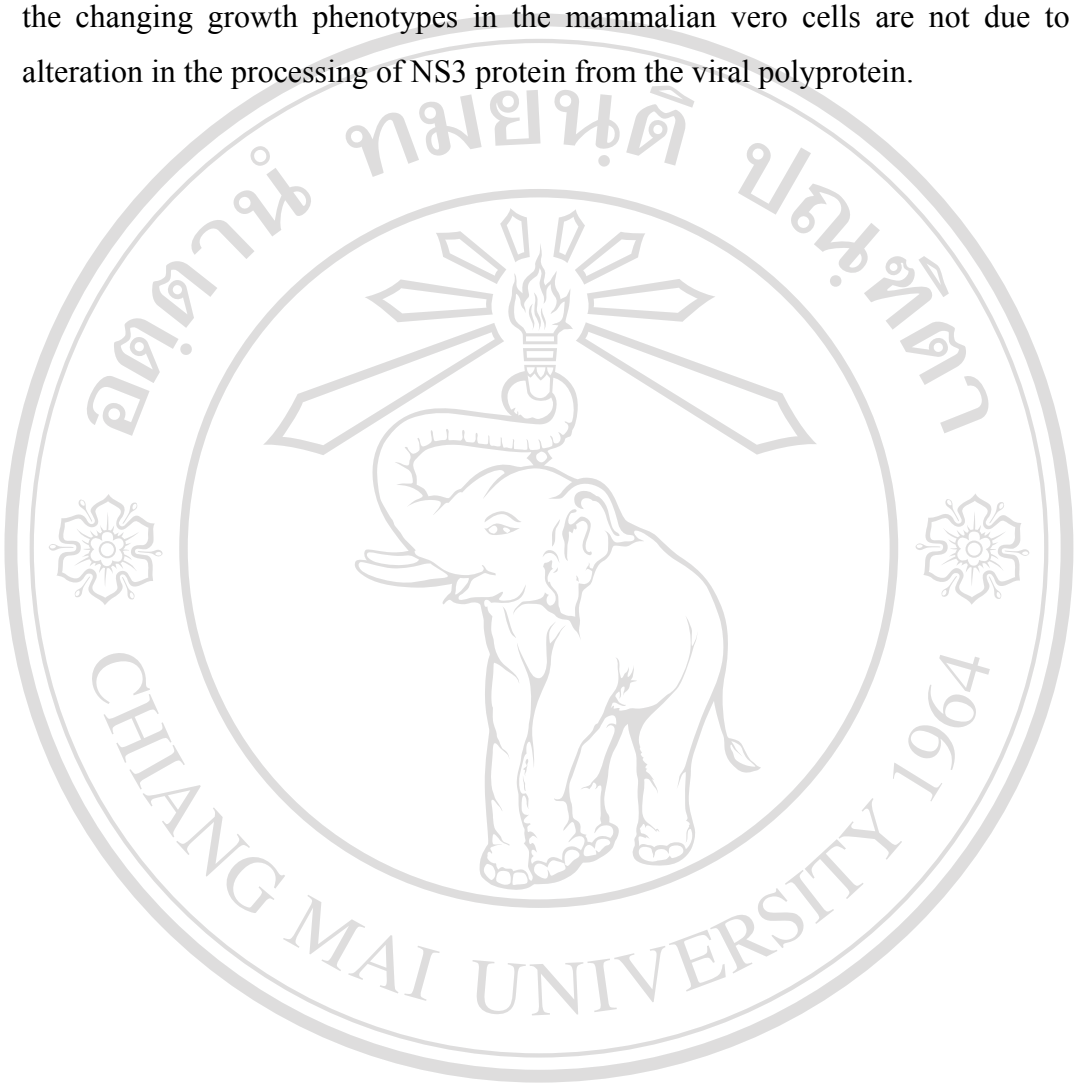
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

supernatant of the P2A mutant RNA-transfected cells had P2T phenotype. In the second attempt of generating the P2A mutant virus, the P2A+P7L mutant virus was recovered from P2A RNA transfection. Therefore, seven mutant viruses, P6A, P5A, P4A, P3A, P2T, P2A+P7L and P1´S were examined for their abilities of replication, focus size formation and efficiency of NS3 cleavage from the polyprotein. When compared with wild type virus, the P5A, P3A and P2T viruses replicated with indistinguishable kinetics on both mosquito C6/36 cells and mammalian vero cells. Moreover, the focus sizes and NS3 productions in both cell lines were at the level of parental phenotype. The small focus-size mutants, P2A+P7L and P6A, replicated as efficiently in the C6/36 cells but their growth curves observed in the vero cells exhibited 100-time and 1,000-time reductions, respectively, as compared to the parent strain. Surprisingly, the NS3 cleavage in infected cells of both viruses showed compatible level as the wild type. The most affected virus tested in this study was the P4A+P8Q virus. Its focus size and the growth kinetics in both cell lines were lower than the parent virus, however its NS3 cleavage activity was not impaired. Unexpectedly, the mutant virus, the alanine substitution at the P1´ position with serine, a consensus amino acid, exhibited the small focus-size phenotype and yielded the reduction of NS3 processing, as observed the NS3 precursor in infected vero cells. Surprisingly, this P1´S virus replicated efficiently in both C6/36 and vero cells.

Results obtained from this study showed that mutations at the P3 and P5 positions of the DENV-2 NS2B/NS3 junction had no effect on the viral replication and the NS3 processing. We were unable to generate the P1A single or the P1A+P3A double mutant virus, which indicate that the P1 position is essential for the replication of dengue virus. The polar uncharged amino acid residue at the P2 position may be crucial for the viral growth because the P2A RNA-transfected cells produced P2A+P7L and P2T infectious viruses. The P2A+P7L virus showed the small focus phenotype and the reduction of the growth kinetics in vero cells while the P2T virus had the parental phenotypes. The charged amino acid residues of the P4 and P6 positions are important because the alanine substitutions of these positions could affect the focus formation and the growth kinetics. When the P1´ position was replaced with serine, the mutant virus replicated efficiently but had the reduction of NS3 cleavage efficiency suggesting that alanine at this position is required for the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

NS3 processing. Overall, the results of the NS2B/NS3 mutant infectious clone viruses, P6A, P5A, P4A+P8Q, P3A, P2T, P2A+P7L and P1´S viruses, indicate that the changing growth phenotypes in the mammalian vero cells are not due to any alteration in the processing of NS3 protein from the viral polyprotein.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลกระทบของการแทนที่กรดอะมิโนที่บริเวณตำแหน่งตัด NS2B/NS3 ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ซีโรทัยป์สอง

ผู้เขียน นางสาวพรพรรณ สอนเชื้อ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ.ดร. อมรรัตน์ กาญจนหฤทัย

บทคัดย่อ

สารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเด็งกี่เป็นโมเลกุลอาร์เอ็นเอสายบวกสายเดี่ยวจำนวนหนึ่งสาย ซึ่งกำหนดการสร้างสายโพลีโปรตีนสายยาวหนึ่งเส้น สายโพลีโปรตีนนี้ถูกตัดเป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของอนุภาคไวรัส 3 โปรตีน และโปรตีนที่ไม่อยู่ในโครงสร้างของอนุภาคไวรัส 7 โปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอสของเซลล์โฮสต์และเอนไซม์โปรติเอสของไวรัส (โปรตีน NS3 เป็นเอนไซม์โปรติเอสและโปรตีน NS2B เป็นโคแฟคเตอร์) การตัดสายโพลีโปรตีนของเชื้อไวรัสจำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของมิวเตชั่นในเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อไวรัสบริเวณจุดตัดระหว่างโปรตีน NS2B และโปรตีน NS3 ต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ซีโรทัยป์สอง เชื้อไวรัสกลายพันธุ์ได้ถูกสร้างขึ้นโดยเทคนิค reverse genetic โดยใช้พลาสมิด 2 ตัวคือ พลาสมิด subclone (pCMV$_{\beta}$-NS2B/NS3-ΔKpn908-Nhe4543^{+}) และพลาสมิดที่มี cDNA กำหนดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเด็งกี่ซีโรทัยป์สองทั้งหมด [pBK(S1SP6-10723)Δ402*Pst*#5.14] บริเวณที่มีมิวเตชั่นที่ตำแหน่งจุดตัดนี้ได้ถูกย้ายจากพลาสมิด subclone แล้วนำไปเชื่อมต่อในตำแหน่งที่เข้ากันได้กับพลาสมิดที่มี cDNA กำหนดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสทั้งหมด เพื่อที่จะสร้างเป็นพลาสมิดที่มี cDNA กำหนดสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสเด็งกี่ซีโรทัยป์สองที่มีมิวเตชั่นที่บริเวณจุดตัดระหว่างโปรตีน NS2B และโปรตีน NS3 จากนั้นสายอาร์เอ็นเอที่มีมิวเตชั่นจำนวน 7 แบบซึ่งมีการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอะลานินที่ตำแหน่ง P6, P5, P4, P3, P2, P1 และ P1+P3 และ 1 แบบที่มีการแทนที่กรดอะมิโนอะลานินที่ตำแหน่ง P1´ ด้วยกรดอะมิโนเซอรีน ตรงตำแหน่งจุดตัดระหว่างโปรตีน NS2B และโปรตีน NS3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ถูกนำเข้าสู่เซลล์ยุง C6/36 โดยวิธี transfection เพื่อให้มีการสร้างไวรัสภายในเซลล์ ผลการทดลองพบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เก็บจากเซลล์ที่ถูก transfected ด้วยอาร์เอ็นเอที่มี 6 มิวเตชั่นที่ตำแหน่ง P6A, P5A, P4A, P3A, P2A และ P1´S สร้างไวรัสออกมาได้ ส่วนอาร์เอ็นเอที่มี 2 มิวเตชั่นที่ตำแหน่ง P1A และ P1A+P3A ไม่มีการสร้างไวรัสออกมา นอกจากนี้ผลการตรวจดูลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าไวรัสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ถูก transfected ด้วยอาร์เอ็นเอที่มีมิวเตชั่นแบบ P2A ได้ไวรัสที่มีมิวเตชั่นเป็น P2T ในการสร้างไวรัสครั้งที่สองเพื่อให้ได้ไวรัสที่มีมิวเตชั่นเป็น P2A พบว่าได้ไวรัสเป็น P2A+P7L ดังนั้นไวรัสกลายพันธุ์ทั้ง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ P6A, P5A, P4A, P3A, P2T, P2A+P7L และ P1´S ได้ถูกนำไปศึกษาถึงความสามารถในการเพิ่มจำนวน ลักษณะการสร้างโฟกัสและประสิทธิภาพการตัดโปรตีน NS3 ออกจากสายโพลีโปรตีน พบว่าไวรัสกลายพันธุ์ P5A, P3A และ P2T สามารถเพิ่มจำนวนได้ไม่แตกต่างจากไวรัสต้นตอทั้งในเซลล์ยุง C6/36 และเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม vero นอกจากนี้พบว่าคุณสมบัติการสร้างโฟกัสและการสร้างโปรตีน NS3 ในเซลล์ทั้ง 2 ชนิดยังใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสต้นตอ สำหรับเชื้อไวรัสกลายพันธุ์ที่มีลักษณะโฟกัสขนาดเล็ก ซึ่งคือ P2A+P7L และ P6A สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพในเซลล์ยุง C6/36 แต่เพิ่มจำนวนได้ต่ำกว่าเชื้อไวรัสต้นตอในเซลล์ vero ประมาณหนึ่งร้อยและหนึ่งพันเท่าตามลำดับ ประสิทธิภาพการตัดโปรตีน NS3 ในเซลล์ติดเชื้อของไวรัสกลายพันธุ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสต้นตอ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อไวรัสกลายพันธุ์ที่ได้รับผลกระทบมากที่สุดคือสายพันธุ์ P4A+P8Q เนื่องจากขนาดโฟกัสและการเพิ่มจำนวนในเซลล์ทั้ง 2 ชนิดลดลงจากเชื้อไวรัสต้นตอ แต่น่าแปลกใจที่ไม่พบผลกระทบต่อประสิทธิภาพการตัดโปรตีน NS3 เชื้อไวรัสกลายพันธุ์ที่มีการแทนที่กรดอะมิโนอะลานินที่ตำแหน่ง P1´ ด้วยกรดอะมิโนเซอรีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มเดียวกัน แสดงลักษณะโฟกัสขนาดเล็กและมีประสิทธิภาพการตัดโปรตีน NS3 ลดลงเนื่องจากพบโปรตีน NS3 precursor ในเซลล์ vero ที่ติดเชื้อ ที่น่าแปลกใจคือเชื้อไวรัสนี้มีความสามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ C6/36 และเซลล์ vero ได้เป็นอย่างดี

ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามิวเตชั่นที่ตำแหน่ง P3 และ P5 ของจุดตัดระหว่างโปรตีน NS2B และโปรตีน NS3 ของเชื้อไวรัสเด็งกี่ซีโรทัยป์สองไม่มีผลกระทบต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสและไม่กระทบต่อประสิทธิภาพการตัดโปรตีน NS3 ในการทดลองนี้ไม่สามารถสร้างไวรัสที่มีมิวเตชั่นที่ P1A เพียงตำแหน่งเดียวหรือมิวเตชั่น P1A ร่วมกับ P3A ได้เลย จึงบ่งชี้ว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง P1 นั้นสำคัญสำหรับการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสเด็งกี่ กรดอะมิโนที่มีขั้วแต่ไม่มีประจุที่ตำแหน่ง P2 น่าจะมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อไวรัสเพราะเมื่อเซลล์ที่ถูก transfected ด้วยอาร์เอ็นเอ P2A สามารถสร้างไวรัสที่มีมิวเตชั่น P2A+P7L และ P2T โดยที่เชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไวรัส P2A+P7L แสดงลักษณะโฟกัสขนาดเล็กและมีการเพิ่มจำนวนของเชื้อในเซลล์ vero ลดลง ในขณะที่เชื้อไวรัส P2T มีลักษณะเหมือนเชื้อไวรัสต้นตอ กรดอะมิโนที่มีประจุที่ตำแหน่ง P4 และ P6 มีความสำคัญเพราะการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนอะลานินที่ตำแหน่งดังกล่าวมีผลกระทบต่อขนาดโฟกัสและกระทบต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส เมื่อกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง P1′ ถูกแทนที่ด้วยกรดอะมิโนเซอรีนได้ไวรัสกลายพันธุ์ที่เพิ่มจำนวนได้ดีแต่ลดประสิทธิภาพการตัดโปรตีน NS3 แสดงว่ากรดอะมิโนอะลานินที่ตำแหน่งนี้จำเป็นสำหรับการตัดโปรตีน NS3 โดยรวมผลของการศึกษาในเชื้อไวรัสกลายพันธุ์ที่มีมิวเตชั่นบริเวณจุดตัดระหว่างโปรตีน NS2B และโปรตีน NS3 คือเชื้อไวรัส P6A, P5A, P4A+P8Q, P3A, P2T, P2A+P7L และ P1′S บ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงลักษณะการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัสในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม vero ไม่ขึ้นอยู่กับกระบวนการตัดโปรตีน NS3 ออกจากสายโพลีโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved