

**EFFECTIVE SUPPRESSION OF
DENGUE FEVER VIRUS IN MOSQUITO CELL CULTURES
USING RETROVIRAL TRANSDUCTION OF
HAMMERHEAD RIBOZYMES TARGETING
THE VIRAL GENOME**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(TROPICAL MEDICINE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2009**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

EFFECTIVE SUPPRESSION OF DENGUE FEVER VIRUS IN MOSQUITO CELL CULTURES USING RETROVIRAL TRANSDUCTION OF HAMMERHEAD RIBOZYMES TARGETING THE VIRAL GENOME

PRUKSA NAWTAISONG 4437521 TMTM/D

Ph.D. (TROPICAL MEDICINE)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: NARUMON KOMALAMISRA, Ph.D., YUPHA RONGSRIYAM, Ph.D., MALCOLM FRASER, Ph.D.

ABSTRACT

Outbreaks of Dengue fever impose a heavy economic burden on developing countries in terms of vector control and human morbidity. Effective vaccines are in development, but population replacement with transgenic vectors unable to transmit the virus might ultimately prove to be an effective approach towards disease suppression, or even eradication. A key element of the refractory transgenic vector approach is the development of transgenes that effectively prohibit viral transmission. In this study, the effectiveness of several hammerhead ribozymes in suppressing DENV was evaluated in lentivirus transduced mosquito cells in an attempt to mimic the transgenic use of these effector molecules in mosquitoes. A lentivirus vector that expresses these ribozymes as a fusion RNA molecule using an *Aedes aegypti* tRNA^{val} promoter and terminating with a 60A tail insures optimal expression, localization, and activity of the hammerhead ribozyme against the DENV genome. Among the 14 hammerhead ribozymes designed to attack the DENV genome, several appear to be relatively effective in reducing virus production from transduced cells by as much as 2 logs. Among the sequences targeted are 10 that are conserved among all DENV serotype 2 strains. Our results confirm that hammerhead ribozymes can be effective in suppressing DENV in a transgenic approach, and provide an alternative or supplementary approach to proposed siRNA strategies for DENV suppression in transgenic mosquitoes.

KEY WORDS: DENGUE / HAMMERHEAD RIBOZYME / TRANSGENIC MOSQUITO

161 pages

การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัสไข้เลือดออกอย่างมีประสิทธิภาพในเซลล์ยุงลายด้วย
แฮมเมอร์เฮดโรโบไซม์

EFFECTIVE SUPPRESSION OF DENGUE FEVER VIRUS IN MOSQUITO CELL
CULTURES USING RETROVIRAL TRANSDUCTION OF HAMMERHEAD
RIBOZYMES TARGETING THE VIRAL GENOME

พุกษา แนวไรสง 4437521 TMTM/D

ปร.ด. (อายุรศาสตร์เขตร้อน)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: นฤมล โกมลมิทร์, Ph.D., ยูพา รองศรีแย้ม, Ph.D.,
MALCOLM FRASER, Ph.D.

บทคัดย่อ

โรคไวรัสไข้เลือดออกก่อให้เกิดปัญหาสำคัญทั้งทางด้านเศรษฐกิจและสุขภาพในประเทศ
กำลังพัฒนา วัคซีนไข้เลือดออกที่มีประสิทธิภาพกำลังอยู่ในระหว่างการทดลองพัฒนา การกำจัดเชื้อ
ไวรัสด้วยการเปลี่ยนประชากรยุงไม่สามารพแพร่เชื้อได้นั้น อาจเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพใน
การยับยั้งหรือกำจัดโรคไวรัสไข้เลือดออกให้หมดไปได้อัจฉัยสำคัญในการพัฒนาที่ยังไม่สามารถ
แพร่เชื้อได้นั้นขึ้นอยู่กับพัฒนาที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้
แฮมเมอร์เฮดโรโบไซม์หลายชนิดได้ถูกวัดประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ
ไวรัสไข้เลือดออกในเซลล์ยุงที่ได้ถูกเปลี่ยนแปลงในระดับพันธุกรรม ให้มีการแสดงออกของแฮม
เมอร์เฮดโรโบไซม์อย่างต่อเนื่องด้วยการใช้เลนติไวรัส แฮมเมอร์เฮดโรโบไซม์ที่แสดงออกภายใต้
การควบคุมของ *Aedes aegypti* tRNA^{val} และ มี 60A tail พบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ
ไวรัสได้ดี แฮมเมอร์เฮดโรโบไซม์ทั้งหมด 14 ชนิดที่ศึกษา พบว่ามีหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการ
เจริญเติบโตของเชื้อไวรัสได้มากถึง 100 เท่า นอกจากนี้ 10 ชนิด ได้ถูกออกแบบให้สามารถยับยั้ง
เชื้อไวรัสทุกสายพันธุ์ของ serotype 2 ผลการทดลองครั้งนี้สรุปว่า แฮมเมอร์เฮดโรโบไซม์มี
ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อไวรัส และสามารถใช้เป็นทางเลือกหรือตัวเสริมร่วมกับ RNAi ใน
การกำจัดเชื้อไวรัสไข้เลือดออกในยุงที่เปลี่ยนแปลงยีน