

**THE ROLES OF AN ENDOPLASMIC RETICULUM
CHAPERONING PROTEIN – IMMUNOGLOBULIN BINDING
PROTEIN (BiP) IN DENGUE VIRUS INFECTION**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2010**

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

THE ROLES OF AN ENDOPLASMIC RETICULUM CHAPERONING PROTEIN – IMMUNOGLOBULIN BINDING PROTEIN (BiP) IN DENGUE VIRUS INFECTION

WIYADA WONGWIWAT 4838146 SIIM/D.

Ph.D. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISOR: PRIDA MALASIT, M.D., F.R.C.P., THAWORNCHAI LIMJINDAPORN, M.D., Ph.D, PA-THAI YENCHITSOMMANUS, Ph.D., SANSANEE NOISAKRAN, Ph.D.

ABSTRACT

Dengue virus infection is one of the most important mosquito-borne viral diseases, which is caused by dengue virus (DENV). It causes a broad range of diseases with different clinical severity ranging from mild febrile dengue fever (DF) to severe dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). A better understanding of interactions between host cellular components and dengue virus proteins will provide insight into dengue virus replication and cellular pathogenesis. Dengue virus envelope (DENV E) protein is a membrane glycoprotein that is processed in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER). It is an important component of the virion surface involved in viral attachment to cellular receptors, membrane fusion, and induction of neutralizing antibodies. By a yeast two hybrid system, immunoglobulin binding protein (BiP) was identified as a domain III of DENV E binding protein. BiP is a well characterized ER chaperone protein, which is stimulated by a variety of conditions that disturb ER function and homeostasis. BiP was shown to be strongly up-regulated both in transcription and translation levels during dengue virus infection. However, the significance of this relation and the interaction in dengue virus infection has not been thoroughly investigated. The interaction of BiP and DENV E was confirmed by co-immunoprecipitation and co-localization in dengue virus-infected cells. Direct binding of domain III of DENV E was mapped to amino acid 467-529 in the substrate-binding domain of the C-terminus of BiP by the yeast two hybrid system. To investigate the roles of BiP in its aspect as a receptor, an antibody against the C-terminus of BiP did not block dengue virus infection in Vero cells. This result suggests that BiP does not participate in virus binding or virus entry in Vero cells. Besides the interaction of BiP and DENV E, associations of DENV E with two other chaperones, calnexin and calreticulin, were also observed. To investigate the roles of BiP in its function as a chaperone, RNAi technology was utilized. Knocked down expression of BiP significantly decreased the production of new infectious dengue virions. Moreover, the reduction of calnexin and calreticulin affected infectious virion production. A co-localization study likely indicated that other DENV glycoproteins, prM and NS1 also co-localized with BiP, calnexin and calreticulin. These results indicate that the interaction of these three chaperones with DENV E and other glycoproteins plays an important role in virion production, likely facilitating proper folding and assembly of dengue virus proteins.

**KEY WORDS: DENGUE VIRUS PRODUCTION/ ER CHAPERONE/ BiP/
CALNEXIN/ CALRETICULIN**

180 pages

บทบาทของโปรตีนแชเพอโรนภายในเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม – โปรตีนที่จับกับอิมมูโนโกลบูลิน (BiP) ในการติดเชื้อไวรัสเดงกี

THE ROLES OF AN ENDOPLASMIC RETICULUM CHAPERONING PROTEIN – IMMUNOGLOBULIN BINDING PROTEIN (BiP) IN DENGUE VIRUS INFECTION

วิดา วงศ์วิวัฒน์ 4838146 SIIM/D

ปร.ค. (วิทยานิพนธ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ปริดา มาลาสิทธิ์, M.D., F.R.C.P., ถาวรชัย ลิ่มจินดาพร M.D., Ph.D., เพทชาย เย็นจิต โสมนัส Ph.D., ศันสนีย์ น้อยสคราญ Ph.D.

บทคัดย่อ

ไข่เลือดออกเป็นหนึ่งในโรคติดเชื้อจากไวรัสที่มีอยู่เป็นพาหะ การติดเชื้อดังกล่าวทำให้ความรุนแรงของโรคเกิดขึ้นได้อย่างหลากหลายเริ่มตั้งแต่อาการไข้ธรรมดาจนกระทั่งถึงไข้เลือดออกอย่างรุนแรงและมีอาการช็อคร่วมด้วย การเข้าใจถึงปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างส่วนประกอบต่างๆของเซลล์เจ้าบ้านและโปรตีนของไวรัสเดงกีจะช่วยให้เข้าใจในการเพิ่มจำนวนของไวรัสเดงกีและพยาธิสภาพของเซลล์ในขณะติดเชื้อไวรัสเดงกี ได้เป็นอย่างดี โปรตีน envelope ของไวรัสเดงกี เป็นไกลโคโปรตีนซึ่งถูกสร้างขึ้นภายในเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม โปรตีน envelope นี้เป็นส่วนประกอบที่มีความสำคัญบนผิวของไวรัสเดงกี ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการที่ไวรัสจับกับตัวรับบนผิวเซลล์, การรวมตัวกับเยื่อหุ้มเซลล์ และเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้เกิดแอนติบอดีชนิด neutralization ในการใช้ระบบ yeast two hybrid เพื่อหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน envelope กับโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านนั้น พบว่าโปรตีนที่จับกับอิมมูโนโกลบูลิน หรือ BiP เป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับส่วนที่สามของโปรตีน envelope ของไวรัสเดงกี โดยโปรตีน BiP เป็นหนึ่งในโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นแชเพอโรนในเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม โปรตีน BiP จะถูกสร้างมากขึ้นภายในเซลล์เมื่อมีการกระตุ้นด้วยภาวะต่างๆที่สามารถรบกวนการทำงานที่ และภาวะสมดุลของเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม จากการศึกษาพบว่า ในขณะที่เซลล์ติดเชื้อไวรัสเดงกีนั้น BiP ได้เพิ่มปริมาณขึ้นทั้งในระดับการแสดงออกของยีน และ ระดับการแสดงออกของโปรตีน อย่างไรก็ตามการศึกษาถึงความสำคัญของการเพิ่มขึ้นของ BiP รวมทั้งการปฏิสัมพันธ์ของ BiP กับไวรัสเดงกีนั้นมีน้อยมาก นอกจากการศึกษาโดยระบบ yeast two hybrid แล้ว การเกิดปฏิสัมพันธ์นี้ได้ถูกยืนยันว่าเกิดขึ้นจริงในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยการใช้เทคนิค co-immunoprecipitation and co-localization งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อให้เข้าใจถึงความสัมพันธ์ดังกล่าว โดยการเกิดปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน BiP กับ ส่วนที่สามของโปรตีน envelope นั้นเกิดขึ้นที่กรดอะมิโน ตำแหน่ง 467-529 ซึ่งเป็นส่วนของ substrate binding domain ของโปรตีน BiP ในการศึกษาถึงบทบาทของ BiP ในการเป็นตัวรับไวรัสเดงกีบนผิวเซลล์นั้น พบว่า แอนติบอดีต่อโปรตีน BiP ไม่สามารถใช้ในการยับยั้งไวรัสเดงกีไม่ให้เข้าเซลล์ได้ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน BiP ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องในการจับกับไวรัสหรือการเข้าเซลล์ของไวรัส นอกจากปฏิสัมพันธ์ ของโปรตีน envelope กับโปรตีน BiP แล้วนั้น ยังพบว่าโปรตีน envelope ยังมีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีนแชเพอโรนชนิดอื่น ได้แก่ calnexin และ calreticulin เพื่อศึกษาถึงบทบาทของ BiP ในการเป็นแชเพอโรน เทคนิค RNAi ได้ถูกนำมาใช้เพื่อลดปริมาณการแสดงออกของโปรตีน BiP ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า จำนวนของไวรัสเดงกีได้ลดจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อโปรตีน BiP ลดลง นอกจากนี้ การลดปริมาณการแสดงออกของ โปรตีน calnexin และ calreticulin มีผลให้จำนวนไวรัสลดลง อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน เมื่อพิจารณาจากปฏิสัมพันธ์จากเทคนิค co-localization ซึ่งให้เห็นว่า น่าจะมีปฏิสัมพันธ์ระหว่าง BiP, calnexin และ calreticulin ร่วมกับโปรตีนอื่นของไวรัสเดงกี เช่น โปรตีน PrM และ โปรตีน NS1 ดังนั้นจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น ของโปรตีนแชเพอโรนทั้งสามชนิดกับโปรตีน envelope รวมทั้งโปรตีนอื่นของไวรัสเดงกีนั้น มีความสำคัญในการสร้างไวรัสเดงกี โดยเฉพาะการช่วยพับโปรตีนของไวรัสเดงกีอย่างเหมาะสมไปจนถึงการประกอบรวมกันของโปรตีนไวรัสเพื่อสร้างไวรัสเดงกี