PHYSICAL AND FUNCTIONAL INTERACTION OF DENGUE AND HOST PROTEIN

TEERA POYOMTIP

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (MICROBIOLOGY) FACULTY OF GRADUATE STUDIES MAHIDOL UNIVERSITY 2016

Copyright by Mahidol University

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

PHYSICAL AND FUNCTIONAL INTERACTION OF DENGUE AND HOST PROTEIN

TEERA POYOMTIP 5436626 SCMI/D

Ph.D. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PONPAN MATANGKASOMBUT CHOOPONG, S.D., SIWANON JIRAWATNOTAI, Ph.D., TRAIRAK PISIKUN, M.D.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) is the cause of a life-threatening infectious disease affecting around 390 million people annually. Viral non-structural protein 5 (NS5) is known to form ribonucleic acid (RNA) replication complex with host partners and regulate the RNA synthesis. However, the molecular details remain obscure. Therefore, the understanding of the physical and biochemical nature of the interactions plays a pivotal role in viral research and the interactions could open an avenue to develop a new drug target for the dengue patients. In this study, the researcher studied live virus with the epitope tags inserted in viral genome compared to normal virus. The engineered DENV was infective in several human cell lines, and the tags virus showed the same viral kinetic as the parental virus. The tags allowed co-IP of NS5 protein from the infected cells. Utilizing recombinant virus, the researcher identified novel NS5-interacting partners in Huh-7 cells. This result revealed, for the first time, that ribonucleoproteins and fatty acid biosynthesis complexes were in the NS5-interacting network and worked as viral replicase integrators. The study generated NS5 interaction network using tagged virus for the first time. Moreover, dengue NS5 is a phosphor-protein which the exact role of phosphorylation on this protein is still under investigation. The researcher used *in silico* analysis to screen the potential kinases, which phosphorylate NS5 and the *in vitro* kinase assay were performed to confirm the specific kinases which were able to phosphorylate NS5 protein. The role of enzyme kinases in dengue viral infection was accessed by inhibitors, an activator and specific siRNAs. The research results indicated that PKC and Akt could act as a restricting mechanism that modulated the DENV replication and repressed the viral outburst in the host cells. Using combined *in silico*, genetic engineering and biochemical approaches shaded light on how the DENV protein interacted with various host proteins to survive, and could be explored for therapeutic treatment.

KEY WORDS: NS5/ DENGUE VIRUS/ TAGGED DENGUE VIRUS/ PROTEIN INTERACTION/RIBONUCLEOPROTEINS/ PKC/ Akt

Copyright by Mahidol University

156 pages

ปฏิสัมพันธ์ทางกายภาคและเคมีของเดงกี่ไวรัสโปรตีนกับโปรตีนเจ้าบ้าน

PHYSICAL AND FUNCTIONAL INTERACTION OF DENGUE AND HOST PROTEIN

ธีระ โพยมทิพย์ 5436626 SCMI/D

ปร.ด. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: พรพรรณ มาตังคสมบัติ ชูพงศ์, S.D., ศิวนนท์ จิรวัฒโนทัย, Ph.D., ไตรรักษ์ พิสิษฐ์กุล, M.D.

บทคัดย่อ

เดงกี่ไวรัสเป็นไวรัสที่ทำให้ผู้ติดเชื้อเกิดการเสียชีวิตโดยเฉลี่ยมีผู้ติดเชื้อมากถึงประมาณ 390 ล้านคนต่อปี โดยโปรตีนสำคัญของเชื้อที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนไวรัสคือ NS5 ซึ่งโปรตีนดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับโปรตีนเจ้าบ้าน ทว่ากลไกลของการทำปฏิกริยาระหว่างไวรัสโปรตีนกับโปรตีนเจ้าบ้านดังกล่าวยังไม่มีความเข้าใจที่ชัดเจน ดังนั้นการวิจัยความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาทางกายภาพ และชีวเคมีการทำงานร่วมกันของโปรตีนของไวรัสและโปรตีนเจ้าบ้าน ที่มีผลต่อการควบคุมการทำงานของไวรัสโปรตีนชนิดนี้ จึงมีความจำเป็นในการเข้าใจเพื่อที่จะใช้ในการพัฒนายารักษาโรคต่อไป งานวิจัยนี้ได้ทำการใช้เชื้อไวรัสที่มีเปปไทด์ติดตาม(tag) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวระหว่างเจ้าบ้านกับไวรัสในสภาพที่ใกล้เคียงการติดเชื้อในธรรมชาติมากที่สุด ทำให้งานวิจัยนี้สามารถที่จะผลิตไวรัสที่มีคุณสมบัติเหมือนจริงตามธรรมชาติที่มีความสามารถในการติดต่อได้ในเซลล์หลายชนิด และเหมาะสมแก่การวิจัยแยกโปรตีน NS5 ให้บริสุทธิ์ จากผลการใช้โมเดลนี้ในการศึกษาการรวมกลุ่มของโปรตีนระหว่างไวรัสและเจ้าบ้านพบว่า NS5 จะเข้าจับกับกลุ่มโปรตีนที่หลายชนิดมีหน้าที่เกี่ยวกับอาร์เอ็นเอ และกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ไขมันเป็นหลัก โดยสรุปงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาระหว่างโปรตีนไวรัสและเจ้าบ้านซึ่งจะเป็นพื้นฐานของของการศึกษาไวรัสต่อไป นอกจากนี้ ในการศึกษาความสัมพันธ์ที่ควบคุมการทำงานของโปรตีน NS5 ผู้วิจัยได้ใช้การวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์เพื่อหาโปรตีนที่สามารถเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ NS5 ได้ โดยผลการวิจัยพบว่า PKC และ Akt สามารถเติมหมูฟอสเฟตให้แก่ NS5 ได้ในหลอดทดลอง และการยับยั้งการทำงานด้วยสารยับยั้งโปรตีน PKC และ Akt รวมไปถึงการลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัสได้ดียิ่งขึ้น งานวิจัยที่ใช้การผสมผสานเทคโนโลยีทางการวิเคราะห์ข้อมูลทางคอมพิวเตอร์ พันธุวิศวกรรม และชีวเคมี สามารถทำให้เข้าใจการดำรงชีวิตของไวรัสไข้เลือดออกและอาจนำไปสู่การรักษาที่มีประสิทธิผลได้

156 หน้า

Copyright by Mahidol University