OPTIMIZATION OF DENGUE E PROTEIN EXPRESSION FROM MAMMALIAN CELLS FOR VIRUS-LIKE PARTICLE DEVELOPMENT

SATHIPORN SUKSATHAN 5536141 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORY COMMITTEE : DUNCAN R. SMITH, Ph.D., SITTIRUK ROYTRAKUL, Ph.D., CHUTIMA THEPPARIT, Ph.D., PROMSIN MASRINOUL, Ph.D.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) is a positive-sense, single-stranded RNA virus. The surface of the viral particle contains two transmembrane proteins, E (envelope) and M (membrane). The E protein is the major antigenic determinant of DENV. To date, there is no commercial vaccine to prevent DENV infection. Virus-like particles (VLP) are possible dengue vaccine candidates. This study aimed to investigate the strategies contributing to higher yields of DENV-2 prM-E VLPs from mammalian cell culture systems. Five VLPs expressing DENV-2 prM-E with some modifications were constructed, including constructs with and without a YPTI motif to facilitate protein secretion, with or without the DENV capsid (C) native signal peptide sequence, and a construct with the VSV-G signal sequence and codon optimization (pC2-D2-prM-E, pC2-D2YPTI-prM-E, pC2-D2-C-prM-E, pC2-D2YPTI-C-prM-E, and pcDNA-D2opt.prM-E, respectively). DENV-2 VLP constructs were transfected into mammalian cells. From western blot analysis (WB), only cells transfected with constructs containing the C signal sequence (pC2-D2CprM-E and pC2-D2CYPTI) showed E protein expression, but there was no evidence of secretion into the media, as further verified by dot blot analysis and immunoprecipitation (IP) assays. Because of the deficiency of E protein expression in transfected cells, the presence of the VLP constructs in the transfected cells was evaluated by PCR. Interestingly, the results showed that pC2-D2C-prM-E and pC2-D2YPTI-C-prM-E plasmids, which showed expression of E protein in WB, could not be detected by PCR. Stable transfection of pC2-D2C-prM-E and pC2-D2YPTI-C-prM-E was performed to increase E protein expressing cells. The WB of stable transfection showed E protein expression in cell lysates of both constructs but not in the media, and the IFA result showed only 20-30% of E protein expressing cells. However, E protein expression could be detected in cell lysates and the acetone precipitated supernatant of cells transfected with the pcDNA-D2opt.prM-E construct when using non-reducing loading dye as a loading buffer in WB. The optimal concentration that could increase the expression of E protein in both cells and media was determined to be 8 ug plasmid / 2.0 x 10^6 HEK 293 cells. The addition of oleic acid to the growth media significantly increased expression of E protein in the transfection lysate. Addition of the VSV-G signal sequence and codon optimization facilitated E protein production in a mammalian cell culture system, and the use of non-reducing loading buffer improved the detection sensitivity.

KEY WORDS: PRM-E/ VLP/ YPTI MOTIF/ VSV-G/ CODON OPTIMIZATION

140 pages

การศึกษาถึงปัจจัยที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีนอีของไวรัสเด็งกี่ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อใช้พัฒนาการผลิตอนุภาคที่คล้ายไวรัส

OPTIMIZATION OF DENGUE E PROTEIN EXPRESSION FROM MAMMALIAN CELLS FOR VIRUS-LIKE PARTICLE DEVELOPMENT

สาธิพร สุขสถาน 5536141 MBMG/M

วท.ม. (พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลและพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : DUNCAN R. SMITH, Ph.D., สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, Ph.D., ชุติมา เทพฤทธิ์, Ph.D., พร้อมสิน มาศรีนวล, Ph.D.

บทคัดย่อ

ไวรัสเด็งกี่เป็นไวรัสที่มีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งโปรตีนเปลือกหุ้มของไวรัสประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ Capsid (C), Envelope (E) และ Membrane (M) โดยโปรตีน E นั้นเป็นโปรตีนที่แสดงคุณสมบัติจำเพาะทางแอนติเจนของไวรัส ในปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนทางการค้าที่ใช้ป้องกันไวรัสเด็งกี่อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามอนุภาคที่คล้ายไวรัสเด็งกี่ (virus like particles) เป็นอีกหนึ่งทางเลือกสำคัญในการผลิตวัคซีน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีที่ช่วยเพิ่มผลผลิตอนุภาคที่คล้ายไวรัสเด็งกี่ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อนุภาคที่คล้ายไวรัส 5 ชนิดซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือยีน prM-E ของไวรัสเด็งกี่ซีโรไทป์สอง (D2-prM-E) ถูกสร้างขึ้นในงานวิจัยนี้ ได้แก่ pC2-D2-prM-E, pC2-D2YPTI-prM-E ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน YPTI ที่ได้จาก Yellow fever virus มีหน้าที่ช่วยในการขนส่งอนุภาคไวรัสจาก ER สู่ Golgi apparatus, pC2-D2-C-prM-E และ pC2-D2YPTI-C-prM-E ซึ่งประกอบด้วยเพปไทด์ส่งสัญญาณ (signal peptide) ของไวรัสเด็งกี่ และ pcDNA-D2opt.prM-E ที่ประกอบด้วยเพปไทด์ส่งสัญญาณจาก Vesicular stomatitis virus (VSV-G) และปรับเปลี่ยนรหัสพันธุกรรม (codon) ของ prM-E ให้เหมาะสมกับการแสดงออกในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในการเปรียบเทียบผลผลิตของอนุภาค 4 ชนิดแรก อนุภาคแต่ละชนิดถูกนำเข้าสู่เซลล์และตรวจสอบการผลิตโปรตีน E ทั้งในเซลล์และนอกเซลล์ (อาหารเลี้ยงเซลล์) ด้วยวิธี Western blot (WB) พบว่ามีเพียง pC2-D2-C-prM-E และ pC2-D2YPTI-C-prM-E ที่สามารถผลิตโปรตีน E ในเซลล์ แต่ไม่สามารถตรวจพบโปรตีน E ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของทั้ง 4 อนุภาคได้ ทั้งโดยวิธี WB, Dot blot analysis และ Immunoprecipitation เนื่องด้วยความด้อยประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีน E จึงมีการตรวจสอบการคงอยู่ของอนุภาคภายในเซลล์ด้วยวิธี PCR และพบว่าอนุภาคที่สามารถตรวจพบการผลิตโปรตีนออกมาในเซลล์ด้วยวิธี WB ได้แก่ pC2-D2-C-prM-E และ pC2-D2YPTI-C-prM-E ไม่สามารถตรวจพบการดำรงอยู่ของอนุภาคภายในเซลล์ ดังนั้นหลังการนำอนุภาคเข้าสู่เซลล์จึงคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่มีอนุภาคอยู่ โดยใช้คุณสมบัติการต้านยาของอนุภาคและพบว่าเซลล์ที่คัดเลือกสามารถผลิตโปรตีน E ออกมาเพียงแค่ภายในเซลล์ ไม่พบโปรตีน E ภายนอกเซลล์ Immunofluorescent assay แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ถูกคัดเลือกมีเพียง 20-30% ที่สามารถผลิตโปรตีน E อย่างไรก็ตามพบว่าอนุภาค pcDNA-D2opt.prM-E สามารถผลิตโปรตีน E ทั้งภายในเซลล์และสามารถตรวจพบภายนอกเซลล์โดยการตกตะกอนโปรตีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยอะซีโตนและใช้ loading buffer ที่ไม่ผสม DTT ในกระบวนการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าสำหรับ WB ซึ่งปริมาณอนุภาคต่อจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการนำเข้าสู่เซลล์คือ 8 ไมโครกรัมต่อ 1.8 x 10^6 เซลล์ นอกจากนั้นการเพิ่มกรดอะมิโนชนิดโอเลอิกในอาหารเลี้ยงเซลล์ของอนุภาค pcDNA-D2opt.prM-E มีผลให้เพิ่มการผลิต E โปรตีนในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น ทั้ง VSV-G และการปรับเปลี่ยน codon สามารถช่วยเพิ่มการผลิตโปรตีน E ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ อีกทั้งการใช้บัฟเฟอร์ที่ไม่ผสม DTT ยังช่วยเพิ่มความไวในการตรวจพบโปรตีน E ได้อีกด้วย

140 หน้า