

Abstract

Dengue virus (DENV), an ~10.7-kb positive-sense RNA virus, is the most common arthropod-transmitted pathogen in the world. Despite dengue's clear epidemiological importance, mechanisms for its replication remain elusive. Recently, we have identified a consensus RNA promoter sequence in the SL element in the 3'-UTR of viral genome. This RNA element is specifically recognized by the viral non-structural protein 5 (NS5), which is an exclusive viral RNA-dependent RNA polymerase or RdRp, in viral replication cycle in infected cells. We utilized this robust interaction to establish a new experimental method for analyzing *in vivo* global interaction of host-pathogen, so-called PAR-CLIP (Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation). In the first stage, we developed a novel recombinant DENV that contains a TAP (tandem-affinity purification) -tag epitope including an octahistidine (8xHis) tag followed by a FLAG tag inside the methyltransferase (MTase) domain of the NS5 protein. We showed that this engineered, tagged (et) DENV was infective in several human cell lines and the tags were stable over multiple viral passages, suggesting negligible structural and functional disturbance of NS5. This is so far the first report of stable, infectious tagged DENV. In the mid stage of the project, we performed a large-scale production of etDENV, and further provided proof-of-concept for the use of rationally tagged virus by revealing a high confidence NS5 interaction network in human hepatic cells. Our analysis uncovered previously unrecognized hnRNP complexes and several low-abundance fatty acid metabolism genes, which have been implicated in viral life cycle. Our study has set a new standard for investigation of host-flavivirus interaction. In the last term of the study, we have completed the PAR-CLIP procedure and explored the global interactome of DENV RNA genome with the human factors for the first time. The results revealed uncharacterized complexes involved in interaction with viral RNA such as RNA processing, MCM complex, and chaperones. Although essential roles played by these human complexes in DENV replication definitely require further study to complete the full picture, this work, for the first time, provided mean of investigation and two interactome layers of DENV RNA and NS5 with human proteome. Our results suggest host-pathogen interaction is more prevalent but shaped than earlier believed.

(ภาษาไทย)

ไวรัสไข้เลือดออกเป็นอาร์เอ็นเอไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายบวกขนาดประมาณ 10.7 กิโลเบส (kb) โดยเชื้อไวรัสดังกล่าวอาศัยสัตว์จำพวกแมลงในการแพร่กระจาย ทั้งๆที่ความสำคัญทางระบาดวิทยาของไวรัสเป็นที่ทราบแน่ชัด แต่กระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน เมื่อเร็วๆนี้ คณะผู้วิจัยได้ค้นพบลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่เป็น RNA promoter อยู่บนโครงสร้างของอาร์เอ็นเอที่เรียกว่า SL บริเวณด้าน 3'-UTR ของจีโนมไวรัส โดยโครงสร้างของอาร์เอ็นเอดังกล่าวเป็นบริเวณที่เกาะจำเพาะของโปรตีน NS5 (viral non-structural protein 5) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA-dependent RNA polymerase หรือ RdRp) ของไวรัสที่ทำหน้าที่ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในเซลล์ที่ติดเชื้อ คณะผู้วิจัยมีความคิดใหม่อาศัยปฏิสัมพันธ์จำเพาะของอาร์เอ็นเอโปรโมเตอร์ที่ค้นพบนี้สร้างวิธีการใหม่ที่เรียกว่า PAR-CLIP ซึ่งย่อมาจาก Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation ในการศึกษาวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ทั้งหมดภายในเซลล์เจ้าบ้านที่สัมพันธ์กับเชื้อไวรัส ในระยะแรกของโครงการวิจัยคณะผู้วิจัยได้พัฒนาไวรัสไข้เลือดออกลูกผสมชนิดใหม่ โดยทำการติดฉลากหรือ tag epitope (8xHis tag ตามด้วย FLAG tag) ภายในบริเวณ methyltransferase domain (MTase) ของโปรตีน NS5 ซึ่งผลการสร้างไวรัสลูกผสมที่มีการติดฉลากดังกล่าว สามารถทำให้ human cell line หลายชนิดติดเชื้อ

ได้ และฉลากที่ติดในไวรัสสามารถคงอยู่ตลอดการเพาะเลี้ยงไวรัสหลายๆ รอบ นั้นแสดงให้เห็นว่าบริเวณที่ติดฉลากไม่มีผลกระทบต่อโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน NS5 และนี่เป็นผลการรายงานครั้งแรกที่มีการติดฉลากไวรัสใช้เลือดออกโดยไม่ส่งผลเสียต่อไวรัสได้ ในระยะกลางของโครงการนี้ คณะผู้วิจัยได้เพิ่มจำนวนไวรัสลูกผสม (etDENV) และนำไปใช้ทดสอบความเป็นไปได้ของไวรัสลูกผสมต่อการศึกษาเครือข่ายปฏิสัมพันธ์ของโปรตีน NS5 ในเซลล์ตับของมนุษย์ (human hepatic cells) จากผลการวิเคราะห์ เราพบ heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) complexes ที่ยังไม่มีที่ค้นพบมาก่อน รวมถึงหลายๆ ยีนในกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดไขมันที่เกี่ยวข้องกับวงจรชีวิตของไวรัส ซึ่งการศึกษาของเราได้สร้างมาตรฐานใหม่ ในการตรวจสอบปฏิสัมพันธ์ระหว่าง flavivirus และเซลล์เจ้าบ้าน ในระยะสุดท้ายของการศึกษา คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการกระบวนการ PAR-CLIP และสำรวจ global interactome ของสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอของไวรัสใช้เลือดออกกับโปรตีนภายในเซลล์มนุษย์ (human factors) เป็นครั้งแรก ผลการศึกษาได้เผยถึง complexes ใหม่ที่เกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์กับสายอาร์เอ็นเอของไวรัส ตัวอย่างเช่น RNA processing, MCM complex และ chaperones แม้ว่าบทบาทสำคัญของ human complexes ที่ค้นพบนั้น ต่อกระบวนการเพิ่มจำนวนไวรัสใช้เลือดออกยังต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ภาพรวมของการศึกษาสมบูรณ์แบบ แต่โครงการวิจัยนี้ได้สร้างวิธีการศึกษาปฏิสัมพันธ์ของไวรัสภายในเซลล์ รวมถึงแสดง interactome layers ของ DENV RNA และโปรตีน NS5 กับ human proteome เป็นครั้งแรก จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าลักษณะโครงสร้างปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรคและเซลล์เจ้าบ้าน (host-pathogen interaction) นั้นมีความหลากหลายแต่เป็นรูปร่างที่จำเพาะมากกว่าที่เคยเชื่อกันมา