



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสแดง
กึ่งในการเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในเซลล์ C6/36 และ Vero

โดย ขวัญฤทัย ชื่นอินมณู

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ

พฤษภาคม 2562

สัญญาเลขที่ TRG5980011

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสแดง
กึ่งในการเลี้ยงอย่างต่อเนื่องในเซลล์ C6/36 และ Vero

ผู้วิจัย ขวัญฤทัย ชื่นอินมณู

สังกัด งานกลุ่มวิจัยและเครือข่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ศิริราช

พยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและต้นสังกัด

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : TRG5980011

Project Title : Detection of Genetic Variations Associated with Phenotypic Changes in Dengue Virus driven by Serial Passaging in C6/36 and Vero cells

Investigator : Kwanrutai Chininmanu

Research Division / Faculty of Medicine Siriraj Hospital / Mahidol University / 2 Wang Lang Rd, Bangkoknoi, Bangkok 10700

E-mail Address : kwanrutai@gmail.com, kwanrutai.chi@mahidol.edu

Project Period : 2 Years and 1 year extension

บทคัดย่อ

การเลี้ยงไวรัสเดงกีอย่างต่อเนื่องใน cell line ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไวรัสเป็นวิธีการปกติที่ใช้ในการพัฒนาเดงกีวัคซีนเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (live-attenuated dengue vaccine) นอกจากนี้การเลี้ยงไวรัสเดงกีอย่างต่อเนื่องใน cell line เช่น เซลล์ C6/36 จากยุงลาย (*Aedes albopictus*) และเซลล์ Vero (เซลล์ไตของลิง African green monkey kidney cells) ซึ่งใช้ทั่วไปในการศึกษาวิจัยเชื้อไวรัสเดงกีหรือการทำ stock เชื้อไวรัสเดงกี ก็สามารถส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype ของเชื้อไวรัสเดงกีได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามข้อมูลของความเชื่อมโยงของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Genotypic change) กับการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์ (Phenotypic change) ที่เกิดขึ้นในช่วงที่เลี้ยงไวรัสอย่างต่อเนื่องใน cell line ยังไม่มีการอธิบายไว้ชัดเจน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการแยกไวรัสเดงกีจากพลาสมาของคนไข้ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทัยป์หนึ่ง จำนวนหนึ่ง ตัวอย่างลงใน C6/36 cell และ Vero cell และเลี้ยงไวรัสอย่างต่อเนื่องในเซลล์ทั้งสองชนิดจำนวน 15 passages โดยใน passage ที่ 2 – 15 จะทำการเพาะเลี้ยงไวรัส passage ละสามซ้ำ ไวรัสเดงกีที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องนี้แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype คือขนาดของ Foci และรูปแบบของ Foci ที่เปลี่ยนแปลงไปในไวรัสเดงกีแต่ละ passage ที่เพาะเลี้ยง ไวรัสเดงกีที่เพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่องใน C6/36 และ Vero เริ่มสร้างรูปแบบของ foci ที่จำเพาะต่อชนิดของ Cell line ที่เพาะเลี้ยงตั้งแต่ passage ที่สามเป็นต้นไป โดยไวรัสเดงกีจาก Vero cell เริ่มสร้าง foci ขนาดใหญ่ (Large foci) ตั้งแต่ passage ที่สาม ดังนั้นจึงแนะนำว่าในการศึกษา

ไวรัสเดงกีจากตัวอย่างคนไข้ไม่ควรเพาะเลี้ยงไวรัสเดงกีเกินกว่า passage ที่สองเพื่อรักษา phenotype เดิมของไวรัสเดงกีที่มาจากตัวอย่างผู้ป่วยเอาไว้ จากนั้นไวรัสเดงกีจาก C6/36 และ Vero ใน passage ที่หนึ่ง (P1) passage ที่สอง (P3) และ passage ที่ห้า (P5) ถูกเลือกเพื่อส่งไปหาลำดับเบส Whole Genome Sequencing (WGS) ด้วย Illumina ผล WGS แสดงให้เห็นว่ามี genotypic change เกิดขึ้นตั้งแต่ P1 โดยจาก variations ที่พบในตัวอย่างไวรัสเดงกีจากพลาสมา (ข้อมูลจากการทดลองในโครงการก่อนหน้านี้) จำนวน 1,031 ตำแหน่ง มี variations ที่ส่งต่อไปที่ P1 ของ C6/36 จำนวน 39 ตำแหน่ง และ Vero จำนวน 37 ตำแหน่ง และคงเหลืออยู่ใน P3 และ P5 ของ C6/36 และ Vero จำนวน 14 และ 24 ตำแหน่งตามลำดับ โดย Variations จากพลาสมาผู้ป่วย (P0) ที่พบ conserved อยู่ในทั้งสาม passage ของ cell line ทั้งสองชนิดมีแค่แปดตำแหน่งเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบ variations ใหม่ในไวรัสเดงกีจากทั้งสาม passages ของ cell line ทั้งสองชนิด โดยเฉพาะ Vero ที่สร้าง variants ใหม่มากกว่า C6/36 นอกจากนี้ไวรัสเดงกีจากแต่ละชนิดเซลล์ยังสร้าง variants ที่จำเพาะต่อเซลล์นั้น ๆ (cell-type specific variants) อีกด้วย โดย variants จำนวน 20 จาก 22 ตำแหน่งจาก Vero ถูกพบอยู่ใน coding region ในขณะที่ variants ที่จำเพาะต่อ C6/36 ทั้งหมดพบอยู่ใน Untranslated region (UTR) จากผลแสดงให้เห็นว่า Vero cell ส่งผลให้ไวรัสเดงกีเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับ Genotype และ Phenotype ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงไวรัสใน C6/36 cell ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้พยายามที่จะระบุ Variation ที่อาจสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype ของไวรัสเดงกีด้วย โดยพบว่ามี variants จำนวน 19 ตำแหน่งที่พบเฉพาะใน P3 และ P5 ของ Vero ซึ่งเป็น passage ที่ไวรัสเดงกีสร้าง large foci โดย variants ทั้ง 19 ตำแหน่งนี้ทั้งหมดเป็น non-synonymous variation ซึ่งเปลี่ยนชนิด Amino acid โดยหลายตำแหน่งพบอยู่ในยีน NS4B โดย variants เหล่านี้อาจสัมพันธ์กับการเกิด large foci ในไวรัสเดงกีจาก Vero ได้ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของ variations เหล่านี้ต่อการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype หรือ fitness ของไวรัสเดงกีใน Vero cell จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลต่อไป.

Abstract

The serial passaging to accumulate genetic changes is one of the methods commonly used in live-attenuated dengue vaccine development. In addition, extensive serial passaging in cell lines, such as C6/36 from *Aedes albopictus* mosquito and Vero cells from African green monkey kidney epithelial cells, routinely used for virus research or stock collection also resulted in phenotypic changes. However, there is still no clear information connecting genetic changes to phenotypic changes observed during serial passaging. In this study, we isolated dengue virus from the plasma of a dengue patient and then serially passaged dengue virus in C6/36 and Vero cells in triplicate. The virus from serial passages showed phenotypic changes including foci size

and pattern of foci. The dengue virus serially passaged in C6/36 and Vero cells started to develop the specific patterns of foci at the third passage after virus isolation from the plasma. The dengue virus cultured in Vero cell produced large foci since passage three (P3) onwards. Therefore, dengue virus from clinical isolation should not be cultured beyond the second passage to retain the original phenotype. Dengue virus cultured in C6/36 and Vero cells from passage 1 (P1), passage three (P3), and passage five (P5), were selected for genome sequencing by Illumina platform. The genome sequencing data revealed that genotypic changes occurred since the P1. Only 39 and 37 of 1,031 original variants detected in dengue virus sequenced from patient's plasma (P0) were transferred to P1 of C6/36, respectively. However, only 14 and 24 variants still remained in P3 and P5 from C6/36 and Vero cells. Only eight conserved variants were detected in P0 (patient's plasma) and P1, P3, and P5 of dengue cultured in C6/36 and Vero cells. New variants were found in all three passages of both cell lines, especially Vero. The cell-type specific variants were also observed in dengue virus from C6/36 and Vero cells. There are 20 from 22 Vero-specific variants found in coding region, whereas all of C6/36-specific variants were located in UTR. Therefore, Vero cells seemed to drive the higher rate of genotypic and phenotypic change in dengue virus population than that of C6/36 cell line. The variants which may associated to phenotypic change were identified. There are 19 variants detected only in P3 and P5 of Vero which may related to large foci. Interestingly, all 19 variants are non-synonymous with several variants located in NS4B gene. However, the correlation of these variations to phenotypic change or dengue fitness need to be further investigated.

Keywords : dengue virus, viral cell culture, genetic changing, C6/36 cell, Vero cell

Executive summary

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ไวรัสเดงกีเป็น single-stranded RNA virus ประกอบด้วยซีโรทัยป์ 1 ถึง 4 โดยไวรัสเดงกีทั้ง 4 ซีโรทัยป์เป็นสาเหตุให้เกิดโรคไข้เดงกี และไข้เลือดออกเดงกี ในการศึกษาไวรัสเดงกีหลายๆ อันต้องทำการแยกไวรัสและเลี้ยงใน cell line เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสและเก็บไว้เพื่อการศึกษาต่อไป cell line ที่ถูกใช้อย่างแพร่หลายในการแยกเพาะเชื้อไวรัสเดงกี (virus isolation) คือ C6/36 เป็น cell ยุง Aedes albopictus ส่วนในการทำ viral titration และ viral propagation ชนิดของ cell lines ที่มักถูกใช้คือ C6/36 cells และ African green monkey kidney epithelial cells (Vero cells) นอกจากนี้ Vero cell ยังใช้ในการเพิ่มจำนวนไวรัสวัคซีนต้นแบบ (vaccine candidate) อีกด้วย

การทำ virus culture เป็นสิ่งจำเป็นต่อการศึกษาไวรัสหลายอย่าง เช่น การวินิจฉัยโรคจากไวรัส (virus diagnosis), การเพิ่มจำนวนไวรัส (viral propagation), cytopathic effect, และ antiviral susceptibility testing อย่างไรก็ตาม ตามที่เดงกีไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงทางจีโนมได้สูงภายใต้ selective pressure ของ host การเลี้ยง cell culture หลายๆ passages สามารถส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบประชากรไวรัสได้ ในการสร้าง live-attenuated vaccine ไวรัสเดงกีจะถูก sub-cultured ในหลายๆ passage ของ Primary Dog Kidney (PDK) cell เพื่อทำให้เชื้ออ่อนฤทธิ์ โดยมี biological marker ที่สัมพันธ์กับการอ่อนฤทธิ์ของเชื้อ เช่น plaque ขนาดเล็ก (small plaque size) และ temperature sensitive ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก (phenotypic change) ที่สังเกตได้บน cell culture จะเกิดขึ้นเมื่อมีการเลี้ยง cell ต่อเนื่องหลาย passage จากข้อมูลการศึกษาก่อนหน้านี้ในการหาลำดับเบสของไวรัสเดงกี stain ต้นแบบ (prototype stain) ที่ถูกเลี้ยงผ่านมาหลายๆ passages พบความแตกต่างบน genome sequence เมื่อเทียบกับ sequence ของ prototype stain เดียวกันที่ submit ใน Genbank สถานการณ์นี้อาจอธิบายได้โดย population bottleneck และ selection ซึ่งถูกผลักดันโดยสภาพแวดล้อมที่ไวรัสอยู่ เช่น ไวรัสถูกย้ายจาก cell line ชนิดหนึ่งไปเลี้ยงใน cell line อีกชนิดหนึ่งเช่น จาก Primary Dog Kidney cell (PDK) ไปเพิ่มจำนวนใน Vero cell ในการสร้างวัคซีน หรือการย้ายจากพลาสมาของผู้ติดเชื้อไวรัสเดงกีไปสู่ C6/36 cell lines ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรไวรัส (viral population) อาจเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ช่วงแรก อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงนี้ชัดเจน

ดังนั้นในโครงการนี้จึงทำการศึกษารูปแบบของการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรไวรัสเดงกีเมื่อถูกเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง (serial passages) ใน C6/36 และ Vero cells โดยใช้ Next-Generation Sequencing Technology โดยไวรัสเดงกีจากพลาสมาของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 1 จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่เรามีข้อมูล sequence อยู่แล้วจากการศึกษาก่อนหน้าถูกนำมาเลี้ยงอย่างต่อเนื่องใน C6/36 และ Vero cells และติดตามศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ phenotype (Phenotypic change) ได้แก่ ขนาดและรูปแบบของ Foci ที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละ passage จากนั้นจึงเลือกไวรัสเดงกีจำนวนสาม passages จาก cell line ทั้งสองชนิดมา

หาลำดับเบสของจีโนม (Whole Genome Sequencing) ด้วย Illumina sequencing platform ข้อมูลที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางชีวสารสนเทศเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจีโนมในกลุ่มประชากรของไวรัสเดงกีตามลักษณะ phenotype ที่เปลี่ยนไปในแต่ละชนิดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยง ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นรูปแบบการเปลี่ยนแปลงทางจีโนม (Genotypic change) ร่วมกับลักษณะภายนอก (Phenotypic change) ที่เกิดขึ้นโดยการเลี้ยงไวรัสใน C6/36 และ Vero cell ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการว่าเป็นเช่นไร และสามารถระบุ limit ของจำนวน passage ในการทำ virus propagation ที่ยังคงรักษารูปแบบ phenotype ของกลุ่มประชากรตั้งต้นจากตัวอย่างคนไข้ ไว้ได้เพียงพอเพื่อการศึกษาไวรัสในด้านต่างๆ และสามารถระบุ variations ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype ของไวรัสเดงกีที่เพาะเลี้ยงใน cell line ด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic variation) ของกลุ่มประชากรไวรัสเดงกี ที่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงภายนอก (Phenotypic change) ที่เกิดขึ้นจากการผลัดกันของการเลี้ยงไวรัสอย่างต่อเนื่อง (serial passaging) ใน C6/36 และ Vero cells
2. เพื่อศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นจำเพาะกับชนิดของ cell line

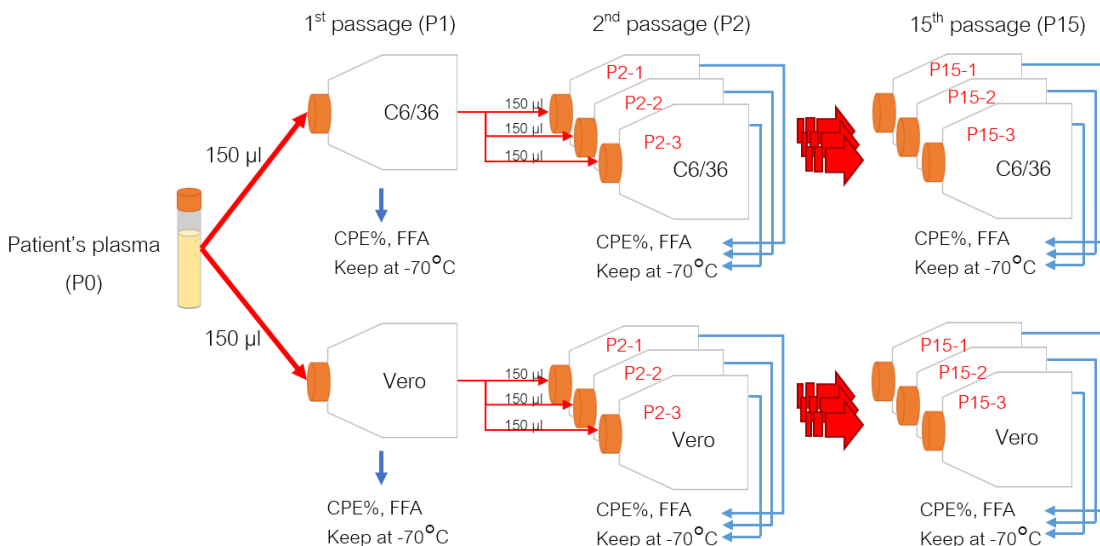
ระเบียบวิธีวิจัย

Virus culture from plasma of dengue infected patient

ในโครงการนี้ได้คัดเลือกพลาสมาจำนวนหนึ่งตัวอย่างจากผู้ป่วยไข้เลือดออก (Dengue Hemorrhagic Fever) ที่ติดเชื้อไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 1 โดยตัวอย่างที่นำมาใช้ได้หาลำดับเบสทั้งจีโนมของไวรัสเดงกีด้วย Next-Generation Sequencing technology ไว้แล้วจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของทีมนักวิจัยเดียวกัน โดยข้อมูลลำดับเบสชุดนี้เป็นข้อมูลจีโนมของกลุ่มประชากรไวรัสเดงกีที่อยู่ในพลาสมาของคนไข้จริง เนื่องจากได้สกัด RNA ของไวรัสเดงกีจากพลาสมาคนไข้โดยตรงแล้วนำไปทำ PCR โดยใช้ Serotype specific primer ที่จับบริเวณ conserved บน genome ของไวรัสเดงกีซีโรทัยป์ 1 และนำ PCR product ไปหาลำดับเบสเลยโดยไม่ได้ผ่านการทำ cloning หรือ cell culture ก่อน ข้อมูลชุดนี้จะถูกใช้เป็นข้อมูลตั้งต้น (original virus) ในการวิเคราะห์ต่อไป

ไวรัสเดงกีในพลาสมาของคนไข้ถูกนำไป propagation ใน C6/36 และ Vero cell นับเป็น 1st passage (P1) เมื่อครบ 5 วัน Cell-free supernatant จำนวน 150 µl จาก P1 จะถูกเลี้ยงต่อใน C6/36 และ Vero เป็น 2nd passage (P2) โดยจะทำการเป็น triplicate ดังนั้นใน P2 จะมีจำนวน dengue culture ใน T25 ทั้งหมด 6 flasks เป็น C6/36 สาม flasks (C6/36_P2-1, C6/36_P2-1, P6/36_p2-3) และเป็น Vero สาม flasks (Vero_P2-1, Vero_P2-1, Vero_p2-3) จากนั้น cell-free supernatant ถูกแบ่งมาทำ Focus Forming Assay (FFA) ทันทีในวันที่เก็บ supernatant เพื่อศึกษา phenotype ที่เปลี่ยนแปลงไปของไวรัสเดงกีในทุก flasks ที่เลี้ยง ส่วน cell-free supernatant ที่เหลือของทุก flask จะถูก aliquot และเก็บที่ -70°C จากนั้น P2 ถูกเลี้ยง

จนครบห้าวัน (Day 5) ก็จะเก็บไวรัสเดงกีจาก P2 และเลี้ยงต่อไปยัง P3 โดยจะทำการทดสอบและเก็บ supernatant ตามวิธีการข้างต้น และจะทำซ้ำแบบนี้จนถึง 15th passage (P15) ขั้นตอนโดยสรุปแสดงในรูปด้านล่าง



Sequencing whole genome of dengue virus by Illumina sequencing platform

ไวรัสเดงกีที่เก็บได้จาก cell culture ข้างต้นสาม passages ได้แก่ P1 P3 และ P5 รวมถึง triplicate ของ P3 และ P5 ถูกนำมาหาลำดับเบสด้วยเทคโนโลยี Illumina โดยเหตุผลในการเลือกคือ

- P1 เป็น passage แรกที่ไวรัสจากพลาสมาถูกเปลี่ยนมาอยู่ใน cell line ซึ่งเป็นการเปลี่ยน Host ใหม่ซึ่งจะเป็นช่วงที่เกิด bottleneck จากการเปลี่ยนสิ่งแวดล้อมของไวรัสจากคนมาสู่เซลล์ยุง (C6/36) และเซลล์ลิง (Vero cell)
- P3 เป็น passage ที่เริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype ของเซลล์ ได้แก่ รูปแบบและขนาดของ foci จากการทำ FFA
- P5 เป็น passage ที่รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของ Phenotype คงที่ชัดเจน

อย่างไรก็ตาม ในไวรัสเดงกีที่เลี้ยงใน C6/36 cell line มีการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบและขนาด Foci ให้เห็นชัดเจนอีกครั้งใน P14 และ P15 จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตต่อไป

Data Analysis

ข้อมูลลำดับเบสที่ได้ทั้งหมดจะนำมาผ่านขั้นตอน data cleaning เพื่อให้เหลือเฉพาะข้อมูลที่มีคุณภาพ แล้วจึง assembly ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรม IVA เพื่อสร้าง consensus sequence ของแต่ละตัวอย่าง จากนั้นจะ mapped ข้อมูลทั้งหมดกับจีโนมของเดงกีไวรัสด้วยโปรแกรม BWA MEM แล้วนำไฟล์ผล alignment (BAM file) ที่ได้มาทำ Base recalibration ด้วย GATK pipeline เพื่อลด System error ที่อาจเกิดขึ้นจากขั้นตอนการ

หาลำดับเบสอีกครั้ง ก่อนจะนำไปทำการระบุตำแหน่ง variation (Variant calling) ที่พบจากผลการหาลำดับเบส ทั้งจีโนมของไวรัสแดงก็ด้วยโปรแกรม LoFreq โดย variation ที่พบอย่างน้อยจากสองในสามของการเลี้ยงไวรัส เป็น triplicate ในแต่ละ passage จึงจะถูกนำมาใช้ในการแปลผลการวิเคราะห์ต่อไป

Data interpretation

1. การติดตามการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรไวรัสแดงก็

จาก variations ที่พบในไวรัสแดงก็จากพลาสมาคนไข้จำนวน 1,031 ตำแหน่ง พบว่ามีเพียง 39 ตำแหน่งที่พบใน P1 ของไวรัสแดงก็จาก C6/36 และ 37 ตำแหน่งใน P1 จาก Vero และมี variations แค่ 8 ตำแหน่งเท่านั้นที่พบว่าถูกส่งต่อจากพลาสมาคนไข้ (P0) ไป P1 P3 และ P5 ของทั้ง C6/36 และ Vero โดยมี variations อยู่ 6 จาก 8 ตำแหน่งที่มี allele frequency $\geq 0.5\%$ และมีสองตำแหน่งที่เปลี่ยนชนิด Amino acid (Non-synonymous variation) คือที่ nucleotide T6885C (NS4B Val20Ala) และ nucleotide A8838G (NS5 Lys422Arg) นอกจาก variations ที่ถูกส่งต่อจาก P0 แล้ว เมื่อเลี้ยงไวรัสแดงก็ใน C6/36 และ Vero ไวรัสแดงก็มีการสร้าง variations ใหม่ในช่วงที่ไวรัสแดงก็เพิ่มจำนวนทั้งใน P1 P3 และ P5 โดยไวรัสแดงก็ที่เลี้ยงใน Vero cell มีการสร้าง variations ใหม่ในแต่ละ passage ในจำนวนสูงกว่าไวรัสแดงก็ที่เลี้ยงใน C6/36 cell โดยใน variations ที่สร้างใหม่นี้มี variations ที่เกิดขึ้นและจำเพาะกับแต่ละชนิดเซลล์ (cell-type specific variations) โดยใน Vero พบ cell-type specific variations 22 ตำแหน่งที่พบเฉพาะใน Vero ทั้งสาม passages โดยมี 15 ตำแหน่งเป็น Non-synonymous variations ส่วนใน C6/36 พบ cell-type specific variations ทั้งหมด 13 ตำแหน่งและทั้งหมดอยู่ใน Untranslated region จากข้อมูลลำดับเบสที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า ไวรัสแดงก็ที่เพาะเลี้ยงใน cell line ทั้งสองชนิดมีการเปลี่ยนแปลงทาง Genotype ตั้งแต่ P1 โดยมี population ที่ถูกคัดเลือกจาก P0 ส่งต่อไปยัง P1 ของแต่ละ cell line และมี population ใหม่ที่เกิดขึ้นจาก selective pressure ของแต่ละ host cell โดยจะเห็นได้จาก variations ที่พบในไวรัสแดงก็จาก C6/36 และ Vero แสดงให้เห็นว่า ไวรัสแดงก็ที่เลี้ยงใน Vero cell มีการเปลี่ยนแปลงทาง Genotype สูงกว่าไวรัสแดงก็ที่เลี้ยงใน C6/36 ในระยะเวลาที่เท่ากัน

2. การค้นหา variation ที่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับ phenotypic change

จากผลการทำ Focus Forming Assay (FFA) ของแดงก็ไวรัสจาก P1 P3 และ P5 ของ C6/36 และ Vero ทั้งสามซ้ำ (Triplicate) พบว่าไวรัสแดงก็เมื่อเลี้ยงอย่างต่อเนื่องใน cell line มีการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype ทั้งขนาดและรูปแบบของ foci โดยไวรัสแดงก็ที่เลี้ยงใน C6/36 และ Vero มีเปลี่ยนแปลงของรูปแบบของ foci ที่จำเพาะและแตกต่างกันอย่างชัดเจน

ใน P1 และ P2 ของทั้ง C6/36 และ Vero ยังมีขนาดและรูปแบบ foci ที่ไม่แตกต่างกัน (Homogeneous foci) โดย foci ที่เกิดขึ้นมีขนาดไม่เกินหัวเข็มหมุด (pinhead foci) ใน P3 ของ C6/36 ยังพบรูปแบบของ foci เหมือนกับใน P1 และ P2 ไวรัสแดงก็จาก C6/36 เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของ foci ให้เห็นใน P4 โดยมีรูปแบบ foci ที่ผสม (Heterogeneous foci) ระหว่าง pinhead foci และ foci ที่ขนาดเล็กกว่า โดยจะพบรูปแบบ foci แบบนี้ จนถึง P13 และเริ่มมีรูปแบบของ foci ที่เปลี่ยนแปลงให้เห็นชัดเจนอีกครั้งใน P14 และ P15 โดยรูปแบบของ foci จะคล้ายคลึงกับ P3 ของ Vero

สำหรับไวรัสแดงก็จาก Vero ใน P3 เริ่มมีรูปแบบของ foci ที่ปะปนระหว่าง pinhead foci และ foci ที่มีขนาดใหญ่กว่า และสามารถเห็นรูปแบบของ foci ที่จำเพาะต่อ Vero ได้อย่างชัดเจนใน P4 เป็นต้นไป โดย foci ที่พบใน Vero เป็น foci ขนาดใหญ่มาก (Large foci) และมี foci ขนาดเล็กเป็นจุดกระจายอยู่โดยรอบ ซึ่ง large foci จะพบเป็นรูปแบบหลักที่พบจนถึง P15 โดยสามารถพบ pinhead foci ปะปนมาด้วยเล็กน้อย

เมื่อดูข้อมูล Variations ใน P3 และ P5 ของ Vero ซึ่งเป็น passage ที่พบ large foci นั้นพบว่า Variations จำนวน 19 ตำแหน่งที่พบเฉพาะใน P3 และ P5 ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด Large foci ใน Vero ได้ และพบว่า variations ทั้ง 19 ตำแหน่งอยู่ในบริเวณ coding region และเป็น Non-synonymous variations ทั้งหมด โดยยีนที่พบ variations มากที่สุดคือ NS4B โดยพบมีการศึกษามาแล้วว่า variation ที่ NS4B V116M V116A T109I L113F และ P105L ทำให้เพิ่ม replication ของไวรัสแดงที่ซีโรทัยป์ 1 ใน Vero cell โดยพบ large foci ในไวรัสแดงที่มี variation NS4B V116M และ V116A ที่เลี้ยงใน Vero ด้วยเช่นกัน โดย variations ที่มีรายงานแล้วเหล่านี้ถูกพบใน P3 และ P5 ของ Vero ในการศึกษาด้วย อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของ variations ตำแหน่งอื่น ๆ กับการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype หรือ fitness ของไวรัสแดงก็ใน Vero cell นั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลต่อไป

สำหรับ C6/36 เนื่องจาก foci ที่เกิดขึ้นไม่มีรูปแบบของ foci ที่โดดเด่นชัดเจนเช่นที่พบใน Vero จึงทำให้ยากต่อการสรุป variation ที่น่าจะสัมพันธ์กับรูปแบบ foci ที่เกิดขึ้น

3. จำนวน passage ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไวรัส

จากผลการเปลี่ยนแปลงของ Genotype ที่พบจากผลการหาลำดับเบส และการเปลี่ยนแปลง phenotype คือขนาดและรูปแบบ foci จากการทำ FFA ในศึกษานี้พบว่า ในการศึกษาไวรัสแดงก็ไม่ควรเลี้ยงไวรัสแดงก็เกินสอง passages เพื่อรักษารูปแบบของ phenotype เท่าที่เหลื่ออยู่จากไวรัสตั้งต้นไว้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ เราไม่สามารถได้ข้อมูลรูปแบบ foci จากการทำ FFA ของไวรัสจากพลาสมาโดยตรงได้ ข้อมูล phenotype ที่มีเริ่มต้นได้จาก passage แรกที่ทำ virus isolation จากพลาสมาคนไข้ไปที่ C6/36 และ Vero cell ดังนั้นจึงทำได้แค่เปรียบเทียบกับรูปแบบของ phenotype ที่ยังคงที่ใน P1 เท่านั้น อย่างไรก็ตามหากดูจากผล variations จะ

เห็นได้ชัดเจนว่ามีการเปลี่ยนแปลงของ population ของไวรัสเดงกีตั้งแต่เริ่มทำ virus isolation ดังนั้นหากต้องการจะศึกษาไวรัสเดงกีโดยไม่ต้องทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ virus population ควรจะศึกษาจากตัวอย่างตั้งต้นโดยตรงโดยไม่ผ่านการ culture ใน cell line

การเปลี่ยนแปลงของ Virus population ที่พบจากการศึกษานี้เป็นการเปลี่ยนแปลงในระดับ Minor population เท่านั้น เนื่องจากผลการเปรียบเทียบ consensus sequence ของตัวอย่างจาก cell culture ทั้งหมดกับ consensus sequence จากไวรัสในพลาสมาคนไข้ไม่มีความแตกต่างกัน

Objective

- To identify a change in genetic variations of the dengue virus population associated with phenotypic changes driven by serial passaging in C6/36 and Vero cells.
- To identify genetic changes that are cell line specific.

Introduction

Dengue is a single-stranded RNA virus. It consists of four serotypes, 1 to 4. All four serotypes are the cause of Dengue Fever (DF), Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), and Dengue Shock Syndrome (DSS). Dengue virus was transmitted between humans by *Aedes aegypti* (*Stegomyia aegypti*) and *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta*) mosquito. The incident of the dengue epidemic around the world increases dramatically with co-circulation among four serotypes (1). The estimation of dengue infection cases per year is 390 million (95% credible interval 284-528) (2). Until now, dengue has no specific drug treatment and no vaccine.

Many dengue viral studies are isolated, propagated, proliferated, and replicated virus in cell line for increasing viral titer and maintain viral for further study. The most common cell line used for dengue viral isolation is *Aedes albopictus* mosquito C6/36 cell line. Cell lines usually used for viral titration and propagation are C6/36 cells and African green monkey kidney epithelial cells (Vero cells) (3). Furthermore, Vero cells are potentially used to up-scale virus production when the vaccine candidate is obtained as successfully done in the polio vaccine (4). Dengue is RNA virus that uses RNA dependent RNA polymerase (RdRp) for replication. RdRp is known to have poor proof reading cause of high error rates (around 10^{-4}) in viral replication. The variability in viral population occurs during viral replication allows virus evolution under selective pressure of host immune (5). Therefore, the dengue population can evolve during propagate in host cells. Viral culture is essential for many kinds of viral studies such as vaccine

production, virus diagnosis, viral propagation, cytopathic effect, antiviral susceptibility testing (6). According to the highly evolved of dengue virus under the selective pressure of host, several passages of viral culture can alter the trend of dengue population. In live-attenuated vaccine development, dengue candidate was sub-cultured in several passages of Primary Dog Kidney (PDK) cell for attenuation (7). The vaccine candidate will contain biological marker that associated with attenuation, such as small plaque size and temperature-sensitive (8). These observed phenotypes will occur when a dengue vaccine candidate was cultured through several passages. From our previous report, the sequencing result of the dengue prototype strain that culture through many passages have some different position from the submitted sequence of prototype strain in Genbank (9). This situation may be explained by the population bottleneck and selection, which is driven by an environmental event.

The environmental event in these cases is the small selected population of the virus was moved from one type of cell culture to another, from mosquito cell to Primary Dog Kidney cell (PDK) for vaccine development, and from patient's plasma to C6/36 mosquito cell. The direction of the RNA viral population may change from the beginner. However, there is no clearing data to prove this hypothesis.

Therefore, in this study, we were investigated the trend of changing in dengue population when growing in serial passages of C6/36 and Vero cells by using Next-generation Sequencing Technology. Plasma from a dengue infected patient, which we already sequenced dengue genome and called variants in the previous study, was selected for serial propagation in C6/36 and Vero cells and selected for sequencing by Illumina sequencing platform. Bioinformatics method was used for analyzing the genetic changing in the dengue population according to the observed phenotypic change of viral cultured cells and pattern of foci from Foci Forming Assay. The findings shown how genetic and phenotypic changes occurred in commonly used cell lines. The information from this study can estimate the upper limit of passage number for virus propagation that still sufficiently retains phenotype of the original virus. Therefore, we hope that the results from this study will potentially have an impact on both basic dengue virus research and vaccine development.

Methodology

Dengue infected sample

The plasma of a dengue infected patient was selected from Dengue cohort clinical database program. The plasma was collected from a patient with Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) grade 2 infected by dengue serotype one, which has been admitted to Songkhla hospitals in 2005. The plasma was collected in three days before defervescence (day -3). This sample was used in the previous work for sequencing the whole genome of dengue virus from a patient's plasma using Next-generation sequencing for investigating the quasispecies of the dengue virus population (manuscript in preparation). This sample was called P0 in this study.

Virus culture from the plasma of dengue infected patient

Dengue virus was isolated from a patient's plasma by cultured in two types of cell lines, C6/36 and Vero cell. C6/36 cell line was maintained in Leibovitz's (L-15) medium (Gibco) contain 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco), 10% tryptose phosphate broth (TPB, SIGMA), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (SIGMA) and incubate in 28°C incubator. The Vero cell line was cultured at 37 °C with 5% CO₂ in Minimum Essential Media (MEM) (Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Gibco), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 20mM L-Glutamine (Gibco). Around 1 x 10⁶ cells of C6/36 and Vero cells were plated in flask T25 with 5 ml of growth media and incubate for two days before inoculate virus. For the first passage (P1) of dengue virus isolation from the patient's plasma, 150 µl of EDTA-plasma was directly apply to C6/36 and Vero cell line. Then, C6/36 and Vero cell line inoculated with dengue virus were maintained in 5ml of growth media contained the supplements as described before, but FBS was reduced to 1.5% for C6/36 and 2% for Vero cell line. The cytopathic effect (CPE) of the cell was observed regularly until the dengue virus was cultured for five days. At day five, the supernatant was collected and centrifuged at 1,500 rpm for 5 minutes at 4°C to remove cell debris. Cell-free supernatant was aliquoted for inoculating to the next passage, extracting dengue RNA for genome sequencing, and performing the Focus Forming Assay (FFA). The remaining supernatant has been stored at -70°C. 150 µl of cell-free supernatant from the first passage (P1) was inoculated in triplicate in the 2nd passage (P2). Virus

culture was serially passaged until passage 15th (P15). The summary of the virus culture was shown in figure 1.

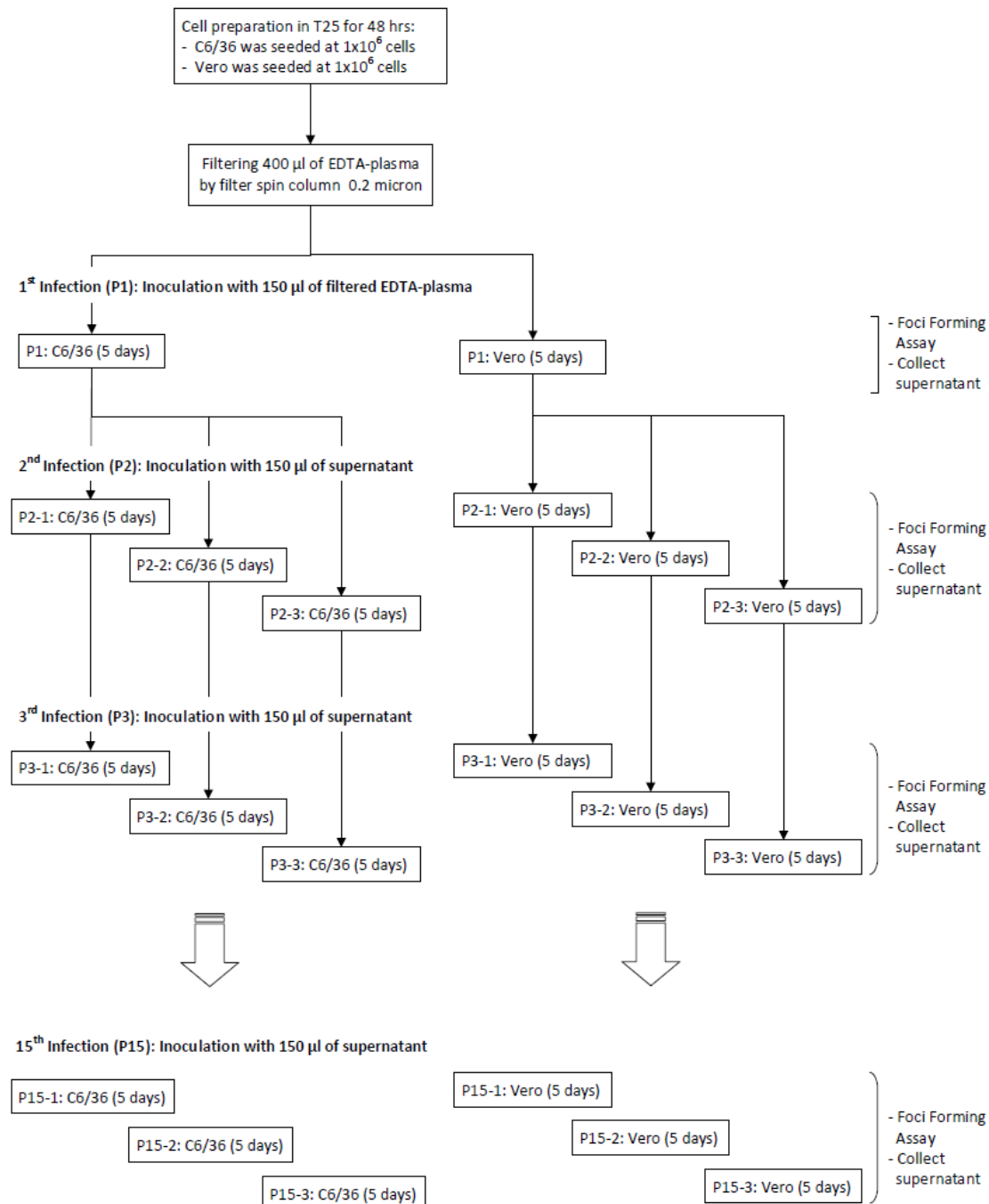


Figure 1. The virus in the patient's plasma was serially passaged in C6/36 and Vero cell. Each passage except the first passage (P1) was cultured in triplicate. Virus culture from each triplicate was passed to the same copies in the next passage, e.g., virus from the 1st copy of 2nd passage

(P2-1) was inoculated to the 1st copy of 3rd passage (P3-1). Virus culture was serially passaged until passage 15th (P15).

Dengue virus quantification by Focus Forming Assay (FFA)

To quantify the infectious dengue virus titer, FFA was performed immediately after collecting the cell-free supernatant of each passage. 50 µl of cell-cultured supernatant was collected and diluted to 10-fold serial dilution from 10^{-1} to 10^{-7} . Each dilution was inoculated in duplicate to Vero cells, which has been cultured in a 96-wells plate. The number of foci was count and averaged. The virus titer (FFU/ml) was calculated by using the following equation.

$$\text{FFU/ml} = \frac{1}{\text{dilution factor}} \times \text{number of foci} \times \frac{1}{\text{ml of inoculum}}$$

Template preparation for dengue whole genome sequencing

Three selected passages of dengue virus cultured in C6/36 and Vero were separately prepared for Next-Generation Sequencing (NGS).

For C6/36 viral culture, dengue RNA was extracted from cell-free supernatant using QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN. Then, cDNA was constructed from extracted RNA using SuperScript III First-Strand Synthesis System, Invitrogen. The protocol was modified from manufacturer protocol by increasing the extension time to 90 minutes, which help to improve yield and completeness of cDNA product (10). The primer used for constructing cDNA was mapped at the 3'end of the dengue genome (9). The whole genome of dengue virus was amplified into two overlapping fragments (figure 2) using AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen. The set of primer and protocol for amplifying the dengue DNA template was followed our previous report (9). PCR product was separated in 1% agarose gel electrophoresis followed by gel slicing and gel extraction by QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN. The extracted DNA was eluted by 30µl of sterile water (water for injection grade). Purified PCR products were measured the concentration by Qubit™ dsDNA BR Assay Kits, Invitrogen. The OD260/280 ratio was measured by NanoDrop 2000 Spectrophotometers for checking DNA purity from protein contamination.

For dengue virus cultured in Vero cell, 1 ml of cell-free supernatant was centrifuged at 120,000 g for 1.5hours at 4°C. The supernatant was carefully removed. The pellet was resuspended in 140µl of 1X PBS (11). Dengue RNA was extracted from a resuspended pellet

using QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN, and used 11.2 µg (20µg/ml in buffer AVL 560 µl) of Glycogen (Roche applied science) as the carrier instead of carrier RNA provided in the extraction kit. RNA was eluted by 50µl of sterile water (water for injection grade). The concentration of extracted RNA was measured the concentration by Qubit RNA HS Assay Kits (Invitrogen). The purity of RNA was measured by NanoDrop 2000 Spectrophotometers. The extracted RNA was aliquoted and stored at -70°C until sent to RNA sequencing service at Macrogen Korea.

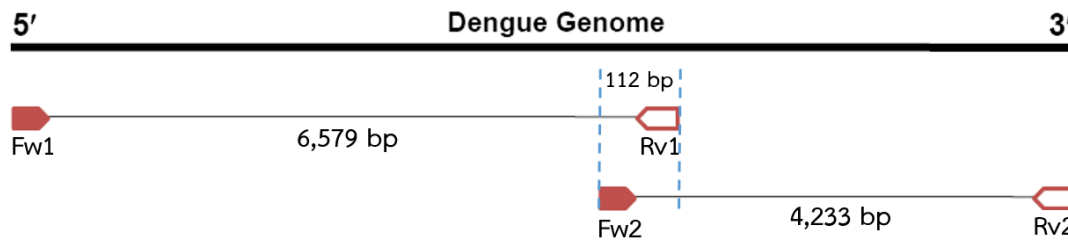


Figure 2. The whole genome of the dengue virus was amplified using PCR technology with specific primers for dengue serotype 1. Two fragments of PCR products consist of DNA fragment size 6,579 bp and 4,233 bp with overlapping size 112 bp.

Whole dengue genome sequencing by Next-Generation Sequencing platform

Dengue virus cultured in C6/36 cell lines

Purified PCR product of the dengue DNA template from the previous step was sequenced by the Illumina sequencing system. Two overlapping DNA templates of each sample were mixed with the same amount of DNA molecule for completing the dengue genome. The amount of DNA molecule of each DNA fragment was calculated using the following equation.

$$\text{Molecules}/\mu\text{l} = \frac{\text{sample concentration (ng}/\mu\text{l}) \times 6,022 \times 10^{23}}{656.6 \times 10^9 \times \text{fragment length (bp)}}$$

where $6,022 \times 10^{23}$ is Avogadro's number (molecules/mole)

656.6×10^9 is the average molecular weight of nucleotide pairs in g/mole

A mixed DNA template of seven samples from three passages (each passage has triplicate, except P1) were sent to Macrogen Korea to prepare a sequencing library using TruSeq DNA PCR-Free kit and perform 101 bp paired-end sequencing.

Dengue virus cultured in Vero cell lines

Twenty microliters of seven extracted dengue RNA samples were sent to Macrogen Korea. All seven samples were selected from the same passage as C6/36. Library preparation was performed using TruSeq RNA Sample Prep Kit v2. Then RNA sequencing of 151 bp paired-end was performed by Illumina sequencing platform.

Dengue virus directly extracted from patient's plasma (P0)

DNA template of sample P0 was prepared in the previous work using the same protocol as C6/36. The pooled DNA template was sent to Macrogen Korea to prepare sequencing library using Nextera-XT kit and perform 101 bp paired-end sequencing.

NGS Data cleaning

The sequencing results of dengue virus from C6/36, Vero cell, and patient's plasma (P0) were analyzed with the same data analysis pipeline. First, the quality of sequencing data was explored using the program FastQC (12). The low-quality bases (mean quality score <20) and adaptor/primer sequence were trimmed from the end of each read using program Trimmomatic (13).

Consensus sequences construction

The consensus sequence of each sample, including P0, was constructed from cleaned sequencing data using the IVA version 1.0.3 (14). The cleaned data of each sample were aligned to the corresponding assembled genome using “BWA mem” version 0.7.17 (15). The fault assembly was revealed by displaying the alignment result in Integrative Genomics Viewer (IGV) tool version 2.4.14 (16, 17) and then removed from assembled genome sequences.

Single Nucleotide Variant (SNV) calling

The SNVs of all samples were called using the consensus sequences of P0 as a reference sequence. The cleaned sequencing data were aligned to a consensus sequence of P0 using BWA mem version 0.7.17 (15). Then alignment results were recalibrated the bases quality score using “BaseRecalibrator” and “ApplyBQSR” of Genome Analysis Toolkit (GATK) version 4.1.2 (18). The dengue variants were called from recalibrated results using LoFreq version 2.1.2 (19). The analysis flow was shown in figure 3. The called variants of each sample were compared to each other.

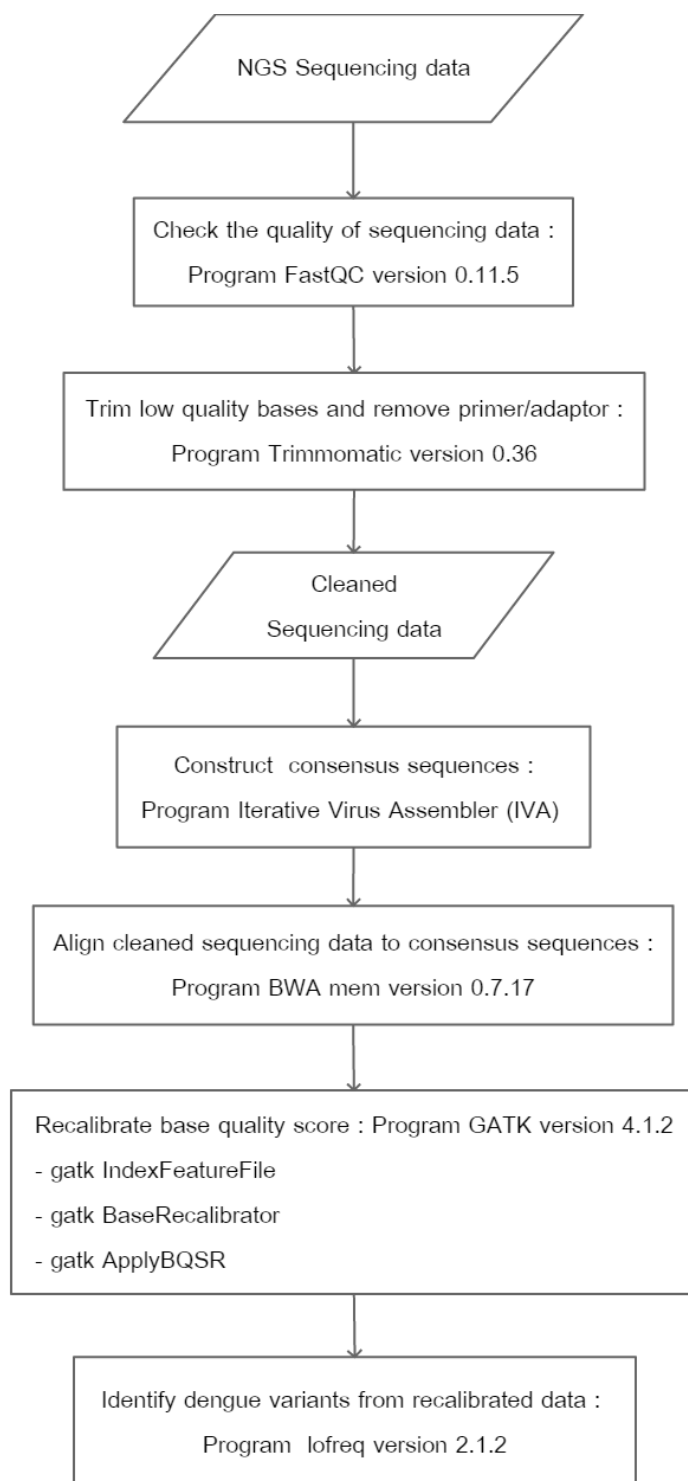


Figure 3. NGS data analysis workflow for identifying variations from all dengue samples.

Results

Dengue virus isolation in C6/36 and Vero cells

In the first infection (P1), 150 µl of EDTA-plasma from dengue patient (P0) was separately infected to C6/36 and Vero cell cultured in flask T25. The components in plasma and EDTA affected cell cultured, especially for C6/36 cells. After infected with a virus from EDTA-plasma for 1 hour, 50% of C6/36 cells died and detached from the flask's surface. About 80% of C6/36 cells died and detached at 2 hours after infection. Therefore, 2×10^6 C6/36 cells were added to the cultured flask at 2 hours and one day after infection to maintain a level of living C6/36 cells. For Vero cells, the CPE can be detected, but cell detachment did not occur. Therefore, additional Vero cells were not added. Dengue virus from plasma was cultured in both cells for five days before passing to the next passage. In each passage, the dengue virus was cultured in C6/36 and Vero cell for five days. More than 80% CPE can be detected in day five of cell culture in both cell lines. The CPE of C6/36 cell, which occurred after infected with the dengue virus, is a giant cell. In Vero, cell detachment has been detected. The CPE in each passage was identified under the light microscope (figure 4).

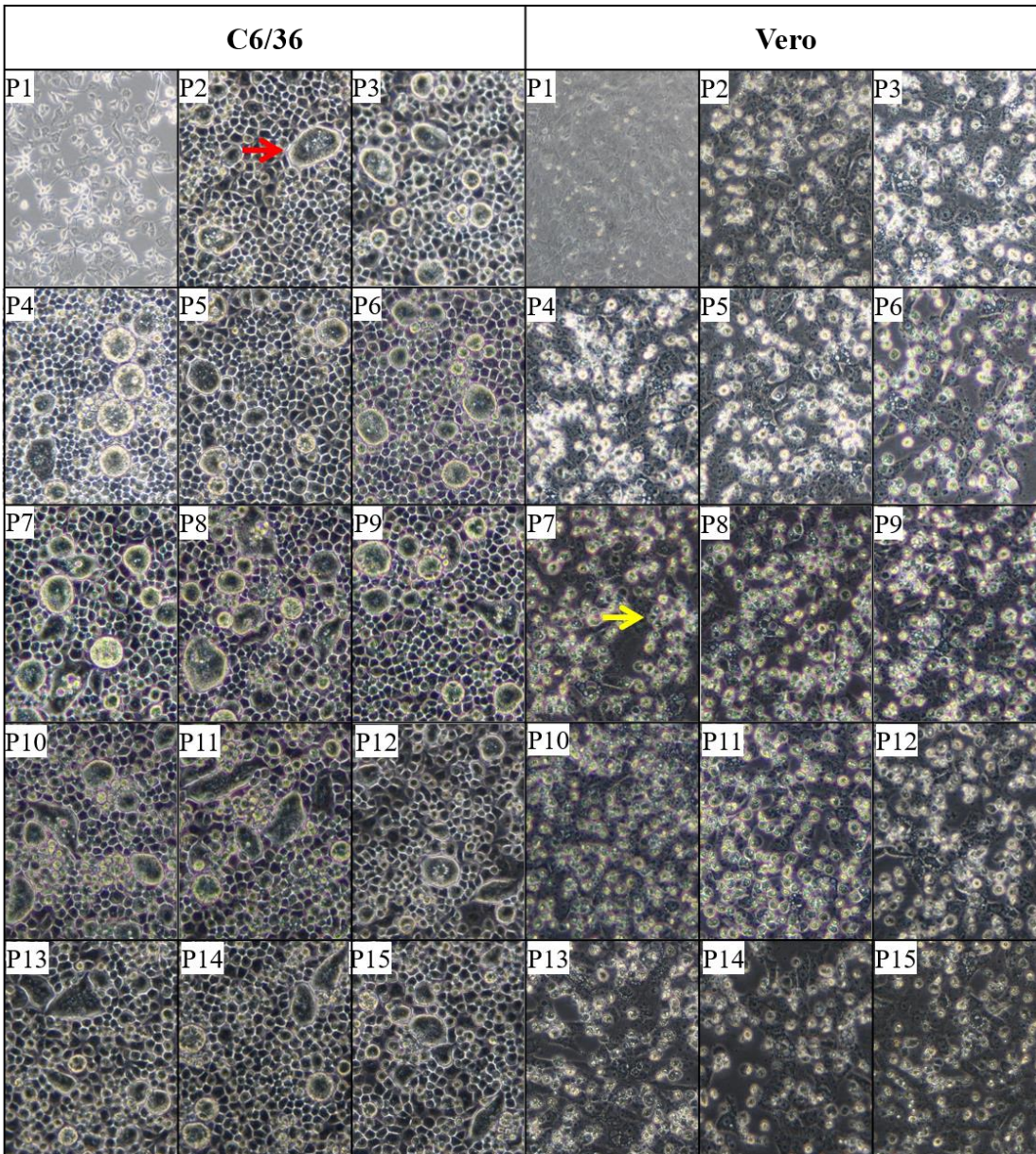


Figure 4. Cytopathic effect (CPE) of C6/36 and Vero cell line after five days of dengue virus infection. The giant cell was observed in the C6/36 cell line. Cell detachment occurred in the Vero cell. (Cell figure under the light microscope at magnification power of 20x) (Red and Yellow arrow show the example of giant cell and cell detachment, respectively)

Dengue viral titration and foci pattern

The infectious dengue virus titer of each passage was measured from cell-free supernatant by Foci Forming Assay (FFA). The dengue titer was measured in Focus Forming Unit/ml (FFU/ml). The dengue virus titer of each passage was shown in table 1. Moreover, the pattern and size of

focus formation detected from C6/36 and Vero were changing during continuously passaged in each cell type (figure 5 and figure 6).

P1: In this passage, the dengue virus from Vero cell has a higher virus titer than C6/36. The virus titer measured from Vero and C6/36 is 3.2×10^7 FFU/ml and 1.4×10^6 FFU/ml, respectively. The pattern of focus formation from both cells are similar. The foci had similar size as pinhead. Dengue virus from both cell lines had homogenous foci pattern.

P2: Dengue virus produced from C6/36 cell has a higher virus titer than Vero in all three repeated. The virus titer calculated from three repeated of C6/36 are 6.5×10^8 , 8.8×10^8 and 8.9×10^8 FFU/ml. Dengue virus titer measured from Vero are 2.5×10^7 , 1.8×10^7 , and 1.3×10^7 FFU/ml. Dengue virus from both cell types still generated similar size and pattern of foci as detected in P1. Dengue virus from both cell lines had homogenous foci pattern.

P3: Dengue virus produced from C6/36 cell had a higher virus titer than Vero in all three repeated. The virus titer calculated from three repeated of C6/36 is 4.2×10^8 , 4.7×10^8 , and 4.9×10^8 FFU/ml. The titer of dengue virus cultured in Vero is 5.5×10^6 , 5.7×10^6 , and 6.0×10^6 FFU/ml. The virus titers measured from both cell types are lower than P2, especially for Vero, which has a lower virus titer than P2 for one log. Dengue virus from C6/36 has a homogeneous pattern of foci and has a smaller foci size than P2. Whereas, dengue virus cultured in Vero cell produced the bigger size of foci than P2. The heterogeneous pattern of foci has been observed in this passage.

P4: Dengue virus produced from C6/36 cell has a higher virus titer than Vero in all three repeated. The virus titer calculated from three repeated of C6/36 is 4.7×10^8 , 6.3×10^8 , and 6.3×10^8 FFU/ml. The virus titer of three repeated from Vero is 5.1×10^6 , 4.9×10^6 , and 5.2×10^6 FFU/ml. The pattern of foci from C6/36 and Vero is a noticeable difference in this passage. In C6/36, a heterogeneous pattern of foci was observed. All foci are not bigger than pinhead-sized and scattered around a 96-well plate. For Vero, the numbers of foci are much lower, but the size of foci are much bigger than C6/36 and previous passage of Vero. In this passage, large foci with pinpoint foci scattered around were clearly observed. The pinhead foci also occurred in this passage

P5: Dengue virus produced from C6/36 cell has a higher virus titer than Vero in all three repeated. The virus titer calculated from three repeated of C6/36 is 5.9×10^8 , 6.3×10^8 , and

6.4×10^8 FFU/ml. The virus titer of three repeated from Vero is 3.2×10^7 , 2.5×10^7 , and 2.7×10^7 FFU/ml. The dengue virus titer from Vero cell is higher than the previous passage in all three repeated. In this passage, the dengue virus from C6/36 produced bigger foci mixed with the pinhead foci. For Vero, the dengue virus produced the pattern of foci as similar to P4.

P6 – P10: Dengue virus produced from C6/36 cell has a virus titer calculated from three repeated is around 10^8 FFU/ml. The titer of dengue virus cultured in Vero are around 10^7 FFU/ml. The virus titer of all passages was shown in table 1. For the pattern of foci of P6-P10, the dengue virus from C6/36 has a similar pattern of foci in P5, but the bigger size of foci was produced higher than the previous passage. In Vero, the pinhead foci are decreasing. The large foci with pinpoint foci scattering around are the main pattern.

P11: Dengue virus produced from C6/36 cell has a higher virus titer than Vero in all three repeated. The virus titer calculated from three repeated of C6/36 is 6.4×10^8 , 5.3×10^8 , and 3.6×10^8 FFU/ml. The virus titer of three repeated from Vero is 6.5×10^6 , 6.7×10^6 , and 7.2×10^6 FFU/ml, which are lower than previous passages. The pattern of foci of C6/36 is similar to P9 and P10, but the number of foci is decreasing since this passage. For Vero, the pattern of foci is not changing. Large foci contain pinpoint foci scattering around is the main pattern.

P12: Dengue virus produced from C6/36 cell has a slightly lower virus titer than Vero in all three repeated. The virus titer calculated from three repeated of C6/36 is 3.3×10^7 , 3.8×10^7 , and 7.2×10^7 FFU/ml. The virus titer of three repeated from Vero is 4.0×10^7 , 4.8×10^7 , and 5.0×10^7 FFU/ml, which are higher than P11. The pattern of foci from C6/36 and Vero is not differencing from P11.

P13: In this passage, C6/36 back to produce higher virus titer than Vero. The virus titer calculated from three repeated of C6/36 is 2.2×10^8 , 3.0×10^8 , and 2.5×10^8 FFU/ml. The virus titer of three repeated from Vero is 1.2×10^7 , 2.5×10^7 , and 2.0×10^7 FFU/ml. The pattern of foci from C6/36 and Vero are not differencing from the previous passage, but the number of foci from Vero is decreasing.

P14 - P15: Dengue virus produced from C6/36 cell has a higher virus titer than Vero in all three repeated. The virus titer calculated from three repeated C6/36 are around 10^8 FFU/ml (table 1). The virus titer of three repeated from Vero are around 10^7 FFU/ml, as shown in table

1. In these last two passages, C6/36 produced a similar pattern of foci to the dengue virus from Vero in P3. For the dengue virus from Vero, the large foci with pinpoint foci scattering around are the main pattern. The pinhead foci are rarely detected in P15.

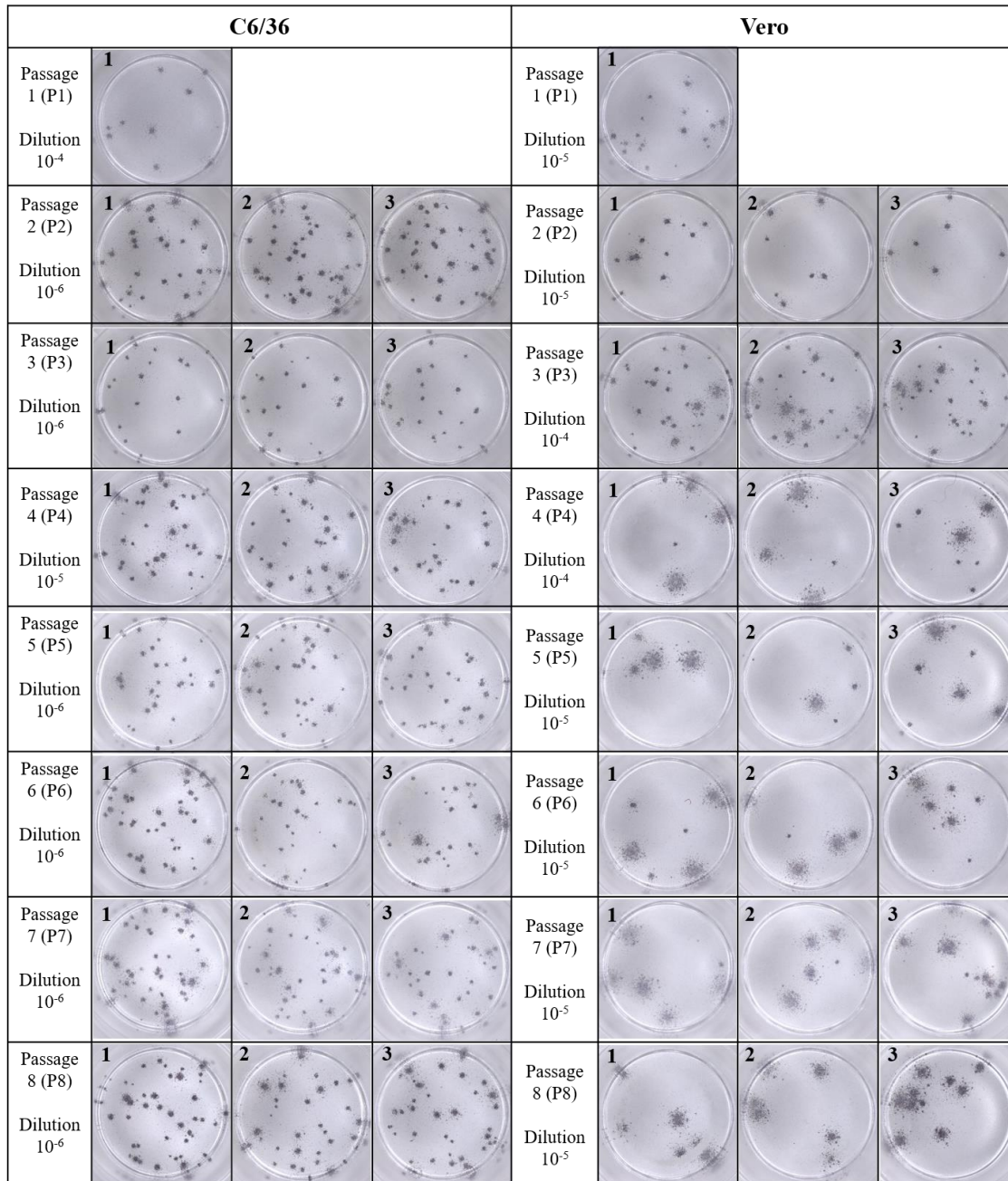


Figure 5. The pattern of foci from Foci Forming Assay (FFA) of dengue virus cultured in passage 1 to passage 8 of C6/36 and Vero cell.

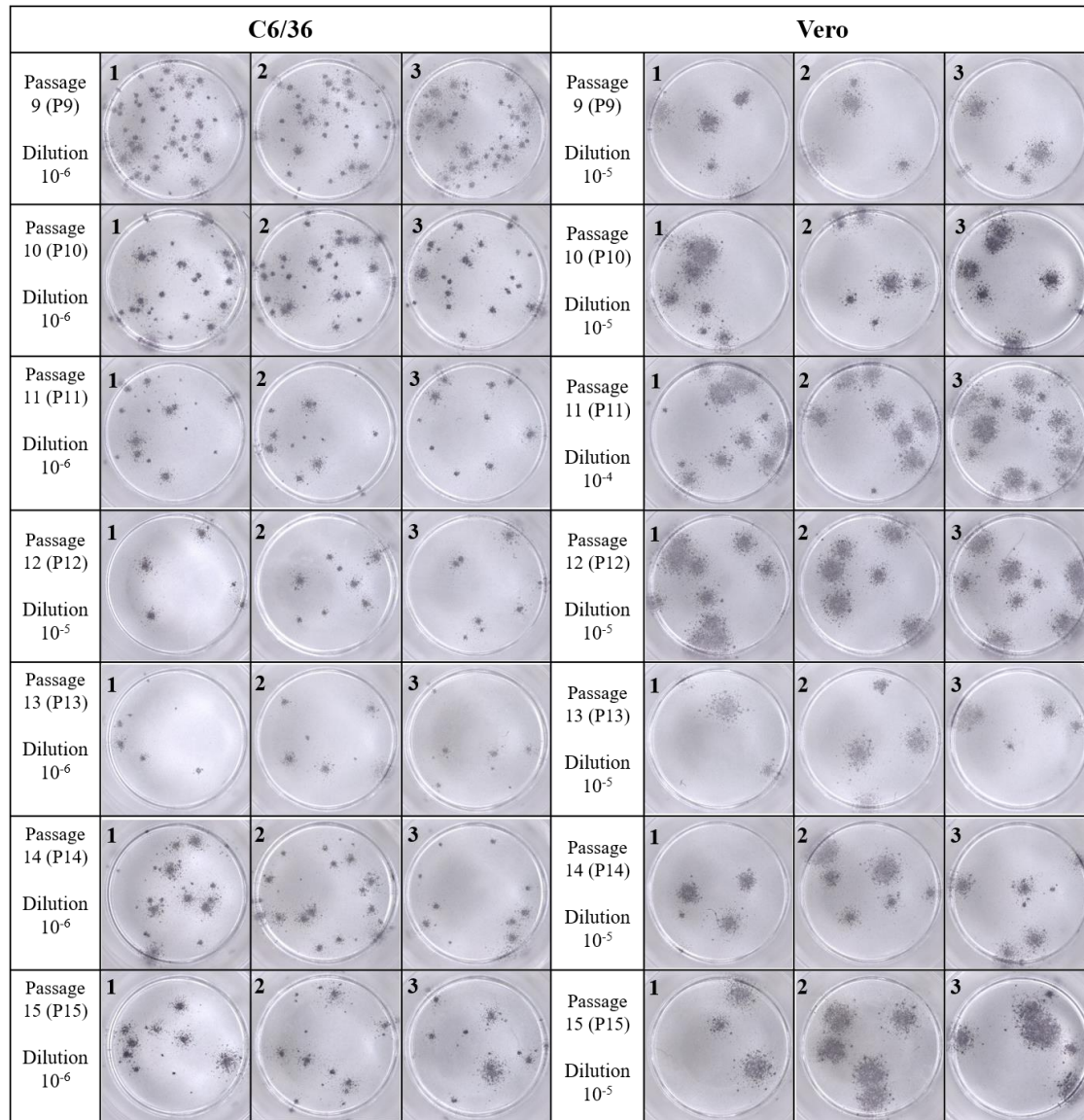


Figure 6. The pattern of foci from Foci Forming Assay (FFA) of dengue virus cultured in passage 9 to passage 15 of C6/36 and Vero cell.

Table 1. The virus titer of 15 passages of dengue virus cultured in C6/36 and Vero cell. Dengue virus titer (FFU/ml) was calculated from an average number of foci from Foci Forming Assay.

passage	C6/36							Vero						
	Dilution	Average No. of foci			FFU/ml			Dilution	Average No. of foci			FFU/ml		
		1	2	3	1	2	3		1	2	3	1	2	3
P0	1.00E-04	7	-	-	1.40E+06	-	-	1.00E-05	16	-	-	3.20E+07	-	-
P1	1.00E-06	32.5	44	44.5	6.50E+08	8.80E+08	8.90E+08	1.00E-05	12.5	9	6.5	2.50E+07	1.80E+07	1.30E+07
P2	1.00E-06	21	23.5	24.5	4.20E+08	4.70E+08	4.90E+08	1.00E-04	27.5	28.5	30	5.50E+06	5.70E+06	6.00E+06
P3	1.00E-06	23.5	31.5	31.5	4.70E+08	6.30E+08	6.30E+08	1.00E-04	25.5	24.5	26	5.10E+06	4.90E+06	5.20E+06
P4	1.00E-06	29.5	31.5	32	5.90E+08	6.30E+08	6.40E+08	1.00E-05	16	12.5	13.5	3.20E+07	2.50E+07	2.70E+07
P5	1.00E-06	37	27	28	7.40E+08	5.40E+08	5.60E+08	1.00E-05	17	14	19	3.40E+07	2.80E+07	3.80E+07
P6	1.00E-06	40.5	39	38	8.10E+08	7.80E+08	7.60E+08	1.00E-05	15.5	18	17.5	3.10E+07	3.60E+07	3.50E+07
P7	1.00E-06	43	35	44	8.60E+08	7.00E+08	8.80E+08	1.00E-05	12.5	16	21.5	2.50E+07	3.20E+07	4.30E+07
P8	1.00E-06	51	42.5	48	1.02E+09	8.50E+08	9.60E+08	1.00E-05	15	11.5	12	3.00E+07	2.30E+07	2.40E+07
P9	1.00E-06	48	29	31.5	9.60E+08	5.80E+08	6.30E+08	1.00E-05	18.5	22	22	3.70E+07	4.40E+07	4.40E+07
P10	1.00E-06	32	26.5	18	6.40E+08	5.30E+08	3.60E+08	1.00E-04	32.5	33.5	36	6.50E+06	6.70E+06	7.20E+06
P11	1.00E-05	16.5	19	13.5	3.30E+07	3.80E+07	2.70E+07	1.00E-05	20	24	25	4.00E+07	4.80E+07	5.00E+07
P12	1.00E-06	11	15	12.5	2.20E+08	3.00E+08	2.50E+08	1.00E-05	6	12.5	10	1.20E+07	2.50E+07	2.00E+07
P13	1.00E-06	28.5	35	24	5.70E+08	7.00E+08	4.80E+08	1.00E-05	10.5	14.5	23	2.10E+07	2.90E+07	4.60E+07
P14	1.00E-06	30	32.5	23	6.00E+08	6.50E+08	4.60E+08	1.00E-05	19	22.5	23	3.80E+07	4.50E+07	4.60E+07

The virus titer (FFU/ml) measured from each passage of C6/36 and Vero (table 1) were plotted. Most of all passages, C6/36 can produce higher virus titer than Vero about one log, except in P1 and P12 (figure 7).

When compare between foci size produced from the dengue virus from C6/36 and Vero, the foci produced by dengue virus cultured in Vero are much bigger than C6/36 since P3. In P1 and P2, the pattern of foci of C6/36 and Vero are similar. Since P3, C6/36 and Vero develop their own unique foci pattern. Until P14 and P15, the dengue virus from C6/36 turns to have a similar foci pattern to P3 of Vero.

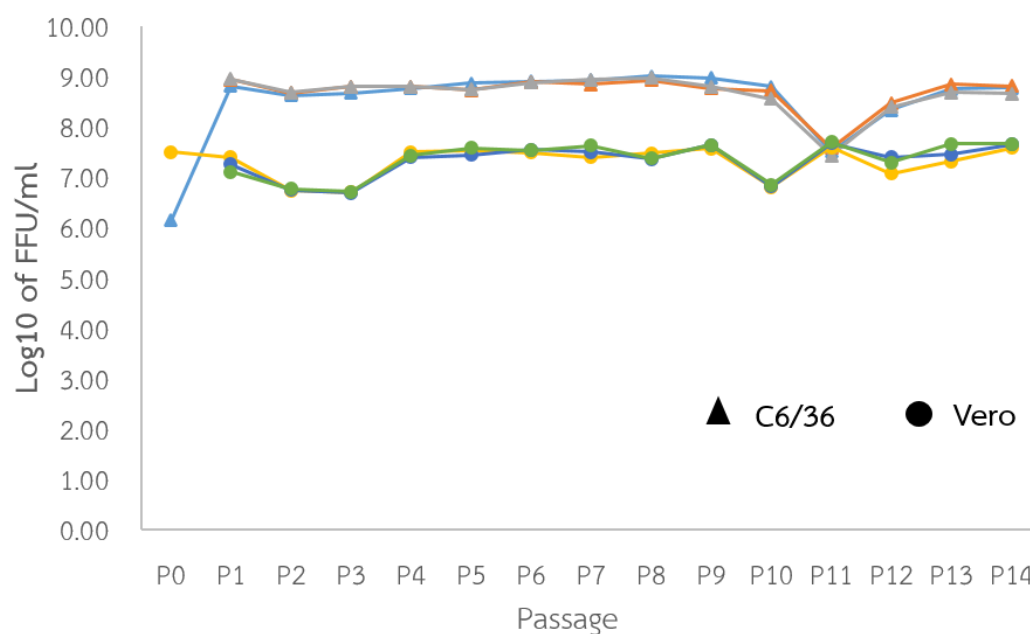


Figure 7. Graph show log10 dengue virus titer (Log10 FFU/ml) of 15 passages, which were cultured in C6/36 and Vero cell. The triangle shows a dengue virus titer from the C6/36 cell line. The circle represents the dengue virus titer from the Vero cell line.

Sample selection for NGS

Dengue virus from three passages, P1, P3, and P5, of C6/36 and Vero were selected for sequencing by Illumina platform.

P1: This is the first passage of the virus isolated from the patient's plasma. The environment of the virus was changed from human to two different types of the cell line. Therefore, the dengue virus has to survive through selective pressure of the new environment. The selected population of the dengue virus, after propagated in the first passage of each cell line, must be explored.

P3: This is the third passage after the dengue virus was cultured in C6/36 and Vero cell line. In this passage, the dengue virus from Vero cell starting to produce the large foci in Foci Forming Assay. The different patterns of foci between C6/36 and Vero can be detected. Therefore, the genotypic changes that are related to phenotypic change in the dengue virus from Vero cell should be detected. For dengue virus isolation in the laboratory, the dengue virus was normally cultured in C6/36 no longer than the P3. Therefore, how different between the genotypic pattern of the dengue population in this passage and patient plasma is very interesting.

P5: This is the fifth passage after the dengue virus was cultured in C6/36 and Vero cell. In this passage, the dengue virus from C6/36 starts forming the bigger size of foci mixed with pinhead foci. The pattern of foci is different from previous passages. Therefore, the genotypic change in the dengue population that related to the phenotypic change in C6/36 may be observed in this passage. In live-attenuated dengue vaccine development, the candidate vaccine was propagated in Vero cell for five passages. Therefore, exploring the genotype data of the dengue virus from the Vero cell in this passage may give more understanding about the genotype of the dengue population in live-attenuated dengue vaccine development after propagated in Vero cell.

14 selected samples for NGS sequencing:

- Passage 1: One sample from C6/36 and One sample from Vero
- Passage 3: Triplicated samples from C6/36 and triplicated samples from Vero
- Passage 5: Triplicated samples from C6/36 and triplicated samples from Vero

Template preparation for NGS sequencing

Seven dengue samples from the C3/36 cell line were amplified to two overlapping fragments using specific primers to serotype 1. PCR products were purified using QIAquick Gel Extraction Kit. The concentration and purity (A260/A280) of each fragment was shown in table 2. For dengue samples from Vero cell, dengue RNA was extracted using QIAamp Viral RNA Mini Kit. The concentration and purity (A260/A280) of seven dengue RNA samples were shown in table 3.

Table 2. The concentration and DNA purity (A260/A280) of amplified DNA template of dengue cultured in C6/36 cell line

Sample	Size of DNA fragment	A260/A280 by NanoDrop 2000 Spectrophotometers	Conc. by Qubit™ dsDNA BR Assay Kits (ng/ul)
P0 Fragment 1	6579	1.89	112.67
P0 Fragment 2	4233	1.91	94.73
P2-1 Fragment 1	6579	1.94	52.47
P2-1 Fragment 2	4233	1.93	61.93
P2-2 Fragment 1	6579	1.92	65.40
P2-2 Fragment 2	4233	1.94	33.67
P2-3 Fragment 1	6579	1.9	55.87
P2-3 Fragment 2	4233	1.9	63.00
P4-1 Fragment 1	6579	1.94	53.27
P4-1 Fragment 2	4233	1.9	54.67
P4-2 Fragment 1	6579	1.94	45.53
P4-2 Fragment 2	4233	1.91	51.40
P4-3 Fragment 1	6579	1.99	56.93
P4-3 Fragment 2	4233	1.91	75.67

Table 3. The concentration and RNA purity (A260/A280) of extracted dengue RNA from dengue cultured in Vero cell line

Sample	Molecular type	A260/A280 by NanoDrop 2000 Spectrophotometers	Conc. by Qubit RNA HS Assay Kits (ng/ul)
P0	RNA	2.3	1.05
P2-1	RNA	2.13	1.83
P2-2	RNA	1.9	2.7
P2-3	RNA	1.98	2.14
P4-1	RNA	2.86	1.44
P4-2	RNA	2.66	1.14
P4-3	RNA	1.99	2.79

NGS sequencing result

Fourteen dengue samples consisting of seven samples from C6/36 and seven samples from Vero were sequenced by Illumina platform at Macrogen, Korea. The summary of NGS sequencing data was shown in table 4.

Table 4. The summary of NGS data of 14 dengue samples from dengue cultured in C6/36 and Vero cell. The number of sequences, mean quality score, and sequence length, before and after the data QC process shown in the table.

Sample	Total sequences (R1 + R2)		Per sequence mean sequence quality (Min Max) *				Sequence length	
			R1		R2			
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
P0_C6/36	8,462,072	6,065,666	2 39	23 39	2 39	21 39	101	40-101
P2-1_C6/36	7,079,512	5,034,704	2 39	22 39	2 39	22 39	101	40-101
P2-2_C6/36	8,979,816	6,311,912	2 39	24 39	2 39	21 39	101	40-101
P2-3_C6/36	8,447,796	5,862,464	2 39	23 39	2 39	21 39	101	40-101
P4-1_C6/36	7,935,726	5,662,882	2 39	23 39	2 39	22 39	101	40-101
P4-2_C6/36	4,580,092	3,178,566	2 39	23 39	2 39	22 39	101	40-101
P4-3_C6/36	7,589,662	5,421,788	2 39	23 39	2 39	21 39	101	40-101
P0_Vero	26,313,496	23,226,192	13 37	25 37	11 37	24 37	151	40-151
P2-1_Vero	26,420,968	23,250,764	14 37	25 37	11 37	24 37	151	40-151
P2-2_Vero	27,049,380	23,223,832	14 37	24 37	12 37	24 37	151	40-151
P2-3_Vero	24,126,152	21,339,368	14 37	25 37	12 37	23 37	151	40-151
P4-1_Vero	24,527,494	21,842,856	15 37	25 37	11 37	24 37	151	40-151
P4-2_Vero	21,663,268	19,492,760	14 37	25 37	11 37	24 37	151	40-151
P4-3_Vero	30,241,236	26,147,350	14 37	25 37	11 37	24 37	151	40-151

* Minimum and maximum of per sequence mean quality score found in NGS data

NGS data analysis

Data cleaning

The sequencing data were analyzed by bioinformatics analysis. Bad quality data has been removed by the Trimmomatic program. Summarize of NGS data before and after the data cleaning process was shown in table 4. The overall quality score was increased after the data cleaning process. The shortest reads are 40 bp.

Consensus sequences comparison

The consensus sequences of all samples were compared to the consensus sequencing of P0. Interestingly, all consensus sequences are not differencing from P0. Therefore, the major population does not change since the virus was isolated from plasma and continuously propagated in C6/36 and Vero cell until passage five.

Variant identification

SNV were identified from 14 virus-cultured samples and S12. SNV from passage three and passage five were called in their triplicated data. The number of called variants was shown in table 5. Before variant comparison between passages and cell type, the variations from the triplicated experiment were filtered. The only variation was detected from two triplicated cultured was selected as a reliable variant which used for variant comparison in a further step.

Table 5. Number of variations detected from dengue virus cultured in C6/36 and Vero cell line and dengue virus from patient's plasma

Samples	Number of SNV in a triplicated experiment			Pass filter
	1	2	3	
P0	1031	-	-	1031
P1_C6/36	61	-	-	61
P3_C6/36	45	49	47	50
P5_C6/36	21	35	39	39
P1_Vero	109	-	-	109
P3_Vero	110	102	105	113
P5_Vero	116	109	79	116

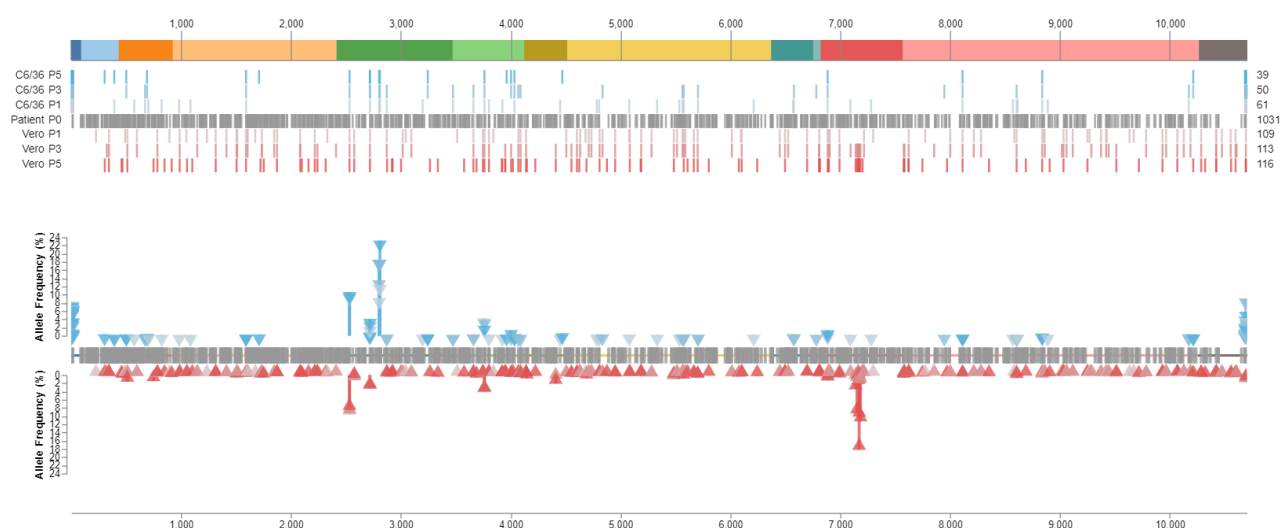


Figure 8. The plot of single nucleotide variation (SNV) detected in the dengue genome. Variations from six dengue cultured in C6/36 and Vero cells were compared to variants from dengue extracted from the patient's plasma. Each color on the rectangle represents each gene in the dengue genome. Blue and red vertical lines represent variations detected in dengue cultured from C6/36 and Vero cell, respectively. Blue and red triangle with vertical line represent detected variation and allele frequency in dengue from C6/36 and Vero cell, respectively.

Variants comparison between passage and cell type

SNV detected from P0 and all passages of C6/36 and Vero were compared together.

Comparison between cell type

There are 958 variants found only in P0. There are variants transfer from P0 to dengue virus isolated in C6/36 and Vero cell. For dengue cultured in C6/36, there are 39, 21, and 14 variants that were transferred from P0 to P1, P3, and P5 of C6/36, respectively. For dengue cultured in Vero cell, there are 37, 32, and 24 variants that were transferred from P0 to P1, P3, and P5 of Vero, respectively. The number of variants which were transfer from P0 to virus culture and still maintained until P5 was not much difference in both type of cell line. However, there are a number of new variants that occurred during dengue virus propagation in each cell line, which should be considered. There are 22, 8, and 4 new variants that occurred during dengue propagation in P1, P3, and P5 of the C6/36 cell line, respectively. For the dengue virus propagated in Vero cell, there are 72, 27, and 43 new variants that occurred in P1, P3, and P5, respectively.

There are eight variants that can be detected in P0 and all passages of C6/36 and Vero. Six of eight variants have allele frequency $\geq 0.5\%$. Only two variations at nt6885 and nt8838 change amino acid from Valine to Alanine (V20A NS4B) and Lysine to Arginine (K422R NS5), respectively (Table 6).

There are ten variants identified in P0 and all passages of Vero but not found in C6/36. All detected variants have allele frequency less than 0.5%. There are two non-synonymous variants at nt1505 and nt6698. For variant at nt1505, the amino acid was changed from Leucine to Isoleucine (L193I Envelope). For variant at nt6698, the variation detected from P0 is difference from Vero. At this position, the amino acid of P0 was changed from Serine to Proline (S108P NS4A), whereas Serine was changed to Threonine (S108T NS4A) in Vero. The different variants also detected at nt10421 (3'UTR) of P0 and Vero. The detail of variants was shown in table 6.

Six variants were identified in P0 and all passages of C6/36 but not found in Vero. Five of six variants have allele frequency $\geq 0.5\%$. There are three non-synonymous variants at nt2802, nt2810, and nt4034 which changes amino acid from Alanine to Valine (A128V NS1), Alanine to Threonine (A131T NS1), and Glutamine to Lysine (Q187K NS2A), respectively. The detail of variants was shown in table 6.

At position nt3802, the variation was transferred from P0 to only P1 of C6/36 but was found in all three passages, P1, P3, and P5, of Vero.

Table 6. The variations which are transferred from dengue infected patient to dengue isolated in cell line

Patient (P0)		Cell line		Gene	Synonymous/ Non-synonymous	R-residue
Nucleotide change	Amino acid change	Nucleotide change	Amino acid change			
Variations found in P0 and three passages of both cell line						
T 1591 C	P 221 P	T 1591 C	P 221 P	E	synonymous	NonPolar-->NonPolar
C 2533 T	S 38 S	C 2533 T	S 38 S	NS1	synonymous	Polar-->Polar
G 2719 A	G 100 G	G 2719 A	G 100 G	NS1	synonymous	Polar-->Polar
C 3761 T	L 96 L	C 3761 T	L 96 L	NS2A	synonymous	NonPolar-->NonPolar
T 6885 C	V 20 A	T 6885 C	V 20 A	NS4B	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
A 8113 G	K 180 K	A 8113 G	K 180 K	NS5	synonymous	Basic-->Basic
A 8838 G	K 422 R	A 8838 G	K 422 R	NS5	non-synonymous	Basic-->Basic

Patient (P0)		Cell line		Gene	Synonymous/ Non-synonymous	R-residue
Nucleotide change	Amino acid change	Nucleotide change	Amino acid change			
A 10692 C	-	A 10692 C	-	3'UTR	-	-
Variations found only in P0 and three passages of Vero cell						
T 511 C	F 25 F	T 511 C	F 25 F	prM	synonymous	NonPolar-->NonPolar
A 1315 G	G 129 G	A 1315 G	G 129 G	E	synonymous	Polar-->Polar
C 1505 A	L 193 I	C 1505 A	L 193 I	E	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
T 1873 C	A 315 A	T 1873 A	A 315 A	E	synonymous	NonPolar-->NonPolar
A 4603 G	R 28 R	A 4603 G	R 28 R	NS3	synonymous	Basic-->Basic
T 5084 C	L 189 L	T 5084 C	L 189 L	NS3	synonymous	NonPolar-->NonPolar
T 5188 C	A 223 A	T 5188 A	A 223 A	NS3	synonymous	NonPolar-->NonPolar
T 6698 C	S 108 P	T 6698 A	S 108 T	NS4A	non-synonymous non-synonymous	Polar-->NonPolar Polar-->Polar
T 10285 C	-	T 10285 C	-	3'UTR	-	-
A 10421 G	-	A 10421 C	-	3'UTR	-	-
Variations found only in P0 and three passages of C6/36 cell						
T 12 G	-	T 12 G	-	5'UTR	-	-
C 14 A	-	C 14 A	-	5'UTR	-	-
T 2802 C	A 128 V	T 2802 C	A 128 V	NS1	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
A 2810 G	A 131 T	A 2810 G	A 131 T	NS1	non-synonymous	Polar-->NonPolar
C 4034 A	Q 187 K	C 4034 A	Q 187 K	NS2A	non-synonymous	Polar-->Basic
A 10686 C	-	A 10686 C	-	3'UTR	-	-

There are 22 variants detected only in all passages of dengue cultured from Vero. These are Vero specific variants. There are three variants at nt2576, nt5485, and nt5702 have allele frequency $\geq 0.5\%$. Fifteen variants are non-synonymous variations that cause amino acid changed. The detail of the variations was shown in table 7.

Thirteen variations were identified only in all passages of dengue cultured from the C6/36 cell line. All 13 variants have allele frequency $\geq 0.5\%$. However, all variants located on the UTR region, which is the primer binding site of the template preparation step. The minor allele of all variants is the same in all three passages, except for position nt17 and nt10684. The variations found in P1 are G17T and C10684A, but in P3 and P5 are G17A and C10684G (Table 7).

Table 7. The variations which are occurred specifically in dengue virus cultured in each cell type

Nucleotide change	Amino acid change	Gene	Synonymous/ Non-synonymous	R-residue
Vero-specific variants				
T 343 A	G 83 G	C	synonymous	Polar-->Polar
T 784 G	A 116 A	prM	synonymous	NonPolar-->NonPolar
C 987 A	A 20 E	E	non-synonymous	NonPolar-->Acidic
T 2217 A	V 430 E	E	non-synonymous	NonPolar-->Acidic
G 2576 T	G 53 C	NS1	non-synonymous	Polar-->Polar
T 3747 A	L 91 Q	NS2A	non-synonymous	NonPolar-->Polar
T 4140 A	L 4 H	NS2B	non-synonymous	NonPolar-->Basic
T 4809 A	V 97 E	NS3	non-synonymous	NonPolar-->Acidic
A 4951 G	G 144 G	NS3	synonymous	Polar-->Polar
A 5485 T	S 322 S	NS3	synonymous	Polar-->Polar
T 5667 A	V 383 E	NS3	non-synonymous	NonPolar-->Acidic
T 5702 A	Y 395 N	NS3	non-synonymous	Polar-->Polar
T 6103 A	G 528 G	NS3	synonymous	Polar-->Polar
T 6497 A	Y 41 N	NS4A	non-synonymous	Polar-->Polar
A 6809 C	I 18 L	2K_peptide	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
C 6896 T	H 24 Y	NS4B	non-synonymous	Basic-->Polar
T 7623 A	L 17 Q	NS5	non-synonymous	NonPolar-->Polar
G 9032 T	A 487 S	NS5	non-synonymous	NonPolar-->Polar
T 9933 A	V 787 D	NS5	non-synonymous	NonPolar-->Acidic
G 10068 T	W 832 L	NS5	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
G 10422 T	-	3'UTR	-	-
A 10598 T	-	3'UTR	-	-
C6/36-specific variants				
T 3 G	-	5'UTR	-	-
T 6 G	-	5'UTR	-	-
A 8 T	-	5'UTR	-	-
G 9 T	-	5'UTR	-	-

Nucleotide change	Amino acid change	Gene	Synonymous/ Non-synonymous	R-residue
T 10 C	-	5'UTR	-	-
C 11 A	-	5'UTR	-	-
T 16 G	-	5'UTR	-	-
G 17 T G 17 A	-	5'UTR	-	-
C 10684 A C 10684 G	-	3'UTR	-	-
G 10687 T	-	3'UTR	-	-
C 10689 G	-	3'UTR	-	-
A 10690 T	-	3'UTR	-	-
A 10694 C	-	3'UTR	-	-

Comparison within cell type

The variant comparison between each passage within cell type was aimed for investigating the genotypic changed, which may be involved with phenotypic change.

In P1, the first passage that the virus from the patient was isolated in C6/36 and Vero cell line. There are variants found in P0 and P1 of cell line, then disappear in P3 and P5. This set of variants was transferred from the dengue population in patient plasma to dengue cultured in the cell line. However, these variants were not maintained in the cell line environment. There are 17 and five variants in P1 of C6/36 and Vero, respectively.

In dengue virus cultured in Vero, the large size of foci with pinpoint foci scatter around was first recognized in P3 and more obvious in P4 onwards. Therefore, the variation which firstly occurred in P3 and still maintains in P5 is interesting. There are 19 variants found in P3 and P5 but not be found in P1 of dengue cultured in Vero. All 19 variants are non-synonymous variations and located in the coding region (Table 8).

For dengue cultured in C6/36, the homogeneous pattern of pinhead foci was observed in P3. The variation that occurred in P3 and still maintained in P5 may link to pinhead foci. There are six variants detected only in both P3 and P5 of dengue cultured in C6/36. All six variants located in the coding region. Five of six variants are synonymous variations (table 8). However, mix pattern of foci between pinhead foci and bigger size of

foci with pinpoint foci scatter around can be observed in P4 onwards. The specific variation of P5 that may be related to the bigger size of foci was identified. There are five P5-specific variations. Three of them are non-synonymous variations located in Envelope, NS2A, and NS2B gene. The detail of these variants was shown in table 8.

Table 8. The variations which occurred during the phenotypic change in dengue virus cultured

Nucleotide change	Amino acid change	Gene	Synonymous/ Non-synonymous	R-residue
Variants only in P3 and P5 of Vero				
A 2085 G	E 386 G	E	non-synonymous	Acidic-->Polar
T 2241 C	V 438 A	E	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
T 3951 C	F 159 S	NS2A	non-synonymous	NonPolar-->Polar
T 4004 C	F 177 L	NS2A	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
C 4410 T	T 94 M	NS2B	non-synonymous	Polar-->NonPolar
G 4553 A	E 12 K	NS3	non-synonymous	Acidic-->Basic
G 6808 A	M 17 I	2K_peptide	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
C 6993 A	T 56 K	NS4B	non-synonymous	Polar-->Basic
C 7140 T	P 105 L	NS4B	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
C 7152 T	T 109 I	NS4B	non-synonymous	Polar-->NonPolar
T 7163 A	L 113 M	NS4B	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
T 7164 C	L 113 S	NS4B	non-synonymous	NonPolar-->Polar
G 7165 T	L 113 F	NS4B	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
G 7172 A	V 116 M	NS4B	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
T 7173 C	V 116 A	NS4B	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
G 7184 A	A 120 T	NS4B	non-synonymous	NonPolar-->Polar
C 7578 T	T 2 M	NS5	non-synonymous	Polar-->NonPolar
C 7584 T	A 4 V	NS5	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
A 9513 G	E 647 G	NS5	non-synonymous	Acidic-->Polar
Variants found in P3 and P5 of C6/36				
C 501 T	S 22 L	prM	non-synonymous	Polar-->NonPolar
A 690 G	E 85 G	prM	non-synonymous	Acidic-->Polar

Nucleotide change	Amino acid change	Gene	Synonymous/ Non-synonymous	R-residue
G 2718 A	G 100 E	NS1	non-synonymous	Polar-->Acidic
G 3245 A	D 276 N	NS1	non-synonymous	Acidic-->Polar
T 4004 C	F 177 L	NS2A	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
T 10213 C	D 880 D	NS5	synonymous	Acidic-->Acidic
Variants only in P5 of C6/36				
G 15 C	-	5'UTR	-	-
C 304 A	G 70 G	C	synonymous	Polar-->Polar
C 1710 T	A 261 V	E	non-synonymous	NonPolar-->NonPolar
A 3963 G	Y 163 C	NS2A	non-synonymous	Polar-->Polar
T 4470 C	I 114 T	NS2B	non-synonymous	NonPolar-->Polar

Conclusion and discussion

In the first passage of dengue virus isolation, the patient's plasma was added to C6/36 and Vero cell. Plasma effect to both cell type, which cause a lot of cell death in the first passage. Especially for the C6/36 cell line, cell detachment can be observed in the past two hours after plasma was added. One day after infected with the patient's plasma, 1×10^6 C6/36 cell line was added to the dengue culture flask. Therefore, a low virus titer was produced in the first passage of virus culture, especially for the C6/36 cell line.

The pattern of foci can be observed from the FFA result of each viral passage. In the first and second passages, the dengue virus from C6/36 and Vero still produced a similar pattern of foci. However, the pattern of foci was developed differently since the third passage. Dengue virus cultured in the C6/36 cell line has a homogeneous foci pattern of pinhead foci in the third passage. Since the fourth passage, the dengue virus produced pinhead foci as the main pattern and mixed with bigger foci. For the dengue virus from Vero cell, large size of foci was observed since the third passage and more obvious in the fourth passage. After the fourth passage and later, the main pattern of foci produced by the dengue virus from Vero cell is large foci contained pinpoint foci scatter around and has some mixed of pinhead foci. The FFA result confirmed that there is a phenotypic change in dengue virus serially cultured in both cell lines which occurred specifically to

host environment. However, the phenotypic change in dengue virus cultured in Vero cell can be observed faster and more obvious than C6/36.

From NGS data analysis, the detected variations from dengue virus cultured in C6/36 and Vero cell consist of:

- variations obtained from P0 and still conserved until P5 of C6/36 and Vero (table 6)
- variation obtained from P0 and found uniquely in dengue virus from each cell type until P5 (table 6)
- variations obtained from P0 and maintained only in the first passage of virus culture
- New variations occurred specifically in each cell type (cell type-specific variations) (table 7)

Most of cell type-specific variations that found in dengue virus cultured in Vero cell are non-synonymous variations. Whereas, all cell type-specific variations found in dengue virus cultured in C6/36 located in the untranslated region.

Even though the number of transferred variants from P0 to C6/36 and Vero cell are similar, however, dengue virus propagated in Vero cell produced a higher number of new variants in each passage than C6/36. This data shows that the dengue virus propagated in Vero has higher genotypic change than the dengue virus propagated in C6/36.

In this study, we attempt to observe the variations which may be related to the phenotypic change in dengue virus culture. For dengue virus cultured in Vero cell, large foci were firstly observed in P3. Therefore, the variations that occurred in P3 and still maintain until P5 may be related to the phenotypic change in dengue virus cultured in Vero cell. There are 19 variants detected, and all variants are non-synonymous variation (table 8). Nine out of 19 are located in the NS4B gene. The variation at NS4B-116 has been reported that 166V variant remain constantly in serial passages in C6/36 cell, whereas V116M and V116A variant become dominate when serially cultured in Vero cell (20). Moreover, V116M and V116A variant resulted in enhanced virus growth in human cell and caused of the appearance of large foci (20). The variations at NS4B T109I and L113F have also been reported to involve with the enhancement of replication of virus in Vero cell (20, 21). The variations at NS4B P101L (nt C7129T) of dengue serotype 4, which is related

to variants NS4B P105L (nt C7140T) of dengue serotype 1, was reported to result in decreased the replication and infectivity of dengue serotype 4 in C6/36 cell, but enhanced the replication in Vero and human HuH7 cell (21, 22). In this study, variation NS4B V116M, V116A, T109I, L113F, and P105L were detected only in P3 and P5 of Vero, which related to the occurring of large foci in Vero. The variations at nt7165 and nt7173 has been reported that these variations arising when cultured dengue virus in Vero cell (23).

In dengue virus cultured in C6/36 cell, the pattern of foci can be found since the first passage is pinhead foci. In P4, the bigger size of foci (smaller than large foci found in Vero) was firstly detected in C6/36. Therefore, five variants found specifically in sequencing data of P5 of C6/36 may be related to this foci pattern, especially for three non-synonymous variations in gene (table 8).

The phenotypic and genotypic information from this study revealed that the dengue population was selected since the first passage of virus isolation in both types of cell lines. The comparison between detected variants in dengue cultured in C6/36 and Vero cell show that dengue virus cultured in Vero cell produced a higher number of new variants than dengue virus cultured in C6/36 cell. However, for dengue virus isolation in a laboratory that would like to retain the property of the dengue population from the patient's plasma, dengue virus isolation should not be cultured beyond the second passage.

The changing of the dengue population detected in this study was found only in the minor population. The consensus sequence comparison between P0 (from patient's plasma) and P1, P3, and P5 from C6/36 and Vero cell show conserved sequences in all sequencing data, which means that the major populations of all samples are identical.

References

1. Holmes EC, Tio PH, Perera D, Muhi J, Cardoso J. Importation and co-circulation of multiple serotypes of dengue virus in Sarawak, Malaysia. *Virus research*. 2009;143(1):1-5.
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
3. Medina F, Medina JF, Colon C, Vergne E, Santiago GA, Munoz-Jordan JL. Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage. *Current protocols in microbiology*. 2012;Chapter 15:Unit 15D 2.

4. Montagnon BJ, Fanget B, Nicolas AJ. The large-scale cultivation of VERO cells in micro-carrier culture for virus vaccine production. Preliminary results for killed poliovirus vaccine. *Developments in biological standardization*. 1981;47:55-64.
5. Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*. 2002;296(5571):1270-3.
6. Harper DR. *Viral Culture Methodologies* 2001. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0001090/full>.
7. Bhamarapavati N, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*. 2000;18 Suppl 2:44-7.
8. Butrapet S, Huang CY, Pierro DJ, Bhamarapavati N, Gubler DJ, Kinney RM. Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. *Journal of virology*. 2000;74(7):3011-9.
9. Chin-inmanu K, Suttitheptumrong A, Sangsrakru D, Tangphatsornruang S, Tragoonrung S, Malasit P, et al. Feasibility of using 454 pyrosequencing for studying quasispecies of the whole dengue viral genome. *BMC genomics*. 2012;13 Suppl 7:S7.
10. Sujayanont P, Chininmanu K, Tassaneetrithep B, Tangthawornchaikul N, Malasit P, Suriyaphol P. Comparison of phi29-based whole genome amplification and whole transcriptome amplification in dengue virus. *Journal of virological methods*. 2014;195:141-7.
11. Malboeuf CM, Yang X, Charlebois P, Qu J, Berlin AM, Casali M, et al. Complete viral RNA genome sequencing of ultra-low copy samples by sequence-independent amplification. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(1):e13.
12. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data 2010 [updated 04-10-2018; cited 2019. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
13. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-20.
14. Hunt M, Gall A, Ong SH, Brener J, Ferns B, Goulder P, et al. IVA: accurate de novo assembly of RNA virus genomes. *Bioinformatics*. 2015;31(14):2374-6.
15. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.

16. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29(1):24-6.
17. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013;14(2):178-92.
18. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-303.
19. Wilm A, Aw PP, Bertrand D, Yeo GH, Ong SH, Wong CH, et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(22):11189-201.
20. Bui TT, Moi ML, Nabeshima T, Takemura T, Nguyen TT, Nguyen LN, et al. A single amino acid substitution in the NS4B protein of Dengue virus confers enhanced virus growth and fitness in human cells in vitro through IFN-dependent host response. *J Gen Virol.* 2018;99(8):1044-57.
21. Tajima S, Takasaki T, Kurane I. Restoration of replication-defective dengue type 1 virus bearing mutations in the N-terminal cytoplasmic portion of NS4A by additional mutations in NS4B. *Arch Virol.* 2011;156(1):63-9.
22. Hanley KA, Manlucu LR, Gilmore LE, Blaney JE, Jr., Hanson CT, Murphy BR, et al. A trade-off in replication in mosquito versus mammalian systems conferred by a point mutation in the NS4B protein of dengue virus type 4. *Virology.* 2003;312(1):222-32.
23. Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney JE, Jr., Markoff L, Murphy BR. A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *Journal of virology.* 2003;77(2):1653-7.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Manuscript in preparation to publish in international scientific journal:

Genetic Variations Associated with Phenotypic Changes in Dengue Virus serotype 1 driven by Serial Passaging in C6/36 and Vero cells

Chin-inmanu, K., Punyadee, N., Mairiang, D., Tangthawornchaikul, N., Malasit, P., Panisadee, A., Suriyaphol, P.