

**STUDIES ON THE INTERACTION BETWEEN DENGUE VIRUS
AND ITS COGNATE RECEPTOR**

SUMALEE JINDADAMRONGWECH

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2005

ISBN 974-04-5630-8

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสไข้เลือดออกเดงกีและตัวตอบรับบนผิวเซลล์ (STUDIES ON THE INTERACTION BETWEEN DENGUE VIRUS AND ITS COGNATE RECEPTOR)

สุมาลี จินดาดำรงเวช 4436419 MBMG/D

ปร.ด. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : DUNCAN R. SMITH, Ph.D., ALBERT KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., วิฑูรย์ ธีระโสภณ, Ph.D., เฉลิมพร องศ์วร โสภณ, Ph.D.

บทคัดย่อ

ขั้นตอนสำคัญในการที่เซลล์จะติดเชื้อไวรัสคือ การที่ไวรัสเข้าจับกับตัวตอบรับบนผิวเซลล์ เป้าหมาย เนื่องจากมีรายงานว่าตัวตอบรับของไวรัสไข้เลือดออกเดงกี อาจแตกต่างกันในระหว่างซีโรทัยป์ของไวรัสและในชนิดของเซลล์เป้าหมาย และยังไม่เคยมีรายงานการค้นพบตัวตอบรับบนผิวเซลล์เป้าหมายในมนุษย์สำหรับไวรัสไข้เลือดออกเดงกี การศึกษานี้จึงพิสูจน์หาตัวตอบรับสำหรับไวรัสไข้เลือดออกเดงกีซีโรทัยป์ 2 ในเซลล์เป้าหมายคือ เซลล์ตับมนุษย์ โดยใช้เซลล์ HepG2 เป็นเซลล์ต้นแบบ จากการใช้เทคนิค viral overlay protein binding assay และ peptide mass fingerprint analysis พบว่า ตัวตอบรับสำหรับไวรัสไข้เลือดออกเดงกีซีโรทัยป์ 2 ในเซลล์คือ โปรตีน GRP78 ซึ่งสามารถพิสูจน์โดยการยับยั้งการเข้าจับของไวรัสและการติดเชื้อของเซลล์ได้ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนตัวนี้

นอกจากนี้ยังทำการศึกษขั้นตอนการเข้าเซลล์และการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน โดยเปรียบเทียบระหว่างเซลล์ตับมนุษย์ และเซลล์ไวรัสที่ไม่ใช่เป้าหมายในธรรมชาติของไวรัสเดงกี พบว่าไวรัสเดงกีเข้าเซลล์โดยขบวนการเอนโดไซโตซิส และพบขบวนการฟาโกไซโตซิสได้บ่อยกับทั้งสี่ซีโรทัยป์ ส่วนการเข้าเซลล์ไวรัสพบการแทรกผ่านเข้าเซลล์โดยตรงผ่านการผสานกันระหว่างเปลือกของไวรัสกับผิวเซลล์ และพบเอนโดไซโตซิสได้ในซีโรทัยป์ 1 และ 3 สำหรับการเพิ่มจำนวนไวรัสในเซลล์พบว่าสัมพันธ์กับแควิวโอลที่มีเวสิเคิลหลายขนาดและที่มีไวรัสบรรจุอยู่ ต่างจากในเซลล์ไวรัสซึ่งพบว่าสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมและ smooth membrane structure และพบไวรัสที่สร้างขึ้นใหม่บรรจุอยู่ในถุงหุ้ม ไวรัสเดงกีจะขนส่งโดยบรรจุในถุงหุ้ม และออกจากเซลล์โดยขบวนการ exocytosis การค้นพบนี้แสดงให้เห็นความแตกต่างในขบวนการเข้าเซลล์และการเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์ทั้งสองชนิด

STUDIES ON THE INTERACTION BETWEEN DENGUE VIRUS AND ITS COGNATE RECEPTOR**SUMALEE JINDADAMRONGWECH 4436419 MBMG/D****Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)****THESIS ADVISORS: DUNCAN R. SMITH, Ph.D., ALBERT KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., WITON TIRASOPHON, Ph.D., CHALERMPORN ONGVARRASOPONE, Ph.D.****ABSTRACT**

The first important step of virus infection is the interaction between the virus and its receptor on the target cells. Dengue virus receptors have been suggested to be virus serotype- and cell type-dependent. However, to date no study has identified a dengue virus receptor in human liver cells.

A receptor for dengue serotype 2 was identified in the human liver cell line, HepG2, a target cell for dengue virus, by using viral overlay protein binding assay and peptide mass fingerprint analysis. Human GRP78 was identified as a receptor for dengue serotype 2. The expression of GRP78 on the HepG2 cell surfaces was positively demonstrated by immunochemical staining. Its receptor function was proved by antibody inhibition assays using both virus binding and infection approaches. Antibody inhibition was measured by plaque reduction assay and immunofluorescent staining. A N-terminal antibody inhibited both dengue virus serotype 2 binding and infection into HepG2 cells, while a C-terminal antibody slightly inhibited virus binding but enhanced viral production.

The ultrastructures of dengue virus internalization and replication were studied by transmission electron microscopy, and HepG2, which is a human target cell, and Vero which is a non-target cell for the dengue virus, were compared. Dengue virus serotype 2 entered HepG2 cells by endocytosis, although all four serotypes were frequently found to be phagocytosed into HepG2 cells. Whereas all four dengue serotypes were demonstrated to enter Vero cells by direct penetration and endocytosis, at least in serotypes 1 and 3. Dengue virus replication in HepG2 cells was associated with vacuoles containing vesicles and/or virus particles, while in Vero cells it was associated with smooth membrane structures inside the ER cisterns, the proliferation of ER, and prominent viral packets. Dengue virus seems to transport through the secretory pathway and undergo exocytosis from both cell types. These findings show differences in both entry and replication of dengue virus between these two cell types.

**KEY WORDS: DENGUE VIRUS/ RECEPTOR/ GRP78/ HEPG2 CELL/
TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY.**

132 P. ISBN 974-04-5630-8