

**CHARACTERIZATION OF THE RELATIONSHIP
BETWEEN THE DENGUE VIRUS AND THE
Aedes albopictus CELL LINE, C6/36**

PRIRAYAPAK SAKOONWATANYOO

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MOLECULAR GENETICS-GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005**

**ISBN 974-04-6658-3
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การศึกษาความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องระหว่างเชื้อไวรัสเด็งกีและเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 ที่มาจากยุงพาหะชนิด *Aedes ALBOPICTUS* (CHARACTERIZATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE DENGUE VIRUS AND THE *Aedes ALBOPICTUS* CELL LINE, C6/36.)

ไปรษณีย์ สกฤตวิทย์ 4537115 MBMG/D

ปร.ด. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : DUNCAN R. SMITH, Ph.D., ALBERT J KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., เฉลิมพร องค์กรวิทย์, Ph.D., วราภรณ์ อัครปทุมวงศ์, Ph.D.

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสเด็งกี เป็น RNA ไวรัส เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคไข้เลือดออกโดยสามารถแบ่งตามความรุนแรงของโรคได้เป็น 3 ระดับคือ dengue fever, dengue hemorrhagic fever และ dengue shock syndrome. เชื้อไวรัสเด็งกีแบ่งตามซีโรไทป์ได้เป็น 4 ชนิดคือ 1, 2, 3 และ 4 ยุงที่เป็นพาหะของเชื้อไวรัสเด็งกีคือยุงลายชนิด *Aedes albopictus* และ *Aedes egypti* การศึกษาถึงความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องระหว่างไวรัสเด็งกีและเซลล์เพาะเลี้ยงที่มาจากยุงพาหะอาจจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาโรคหรือยาฆ่าแมลงที่จำเพาะเจาะจงได้ เซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเซลล์ที่ได้มาจากลูกน้ำของยุง *Aedes albopictus* และได้นำมาใช้เพื่อเป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาการติดเชื้อไวรัสเด็งกีในห้องทดลอง

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสเด็งกีทั้ง 4 ซีโรไทป์และเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 ในการทดลองนี้ มุ่งเน้นถึงขั้นตอนการเข้าสู่เซลล์ (internalization), การผลิตไวรัสใหม่ (propagation) หลังจากเซลล์ติดเชื้อไวรัส และโปรตีนตอบรับ (putative binding protein) ที่ไวรัสเด็งกีใช้ในการเข้าสู่เซลล์ โดยพบว่า การเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงของไวรัสทั้ง 4 ซีโรไทป์ มีลักษณะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไปโดยไม่พบการอ้อมตัวของเซลล์ของไวรัสในช่วง 5 ชั่วโมง การผลิตไวรัสใหม่หลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้วใช้เวลาระหว่าง 14 ชั่วโมง (ซีโรไทป์ 4) ถึง 19 ชั่วโมง (ซีโรไทป์ 3) การหาค่าการผลิตไวรัสสูงสุดหลังการติดเชื้อพบว่าแตกต่างกันตามซีโรไทป์โดยพบปริมาณไวรัสที่ผลิตใหม่มากที่สุดใช้เวลา 6-10 วัน นอกจากนี้เมื่อมีการเลี้ยงเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเป็นระยะเวลานานขึ้นถึง 20 สัปดาห์ พบว่ามีการลดลงของการผลิตไวรัสที่ยังคงสภาพการติดเชื้อได้ ซึ่งไม่ได้เป็นผลมาจากจำนวนเซลล์ที่ลดลงหรือการตายของเซลล์แบบ apoptosis เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อค้นหาโปรตีนตอบรับสำหรับไวรัสเด็งกี ซีโรไทป์ 2, 3 และ 4 ใช้ในการเข้าสู่เซลล์โดยวิธี VOPBA พบว่าไวรัสสามารถจับกับโปรตีนขนาดประมาณ 50 kDa ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับโปรตีน 37/67kDa high affinity laminin receptor ในการทดลองเดียวกัน นอกจากนั้นผลการทดลองโดยการใช้สารสองชนิดคือ 37/67kDa high affinity laminin receptor antibody และ soluble laminin พบว่าสารทั้งสองชนิด สามารถหยุดยั้งการเข้าสู่เซลล์ได้เฉพาะซีโรไทป์ 3 และ 4 ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าโปรตีน 37/67kDa high affinity laminin receptor เป็นชนิดของโปรตีนตัวตอบรับบนผิวเซลล์ที่ไวรัสเด็งกีใช้ในการเข้าสู่เซลล์ยุงเพาะเลี้ยง

CHARACTERIZATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE DENGUE VIRUS AND THE AEDES ALBOPICTUS CELL LINE, C6/36.

PRIRAYAPAK SAKOONWATANYOO 4537115 MBMG/D

Ph.D. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS : DUNCAN R. SMITH, Ph.D., ALBERT J KETTERMAN, Ph.D., GERD KATZENMEIER, Ph.D., CHALERMPORN ONGVARRASOPONE, Ph.D., VARAPORN AKKARAPATUMWONG, Ph.D.

ABSTRACT

Dengue viruses are positive single-stranded RNA viruses. They are the causative agents of dengue fever, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. The principal vectors for transmission of the viruses are the *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes. Understanding the relationship between the dengue viruses and insect vector host cells may lead to the development of novel strategies to combat transmission of the viruses. One cell line derived from larva of *Ae. albopictus*, namely C6/36, is susceptible to dengue viruses and can be used as a model system.

This study investigated the dengue virus: mosquito cell interactions with regards to internalization and propagation of the viruses in C6/36 cells as well as investigating putative binding proteins which the viruses utilize to enter the mosquito cells. Internalization of all four serotypes of the dengue virus into C6/36 cells is an essentially linear process, with no plateau of internalization even after 5 hours. Production of *de novo* viruses takes between 14 (serotype 4) and 19 (serotype 3) hours post infection, and maximal virus is produced between 6 and 10 days post infection after which time a significant long term (up to 20 weeks) reduction in titer is seen. No evidence of apoptosis or deficit in cell number is seen in response to infection as compared to controls. Virus overlay protein binding assay identified a single band of approximately 50kD for dengue serotypes 2, 3 and 4 which co-migrated with the 37/67kDa high affinity laminin receptor protein. Both antibodies directed against the 37/67kDa high affinity laminin receptor protein as well as soluble laminin significantly inhibited the internalization of dengue virus serotypes 3 and 4, but not serotypes 1 and 2. As such the 37/67kDa high affinity laminin receptor is the first identified mosquito dengue virus receptor protein.

KEY WORDS : AEDES ALBOPICTUS / C6/36 / DENGUE VIRUS /
LAMININ RECEPTOR / APOPTOSIS / PERSISTENT

127 P. ISBN 974-04-6658-3