

**MOLECULAR CHANGE OF FLAVIVIRUS WHICH INVOLVES
IN ITS PATHOGENESIS**



SIRITORN BUTRAPET

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(PATHOBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1997

Copyright © Mahidol University
ISBN 974-588-912-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
S619m
1997

**With compliments
of**

Siritor Butrapet

SCPA/D 3231037 : MAJOR: PATHOBIOLOGY ; Ph.D. (PATHOBIOLOGY)

KEYWORD : JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS / ENVELOPE PROTEIN
/ DENGUE VIRUS TYPE 2 / MUTATION

SIRITORN BUTRAPET : MOLECULAR CHANGE OF FLAVIVIRUS
WHICH INVOLVES IN ITS PATHOGENESIS. THESIS ADVISORS : VINA
CHURDBOONCHART Ph.D., NATH BRAMARAPRAVATI Ph.D., SOMPHONG
SAHAPHONG Ph.D., SUDA RIENGROJPITAK Ph.D. 176 p. ISBN 974-588-912-1

Conformational changes of the envelope protein (E) of Japanese encephalitis virus (JEV) and mutations in the genome of Dengue type 2 virus (DEN2) are examples of molecular changes which effect flavivirus pathogenesis. Entry of JEV into the cells was studied using JEV-specific neutralizing monoclonal antibody (MAb) 503, radiolabeled-JEV, and observations with microscope. Treatment with MAb503 strongly inhibited internalization of JEV into the cells but not binding of the JEV to the cell surface, and also resulted in enhanced release of JEV-RNA from the cells in the form of intact virus particles. Binding of the MAb503 induced the formation of protease resistance E protein. Because of the fusion inhibition activity of the MAb503, the binding of MAb503 to JEV probably interferes with the structural rearrangement of the E protein, which further results in the failure of viral internalization into the cells.

The genome of the attenuated DEN2-16681-PDK53 virus differs from that of DEN2-16681 virus by 9 nucleotide mutations. Recombinant infectious cDNA clones 16681/PDK53 viruses were constructed to investigate the affects of these mutations. Neurovirulence in mice and biological markers of the recombinant viruses were also studied. A mutation that occurred in prM did not effect virus virulence. Recombinant viruses containing mutation at position 57 in the 5'-noncoding region of PDK53 virus were significantly reduced in their virulence. A mutation of amino acid 250 in NS3 gene contributed a major part to temperature sensitivity phenotype. Small plaque size correlated well with a less virulence property of the recombinant viruses. Therefore, attenuation phenotype of the PDK53 virus is clearly defined by multiple genetic loci.

SCPA/D 3231037 : MAJOR : PATHOBIOLOGY ; Ph.D. (PATHOBIOLOGY)

KEYWORD : JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS / ENVELOPE PROTEIN /
DENGUE TYPE 2 / MUTATION

ศิริธร บุตรเพชร : การเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของฟลาวิไวรัสที่มีผลต่อการก่อ
พยาธิสภาพ (MOLECULAR CHANGE OF FLAVIVIRUS WHICH INVOLVES IN ITS
PATHOGENESIS) อาจารย์ที่ปรึกษา: วิณา เชิดบุญชาติ Ph.D., ณัฐ ภมรประวัตติ Ph.D., สมพงษ์
สทพงศ์ Ph.D., สุดา เรืองโรจน์พิทักษ์ Ph.D. 176 หน้า ISBN 974-588-912-1

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน อี ของ Japanese encephalitis virus (JEV) และการผ่าเหล่า
(mutation) ของสารพันธุกรรมของเค็งกีไวรัส ชนิดที่2 เป็นตัวอย่างที่แสดงถึง ผลกระทบอันเกิดจาก
การเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล ที่มีต่อการก่อพยาธิสภาพของไวรัสในกลุ่มฟลาวิไวรัส การศึกษา
โดยใช้ monoclonal antibody (MAb)503 ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนอี ของ JEV และ JEV ที่คิด
ฉลาดด้วยสารกัมมันตภาพรังสี ประกอบกับการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า MAb503 ไม่
ได้ขัดขวางการจับตัวของไวรัสกับเซลล์ แต่จะป้องกันไม่ให้ไวรัสเข้าสู่เซลล์ (internalization) และ
กระตุ้นให้ไวรัสที่จับตัวกับเซลล์แล้ว หลุดออกจากเซลล์อีกด้วย อีกทั้งยังกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยน
แปลงรูปร่าง (conformational change) ของโปรตีนอี ที่เพิ่มความต้านทานต่อเอนไซม์ protease ผล
การทดลองนี้ผนวกกับความสามารถของ MAb503 ในการขัดขวาง cell fusion แสดงให้เห็นว่า
การจับตัวของ MAb503 กับโปรตีนอี จะมีผลรบกวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนอี ซึ่งนำ
ไปสู่ความล้มเหลวใน การเข้าสู่เซลล์ของไวรัส

เค็งกีไวรัส ชนิดที่2 สายพันธุ์ 16681 และสายพันธุ์ 16681-PDK53 มีความแตกต่างกันเพียง
9 นิวคลีโอไทด์ มีการสร้าง Infectious cDNA clone ของไวรัสลูกผสม (recombinant virus)
ระหว่างสายพันธุ์ 16681 และ PDK53 เพื่อศึกษาถึง ลักษณะทางชีวภาพ และ neurovirulence ของ
ไวรัสในหนูทดลอง จากการศึกษาพบว่า จุดผ่าเหล่าหนึ่งตำแหน่งที่พบในโปรตีน prM ไม่มีผลต่อ
ความรุนแรงของไวรัส ไวรัสลูกผสมที่มีจุดผ่าเหล่า อยู่ที่ ตำแหน่งที่ 57 ในส่วน 5'-noncoding
region จะมีความรุนแรงลดลง ส่วนจุดผ่าเหล่าที่ตำแหน่ง250 ของโปรตีน NS3 จะมีผลเพิ่มลักษณะ
ความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของไวรัส ลักษณะ plaque ที่มีขนาดเล็ก จะเป็นลักษณะที่พบ
ได้ในไวรัสลูกผสมที่มีความรุนแรงน้อย ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ลักษณะความไม่รุนแรงของสายพันธุ์
PDK53 เกิดจากการผ่าเหล่า ของสาร พันธุกรรมมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง