

29 OCT 2002



**CHARACTERIZATION OF THE DENGUE VIRUS
AND ITS BINDING TO HEPATOCYTE**

LUKKANA SUKSANPAISAN

With compliments
of

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

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

2002

ISBN 974-04-2249-7

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
L954c
2002

4336310 MBMG/M : MAJOR : MOLECULAR GENETICS AND
GENETIC ENGINEERING; M.Sc. (MOLECULAR
GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
KEY WORDS : DENGUE VIRUS/ SATURATION BINDING/
INFECTION/ STABILITY

LUKKANA SUKSANPAISAN : CHARACTERIZATION OF THE
DENGUE VIRUS HEPATOCYTE RECEPTOR. THESIS ADVISORS: DUNCAN
R. SMITH, Ph.D., SIRITORN BUTRAPET, Ph.D., WITON TIRASOPHON,
Ph.D. 139 p. ISBN 974-04-2249-7

The dengue virus (DEN), a mosquito-borne member of the flavivirus genus, causes a serious febrile illness in humans known as dengue fever and in its severe forms, dengue haemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Dengue fever affects over 100 million people worldwide, and there are still no vaccines or antiviral agents available. Virus binding to susceptible target cells is the first event required for productive infection. The liver is suspected as a target organ for dengue virus infection. The objective of this project is to characterize the binding of the dengue virus to human liver cells and investigate viral stability.

Viral growth curves from infected Vero cells were taken to determine the time needed to produce the maximum viral yield. The results showed the highest titer of DEN1 and DEN2 on day 4 and on days 3 and 6 for DEN3 and DEN4 respectively. The results of viral growth curves were used to purify radiolabeled DEN for study in saturation binding experiments on HepG2 cells, a model cell line for hepatocyte. The results using radiolabeled virus indicated that it was not possible to saturate binding under experimentally achievable conditions. Further experiments sought to determine whether it was possible to reach a state of saturation of infection on HepG2 cells by using an increasingly high input of the virus on a constant cell number. DEN1 and DEN4 showed no evidence of saturation of infection even at 5,000 virus particles per cell, while DEN2 became saturated in respect of infection at approximately 3,000 virus per cell. Interestingly, with DEN3 the response to infection increased up to 2,500 virus per cell followed by a reduction to almost zero at higher levels of virus infection.

Dengue viral stability was examined in normal growth media, human serum and plasma by inoculation with dengue virus at 37°C/ 10% CO₂, and the level of infectious virus titered over time. Each serotype showed significant loss of infectious virus over the time. Interestingly, loss of infectivity was exponential for each serotype, and half-lives were determined for DEN1 to DEN4 as 4.2, 6.8, 2.4 and 7.5 hours respectively. The viral half lives in both serum and plasma are less than that seen in growth media. There is a variation of half-lives in different individuals for all four serotypes. The half-life was not affected by the presence of either immunoglobulin G or heparin level.

4336310 MBMG/M : สาขาวิชา: อนุพันธุศาสตร์ และพันธุวิศวกรรมศาสตร์; วท.ม.
(อนุพันธุศาสตร์ และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

ลักษณะ สุขสันต์ไพศาล: การแยกลักษณะของตัวตอบรับบนเซลล์ระดับของคนที่มีต่อเชื้อ
ไข้เลือดออก (CHARACTERIZATION OF THE DENGUE VIRUS HEPATOCYTE
RECEPTOR) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: Duncan R. Smith, Ph.D., ศิริธร
บุตรเพชร, Ph.D., วิฑูรย์ ธิระโสภณ, Ph.D. 139 หน้า. ISBN 974-04-2249-7

เชื้อไวรัสไข้เลือดออกจัดอยู่ในจีนัสฟลาวิไวรัส และเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคไข้
เลือดออก มีประชากรมากกว่า 100 ล้านคนทั่วโลกที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ ซึ่งขณะนี้ยังไม่มีวัคซีน
หรือยาที่มีประสิทธิภาพป้องกันหรือรักษาได้ ขั้นตอนแรกของการที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย
และเพิ่มจำนวนได้คือการจับกับตัวตอบรับบนเซลล์ โดยมีต้นเป็นอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญอย่าง
หนึ่ง จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อแยกลักษณะของการจับกับตัวตอบรับบนเซลล์ระดับของคน
และศึกษาความคงตัวของไวรัสชนิดนี้

จากการศึกษาระยะเวลาการเติบโตของไวรัสในเซลล์ Vero พบว่าไวรัสซีโรไทป์ 1 และ 2
เพิ่มจำนวนได้มากที่สุดในวันที่ 4 หลังการติดเชื้อ ในขณะที่ไวรัสซีโรไทป์ 3 และ 4 เพิ่มจำนวนได้
มากที่สุดในวันที่ 3 และ 6 หลังการติดเชื้อตามลำดับ การจับกับตัวตอบรับบนผิวเซลล์ระดับของคน
โดยใช้ไวรัสซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี พบว่าไม่เกิดภาวะอึดตัวได้ในสภาวะที่ใช้ใน
การทดลอง เมื่อทดสอบความอึดตัวของ การติดเชื้อของไวรัสบนเซลล์ระดับ โดยเพิ่มจำนวนไวรัส
และกำหนดให้จำนวนเซลล์คงที่ พบว่าแม้ว่าจะเพิ่มจำนวนไวรัสถึง 5,000 ไวรัสต่อหนึ่งเซลล์แล้ว
การติดเชื้อของไวรัสซีโรไทป์ 1 และ 4 ก็ยังไม่อึดตัว ในขณะที่ซีโรไทป์ 2 เริ่มอึดตัวที่จำนวนไว
รัสประมาณ 3,000 ไวรัสต่อหนึ่งเซลล์ แต่การติดเชื้อของไวรัสซีโรไทป์ 3 เพิ่มขึ้นจนกระทั่ง
จำนวนไวรัสต่อเซลล์เท่ากับ 2,500 จากนั้นจึงเริ่มลดลง

ผลของการทดสอบความคงตัวของไวรัสในอาหารเลี้ยงเซลล์, ซีรัม และ พลาสมาที่ 37°C
10% CO₂ พบว่าไวรัสแต่ละซีโรไทป์มีความคงตัวแตกต่างกัน และมีค่าความสามารถของการติด
เชื้อลดลงแบบ exponential ค่าครึ่งชีวิตของซีโรไทป์ 1 ถึง 4 คือ 4.2, 6.8, 2.4 และ 7.5 ชั่วโมงตาม
ลำดับ นอกจากนี้พบว่าไวรัสที่อยู่ในซีรัมและพลาสมามีค่าครึ่งชีวิตน้อยกว่าไวรัสที่อยู่ใน
อาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไวรัสแต่ละซีโรไทป์จะมีค่าครึ่งชีวิตแตกต่างกันในแต่ละ
บุคคล และค่านี้ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับของอิมมูโนโกลบูลินจีและเฮปาริน