Thesis Title Mapping of Epitopes on prM Protein that Enhance Dengue Virus Infection via Antibody-dependent Enhancement Mechanism

Author Miss Sunpetchuda Supasa

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisor Dr. Poonsook Keelapang

ABSTRACT

Dengue virus infection causes dengue fever (DF), dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). As the severe forms, DHF and DSS, occur predominantly in children experiencing a secondary dengue virus infection that has a different serotype from that of the first infection, it is believed that the disease severity may be partly resulted from the enhancement of dengue virus infection by the pre-existing antibodies. This phenomenon was explained by an antibody-dependent enhancement (ADE) of infection hypothesis. In addition to anti-E antibodies, anti-prM antibodies can also enhance dengue virus infection in Fc receptor-bearing cells when the antibodies were pre-incubated with the virus. However, information of enhancing epitopes on the prM protein is currently limited.

In this study, seven anti-prM antibodies were used to map the potential enhancing epitopes on the prM protein of dengue virus serotype 2, strain 16681. Based on inhibition of binding assay results, the anti-prM antibodies used in this test can be classified into five binding groups. The first group consists of three antibodies (1C3, 1B5 and 1H10) while the other four groups has only single members (1A8, 4C1, 1G1 and 2H2). The binding sites of nearly all antibodies are close together, except 2H2 which seems to be further apart. Overlapping sets of synthetic peptides

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

spanning the entire prM protein were then used to locate the linear epitopes of four anti-prM antibodies (1C3, 1B5, 1H10 and 1A8). Results showed that these antibodies bound to two peptides in the pr portion of prM protein, 11-HMIVSRQEKGKSLLF-25 and 81-TTMGHRREKRSVAL-95. Focus immunostaining results of dengue chimeric virus strain JEV/pr16681-infected PS cells demonstrated that the substitution of amino acid residues in the later portion by those corresponding regions from Japanese encephalitis virus did not alter the binding ability of the antibodies, suggesting that their binding targets in natural antigen are likely to locate within the N-terminal part of the prM protein. Fine mapping using a set of decapeptides revealed that the amino acid residues 19-KG-20 are essential for the interaction between these antibodies and the prM protein.

Collectively, our data demonstrated that anti-prM antibodies bound to the N-terminus of the prM protein which is only found on immature or partially mature virions. These results suggested that the prM-containing particles can enter and replicate in Fc receptor-bearing cells. As it is generally known that the removal of pr peptide is required for uncoating of flaviviruses, our data shown here implied that there might be another mechanism for uncoating these particles.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การกำหนดตำแหน่งอีพิโทปบนโปรตีนพีอาร์เอ็มเพื่อช่วยเพิ่มการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ผ่านกลไกการเพิ่มที่อาศัยแอนติบอดี

ผู้เขียน นางสาวสรรเพชุดา สุภาษา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ.ดร. พูนสุข กีฬาแปง

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสเด็งกี่เป็นสาเหตุของโรคไข้เด็งกี่ ไข้เลือดออกเด็งกี่ และไข้เลือดออกเด็งกี่ที่มีอาการช็อก เนื่องจากโรคที่มีอาการรุนแรงได้แก่โรคไข้เลือดออกเด็งกี่ และไข้เลือดออกเด็งกี่ที่มีอาการช็อกมักพบในเด็กที่มีการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ซ้ำครั้งที่สองจากเชื้อไวรัสต่างซีโรทัยป์กับการติดเชื้อครั้งแรก จึงเชื่อว่าความรุนแรงของโรคส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการส่งเสริมการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่โดยแอนติบอดีที่มีอยู่ก่อนหน้านี้ ปรากฏการณ์นี้สามารถอธิบายได้ด้วยสมมติฐานที่แอนติบอดีไปช่วยส่งเสริมการติดเชื้อ นอกจากแอนติบอดีต่อโปรตีน E พบว่าการใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน prM สามารถส่งเสริมการติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ในเซลล์ที่มี Fc receptor ให้สูงขึ้นเมื่อเติมแอนติบอดีให้จับกับเชื้อไวรัสก่อน อย่างไรก็ตามปัจจุบันข้อมูลของ epitopes บนโปรตีน prM ที่ส่งเสริมการติดเชื้อ ไวรัสยังมีจำกัด

ในการศึกษานี้ แอนติบอดีต่อโปรตีน prM จำนวน 7 โคลนถูกใช้ในการหาตำแหน่งที่น่าจะเป็น epitope บนโปรตีน prM ที่ช่วยส่งเสริมการติดเชื้อของเชื้อไวรัสเด็งกี่ ซีโรทัยป์ 2 สายพันธุ์ 16681 จากผลการทดสอบการยับยั้งของการจับ (inhibition of binding assay) สามารถแบ่งแอนติบอดีที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มแรกมีสมาชิก 3 โคลน (1C3, 1B5 และ 1H10) โดยกลุ่มที่เหลืออีก 4 กลุ่มต่างก็มีสมาชิกเพียงโคลนเดียว (1A8, 4C1, 1G1 และ 2H2) ตำแหน่งในการจับของแอนติบอดีเกือบทุกตัวจะอยู่ใกล้กันยกเว้น 2H2 ซึ่งดูเหมือนว่าจะอยู่ห่างออกไป ชุดของเปปไทด์สังเคราะห์ที่คาบเกี่ยวกันครอบคลุมโปรตีน prM ทั้งหมดถูกใช้ในการหาตำแหน่ง linear epitope ของแอนติบอดีต่อโปรตีน prM จำนวน 4 โคลน (1C3, 1B5, 1H10 และ 1A8) ผลการทดลองพบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอนติบอดีเหล่านี้จับกับเปปไทด์ 2 ท่อนในส่วน pr ของโปรตีน prM ที่บริเวณ 11-HMIVSRQEKGKSLLF-25 และ 81-TTMGHRREKRSVAL-95 ผลจากการย้อมกลุ่มเซลล์ PS ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี่ลูกผสมสายพันธุ์ JEV/pr16681 พบว่าการแทนที่ของกรดอะมิโนในส่วนหลังด้วยกรดอะมิโนที่ตำแหน่งเดียวกันจากเชื้อไวรัสไข้สมองอักเสบไม่มีผลต่อความสามารถในการจับของแอนติบอดีกับเชื้อไวรัส ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าเป้าหมายในการจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนในธรรมชาตินำจะอยู่ในส่วนเปปไทด์ทางด้านปลายอะมิโนของโปรตีน prM เมื่อใช้ชุดของเปปไทด์ที่มีความยาว 10 กรดอะมิโนมาหาตำแหน่งของ epitopes อย่างละเอียด ผลการทดลองบ่งชี้ว่ากรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการจับกันระหว่างแอนติบอดีเหล่านี้กับโปรตีน prM คือกรดอะมิโนไลซีนที่ตำแหน่ง 19 และไกลซีนที่ตำแหน่ง 20

โดยสรุป ผลการทดลองพบว่าแอนติบอดีต่อโปรตีน prM จับได้กับกรดอะมิโนในส่วนปลายอะมิโนของโปรตีน prM ซึ่งพบได้เฉพาะบนอนุภาคไวรัสที่สร้างขึ้นใหม่หรืออนุภาคที่บางโมเลกุลของโปรตีน prM ไม่ถูกตัด ผลการทดลองเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าอนุภาคที่มีโปรตีน prM คงเหลืออยู่สามารถเข้าสู่เซลล์และเพิ่มจำนวนในเซลล์ที่มี Fc receptor ได้ โดยทั่วไปเป็นที่รู้กันว่าการตัดเปปไทด์ pr ออกนั้นจำเป็นต่อการปล่อยสารพันธุกรรมเข้าสู่ไซโตพลาสซึม (uncoating) ของเชื้อในกลุ่ม flaviviruses ข้อมูลที่ได้นี้ บอกเป็นนัยว่าอาจจะมีกลไกอื่นที่ใช้ในการปล่อยสารพันธุกรรมเข้าสู่ไซโตพลาสซึมของอนุภาคเหล่านี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved