

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

探討單株抗體及人類血清位於第三型登革病毒

外套膜蛋白質之抗體辨識部位

Study of the Epitopes on the Envelope Protein of

Dengue Virus Type 3 Recognized by

Monoclonal Antibodies and Human Sera

吳怡潔

Yi-Chieh Wu

指導教授：王維恭 博士

Advisor: Wei-Kung Wang, M.D., Sc.D.

中華民國九十九年五月

May, 2010

## 目 錄

口試委員會審定書 .....	i
誌謝 .....	ii
中文摘要 .....	iii
英文摘要 .....	v
<b>第 1 章：序論 .....</b>	<b>1</b>
1.1 登革病毒之簡介及流行 .....	1
1.2 感染登革病毒之臨床症狀 .....	2
1.3 登革出血熱之致病機制 .....	3
1.4 登革病毒之結構與基因體 .....	4
1.5 登革病毒之前驅膜/膜蛋白質與外套膜蛋白質 .....	4
1.6 登革病毒之生活史 .....	5
1.7 類病毒顆粒 .....	6
1.8 外套膜蛋白質之抗原結構 .....	6
1.9 研究目的 .....	8
<b>第 2 章：材料與方法 .....</b>	<b>10</b>
2.1 質體的構築 .....	10
2.2 菌種 .....	11
2.3 質體轉形作用 .....	12
2.4 製備小量質體 .....	12
2.5 製備大量質體 .....	13
2.6 細胞培養 .....	13
2.7 細胞轉染試驗 .....	13
2.8 西方墨點分析法 .....	14
2.9 影像分析軟體 .....	15
2.10 超高速離心分離重組次病毒顆粒 .....	15
2.11 抗原捕捉酵素連結免疫分析法 .....	16
2.12 病人血清 .....	16
2.13 單株抗體 .....	16
<b>第 3 章：結果 .....</b>	<b>18</b>
3.1 老鼠單株抗體位於 DENV3 E 蛋白質之抗體辨識部位 .....	18
3.2 感染 DENV3 病人血清抗 E 抗體之辨識部位分析 .....	19
3.3 利用 VLPs 建立 capture ELISA system 研究 DENV3 E 蛋白質之 抗體辨識部位 .....	20
3.4 分析病人血清中辨識 fusion loop 之抗 E 抗體所佔的比例 .....	21
<b>第 4 章：討論 .....</b>	<b>22</b>
<b>第 5 章：參考文獻 .....</b>	<b>26</b>
<b>圖表附錄 .....</b>	<b>34</b>

## 圖表目錄

表一、構築質體所使用的引子序列 .....	34
圖一、表現 DENV3 PrM/E 蛋白質之質體及 E 蛋白質 alanine 單點置換 突變之質體 .....	35
圖二、表現單點突變之 DENV3 E 蛋白質 .....	36
圖三、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對於 flavivirus group-reactive 單株抗體結合能力的影響 .....	37
圖四、E 蛋白質 fusion loop 區域之單點突變對於 flavivirus group-reactive 單株抗體結合能力的影響 .....	38
圖五、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對於 complex/ subcomplex-reactive 單株抗體結合能力的影響 .....	39
圖六、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對 DENV3 type-specific 單株抗體 DC6-3 結合能力的影響 .....	40
圖七、不同種類之老鼠單株抗體對於 DENV3 E 蛋白質及 DENV1 E 蛋白質 上的抗體辨識部位之比較 .....	41
圖八、感染 DENV3 之 DF 病人血清，包括初次感染以及二次感染之病人 .....	42
圖九、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對 DENV3 初次感染之 DF 病人( DF89-2008 ) 血清中抗 E 抗體結合能力的影響 .....	43
圖十、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對二次感染 DENV3 之 DF 病人血清中抗 E 抗體結合能力的影響 .....	44
圖十一、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對二次感染 DENV3 之 DF 病人血清中抗 E 抗體結合能力的影響 .....	46
圖十二、alanine fusion loop 及 domain III 多點突變之 VLPs 對 DF 病人 血清中抗 E 抗體結合能力的影響 .....	48
圖十三、alanine fusion loop 多點突變之 VLPs 對 DF 病人血清中抗 E 抗體 結合能力的影響 .....	50

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文

口試委員會審定書

中文題目：探討單株抗體及人類血清位於第  
三型登革病毒外套膜蛋白之抗體辨識部位

英文題目：Study of the Epitopes on the Envelope protein of  
Dengue virus type 3 Recognized by Monoclonal  
Antibodies and Human Sera

本論文係吳怡潔君 (學號 R92445108) 在國立臺灣大學  
微生物學所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 99 年 5 月 18 日承  
下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

王維恭

(簽名)

(指導教授)

何宇倫

吳德忠

張淑媛

系主任、所長

陳川和

(簽名)

## 誌 謝

這陣子七樓不斷出現陌生學弟妹臉孔，常常覺得自己成為微生物所學生是不久前的事情，但...兩年的研究所生活真的即將結束了，這段期間成長不少，需要感謝的人也不少！

首先感謝王維恭老師當初很爽快地答應當我的指導教授，這兩年老師對於實驗上以及邏輯上的指導著實讓我獲益良多！感謝我的口試委員吳漢忠老師、伍安怡老師以及張淑媛老師對於實驗的指導和指正；還要謝謝董老師提供的幫助，讓我可以繼續在 742 繼續做實驗！

謝謝 R712 的學長姊們：蕙蓉、賢屏、瑜萍、素如、思嘉、小標、沛瑩、文揚、飛龍以及維哲，感謝大家平日對我的照顧，不管是實驗上的協助或生活上的幫助，我覺得很幸運也很開心可以成為 R712 的一員！

謝謝 R742 的同伴們：素心、健治、文蕙、怡琇、韻卉，很開心可以和大家打成一片，感謝你們讓我碩二的生活每一天都充滿歡樂！也要謝謝葉家的好朋友雅紋、爾雅、巧玲，感謝你們提供實驗上的幫助以及不嫌棄我在 743 的吵鬧！

最後最感謝我的家人給予我精神上以及生活上的支持，讓我得以完成碩士學位！

## 中文摘要

登革病毒 (Dengue virus, DENV) 分類上屬於黃病毒科 (*Flaviviridae*) 中的黃病毒屬 (*Flavivirus*) 之成員，共有四種血清型 (DENV1, DENV 2, DENV 3 和 DENV4)，可造成熱帶及亞熱帶地區最重要的節肢動物傳播疾病。

登革病毒顆粒表面的外套膜蛋白質 (Envelope protein, E)，是決定病毒進入宿主細胞及膜融合的重要因子，並且也是宿主抗體辨識的主要目標。根據 X 線繞射晶體結構 (X-ray crystallography) 分析，其 N 端包含三個區域 (domain)，根據先前的研究報導，domain II 之 fusion loop 為黃病毒群交叉反應 (flavivirus group-reactive) 抗體的主要辨識部位 (epitopes)，domain III 包含複合型/次複合型交叉反應 (complex/subcomplex-reactive) 和血清型專一 (type-specific) 的抗體辨識部位。

由於過去的研究主要著重在感染 DENV2 後血清中抗 E 抗體的研究，對於感染其他血清型後之抗 E 抗體反應尚未瞭解。此外，大多數老鼠單株抗體之抗體辨識部位的數據主要來自 DENV2 E 蛋白質的研究。本研究第一個目標透過西方墨點法來研究 DENV3 E 蛋白質上其交叉反應及血清型專一的抗體辨識部位。以 DENV3 前驅膜蛋白質 (Precursor membrane protein, PrM) 及 E 蛋白質的表現質體為骨幹，在 28 個 E 蛋白質露出表面的胺基酸製造丙胺酸 (alanine) 定點突變，檢視老鼠單株抗體和 DENV3 病人血清多株抗體對於 E 蛋白質結合能力的影響。結果顯示 domain II 之 fusion loop 的某些胺基酸點突變會降低 flavivirus group-reactive 單株抗體結合能力，利用蛋白質結構為基礎的分析 (structure-based modeling) 顯示這些胺基酸之間的距離均符合同一個抗體辨識部位的範圍。domain III 及 domain I 之某些胺基酸點突變會降低 complex/subcomplex-reactive 單株抗體結合能力，domain I 之胺基酸點突變也影響所研究的一個 type-specific 單株抗體結合能力，蛋白質結構為基礎的分析顯示這些胺基酸符合形成相同的抗體辨識部位，E 蛋白質上 fusion loop 和少數 domain I 胺基酸點突變則降低大多數感染 DENV3 病人血清抗 E 抗體

的結合能力，顯示 fusion loop 是血清中主要抗 E 抗體的辨識部位。

本研究第二個目標，使用類病毒顆粒 (virus-like particles, VLPs) 建立 capture ELISA 系統來確認 E 蛋白質的抗體辨識部位，結果顯示 fusion loop 多點胺基酸突變 VLPs 會明顯降低感染 DENV3 病人血清抗 E 抗體的結合能力，利用終點稀釋倍數 (endpoint titer) 計算，顯示這群辨識 fusion loop 胺基酸 (101W, 108F) 的抗 E 抗體所佔比例約為全部抗 E 抗體之 20 至 70%。

綜合以上，本研究之結果顯示感染 DENV 的病人血清中主要抗 E 抗體辨識 domain II fusion loop，另一方面，利用 DENV3 E 蛋白質為骨幹的胺基酸點突變對不同的老鼠單株抗體結合能力的分析顯示，其辨識部位大致與之前文獻利用其他血清型 E 蛋白質所做的研究結果一致，但是也找到一些特殊的抗體辨識部位。這些結果提供對於交叉反應及血清型專一之抗體辨識部位的瞭解，以及對自然感染 DENV3 之下所誘發人體產生的抗 E 抗體特性的瞭解，可以對日後設計登革病毒重組疫苗提供有用的資訊。

關鍵詞：登革病毒，外套膜蛋白質，單株抗體，人類血清多株抗體，抗體辨識部位

## Abstract

*Dengue virus* (DENV) belongs to the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae*. The four serotypes of DENV (DENV1, DENV 2, DENV 3 and DENV4) are the leading cause of arboviral diseases in the tropical and subtropical areas.

The envelope (E) protein is known to play the critical role in virus entry and membrane fusion, as well as the major target of neutralizing antibodies. X-ray crystallographic analyses of the N-terminal ectodomain of E protein revealed three distinct domains. It has been shown that the fusion loop of domain II contains flavivirus group-reactive epitopes, whereas domain III contains complex/subcomplex-reactive and type-specific epitopes.

Previous studies of anti-E antibodies in polyclonal human sera focused primarily on DENV2 patients and anti-E antibody responses after infection by other serotypes remains largely unknown. Moreover, the epitope mapping of most mouse monoclonal antibodies (mAbs) was based on DENV2 E protein. In the first specific aim of this study, we investigated the cross-reactive and type-specific epitopes on the E protein of DENV3 by Western blot. We generated 28 alanine-substitution mutants which were predicted as surface exposed E residues by site-directed mutagenesis on a DENV3 Precursor membrane (PrM) /E expression construct, and examined the E-binding activity of mouse mAbs and polyclonal human sera. Substitution of several fusion loop residues at domain II reduced the E-binding activity of flavivirus group-reactive mAbs, and structure-based modeling suggested that these fusion loop residues were within the range of an epitope. Substitution of some domain III or domain I residues reduced the E-binding activity of complex/subcomplex-reactive mAbs. Mutations of a few domain I residues also reduced the E-binding activity of one type-specific mAb studied. The E-binding activity of anti-E antibodies of most DENV3-infected patients' sera were



affected by mutations of fusion loop residues as well as domain I residue (two case) , suggesting that fusion loop is the major epitope recognized by anti-E antibodies in human sera.

In the second specific aim of this study, we established capture ELISA by using virus-like particles (VLPs) to confirm the epitopes identified by Western blot. Our results showed that VLPs containing multiple mutations of fusion loop residues reduced the E-binding activity of anti-E antibodies in DENV3-infected patients' sera. Based on the endpoint titers of capture ELISA, the proportion of the anti-E antibodies recognizing the fusion loop residues (101W, 108F) ranged from 20% to 70%.

In summary, our study suggests that anti-E antibodies in DENV patients' sera primarily recognized fusion loop residues of domain II. Moreover, the epitopes of different mouse mAbs identified by amino acid substitutions in the DENV3 E protein backbone were generally in agreement with previous reports based on E protein of other serotypes. A new epitope recognized by a type-specific anti-E mAb was also found. The results presented in this study could further our understanding of the cross-reactive and type-specific epitopes, as well as the anti-E antibodies in polyclonal human sera. These information will be valuable for future design of recombinant subunit vaccine against DENV.

Key words: dengue virus, envelope protein, monoclonal antibody, polyclonal human sera, epitope

# 第 1 章：序論

## 1.1 登革病毒之簡介及流行：

登革病毒(Dengue virus, DENV)包含四種血清型(DENV1, DENV2, DENV3, DENV4)，分類上屬於黃病毒科(Flaviviridae)中的黃病毒屬(Flavivirus)之成員，黃病毒屬約有 70 種以上的病毒，包括造成全球流行的日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)，西尼羅病毒(West Nile virus, WNV)，黃熱病毒(Yellow fever virus, YFV)；造成地方性流行的蜱傳播腦炎病毒(tick-borne encephalitis virus, TBEV)，聖路易斯腦炎病毒(St. Louis encephalitis virus, SLEV)。黃病毒大都是透過節肢動物傳播(arthropod-borne)而造成人類疾病，其中登革病毒即是藉由埃及斑蚊(*Aedes aegypti*)和白線斑蚊(*Aedes albopictus*)的叮咬來感染人體，引發登革熱(Dengue fever, DF)和登革出血熱/登革休克症候群(Dengue hemorrhagic fever/Dengue shock syndrome, DHF/DSS)(Lindenbach and Rice, 2007)。

在 1906 年 Bancroft 首先提出埃及斑蚊是登革熱的傳播媒介(Bancroft, 1906)，並被 Siler 所證實(Siler, 1926; Cleland, 1918)，之後白線斑蚊也被證實為傳播媒介(Simmons, 1931)。同時在 1906 年 Ashburn 和 Craig 從感染病人中發現濾過性病源，但直到 1944 年 Sabin 和 Schlesinger 才成功分離出登革病毒(Sabin and Schlesinger, 1945)。

關於登革熱流行的記載，在 1779 年和 1780 年即有文獻指出在亞洲、非洲及北美洲有疑似登革熱的疾病流行(Howe, 1977; Rush, 1789)，但在更早之前中國晉朝已有類似登革熱疾病的紀錄(Nobuchi, 1979)。第一個登革熱流行的記載則是 1780 年在費城的大流行(Carey, 1971)。1780 至 1940 之間類似登革熱的案例雖不頻繁，但都是大規模的流行。二次大戰後，登革病毒的傳播擴大，在東南亞及太平洋地區陸續爆發大流行，甚至出現多種血清型的病毒同時流行(hyperendemicity)，並出現新的疾病 DHF，在 1954 年於馬尼拉以及隨後的 20 年間流行於東南亞地區

(Gubler, 1998)。隨著運輸以及貿易的快速發展，登革病毒逐漸擴散至全球，直到 1997 年，登革病毒已是造成熱帶以及亞熱帶地區的蟲媒疾病中的重要來源，估計約有超過 100 個國家，大於 25 億的人口有遭受感染的危險，每年約有 5 千萬到 1 億個人感染登革病毒以及約 50 萬個 DHF 病例(Gubler, 1998, 2002)。

登革熱在台灣的流行最早記載於 1870 年，之後 1902 年、1905 年和 1922 年在澎湖群島，以及 1927 年在台灣南部皆有發生流行，1931、1942~1943 則是爆發全島性的流行，之後約 40 年未再發生，直到 1981 年屏東地區出現 DENV2 流行，接著 1987 年和 1988 年在南台灣爆發大流行，此後幾乎每年有零星案例發生，約每三年有大規模的流行，最近的幾次包括 1998 年台南地區 DENV3 大流行；2001~2002 年高屏地區 DENV2 大流行，以及 2004 年間高屏地區 DENV1 及 DENV4 的流行，2006 年高雄 DENV3 大流行，及 2007 年台南 DENV1 大流行。

## 1.2 感染登革病毒之臨床症狀：

感染登革病毒的臨床症狀，大多數人無症狀或輕微發燒，少數人會出現高燒等較嚴重但會自癒的 DF，更少數人則出現嚴重及可能致命的疾病，即 DHF/DSS，(Gubler, 2002; Guzman and Kouri, 2002)。一般病毒感染後，潛伏期約 2~14 天，平均約 4-7 天，之後出現突然高燒、頭痛、眼窩痛、腰椎神經痛、眼球充血、臉部發紅等症狀。發燒會持續 2~7 天，伴隨肌肉痛、骨痛、噁心、嘔吐等症狀，且約有 50% 病人會發生出疹。實驗室診斷也發現病人會有嗜中性白血球減少 (neutropenia)、血小板減少 (thrombocytopenia) 的現象，大部分感染的人會痊癒，且不會有永久的後遺症，急性期 (acute phase) 持續約 3~7 天才進入恢復期 (convalescence phase) (Gubler, 1998)。

早期的流行病學研究顯示 DHF 主要發生在年齡小於 15 歲的小孩，成人也可能發生，症狀和 DF 類似，除了血小板、白血球減少，還會有出血情形，血管通透性也會增加，導致血漿流失，血壓下降，最後導致休克，即 DSS 的發生。若無妥

善治療，病患可能在 8~24 小時內死亡，若有適當的治療則可降低死亡率(Gubler, 1998)。

### 1.3 登革出血熱之致病機制：

長久以來之研究顯示，許多產生 DHF 的危險因子，包括病毒株，宿主免疫狀態 (immune status)，年紀，營養，HLA 種類，先前疾病 (underlying disease) 等等。主要有兩種假說，雖然彼此爭論，但是並不是互相排斥的 (mutually exclusive)。

病毒假說 (viral hypothesis)：Rosen 提出不同病毒株 (strains) 和臨床症狀嚴重性、病毒複製能力提增以及傳播能力具有相關性(Rosen, 1977)。

免疫假說 (immune hypothesis)：Halstead 基於流行學上的觀察，二次感染者較初次感染者有較高的危險會出現 DHF/DSS，以及實驗室中 (in vitro) 所證實抗體增強效應 (antibody-dependent enhancement, ADE)，即在非中和性抗體或低濃度 (suboptimal concentration) 中和性抗體的存在下，會促進登革病毒透過 Fc 受器而進入單核球 (monocyte) 中大量複製之現象(Brandt et al., 1982; Halstead, 1980, 1988; Halstead and O'Rourke, 1977; Halstead et al., 1984; Kliks et al., 1989)，提出免疫假說(Halstead, 1970, 2003)。在初次感染某一血清型，可以產生針對此血清型的中和性抗體，可提供對該血清型的終身保護力，相對地二次感染不同血清型之登革病毒，相較初次感染之病人具有較高風險會發生 DHF/DSS，由於病人體內存在可以中和先前血清型之中和性抗體以及具交叉反應之非中和性抗體，這些具結合力但卻不具中和力的抗體與病毒形成抗原-抗體複合物 (antibody-antigen complex)，並透過抗體上的 Fc 區域與單核球細胞或巨嗜細胞 (macrophage) 表面之 Fc 受器結合進而攝入細胞之中，增進病毒感染細胞的機會，因此種 ADE 現象而增加感染之單核球/巨嗜細胞，可以增加 T 細胞的活化，誘發細胞激素和化學中間物質的釋放，使得血管通透性增加，血漿流失，進而產生出血和休克現象(Gubler, 1998)。

#### 1.4 登革病毒之結構與基因體：

成熟之登革病毒顆粒為球型結構 (spherical)，直徑約 50 nm，病毒外層由來自宿主細胞之雙脂質 (lipid bilayer) 構成的外套膜以及病毒的外套膜蛋白質 (envelope protein, E) 和膜蛋白質 (membrane protein, M) 所包圍，病毒顆粒內部則包含有核心殼核酸 (nucleocapsid)，由核心蛋白質 (capsid protein, C) 和病毒的基因體所組成(Lindenbach and Rice, 2007)。

登革病毒的基因體為一條正向 (positive sense)、單股 (single stranded) 的 RNA 所組成，大小約 11 kb。此 RNA 之 5'端有外帽 (m7GpppAmpN2 cap)，3'端無聚腺苷序列 (polyadenylate tail) (Cleaves and Dubin, 1979; Wengler and Gross, 1978)。在 5'及 3'端各具有一段非轉譯區 (noncoding region, NCR)，包含一些保守序列 (conserved sequences) 和重要的 RNA 二級結構，可影響 RNA 基因體之複製、轉譯和組裝 (assembly)，中間為單一個 ORF (open reading frame)，經轉錄作用合成出單一多蛋白質 (polyprotein)，其靠近 N 端之四分之一部份為病毒之結構性蛋白質，依 5'至 3'排列順序為 C-PrM-E；其餘 C 端四分之三部分為非結構性蛋白質，依 5'至 3'排列順序為 NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5，此 polyprotein 會經由病毒或宿主細胞內的蛋白酶切割 (processing) 形成 10 個單一蛋白(Lindenbach and Rice,2007)。

#### 1.5 登革病毒之前驅膜/膜蛋白質與外套膜蛋白質：

前驅膜蛋白質 (precursor membrane protein, PrM) 分子量約 19 kDa，包含 166 個胺基酸，其 N 端具有六個半胱胺酸 (cystein) 形成三個雙硫鍵 (disulfide bond) (Nowak et al., 1989)。PrM 蛋白質會和 E 蛋白質在內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 處形成穩定之異類二聚體結構 (heterodimer) (Mukhopadhyay et al., 2005)，並且和 nucleocapsid 進行組裝，形成未成熟病毒顆粒，之後在分泌途徑 (secretory pathway) 中，PrM 蛋白質會被高基氏體 (Golgi) 的酵素 furin 切割其 N 端之 pr 部

分，產生成熟的 M 蛋白質，此切割作用可以促使 PrM-E heterodimer 結構解離 (dissociation) 進而形成 E 蛋白質同類二聚體結構 (homodimer)，成為成熟病毒顆粒，PrM 蛋白質之存在功能被認為可以避免 E 蛋白質在分泌途徑中進行由酸性環境引導的結構性改變 (conformational change) (Guirakhoo et al., 1991; Heinz et al., 1994)。

E 蛋白質，分子量約 55 kDa，包含約 495 個胺基酸，為登革病毒顆粒表面最主要的蛋白質，含有 12 個高度保守的半胱胺酸形成 6 個雙硫鍵穩定其結構 (Nowak and Wengler, 1987)。其功能包括可與宿主細胞之受器 (receptor) 結合，並幫助病毒進行膜融合 (membrane fusion) 以完成進入細胞 (entry) 的步驟，E 蛋白質同時也是中和性抗體 (neutralizing antibodies) 的主要目標 (Bray et al., 1989; Halstead, 1988)。高解析度低溫電子顯微鏡 (cryoelectron micrograph, cryo-EM) 的研究顯示，病毒表面由 90 個 E 蛋白質之 homodimer 排列而形成其二十面體之結構 (Kuhn et al., 2002; Mukhopadhyay et al., 2003)。根據 X 線繞射晶體結構 (X-ray crystallography) 研究解出，E 蛋白質單體 (monomer) 以頭對尾 (head to tail) 方式形成二聚體 (dimer)，平行排列在成熟病毒顆粒之外套膜上，E 蛋白質 N 端的 ectodomain，即包括第 1 至第 395 個胺基酸，具有三個 domains (Modis et al., 2003, 2004; Rey et al., 1995)，domain I 為中央結構區域 (central structural domain)；domain II 為聚合區域 (dimerization domain)，其末端包含一段黃病毒屬間高度保守 (highly conserved) 之序列，即融合圈環 (fusion loop)；domain III 為類免疫球蛋白區域 (immunoglobulin-like domain) 被認為可參予與細胞受器的結合 (Modis et al., 2003, 2005; Mukhopadhyay et al., 2005; Rey et al., 1995; Volk et al., 2004; Yu et al., 2004)。

## 1.6 登革病毒之生活史：

登革病毒顆粒藉由表面之 E 蛋白質與宿主細胞上的受器結合，經由受器所引導的胞飲作用 (receptor-mediated endocytosis) 進入細胞內形成胞飲體 (endosome)，

胞飲體的低 pH 值酸性環境會促使 E 蛋白質產生從 dimer 轉變成同類三聚體 (homotrimer) 的結構性改變，使病毒之外套膜和胞飲體發生膜融合，脫去外殼 (uncoating) 釋放出基因體 RNA (Modis et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 2005)。正股之 RNA 在內質網上轉譯出單一條 polyprotein，經由切割作用形成各個單一蛋白質執行功能，產生之非結構蛋白質，可以幫助 RNA 進行複製，先以正股 RNA 為模板，合成負股 RNA，再以此為模板合成更多正股基因體 RNA，之後與結構性蛋白質在內質網附近進行組裝，產生新的病毒顆粒，之後經由分泌途徑運送至高基氏體進行糖化作用及修飾，在此 PrM 蛋白質會經由 furin 蛋白酶切割為 pr 及 M 蛋白質，此時才形成具感染力之成熟病毒顆粒，最後透過膜融合釋出細胞外 (Lindenbach and Rice, 2007)。

### 1.7 類病毒顆粒 (Virus-like particles, VLPs) :

在登革病毒之生活史當中，除了釋放出成熟病毒顆粒之外，還會形成一種密度與直徑略小的顆粒，即類病毒顆粒 (virus-like particles, VLPs)，這種 VLPs 表面也具有 E 蛋白質和 M 蛋白質，但缺乏內部 nucleocapsid 結構 (Smith et al., 1970)，過去一些對於黃病毒研究發現，在細胞中共同表現 E 蛋白質和 PrM 蛋白質就足以形成重組性次病毒顆粒 (recombinant subviral particles, RSPs)，並且也具有融合 (fusogenic) 之功能 (Allison et al., 1995; Allison et al., 2003; Corver et al., 2000; Kuhn et al., 2002; Lorenz et al., 2003; Schalich et al., 1996)。由於 VLPs 和成熟病毒顆粒在結構上與生化特性上具有相似性，但無感染性，因此可當作一個血清學診斷和疫苗研究的良好工具 (Hunt et al., 2001; Konishi and Fujii, 2002)。

### 1.8 外套膜蛋白質之抗原結構：

E 蛋白質對於誘發中和性抗體以及保護性免疫反應 (protective immune response) 扮演重要角色 (Bray et al., 1989; Heinz and Kunz, 1982; Kaufman et al., 1987; Men et al., 1991; Roehrig et al., 2001)，由動物實驗證實，以重組性次病毒顆粒

或重組之 E 蛋白質進行主動免疫( active immunization )(Bray et al., 1989; Mota et al., 2005) , 或以 E 蛋白質之單株抗體 ( monoclonal antibodies ) 進行被動免疫 ( passive immunization ) (Kaufman et al., 1989; Kaufman et al., 1987) , 可保護實驗動物對登革病毒之感染。

透過 E 蛋白質之多株抗體 ( polyclonal antibodies ) 或各種單株抗體的研究可以幫助了解 E 蛋白質上的抗原結構( antigenic structure )(Beasley and Barrett, 2002; Crill and Roehrig, 2001; Heinz, 1986; Henchal et al., 1982; Roehrig, 2003; Roehrig et al., 1998; Sanchez et al., 2005; Vogt et al., 2009) 。過去對於 TBEV 之 E 蛋白質抗原結構之研究, 根據所找尋到抗體辨識部位 ( epitopes ) , 顯示其具有三個 domains 。 domain A 包含黃病毒群交叉反應之抗體辨識部位 ( flavivirus group-reactive epitopes ) , domain B 包含 TBEV 複合型之抗體辨識部位 ( complex-reactive epitopes ) , 而大部分 TBEV 次血清型專一之抗體辨識部位 ( subtype-specific ) 則位在 domain C , 此三個抗原結構 domain C 、 A 、 B 可以分別對應於 E 蛋白質之 domain I 、 II 、 III (Lindenbach and Rice, 2007) 。

在登革病毒方面, 最近有許多研究利用 yeast display library 系統或細菌表現重組之 E 蛋白質單一 domain 來研究老鼠的抗 E ( anti-E ) 單株抗體, flavivirus group-reactive 單株抗體主要辨識 E 蛋白質之 domain II fusion loop 上的胺基酸; complex/subcomplex-reactive 單株抗體以及 type-specific 單株抗體主要辨識 domain III 上的胺基酸 (Crill and Chang, 2004; Crill et al., 2009; Crill and Roehrig, 2001; Gromowski and Barrett, 2007; Gromowski et al., 2008; Lin et al., 1994; Lisova et al., 2007; Lobigs et al., 1987; Lok et al., 2001; Oliphant et al., 2006; Stiasny et al., 2006; Sukupolvi-Petty et al., 2007) 。此外, 對於老鼠各種抗 E 單株抗體中和效力 ( neutralization potency ) 的研究顯示, type-specific 單株抗體高於 complex-reactive 單株抗體, 而 complex-reactive 單株抗體又高於 flavivirus group-reactive 單株抗體。



在自然感染之人體內抗 E 抗體的研究方面，包括感染 WNV，另一個黃病毒成員，以 single chain phage display library 所製備之單株抗體及感染登革病毒之血清的研究，顯示 E 蛋白質引導人體免疫產生的抗體，大部分辨識 E 蛋白質上 domain II 之 fusion loop 上的胺基酸，而且不具中和能力，(Crill et al., 2009; Lai et al., 2008; Throsby et al., 2006)，具有中和能力的抗體比例極低，主要是辨識 E 蛋白質之 domain III 區域 (Crill et al., 2009; Gould et al., 2005; Lai et al., 2008; Oliphant et al., 2005; Throsby et al., 2006; Vogt et al., 2009)。

## 1.9 研究目的：

實驗室先前的研究(Lai et al., 2008)，以西方墨點法 (Western blot analysis) 分析被 DENV2 感染的病人血清，發現到初次感染 DENV2 之血清中含有大量會與其他血清型交叉反應 (cross reactive) 且不具中和能力的抗 E 抗體。進一步發現這些抗 E 抗體與 E 蛋白質的結合，會嚴重受到 E 蛋白質之 domain II fusion loop 上的丙胺酸 (alanine) 單點突變的影響，顯示這群抗 E 抗體的抗體辨識部位位在 domain II fusion loop 上高度保守的胺基酸。根據過去 Halstead 等人所提出的免疫假說，當二次感染登革病毒時，體內已存在的非中和性抗體會引起 ADE，使得登革病毒更容易在人類單核球中大量複製，而導致 DHF/DSS 的發生，因此，瞭解 E 蛋白質上詳細的抗體辨識部位，可以為未來登革病毒疫苗的設計提供重要的訊息。

由於過去的研究大多侷限在感染 DENV2 後血清中之抗體反應上，感染其他血清型之登革病毒後的抗體反應和 DENV2 有何異同之處，以及體內之抗 E 抗體位於 domain II 以外的抗體辨識部位仍有待研究。

因此，本研究的第一個目標，希望透過在 E 蛋白質上不同區域之露出表面的胺基酸製造 alanine 單點突變，以西方墨點法做 E 蛋白質結合能力分析以檢視感染 DENV3 之病人血清中抗 E 抗體的抗體辨識部位，以及不同種類之老鼠單株抗體的抗體辨識部位。

另一方面，我們希望建立另一套系統來確認以西方墨點法分析抗 E 抗體與 E 蛋白質結合能力的結果，因此，本研究第二個目標為使用 VLPs 來建立 capture ELISA，並且進一步希望透過 capture ELISA 的結果，可以用來測定感染 DENV3 病人血清中辨識不同抗體辨識部位之抗 E 抗體的比例(Crill et al., 2009)。



## 第 2 章：材料與方法

### 2.1 質體的構築

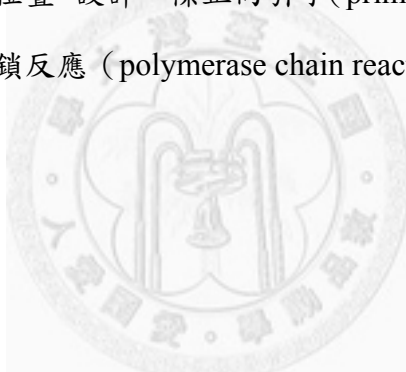
#### 2.1.1. 模板質體來源

pCB-D3，此重組質體由實驗室胡賢屏博士所建構 (Hu et al., 2007)，包含 DENV3 C<sub>101-114</sub> 作為訊號胜肽，能夠表現完整的 DENV3 PrM 蛋白質以及 DENV3 E 蛋白質，本研究所構築之點突變質體皆以此重組質體當作骨架。

#### 2.1.2. 登革病毒 E 蛋白質之定點突變質體建構 (site-directed mutagenesis)

選定欲突變的胺基酸位置，設計一條正向引子(primer)，使用此引子以 pCB-D3 作為模版進行聚合酵素鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，PCR 反應條件及溫度條件如下：

單一 PCR 反應條件：



100 ng/μl DNA	1 μl
10x PFU buffer	2.5 μl
5 μM primer	2 μl
10 mM dNTP	0.5 μl
2.5 U/μl Turbo PFU (Sstratagene, La Jolla, CA)	0.5 μl
100% DMSO	1.25 μl
Nuclease-free water (Promega, Madison, WI)	17.25 μl
<hr/>	
total	25 μl

溫度條件：

95°C	-----	3 min	
95°C	-----	30 sec	¶
54°C	-----	1 min	18 cycles
68°C	-----	6 min	¶
68°C	-----	5 min	
4°C	-----	5 min	

待反應結束後，在產物中加入 1 µl Dpn I 限制酶酵素，37°C 作用隔夜，使模版被切割清除，之後取 10 µl 產物轉形 (transformation) 至 DH5α 中表現質體 DNA。在所得之質體 DNA 上，選擇適當的限制酶酵素，切割出包含有點突變位置的 DNA 片段 (約 300 b.p.~1000 b.p.)，利用接合作用 (ligation) 連結到被相同的限制酶酵素所切割的 pCB-D3 載體上，以確保除了所選定之突變胺基酸以外的序列正確性。

### 2.1.3. 引子

本實驗所使用之引子皆以 QuikChange® Primer Design Program 設計，為 Invitrogen Life Science 所合成，詳見表一。

### 2.1.4. 定序分析

本實驗所構築之質體序列分析由台大醫院醫學研究部第二共同研究室以核酸自動定序儀 (ABI 3730 genetic analyzer) 定序。

## 2.2 菌種

### 2.2.1. 菌株

使用大腸桿菌 *E. coli* DH5α，以 LB 培養基溶液 (Difco™, Sparks, MD) 培養於 37°C。

### 2.2.2. 製備勝任細胞 (competent cells)

將菌種 DH5 $\alpha$  以三區塗畫法接種於不含抗生素之 LB 洋菜培養基上，37°C 培養箱內靜置隔夜後，挑取單一菌落培養於 2.5 ml 不含抗生素之 LB 培養液，於 37°C 培養箱內搖盪培養隔夜後，取 1 ml 菌液加入至 100 ml LB 培養液，置於 37°C 培養箱內搖盪培養，待細菌之 O.D.<sub>600</sub> 達到 0.4 至 0.6 之間，將菌液倒入離心瓶中，在冰上靜置 10 分鐘，以 3000 rpm，4°C 離心 10 分鐘，倒去上清液，以 TFB1 溶液 (30 mM KOAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl, 15% Glycerol, pH5.8) 緩慢地將細菌混合均勻，在冰上靜置 2~3 小時，之後以 3000 rpm，4°C 離心 10 分鐘，倒去上清液，以 TFB2 溶液 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15% Glycerol, pH 6.5) 緩慢地將細菌混合均勻，在冰上靜置 10 分鐘，分裝到 1.5 ml 微量離心管中，儲存於 -80°C 冰箱。

## 2.3 質體轉形作用

將保存於 -80°C 冰箱的勝任細胞 DH5 $\alpha$ ，放置於冰上解凍，加入 10  $\mu$ l 經接合反應之後含有重組質體的混合物，冰上靜置 30 分鐘後，置於 42°C 水浴槽中加熱 90 秒 (heat shock)，馬上移至冰上靜置 5 分鐘，加入 1 ml 不含抗生素的 LB 培養液，在 37°C 培養箱內搖盪培養 1 小時，以 5000 rpm 離心 5 分鐘，倒去上清液，殘留約 100  $\mu$ l，將其重新懸浮後，均勻塗在含有能夠篩選質體的抗生素之 LB 洋菜培養基上，置於 37°C 培養箱內培養隔夜。

## 2.4 製備小量質體

挑取單一菌落培養於 3 ml 含適當抗生素的 LB 培養液，於 37°C 培養隔夜，分兩次將菌液倒入 1.5 ml 微量離心管中，以 13000 rpm 離心 2 分鐘，倒去上清液，以 Plasmid MiniPrep Purification Kit (GeneMark Technology, Taipei, Taiwan) 純化小量質體 DNA。

## 2.5 製備大量質體

挑取單一菌落培養於 4 ml 含適當抗生素的 LB 培養液，37°C 培養隔夜，加入到 400 ml LB 培養液，繼續培養約 16~18 小時，以 6000 rpm，4°C 離心 30 分鐘，利用 QIAGEN tip-500 Kit (Qiagene, Valencia, CA) 純化質體 DNA，純化出的質體利用分光光度計測量吸光值並計算出濃度，配製成 1 µg/µl 之濃度保存在 -20°C 以備用。

## 2.6 細胞培養

293T 細胞 (human embryonic kidney cell line, SV40 Large T transformed) 培養於含 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS; Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), 1% Penicillin / Streptomycin (GIBCO™ Invitrogen, Grand Island, NY), 2% HEPES (GIBCO™ Invitrogen, Grand Island, NY) 之 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/High glucose; Hyclone, Logan, Utah) 培養液。細胞置於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱內，約 2 天繼代培養一次。

## 2.7 細胞轉染試驗 (transfection)

利用磷酸鈣 (calcium phosphate) 將重組質體 DNA 轉染至細胞內。進行轉染作用前一天將適量細胞種植於 6 孔盤或直徑 10-cm 細胞培養皿，於轉染作用前 4 小時置換新的培養液 (6-well 加 2 ml, 10-cm dish 加 8 ml)，使細胞處於相同酸鹼度的環境。

轉染前配製轉染混合物，各物質混合之比例如下：

	6-well	10-cm dish
Nuclease-free water ( Promega , Madison , WI)	88 $\mu$ l	260 $\mu$ l
DNA ( 1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l	10 $\mu$ l
2.5M CaCl <sub>2</sub>	10 $\mu$ l	30 $\mu$ l
2 x BBS ( BES -buffered saline)	100 $\mu$ l	300 $\mu$ l
總體積	200 $\mu$ l	600 $\mu$ l

取適量 DNA 和 ddH<sub>2</sub>O 混合均勻後，以緩慢攪動的方式加入 CaCl<sub>2</sub>，並且緩慢吸吐 10 次，再以同樣的方式加入 BBS，室溫靜置 10 分鐘後，將轉染混合物均勻加入細胞，培養於 35°C，3% CO<sub>2</sub> 培養箱，約 16~18 小時後，置換新的 DMEM 培養液，將細胞移置 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱繼續培養。轉染 48 小時後，以 1xPBS 清洗細胞一次，並以適量的 lysis buffer ( 6-well 轉染加 50  $\mu$ l；10-cm dish 轉染加 200  $\mu$ l ) ( 1% NP-40，50 mM Tris pH 8.0，150 mM NaCl，2 mM EDTA，1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>，Protease Inhibitor；Roche，Mannheim，Germany ) 將細胞溶解，以 13000 rpm，4 °C 離心 30 分鐘，保留上清液，儲存於 -80°C，以進行下一步分析。

## 2.8 西方墨點分析法

本研究之西方墨點分析實驗使用 BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 system ( Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA ) 。

下層 Resolving gel 以及上層 Stacking gel 配製方法如下：

	Resolving gel		Stacking gel
Acrylamide	12%	Acrylamide	5%
Tris pH8.8	0.375 M	Tris pH6.8	0.124 M
SDS	0.1%	SDS	0.1%
APS	1.26 mg/ml	APS	0.78 mg/ml
TEMED	0.04%	TEMED	0.1%

取 3  $\mu$ l cell lysate 樣本溶液加入 1/3 倍體積的 4x non-reducing dye ( 8% SDS，0.2 M Tris pH7.0，20% glycerol，0.4% bromophenol blue )，混合均勻後，95°C 加熱 2 分鐘，取 4  $\mu$ l 進行蛋白質電泳，將膠片組合於電泳槽，使用電泳緩衝液液 ( 25

mM Tris, 250 mM Glycine, 0.1% SDS) 以 80 V~120 V 進行電泳。跑完膠後，使用轉印緩衝液(25 mM Tris, 250 mM Glycine, 20% Methanol)，以固定電流 250 mA，1 小時，將膠體上的蛋白質轉印到硝化纖維紙 (Hybond<sup>TM</sup>-C Extra, GE-Amersham, Buckinghamshire, UK) 上，轉印結束後以 amido black 溶液 (0.1% amido black, 10% methanol, 2% acetic acid) 染色，之後以 blocking buffer (4% non-fat milk in 1x washing buffer) 室溫處理 1 小時，加入一級抗體，4°C 反應至隔夜，以 washing buffer (10 mM Tris-HCl pH7.4, 0.9% NaCl, 0.2% Tween 20) 清洗 3 次，每次 10 分鐘，加入二級抗體，室溫反應 1 小時，再以 washing buffer 清洗 3 次，最後使用 ECL (PerkinElmer life science, Boston, MA) 呈色，以 X 光片感光顯影。

## 2.9 影像分析軟體

UVP Vision Works LS software (UVP, Upland, CA)。

## 2.10 超高速離心分離重組次病毒顆粒 (sucrose cushion ultracentrifugation)

質體 DNA 轉染至細胞約 2 天後，收集三個 10-cm dish 之培養液約 30 ml 至 50 ml centrifuge tube，以 2500 rpm，4°C 離心 20 分鐘，取上清液以 0.22 µm filter (Millipore, Billerica, MA) 過濾至高速離心管 (Beckman Coulter, Fullerton, CA)，從管底緩慢加入 3.5 ml 之 20% sucrose，以精秤平衡各高速離心管重量，須精確至 0.001g，以 SW-28 rotor (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 19000 rpm，4°C 離心 5 小時，之後倒去上清液，將高速離心管倒放在擦手紙上，去除多餘液體，再以拭鏡紙沿管壁但不碰觸到底部擦拭乾淨，以 45 µl 的 1X PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, GIBCO<sup>TM</sup> Invitrogen, Grand Island, NY) 回溶，保存於-80°C。



## 2.11 抗原捕捉酵素連結免疫分析法 (Ag-capture ELISA)

以 coating buffer(15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.5)稀釋兔子抗 DENV3 血清 (由美國 CDC 張光正博士提供), 取 50 µl 稀釋抗體加至 96 孔平底盤 (Nunc-Immuno™ 96 MicroWell™ Plates, Nunc, Roskilde, Denmark), 於 4°C 靜置隔夜, 使抗體吸附在底部, 之後倒掉抗體溶液, 於擦手紙上將殘餘的液體盡量拍乾, 加入 400 µl StartBlock blocking buffer (Thermo, Rockford, IL.) 室溫處理 1 小時, 倒掉 blocking buffer, 將殘餘的液體拍乾, 加入 50 µl 重組次病毒顆粒 (virus like particles, VLPs) 稀釋液 (以 blocking buffer 稀釋), 於 37°C 作用 2 小時後, 倒掉溶液, 以 washing buffer (10 mM Tris-HCl pH7.4, 0.9% NaCl, 0.5% Tween-20) 清洗 4 次, 將殘餘的液體盡量拍乾, 加入一級抗體, 37°C 作用 1 小時後, 以 washing buffer 清洗 4 次, 拍乾殘餘液體, 加入二級抗體於 37°C 作用 1 小時, 以 washing buffer 清洗 6 次, 拍乾殘餘液體, 加入 100 µl TMB (KPL, Gaithersburg, MD) 溶液呈色 10~15 分鐘, 加入 100 µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應, 以 Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VA) 測量 O.D.450 及 O.D.650。

## 2.12 病人血清

實驗中所使用之病人血清由高雄醫學大學附設醫院熱帶醫學中心蔡季君主任提供, 包含 10 個 DF 病人血清, 這些病人之發病日在 2006 年, 血清採集於 2008 年, 其中 1 個是初次感染案例, 9 個為二次感染案例。

## 2.13、單株抗體

1. FL0231: 能夠辨認四型登革病毒 E 蛋白質, 購自 Chance Biotechnology (Taipei, Taiwan)。
2. FL0232: 能夠辨認四型登革病毒 E 蛋白質, 購自 Chance Biotechnology (Taipei, Taiwan)。

Taiwan)。

3. 4G2：融合瘤細胞株 (hybridoma cell line) 4G2 產生的單株抗體 (IgG2a) 能夠辨認四型登革病毒的 E 蛋白質 (Gentry et al., 1982)，由免疫所伍安怡老師實驗室所提供。

4. DC9-6、DC12-3、DC7-3：能夠辨認二型以上登革病毒的 E 蛋白質，由中研院細胞與個體生物研究所吳漢忠老師實驗室所提供。

5. DC6-3：能夠辨認 DENV3 的 E 蛋白質，由中研院細胞與個體生物研究所吳漢忠老師實驗室所提供；



## 第 3 章：結果

### 3.1 老鼠單株抗體位於 DENV3 E 蛋白質之抗體辨識部位：

為了瞭解抗 E 抗體位於登革病毒 E 蛋白質之抗體辨識部位，先前實驗室以表現 DENV1 PrM/E 蛋白質之質體為骨幹，選擇位於 E 蛋白質表面的胺基酸 (Mazumder et al., 2007)，以定點突變法將其分別置換成 alanine 來做抗體辨識部位的研究，根據初步分析之結果，觀察到 28 個胺基酸可能為抗體辨識部位的胺基酸，在本實驗中以表現 DENV3 PrM/E 蛋白質之質體為骨幹，也利用定點突變法將這些胺基酸分別置換成 alanine。

圖一顯示這 28 胺基酸所涵蓋範圍，包含 domain I (17G、37N、167Q、169S、172E、174V、176P、1773、290D)、domain II fusion loop (101W、104G、106G、107L、108F) 以及 domain III (301M、303L、305T、307V、310K、311E、312V、329E、364P、383G、384D、385K、389I、391W)。將這些 alanine 單點突變之質體轉染至 293T 細胞，48 小時之後收集 cell lysates，為了將每一個 alanine 單點突變 E 蛋白質之濃度調整至一致，首先利用 mixed mAbs (包含 flavivirus group-reactive、DENV complex-reactive 及 DENV3 type-specific 三種單株抗體的混合物) 稀釋 1000 倍作為一級抗體，進行西方墨點分析法，利用影像分析軟體 UVP 定量 E band intensity，確認各個 E mutant/wt E 值約為 1.0 (圖二) 再進行下一步的分析。

之後我們使用不同種類的小鼠單株抗體當作一級抗體，進行 SDS-10% PAGE 以及西方墨點法來分析，定量 E band intensity，並且計算 Recognition Index ( $[ \text{Intensity of mutant E/wt E} ]_{\text{mAb}} / [ \text{intensity of mutant E/ wt E} ]_{\text{mixed mAbs}}$ ) (Lai et al., 2008; Thali et al., 1992)，以 cut-off 值小於 0.3 定義此 alanine 單點突變 E 蛋白質可以影響單株抗體的結合能力。

圖三顯示 alanine 單點突變的 E 蛋白質對於 flavivirus group-reactive 單株抗體結合能力的影響。在 101W、104G、106G、107L 及 108F 的 alanine 點突變皆會影響

4G2 對 E 蛋白質的結合能力；101W、104G、107L 及 108F 的 alanine 點突變會影響 FL0231 的結合能力，而 FL0232 則是受到 101W 和 108F alanine 點突變的影響。這些結果顯示，flavivirus group-reactive 單株抗體大部分都是辨識在黃病毒 E 蛋白質上，一段序列高度保守的 fusion loop 位置。

圖五顯示 alanine 單點突變之 E 蛋白質對於 complex/subcomplex-reactiv 單株抗體 (DC7-3、DC9-6、DC12-3) 結合能力的影響。domain III 之 312V、389I 和 391W 的 alanine 點突變會影響 DC12-3 的結合能力，DC9-6 受影響的位置主要位於 domain III (307V、310K、311E、312V、383G、389I、391W) 以及 domain I (172E)，而這些位置的 alanine 點突變並不影響 DC7-3 的結合能力。

圖六顯示 alanine 單點突變之 E 蛋白質對於 DENV3 type-specific 單株抗體 DC6-3 結合能力的影響。domain I (17G、172E、290D) 胺基酸的 alanine 點突變會降低此單株抗體對 E 蛋白質的結合能力。

### 3.2 感染 DENV3 病人血清抗 E 抗體之辨識部位分析：

我們進一步分析被 DENV3 感染的病人，其血清中抗 E 抗體的辨識部位。收集高雄地區 2002 年和 2006 年感染 DENV3 的病人血清，一共分析 10 個採集於 2008 年恢復期之 DF 病人血清，包括一個初次感染 DENV3 之病例，九個二次感染 DENV3 之病例（圖八）。

分析初次感染 DENV3 之病人 (DF89-2008) 血清中的抗 E 抗體，在 101W 和 104G 位置的 alanine 點突變會降低對 E 蛋白質的結合能力（圖九）。

分析二次感染 DENV3 之病人血清中的抗 E 抗體，其中 3 個病例 (DF70-2008、DF95-2008、DF98-2008) 受到 101W 位置 alanine 點突變的影響，而 104G 和 172E 這兩個位置的 alanine 點突變分別會影響 DF90-2008 和 DF71-2008 血清抗 E 抗體的結合能力（圖十）。另外一些病人血清的抗 E 抗體則受到比較多位置的 alanine 點

突變的影響，DF102-2008 可辨識 101W 和 104G；DF87-2008 可辨識 101W、104G 和 108F；DF92-2008 可辨識 101W、104G 以及 domain I 的 172E；DF104-2008 的抗 E 抗體則不受影響（圖十一）。

綜合分析初次感染及二次感染 DENV3 之病人血清，發現血清中主要抗 E 抗體辨識部位在 E 蛋白質之 domain II fusion loop（101W、104G、108F）上。

### **3.3 利用 VLPs 建立 capture ELISA system 研究 DENV3 E 蛋白質之抗體辨識部位：**

根據西方墨點法以 alanine 點突變之 E 蛋白質分析 DENV3 感染之病人血清中的抗 E 抗體，結果顯示主要辨識在 E 蛋白質之 fusion loop 上的胺基酸，為了確認這些結果，我們使用在結構上及生化特性上和成熟病毒顆粒相似的 VLPs 當作抗原，以 ELISA 進行分析，根據先前的研究報導指出在 3-layer ELISA 實驗方法當中的 coating 步驟，以及鹼性緩衝液可能影響抗原的結構(Schwab and Bosshard, 1992; Stiasny et al., 2006)，因此，在本實驗我們建立改以 coating 兔子抗 DENV3 抗體的 capture ELISA system 進行抗體辨識部位的分析。

將 alanine 點突變之質體轉染至 293T 細胞，48 小時後收集上清液進行超高速離心分離出 VLPs，接著先以 capture ELISA 定量，在 coating 兔子抗 DENV3 抗體的 96-well plate，加入序列稀釋之 VLPs，以 mixed mAbs（包含 flavivirus group-reactive、DENV complex-reactive 及 DENV3 type-specific 三種單株抗體的混合物）稀釋 3200 倍作為一級抗體，根據 O.D.450-650 讀值選擇結果約為 1.0（圖十二 A）之下，各 VLPs 所對應的稀釋倍數當做下一步分析的稀釋倍數。接著固定 VLPs 之稀釋倍數，以各病人血清當作一級抗體做序列稀釋進行 capture ELISA，分別以 O.D.450-650 讀值及  $\log(1/\text{dilution factor})$  為 XY 軸畫出相對曲線圖。圖十二 B 及圖十三 A 顯示，相對 DENV3 wild type VLPs，fusion loop 之 101WA108FA 或

101WA106GA108FA 之突變 VLPs 降低病人血清 (DF89-2008、DF92-2008、DF102-2008、DF90-2008) 中抗 E 抗體的結合能力 (圖十二 B 中排、圖十三 A 上排) ; domain III (305TA384DA) 之突變 VLPs 則不影響 DF89-2008 和 DF92-2008 病人血清中的抗 E 抗體的結合能力 (圖十二 B 右排) 。

綜合以上 capture ELISA 的結果和上述西方墨點法的分析結果 (圖十二 B 左排、圖十三 A 下排) 做比較, 顯示兩個實驗結果有相同的趨勢, 即 fusion loop 是主要的抗 E 抗體的辨識部位。

### 3.4 分析病人血清中辨識 fusion loop 之抗 E 抗體所佔的比例:

由上述實驗結果顯示多株抗體之病人血清中, 大部分抗 E 抗體辨識部位在 fusion loop 上, 我們進一步希望分析這些抗 E 抗體在所有抗 E 抗體中所佔的比例。使用 DENV3 wild type VLPs 當作抗原, 以兩組未感染登革病毒之正常血清當作一級抗體, 並且序列稀釋進行 capture ELISA, 以 O.D.450-650 讀值之平均值加 3 個標準差 (mean + 3 S.D.) 當作 cut-off (0.128), 接著計算在此 cut-off 值之下, 各組 VLPs 所對應的終點稀釋倍數 (endpoint titer), 再以公式抗 E 抗體比例 (%) =  $(1 - \text{mutant VLPs 終點稀釋倍數} / \text{wt VLPs 終點稀釋倍數}) * 100\%$ , 可以分別計算出血清中辨識 101W108F 以及 101W106G108G 之抗 E 抗體的比例。

圖十二 C 顯示 DF89-2008 血清中辨識 101W108F 以及 101W106G108G 的抗 E 抗體分別佔有 73%和 70%; DF92-2008 則分別是 49%和 41%; 圖十三 B 顯示 DF102-2008 血清中辨識 101W108F 以及 101W106G108G 的抗 E 抗體有 70%以上; DF71-2008 則分別是 21%和 22%; DF90-2008 分別是 32%和 26%。

綜合以上之分析結果, 感染 DENV3 之病人血清中, 大約有 20~70%的抗 E 抗體, 其抗體辨識位在 fusion loop 上。

## 第 4 章：討論

E 蛋白質對於誘發中和性抗體以及保護性免疫反應扮演重要角色(Bray et al., 1989; Kaufman et al., 1987; Men et al., 1991; Roehrig et al., 2001) ，在人體感染登革病毒後針對病毒抗原所誘發的免疫反應中，E 蛋白質也被證實是主要的免疫原 (immunogen) ，初次感染 DENV2 即可誘發產生大量 (>90%) 具交叉反應的抗 E 抗體 (Lai et al., 2008) 。先前許多文獻中，對於抗 E 抗體的辨識部位之研究以 DENV2 佔大多數，對於其他血清型的瞭解比較少，並且很多是使用單株抗體來做研究，關於人體產生的抗 E 抗體特性之研究不多，在本研究中，我們以表現 DENV3 PrM/E 蛋白質之質體為骨幹，在 28 個位於 E 蛋白質表面的胺基酸分別置換成 alanine，藉此來瞭解各種不同種類的小鼠單株抗體以及感染 DENV3 之病人血清中的抗 E 抗體在 DENV3 之 E 蛋白質上的抗體辨識部位。

首先透過西方墨點法檢視不同種類的小鼠單株抗體對於 E 蛋白質的結合能力是否因 alanine 點突變而受影響，結果發現 flavivirus group-reactive 單株抗體(4G2、FL0231 和 FL0232) 所辨識的胺基酸皆位於 E 蛋白質上序列高度保守的 fusion loop 上 (圖三)，這項結果與實驗室先前以 DENV1 PrM/E 質體為骨幹的研究結果具有一致性 (圖四)，影響 flavivirus group-reactive 單株抗體結合能力的胺基酸點突變在 DENV3 和 DENV1 之間互相符合 (DENV1 之點突變 104GA 未分析)，在其他研究也有對於 fusion loop 包含 flavivirus group-reactive 之抗體辨識部位的報導，例如 Crill et al 使用 flavivirus group-reactive 之小鼠單株抗體來研究，找到 DENV2 E 蛋白質有影響的胺基酸點突變在 104G，106G，107L (Crill and Chang, 2004)；Chiou et al 的研究發現 JEV E 蛋白質之 106G 及 107L 的點突變可以降低交叉反應 (Chiou et al., 2008)；Stiasny et al 也報導 TBE 之 fusion loop 為 flavivirus group-reactive 單株抗體的辨識部位 (Stiasny et al., 2006)。

過去的研究指出 complex/subcomplex-reactive 單株抗體的抗體辨識位在 domain

III 上，曾經被報導的位置包括 DENV1 的 307K, 308L, 309E, 310K, 311E, 312V, 387L, 389L, 391W (Lisova et al., 2007), DENV2 的 305K, 307K, 310K, 311E, 312I, 332P, 364P, 389L, 391W (Crill et al., 2009; Gromowski et al., 2008), DENV3 的 306L, 308K, 381G, 387I, 389W (等同 DENV1 之 308L, 310K, 383G, 389I, 391W) (Matsui et al., 2009), 在本研究中有兩個 complex/subcomplex 單株抗體 (DC9-6, DC12-3) 之結合能力都受到 312V, 389I, 391W 點突變的影響, 其他胺基酸點突變包括 310K, 311E, 329E, 383G 也會影響 DC9-6 的結合能力 (圖五)。DC12-3 是以 DENV3 為免疫原而引誘產生可以辨識 DENV1, DENV2 和 DENV3 之 E 蛋白質的單株抗體, 因此實驗室先前也以 DENV1 為骨幹分析 DC12-3, 受影響的位置則是 310K, 311E, 389L, 391W (圖七), 以上這八個胺基酸雖然屬於不連續片段, 但在 3D 立體結構上的相對距離非常靠近 ( $<30\text{\AA}$ ), 因此極為可能是抗體所能辨識的區域。我們另外發現一個距離比較遠 ( $>30\text{\AA}$ ) 的胺基酸 172E (domain I) 也會降低 DC9-6 的結合能力, 猜測 172E 也許不是直接位於以 312V, 389I, 391W 所形成的抗體辨識部位, 但是其點突變可局部影響該抗體辨識部位的構形 (conformation) 因而影響 DC9-6 的結合能力。

大部分對於黃病毒的研究結果顯示 domain III 包含了 type-specific 的抗體辨識部位 (Beasley and Barrett, 2002; Crill and Roehrig, 2001; Gromowski and Barrett, 2007; Oliphant et al., 2005; Roehrig et al., 1998; Sukupolvi-Petty et al., 2007), 有趣的是, 本研究使用 DENV3 type-specific 單株抗體 DC6-3 進行分析, 結果發現 domain III 上這些胺基酸並不影響結合能力, 反而 domain I 之胺基酸突變 (17G, 172E, 290D) 才造成結合能力下降 (圖六), 這三個胺基酸彼此的相對位置相當靠近 ( $<30\text{\AA}$ ), 因此可能是抗體所能辨識的區域, 這個發現代表一個位於 domain I 的抗體辨識部位。

初次感染 (圖九) 和二次感染 DENV3 (圖十, 圖十一) 的 DF 病人恢復期血清之抗 E 抗體則主要受到 domain II 之 101W, 104G, 108F 這些位置 alanine 點突



變的影響，其中兩個病例則受到 domain I 之 172EA (圖十 E, 圖十一 B) 的影響，顯示血清中的抗 E 抗體主要辨識部位在 E 蛋白質之 domain II fusion loop 上，這項結果類似之前對於 WNV, TBE 及 DENV2 (Crill et al., 2009; Lai et al., 2008; Oliphant et al., 2007; Stiasny et al., 2006) 的研究結果。

由於，本研究中所建立的表現 DENV3 alanine 點突變 E 蛋白質之質體是基於先前以 DENV1 為骨幹進行分析的初步結果，將觀察到可能為抗體辨識部位的 28 個胺基酸以 DENV3 為骨幹來進行 alanine 點突變，然而感染 DENV3 之病人血清中的抗 E 抗體以及其他老鼠單株抗體可能另外包含了 E 蛋白質上其他不同於 DENV1 的抗體辨識部位，因此需要增加更多胺基酸的點突變才能為 DENV3 的抗體辨識部位的研究提供詳細的資訊，

為了進一步確定使用西方墨點法找尋到的抗體辨識部位，本研究另外利用 VLPs 建立 capture ELISA system 來做分析，由於 VLPs 在結構及生化特性上與病毒顆粒相似，很適合作為抗原來研究抗 E 抗體的結合能力，並且為了維持 VLPs 結構上的完整性，本研究不使用傳統的 3-layer ELISA system，而改以 coating 兔子抗 DENV3 抗體取代 coating 病毒抗原蛋白；另一方面，在分析之前我們使用 mixed mAbs 來對每一個 VLPs 作定量 (圖十二 A)，此步驟同時可以確保胺基酸的突變不影響 VLPs 整體的結構。

綜合先前實驗室對於 DENV1 和 DENV2 之病人血清中抗 E 抗體之研究以及本實驗對 DENV3 的分析結果，101WA 及 108FA 突變會降低抗 E 抗體結合能力，在 VLPs 上同時將 101W 和 108F 置換成 alanine，或者表現 101WA-106GA-108FA 之 VLPs，從 capture ELISA 分析結果，這兩個突變之 VLPs 相較於 WT 之 VLPs 會降低 DENV3 感染之病人血清 (DF89, DF92, DF102, DF90) 中抗 E 抗體之結合能力 (圖十二中、圖十三上)；另一方面，305T, 384D 被報導是 DENV2 type-specific 抗體辨識部位 (Gromowski and Barrett, 2007; Sukupolvi-Petty et al., 2007)，在本研究

中，以 305TA-384DA 之 VLPs 進行分析，則發現不影響血清 (DF89, DF92) 中抗 E 抗體之結合能力 (圖十二右)，顯示可以辨認 305T 及 384D 這類 type-specific 抗體辨識部位的抗 E 抗體在血清中所佔的比例極少。綜合比較西方墨點法和 capture ELISA 之分析結果，顯示兩個研究方法之結果有相同的趨勢。其中 DF92 與 DF90 之西方墨點法結果雖然顯示 101WA 及 108FA 不影響抗 E 抗體結合能力，而其 capture ELISA 結果卻看到突變之 VLPs 中度影響結合能力，這些結果說明，有一些抗體辨識部位可能具有協同作用的特性，因此單點突變不足以影響抗體結合。

以上之實驗結果顯示在 DENV3 感染之病人血清中主要的抗 E 抗體辨識部位在 fusion loop (101W, 108F) 上，進一步分析這群抗 E 抗體在所有抗 E 抗體 (IgG) 中所佔的比例，初次感染 DENV3 病人血清中的抗 E 抗體約有 70%，二次感染 DENV3 病人血清中的抗 E 抗體約有 20 至 70% 不等 (平均 45%)，而根據 Crill et al 對於感染 DENV2 之 DF 病人血清的分析，一次感染 DENV2 病人血清中，可以辨識 fusion loop (106G, 107L) 的抗 E 抗體平均約 44% (IgG)，在二次感染 DENV2 病人血清中則是平均約 35%；初次感染 DENV 後針對 fusion loop 所產生的抗 E 抗體似乎大於二次感染 (Crill et al., 2009)，但是由於本研究所分析的血清中只包含一個一初次感染的病例，未來需要分析更多的感染病例才具有統計上的意義。

在本研究中，我們使用西方墨點法檢視了不同種類的單株抗體在 DENV3 之 E 蛋白質上的抗體辨識部位，同時也分析了初次和二次感染 DENV3 病人血清中的抗 E 抗體的辨識部位及其所佔的比例，這些對於 cross-reactive 和 type-specific 之抗體辨識位的瞭解，以及對自然感染 DENV3 之下所誘發人體產生的抗 E 抗體特性的瞭解，可以為日後設計誘導產生交叉保護及中和性抗體的疫苗提供有用的資訊。

## 第 5 章：參考文獻

Allison, S.L., Stadler, K., Mandl, C.W., Kunz, C., and Heinz, F.X. (1995). Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *J Virol* 69, 5816-5820.

Allison, S.L., Tao, Y.J., O'Riordain, G., Mandl, C.W., Harrison, S.C., and Heinz, F.X. (2003). Two distinct size classes of immature and mature subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *J Virol* 77, 11357-11366.

Bancroft, F.W. (1906). On the influence of the relative concentration of calcium ions on the reversal of the polar effects of the galvanic current in paramecium. *J Physiol* 34, 444-463.

Beasley, D.W., and Barrett, A.D. (2002). Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. *J Virol* 76, 13097-13100.

Brandt, W.E., McCown, J.M., Gentry, M.K., and Russell, P.K. (1982). Infection enhancement of dengue type 2 virus in the U-937 human monocyte cell line by antibodies to flavivirus cross-reactive determinants. *Infect Immun* 36, 1036-1041.

Bray, M., Zhao, B.T., Markoff, L., Eckels, K.H., Chanock, R.M., and Lai, C.J. (1989). Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis. *J Virol* 63, 2853-2856.

Carey, D.E. (1971). Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci* 26, 243-262.

Chiou, S.S., Crill, W.D., Chen, L.K., and Chang, G.J. (2008). Enzyme-linked immunosorbent assays using novel Japanese encephalitis virus antigen improve the accuracy of clinical diagnosis of flavivirus infections. *Clin Vaccine Immunol* 15, 825-835.

Cleaves, G.R., and Dubin, D.T. (1979). Methylation status of intracellular dengue type 2 40 S RNA. *Virology* 96, 159-165.

Cleland, J. B. (1918). Dengue fever in Australia: its history and clinical course, its experimental transmission by *Stegomyia fasciata*, and the results of inoculation and other experiments. *The Journal of hygiene* 16, 317-419.

Corver, J., Ortiz, A., Allison, S.L., Schalich, J., Heinz, F.X., and Wilschut, J. (2000). Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral

particles in a liposomal model system. *Virology* 269, 37-46.

Crill, W.D., and Chang, G.J. (2004). Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *J Virol* 78, 13975-13986.

Crill, W.D., Hughes, H.R., Delorey, M.J., and Chang, G.J. (2009). Humoral immune responses of dengue fever patients using epitope-specific serotype-2 virus-like particle antigens. *PLoS One* 4, e4991.

Crill, W.D., and Roehrig, J.T. (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* 75, 7769-7773.

Gould, L.H., Sui, J., Foellmer, H., Oliphant, T., Wang, T., Ledizet, M., Murakami, A., Noonan, K., Lambeth, C., Kar, K., *et al.* (2005). Protective and therapeutic capacity of human single-chain Fv-Fc fusion proteins against West Nile virus. *J Virol* 79, 14606-14613.

Gromowski, G.D., and Barrett, A.D. (2007). Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. *Virology* 366, 349-360.

Gromowski, G.D., Barrett, N.D., and Barrett, A.D. (2008). Characterization of dengue virus complex-specific neutralizing epitopes on envelope protein domain III of dengue 2 virus. *J Virol* 82, 8828-8837.

Gubler, D.J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 11, 480-496.

Gubler, D.J. (2002). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10, 100-103.

Guirakhoo, F., Heinz, F.X., Mandl, C.W., Holzmann, H., and Kunz, C. (1991). Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *J Gen Virol* 72 ( Pt 6), 1323-1329.

Guzman, M.G., and Kouri, G. (2002). Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2, 33-42.

Halstead, S.B. (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med* 42, 350-362.

Halstead, S.B. (1980). Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* 58, 1-21.

Halstead, S.B. (1988). Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology.

Science 239, 476-481.

Halstead, S.B. (2003). Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res* 60, 421-467.

Halstead, S.B., and O'Rourke, E.J. (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 146, 201-217.

Halstead, S.B., Venkateshan, C.N., Gentry, M.K., and Larsen, L.K. (1984). Heterogeneity of infection enhancement of dengue 2 strains by monoclonal antibodies. *J Immunol* 132, 1529-1532.

Heinz, F.X. (1986). Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Adv Virus Res* 31, 103-168.

Heinz, F.X., and Kunz, C. (1982). Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: peptide mapping of large non-structural proteins of European isolates and comparison with other flaviviruses. *J Gen Virol* 62 (Pt 2), 271-285.

Heinz, F.X., Stiasny, K., Puschner-Auer, G., Holzmann, H., Allison, S.L., Mandl, C.W., and Kunz, C. (1994). Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* 198, 109-117.

Henchal, E.A., Gentry, M.K., McCown, J.M., and Brandt, W.E. (1982). Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 31, 830-836.

Howe, G.M. (1977). A world geography of human disease. Academic Press, Inc., New York, N. Y.

Hu, H.P., Hsieh, S.C., King, C.C., and Wang, W.K. (2007). Characterization of retrovirus-based reporter viruses pseudotyped with the precursor membrane and envelope glycoproteins of four serotypes of dengue viruses. *Virology* 368, 376-387.

Hunt, A.R., Cropp, C.B., and Chang, G.J. (2001). A recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen. *J Virol Methods* 97, 133-149.

Kaufman, B.M., Summers, P.L., Dubois, D.R., Cohen, W.H., Gentry, M.K., Timchak, R.L., Burke, D.S., and Eckels, K.H. (1989). Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am J Trop Med Hyg* 41, 576-580.

Kaufman, B.M., Summers, P.L., Dubois, D.R., and Eckels, K.H. (1987). Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am J Trop Med Hyg* 36, 427-434.

Kliks, S.C., Nisalak, A., Brandt, W.E., Wahl, L., and Burke, D.S. (1989). Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 40, 444-451.

Konishi, E., and Fujii, A. (2002). Dengue type 2 virus subviral extracellular particles produced by a stably transfected mammalian cell line and their evaluation for a subunit vaccine. *Vaccine* 20, 1058-1067.

Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., Pletnev, S.V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C.T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., *et al.* (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108, 717-725.

Lai, C.Y., Tsai, W.Y., Lin, S.R., Kao, C.L., Hu, H.P., King, C.C., Wu, H.C., Chang, G.J., and Wang, W.K. (2008). Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *J Virol* 82, 6631-6643.

Lin, B., Parrish, C.R., Murray, J.M., and Wright, P.J. (1994). Localization of a neutralizing epitope on the envelope protein of dengue virus type 2. *Virology* 202, 885-890.

Lindenbach, B. D., Thiel, H. J., and Rice, C. M. (2007). Flaviviridae: the viruses and their replication. In *Fields virology*, D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. (Philadelphia, Pa.: Lippincott William & Wilkins), pp. 1101-1152.

Lisova, O., Hardy, F., Petit, V., and Bedouelle, H. (2007). Mapping to completeness and transplantation of a group-specific, discontinuous, neutralizing epitope in the envelope protein of dengue virus. *J Gen Virol* 88, 2387-2397.

Lobigs, M., Dalgarno, L., Schlesinger, J.J., and Weir, R.C. (1987). Location of a neutralization determinant in the E protein of yellow fever virus (17D vaccine strain). *Virology* 161, 474-478.

Lok, S.M., Ng, M.L., and Aaskov, J. (2001). Amino acid and phenotypic changes in dengue 2 virus associated with escape from neutralisation by IgM antibody. *J Med Virol* 65, 315-323.

- Lorenz, I.C., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Allison, S.L., Heinz, F.X., and Helenius, A. (2003). Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *J Virol* 77, 4370-4382.
- Matsui, K., Gromowski, G.D., Li, L., Schuh, A.J., Lee, J.C., and Barrett, A.D. (2009). Characterization of dengue complex-reactive epitopes on dengue 3 virus envelope protein domain III. *Virology* 384, 16-20.
- Mazumder, R., Hu, Z.Z., Vinayaka, C.R., Sagripanti, J.L., Frost, S.D., Kosakovsky Pond, S.L., and Wu, C.H. (2007). Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. *Virus Genes* 35, 175-186.
- Men, R.H., Bray, M., and Lai, C.J. (1991). Carboxy-terminally truncated dengue virus envelope glycoproteins expressed on the cell surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice. *J Virol* 65, 1400-1407.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6986-6991.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313-319.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., and Harrison, S.C. (2005). Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *J Virol* 79, 1223-1231.
- Mota, J., Acosta, M., Argotte, R., Figueroa, R., Mendez, A., and Ramos, C. (2005). Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. *Vaccine* 23, 3469-3476.
- Mukhopadhyay, S., Kim, B.S., Chipman, P.R., Rossmann, M.G., and Kuhn, R.J. (2003). Structure of West Nile virus. *Science* 302, 248.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., and Rossmann, M.G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3, 13-22.
- Nobuchi, H. (1979). The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia. *Kanpo Rinsho* 26, 422-425. (in Japanese.)
- Nowak, T., Farber, P.M., and Wengler, G. (1989). Analyses of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* 169, 365-376.

Nowak, T., and Wengler, G. (1987). Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. *Virology* 156, 127-137.

Oliphant, T., Engle, M., Nybakken, G.E., Doane, C., Johnson, S., Huang, L., Gorlatov, S., Mehlhop, E., Marri, A., Chung, K.M., *et al.* (2005). Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat Med* 11, 522-530.

Oliphant, T., Nybakken, G.E., Austin, S.K., Xu, Q., Bramson, J., Loeb, M., Throsby, M., Fremont, D.H., Pierson, T.C., and Diamond, M.S. (2007). Induction of epitope-specific neutralizing antibodies against West Nile virus. *J Virol* 81, 11828-11839.

Oliphant, T., Nybakken, G.E., Engle, M., Xu, Q., Nelson, C.A., Sukupolvi-Petty, S., Marri, A., Lachmi, B.E., Olshevsky, U., Fremont, D.H., *et al.* (2006). Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile Virus envelope protein. *J Virol* 80, 12149-12159.

Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C., and Harrison, S.C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291-298.

Roehrig, J.T. (2003). Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res* 59, 141-175.

Roehrig, J.T., Bolin, R.A., and Kelly, R.G. (1998). Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology* 246, 317-328.

Roehrig, J.T., Staudinger, L.A., Hunt, A.R., Mathews, J.H., and Blair, C.D. (2001). Antibody prophylaxis and therapy for flavivirus encephalitis infections. *Ann N Y Acad Sci* 951, 286-297.

Rosen, L. (1977). The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 26, 337-343.

Rush, A. B. (1789). An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780. Medical enquiries and observations, p. 104-117. Prichard and Hall, Philadelphia, Pa.

Sabin, A.B., and Schlesinger, R.W. (1945). Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. *Science* 101, 640-642.

Sanchez, M.D., Pierson, T.C., McAllister, D., Hanna, S.L., Puffer, B.A., Valentine, L.E., Murtadha, M.M., Hoxie, J.A., and Doms, R.W. (2005). Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology* 336, 70-82.



Schalich, J., Allison, S.L., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C., and Heinz, F.X. (1996). Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *J Virol* 70, 4549-4557.

Schwab, C., and Bosshard, H.R. (1992). Caveats for the use of surface-adsorbed protein antigen to test the specificity of antibodies. *J Immunol Methods* 147, 125-134.

Siler, J. F., Hall, M. W., and Hitchens, A. P. (1926). Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. *Philippine. J. Sci* 29, 1-304.

Simmons, J. S., St John, H. F., and Reynolds, H. K. (1931). Experimental studies of dengue. *Philippine. J. Sci* 44, 1-251.

Smith, T. J., Brandt, W. E., Swanson, J. L., McCown, J. M., and Buescher, E. L. (1970). Physical and biological properties of dengue-2 virus and associated antigens. *J. Virol.* 5, 524-532

Stiasny, K., Kiermayr, S., Holzmann, H., and Heinz, F.X. (2006). Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. *J Virol* 80, 9557-9568.

Sukupolvi-Petty, S., Austin, S.K., Purtha, W.E., Oliphant, T., Nybakken, G.E., Schlesinger, J.J., Roehrig, J.T., Gromowski, G.D., Barrett, A.D., Fremont, D.H., *et al.* (2007). Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J Virol* 81, 12816-12826.

Thali, M., Furman, C., Ho, D.D., Robinson, J., Tilley, S., Pinter, A., and Sodroski, J. (1992). Discontinuous, conserved neutralization epitopes overlapping the CD4-binding region of human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein. *J Virol* 66, 5635-5641.

Throsby, M., Geuijen, C., Goudsmit, J., Bakker, A.Q., Korimbocus, J., Kramer, R.A., Clijsters-van der Horst, M., de Jong, M., Jongeneelen, M., Thijsse, S., *et al.* (2006). Isolation and characterization of human monoclonal antibodies from individuals infected with West Nile Virus. *J Virol* 80, 6982-6992.

Vogt, M.R., Moesker, B., Goudsmit, J., Jongeneelen, M., Austin, S.K., Oliphant, T., Nelson, S., Pierson, T.C., Wilschut, J., Throsby, M., *et al.* (2009). Human monoclonal antibodies against West Nile virus induced by natural infection neutralize at a postattachment step. *J Virol* 83, 6494-6507.

Volk, D.E., Beasley, D.W., Kallick, D.A., Holbrook, M.R., Barrett, A.D., and Gorenstein, D.G. (2004). Solution structure and antibody binding studies of the envelope protein domain III from the New York strain of West Nile virus. *J Biol Chem* 279, 38755-38761.

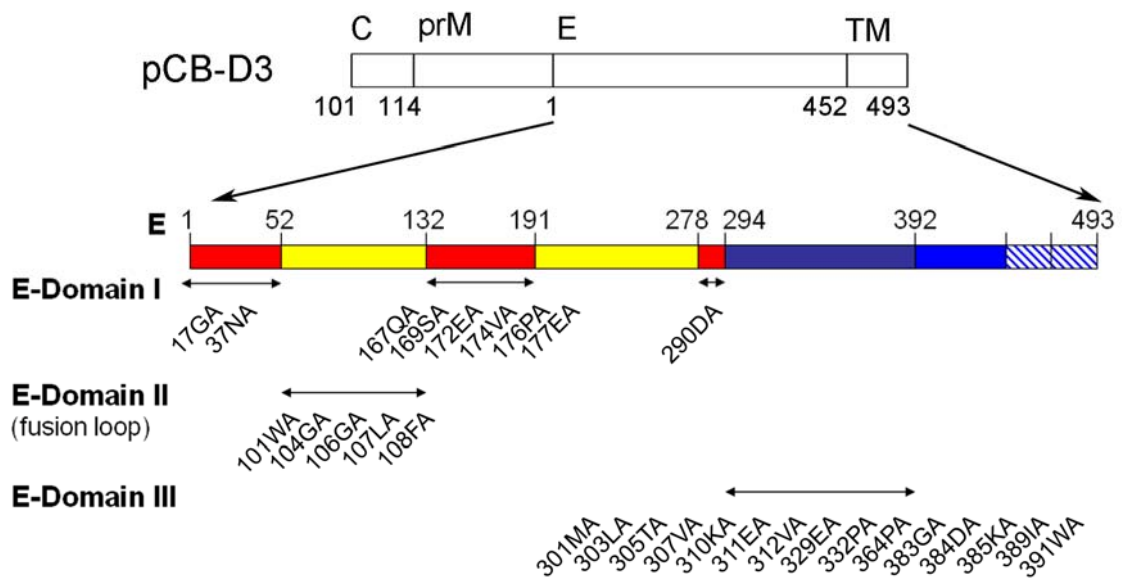
Wengler, G., and Gross, H.J. (1978). Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. *Virology* 89, 423-437.

Yu, S., Wu, A., Basu, R., Holbrook, M.R., Barrett, A.D., and Lee, J.C. (2004). Solution structure and structural dynamics of envelope protein domain III of mosquito- and tick-borne flaviviruses. *Biochemistry* 43, 9168-9176.



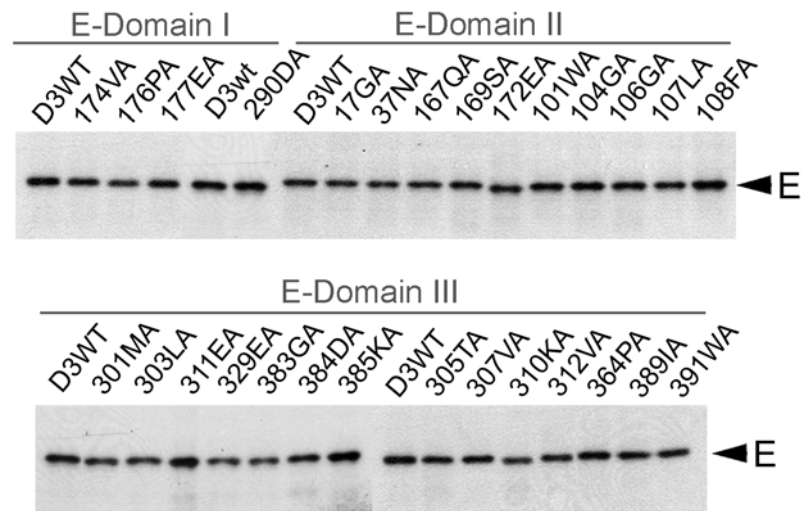
表一、構築質體所使用的引子序列

primer	Sequence 5'→3'
D3E17GA	GGAAGGTCTGTCAGCAGCTACGTGGGTTG
D3E37NA	GACCACCATGGCTAAGGCCAAGCCTACGCTGGAC
D3E101WA	CACACATACGTGGATAGAGGTGCGGGAAACGGTTGTG
D3E104GA	GAGGTTGGGGAAACGCTTGTGGCTTGTGTTGG
D3E106GA	TTGGGGAAACGGTTGTGCCTTGTGTTGAAAAGGAA
D3E107LA	TTGGGGAAACGGTTGTGGCGGTTTGGAAAAGGAAGCTTG
D3E108FA	GGGAAACGGTTGTGGCTTGGCTGGAAAAGGAAGCTTGGT
D3E167QA	CGGTTGAGATAACGCCCGCGCATCAACCGTTGAAG
D3E169SA	ATAACGCCCCAGGCAGCAACCGTTGAAGCTG
D3E172EA	GGCATCAACCGTTGCAGCTGTCCTGCCTG
D3E174VA	CAACCGTTGAAGCTGCCCTGCCTGAGTATGG
D3E176PA	GTTGAAGCTGTCCTGGCTGAGTATGGAACCC
D3E177EA	AAGCTGTCCTGCCTGCGTATGGAACCCTTGG
D3E290DA	GAAATGTAGACTTAAGATGGCCAAATTGGAACCTCAAGGGGA
D3E301MA	CAAGGGGATGAGCTATGCAGCGTGCTTGAATACCTTTGTG
D3E303LA	GGGATGAGCTATGCAATGTGCGCGAATACCTTTGTGTTGAAGAA
D3E305TA	GGGATGAGCTATGCAATGTGCTTGAATGCCTTTGTGTTGAAG
D3E307VA	ATGTGCTTGAATACCTTTGCGTTGAAGAAGGAAGTCTCC
D3E310KA	GAATACCTTTGTGTTGAAGGCGGAAGTCTCCGAAACGCAG
D3E311EA	CTTTGTGTTGAAGAAGGCAGTCTCCGAAACGCAGC
D3E312VA	TGTGTTGAAGAAGGAAGCCTCCGAAACGCAGCATG
D3E329EA	GTTGAGTACAAAGGGGCAGATGCACCTTGCAAGA
D3E332PA	ACAAAGGGGAAGATGCAGCTTGCAAGATTCTTTC
D3E364PA	GACCAAGAAGGAGGAGGCTGTCAACATTGAGGC
D3E383GA	AGCAACATAGTGATTGGAATTGCAGACAAAGCCTTGAAAATTAAC
D3E384DA	AACATAGTGATTGGAATTGGAGCCAAAGCCTTGAAAATTAAGTGG
D3E385KA	CAACATAGTGATTGGAATTGGAGACGCAGCCTTGAAAATTAAGTGG TACAAG
D3E389IA	GAATTGGAGACAAAGCCTTGAAAGCTAACTGGTACAAGAAGGG
D3E391WA	GGAGACAAAGCCTTGAAAATTAACGCGTACAAGAAGGGAAGCT
D3E101A106GA108FA	TGCGGGAAACGGTTGTGCCTTGGCTGGAAAAGGAAGCTTGG

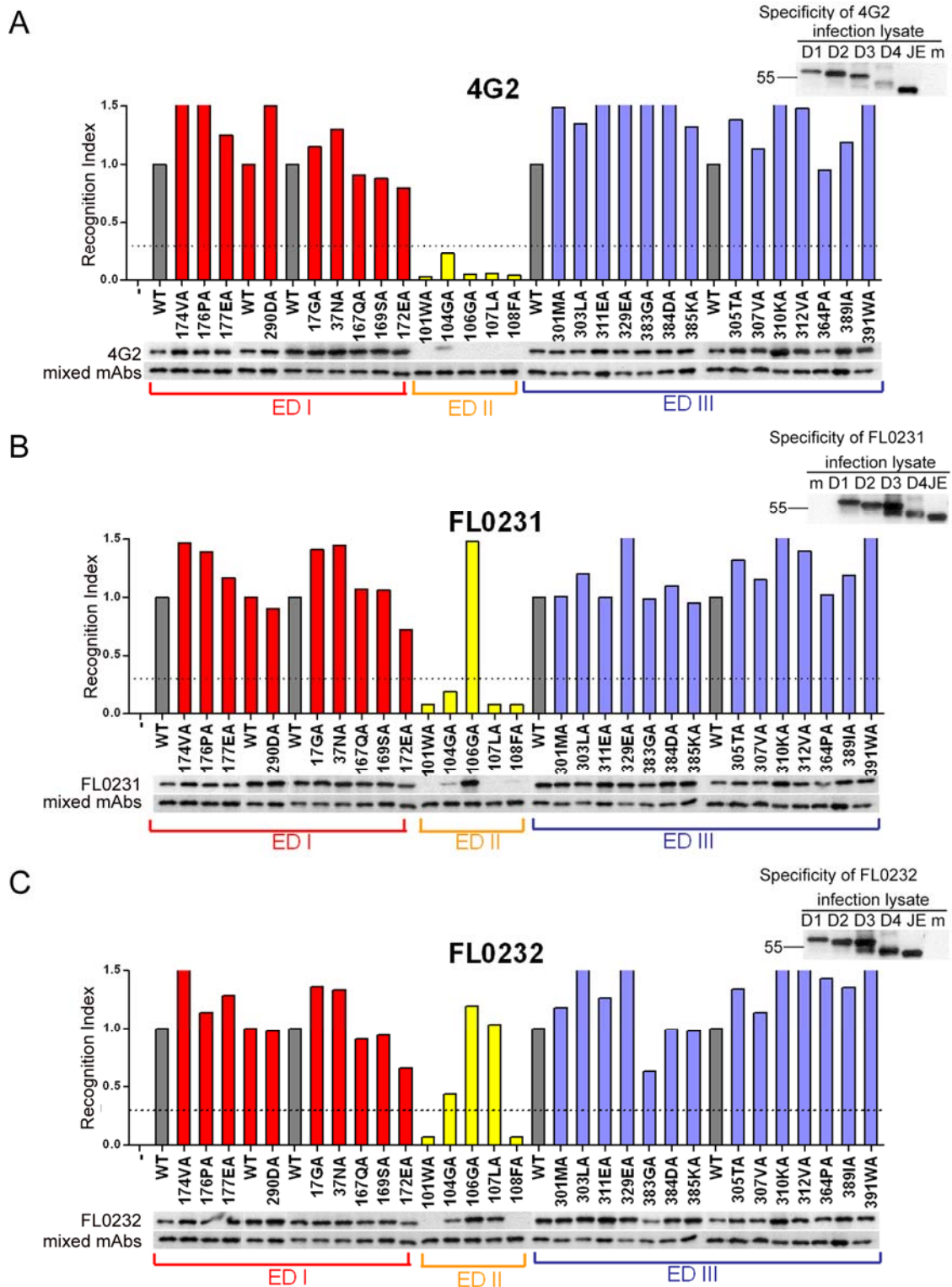


圖一、表現 DENV3 PrM/E 蛋白質之質體及 E 蛋白質 alanine 單點置換突變之質體。

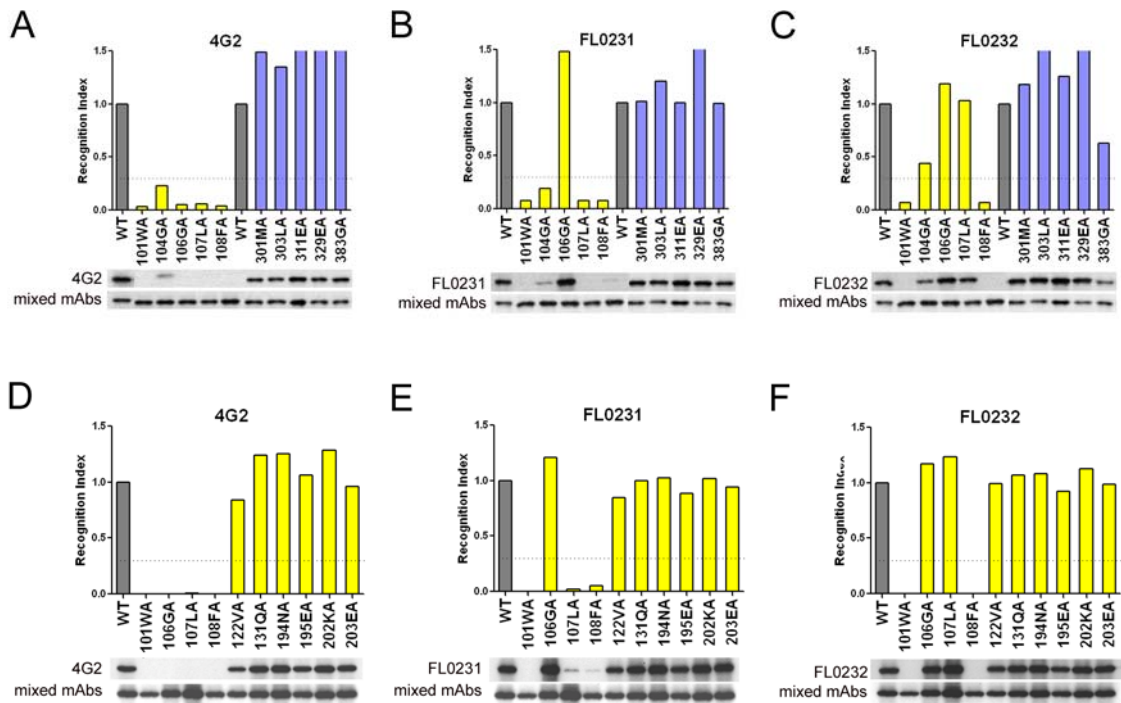




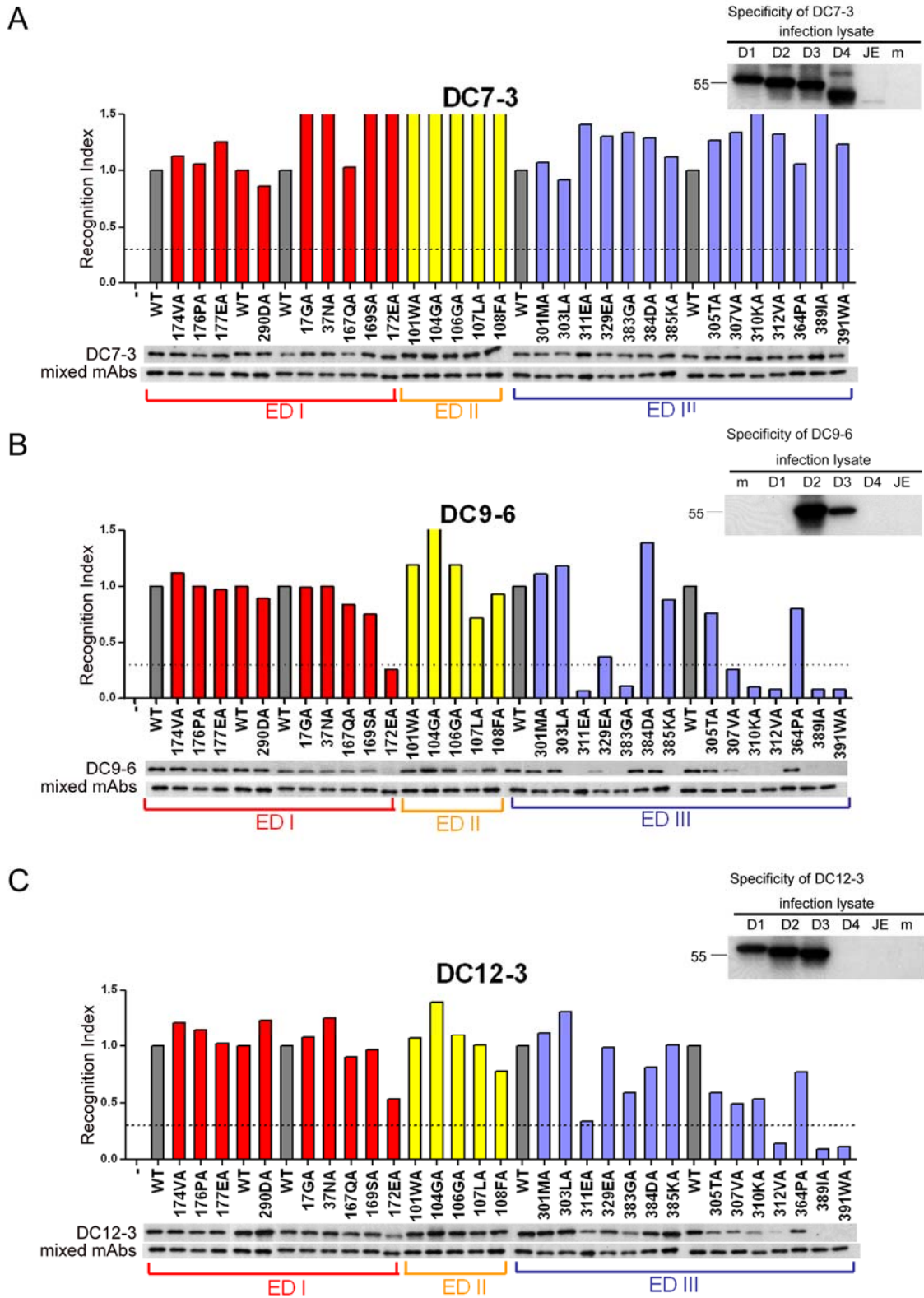
圖二、表現單點突變之 DENV3 E 蛋白質。轉染 DENV3 之 E 蛋白質 alanine 單點突變質體至 293T 細胞，48 小時後收集 cell lysates，以 mixed mAbs (包含 flavivirus group-reactive、DENV complex-reactive 及 DENV3 type-specific 三種單株抗體的混合物)為一級抗體，進行西方墨點分析法，調整 cell lysates 濃度，利用影像分析軟體 UVP 定量 E band intensity，確認各個 E mutant /wt E 值約為 1.0。



圖三、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對於 flavivirus group-reactive 單株抗體結合能力的影響。(A) 4G2；(B) FL0231；(C) FL0232。利用上述方法調整好的 cell lysates 濃度，以不同老鼠單株抗體為一級抗體，進行西方墨點法分析。Recognition Index 計算方式如下： $[ \text{Intensity of mutant E/ wt E} ]_{\text{mAb}} / [ \text{Intensity of mutant E/ wt E} ]_{\text{mixed mAbs}}$ 。

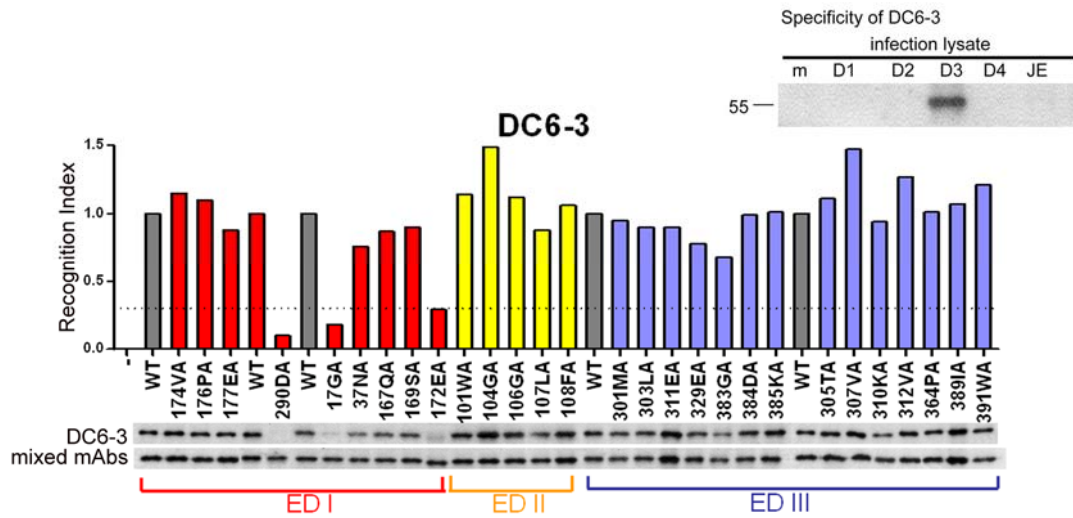


圖四、E 蛋白質 fusion loop 區域之單點突變對於 flavivirus group-reactive 單株抗體結合能力的影響。比較各單株抗體對 DENV3 ( A、B、C ) 及 DENV1 ( D、E、F ) 的 fusion loop 胺基酸單點突變結合能力之異同。



圖五、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對於 complex/ subcomplex-reactive 單株抗體結合能力的影響。(A) DC7-3；(B) DC9-6；(C) DC12-3。





圖六、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對 DENV3 type-specific 單株抗體 DC6-3 結合能力的影響。

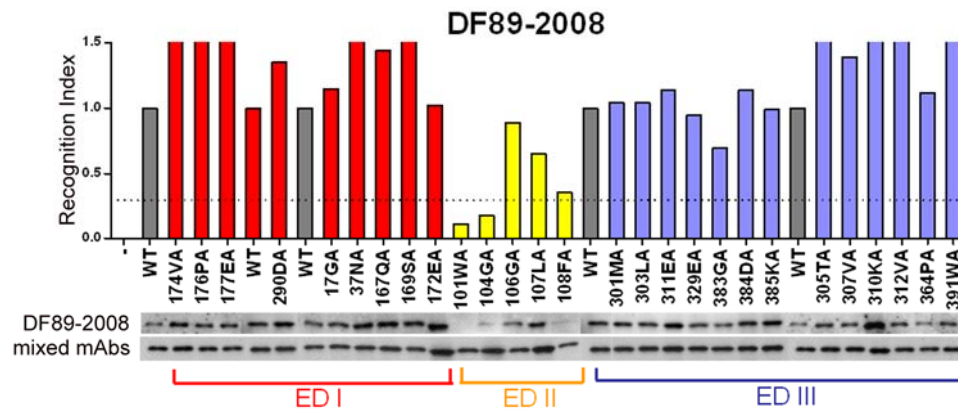
Classification	MAb	DENV3	DENV1 (from H.E. Lin)
<b>Group-reactive</b>	•FL0231	•101W,107L,108F, (104G)	•101W,107L,108F
	•FL0232	•101W,108F	•101W,108F
	•4G2	•101W,106G,107L,108F, (104G)	•101W,106G,107L, 108F
<b>Complex-reactive/ Subcomplex-reactive</b>	•DC7-3 <sub>1234</sub>	•Not identified	•Not identified
	•DC9-6 <sub>23</sub>	•172E, 307V, 310K, 311E, 312V, 329E, 383G, 389I, 391W	• NA
	•DC12-3 <sub>123</sub>	•312V, 389I, 391W	•310K, 311E, 389L, 391W
<b>Type-specific</b>	•DC6-3	•17G, 172E, 290D	• NA

圖七、不同種類之老鼠單株抗體對於 DENV3 E 蛋白質及 DENV1 E 蛋白質上的抗體辨識部位之比較。

collection Time patient group	2008
primary infection	DF89 (2 years) *
secondary infection (9 cases)	DF70 (2 years) DF71 (2 years) DF87 (2 years) DF90 (2 years) DF92 (2 years) DF95 (2 years) DF98 (6 years) DF102 (6 years) DF104 (2 years)

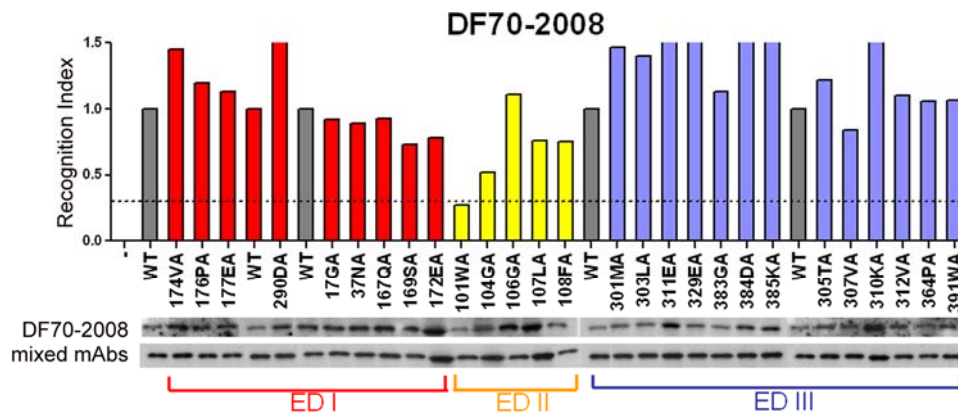
\* DF 發病日與採血日之間隔。

圖八、感染 DENV3 之 DF 病人血清，包括初次感染以及二次感染之病人。

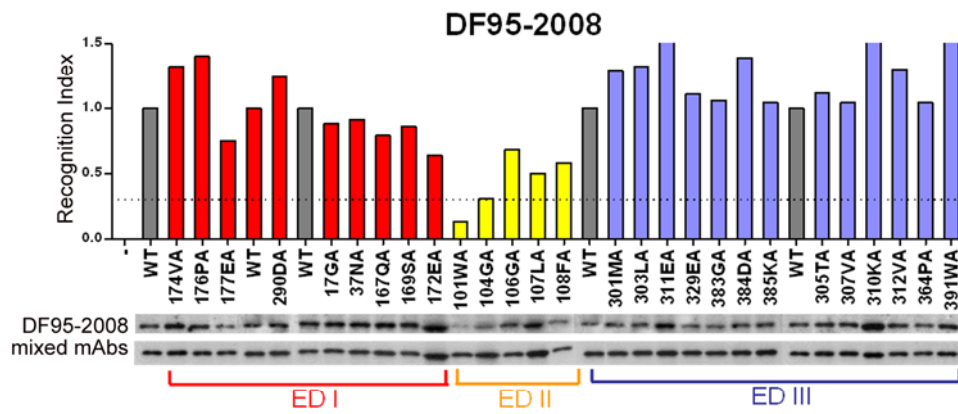


圖九、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對 DENV3 初次感染之 DF 病人 (DF89-2008) 血清中抗 E 抗體結合能力的影響。

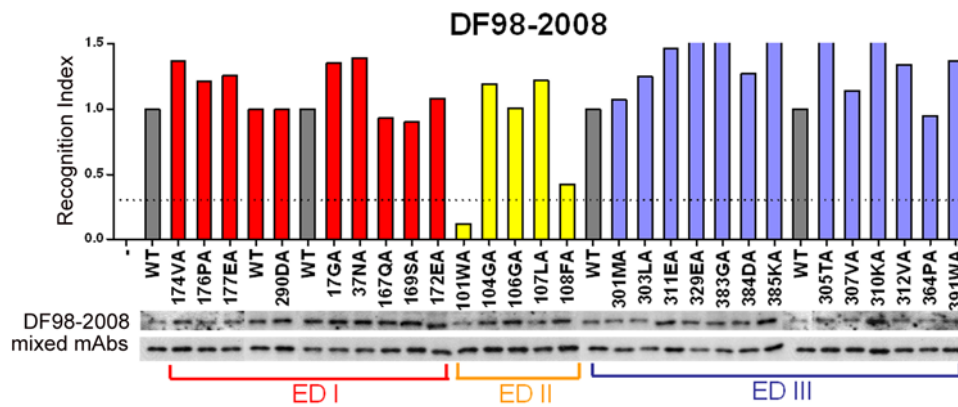
A



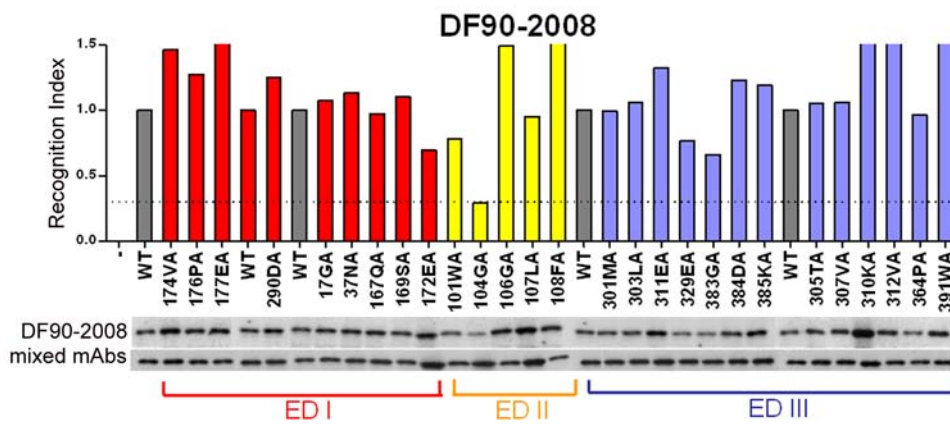
B



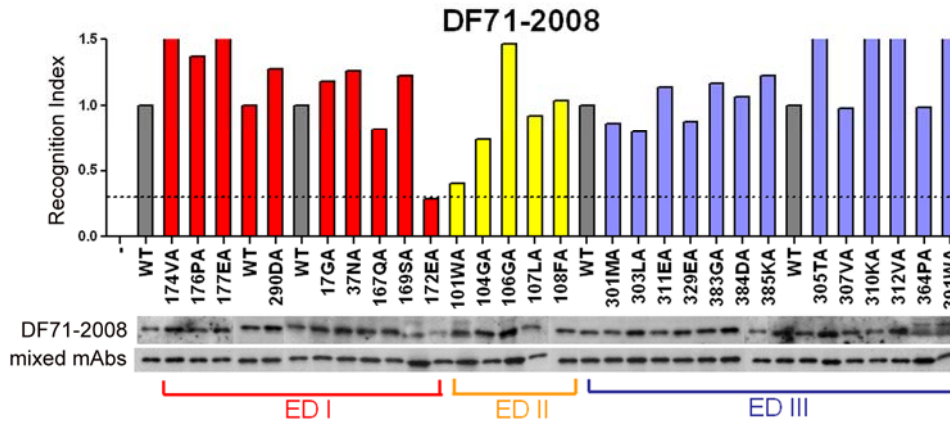
C



D

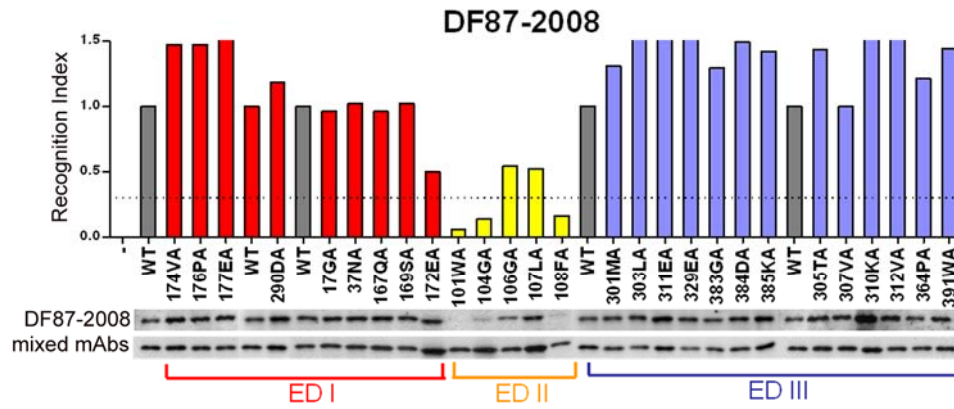


E

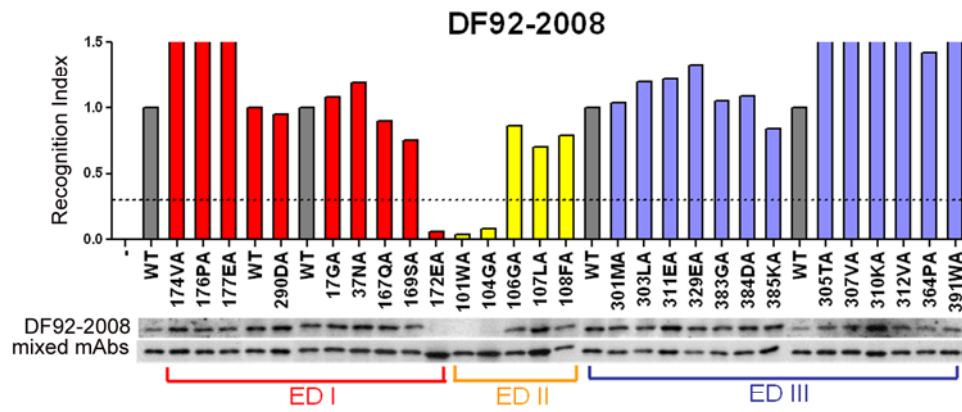


圖十、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對二次感染 DENV3 之 DF 病人血清中抗 E 抗體結合能力的影響。(A) DF70-2008；(B) DF95-2008；(C) DF98-2008；(D) DF90-2008；(E) DF71-2008。

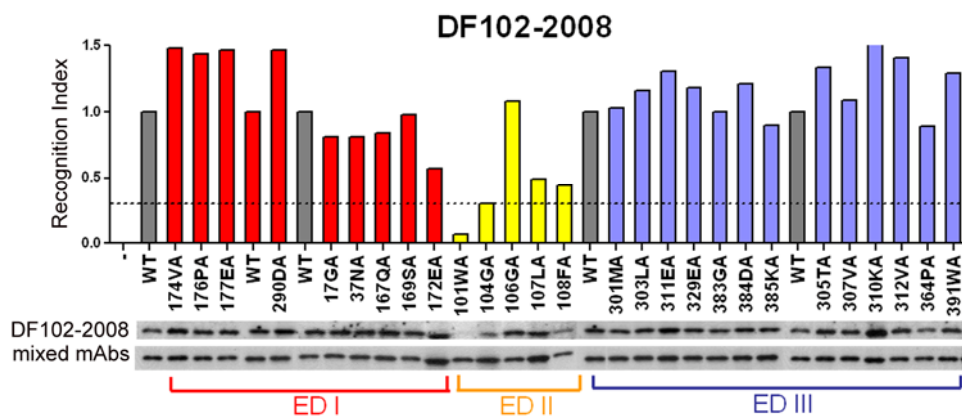
A



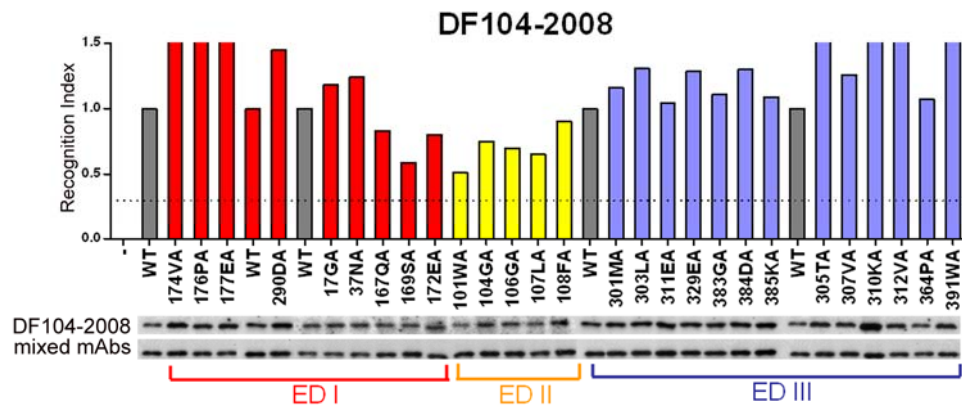
B



C



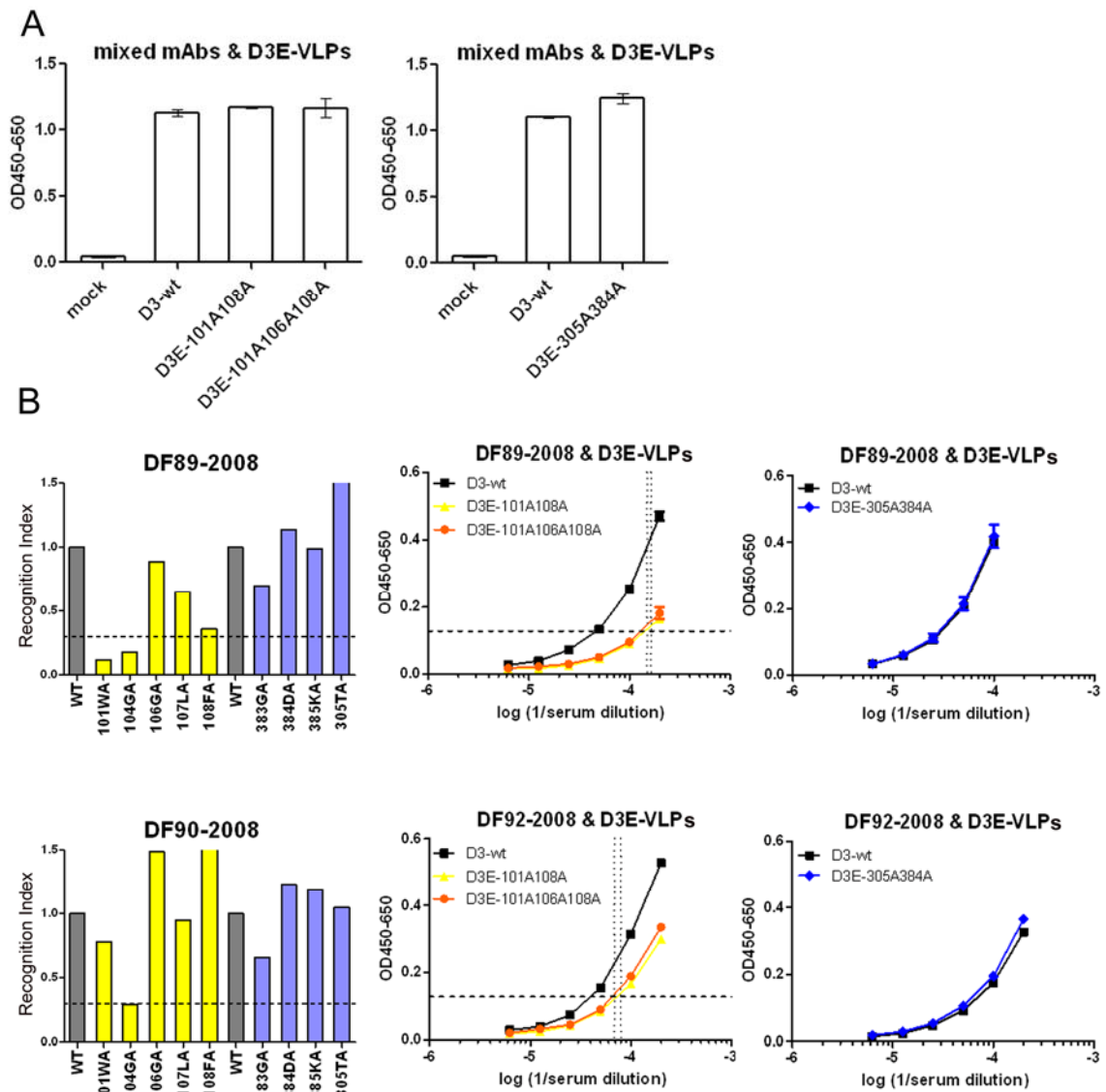
D



圖十一、alanine 單點突變之 DENV3 E 蛋白質對二次感染 DENV3 之 DF 病人血清中抗 E 抗體結合能力的影響。(A) DF87-2008；(B) DF92-2008；(C) DF102-2008；(D) DF104-2008。



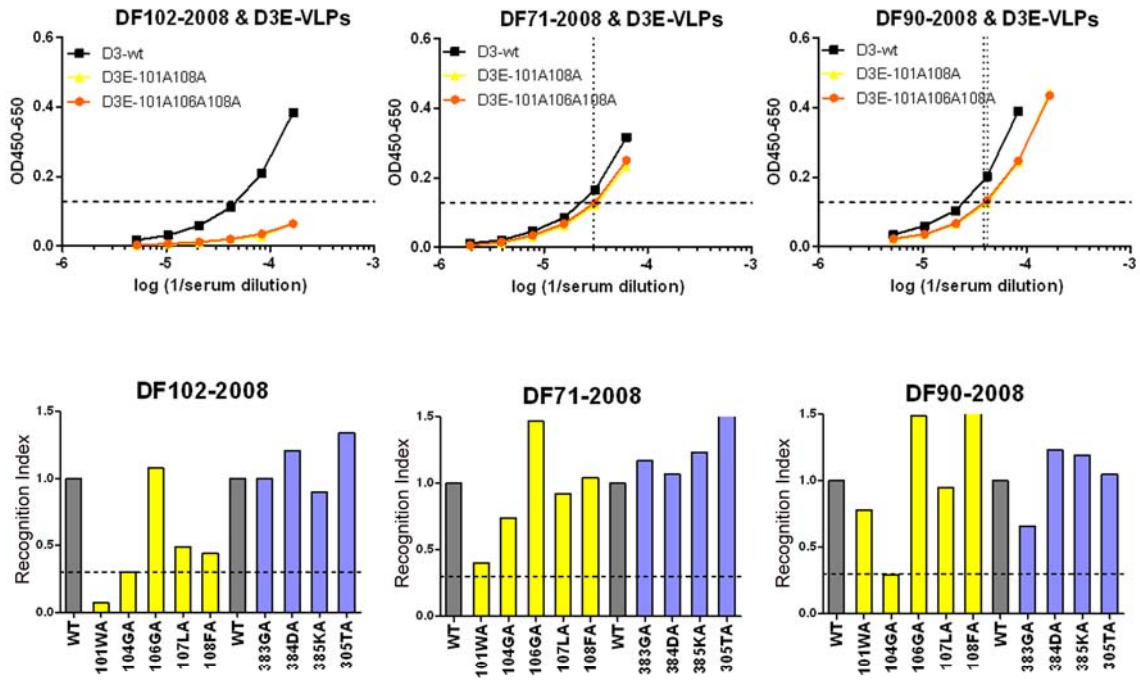




**圖十二、alanine fusion loop 及 domain III 多點突變之 VLPs 對 DF 病人血清中抗 E 抗體結合能力的影響。**轉染 DENV3 之 E 蛋白質 alanine fusion loop 及 domain III 多點突變質體至 293T 細胞，48 小時後收集上清液以超高速離心分離出 VLPs，進行 capture ELISA。(A) 以 mixed mAbs 為一級抗體，利用 capture ELISA 進行定量，調整各個 VLPs 濃度使 OD450-650 讀值約為 1.0，之後以 DF 病人血清為一級抗體，進行 capture ELISA 分析；(B) fusion loop 區域多點突變(中間)與 domain III 多點突變之 E 蛋白質(右)對於 DF 病人血清中抗 E 抗體結合能力的影響，其分析結果與西方墨點分析法之結果(左)有相同趨勢；(C) DF 病人血清中辨識 E 蛋白質之 101W、106G 和 108F 之抗體比例； $\text{proportion (\%)} = (1 - [\text{mutant VLPs endpoint titer} / \text{wt VLPs endpoint titer}]) * 100\%$ 。



A



B

VLPs	Endpoint Titer	Proportion (%)	Endpoint Titer	Proportion (%)	Endpoint Titer	Proportion (%)
	DF102-2008		DF71-2008		DF90-2008	
D3-WT	19421	100	42184	100	34970	100
D3E-101A108A	<6000	>69	33207	21	23778	32
D3E-101A106A108A	<6000	>69	32807	22	25810	26

圖十三、alanine fusion loop 多點突變之 VLPs 對 DF 病人血清中抗 E 抗體結合能力的影響。(A) fusion loop 區域多點突變之 E 蛋白質對於其他 DF 病人血清中抗 E 抗體結合能力的影響；(B) DF 病人血清中辨識 E 蛋白質之 101W、106G 和 108F 之抗體比例，proportion (%) = (1-[mutant VLPs endpoint titer/wt VLPs endpoint titer])\*100%。