Thesis Title Molecular Mechanisms of Interferon Resistance Mediated by NS5A and Core Genes of Hepatitis C Viruses and the Effects of NS5A Protein on the Regulation of Interferon Signaling Pathway

Author Miss Kattareeya Kumthip

Degree Doctor of Philosophy (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Prof. Dr. Niwat Maneekarn Advisor
Assoc. Prof. Satawat Thongsawat, M.D. Co-advisor
Dr. Amornrat O'Brien Co-advisor

ABSTRACT

Response or non-response of hepatitis C virus (HCV) infection to interferon-alpha (IFN-α) based therapy has been documented to be associated with both host and viral factors, including the genotypes of HCV. Mutations in several genomic regions of HCV have been implicated in influencing the response to IFN treatment. The present study investigated the correlation between amino acid (aa) mutations in the core and non-structural protein 5A (NS5A) regions of HCV genotypes 1a, 1b, 3a, 3b, and 6f and clinical outcome in HCV-infected patients who were treated with pegylated IFN-α (Peg-IFN-α) and ribavirin (RBV). The full-length core and NS5A genes of HCV were amplified from patient's sera by using nested reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and then the PCR products were sequenced by direct DNA sequencing method. The nucleotide sequences were translated into aa sequences and were compared with the corresponding reference sequences of each genotype. Analysis of the core protein in pretreatment sera revealed a highly conserved sequences among HCV genotypes (1a, 1b, 3a, and 3b) and no significant difference between the sequences of the viruses from responders,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

non-responders, and relapsers, with the exception of HCV-6f where the mean number of mutations in the core was significantly higher in the viruses obtained from responders compared to treatment failure group (non-responders and relapsers) with *P*-value of 0.023. Analysis of NS5A revealed that the number of aa mutations in full-length NS5A, C-terminus, IFN-α sensitivity determining region (ISDR), variable region 3 (V3), and V3 plus flanking region of HCV-1b and RNA-activated protein kinase binding domain (PKRBD) of HCV-6f were significantly higher in responders than in the treatment failure group (*P*=0.010, 0.031, 0.046, 0.020, 0.006, and 0.022, respectively). Moreover, specific aa substitutions in NS5A appeared to be significantly associated with the treatment failure group were observed at positions 78 and 305 for HCV-1b (*P*=0.028), 64 for HCV-1a (*P*=0.033), and 52 for HCV-6f (*P*=0.045). All together, the data imply that aa mutations in NS5A protein correlate with the response to Peg-IFN-α and RBV treatment and these mutations might be a predictive value for the clinical outcome. Analysis of aa variations before and after Peg-IFN-α and RBV treatment in the core and NS5A proteins of HCV isolated from non-responders and relapsers revealed that aa sequences in the core, ISDR, PKRBD, and V3 of NS5A before treatment were highly conserved and very similar to those of the viruses after treatment. However, when comparing the sequences of the viruses from relapsers to those from non-responders, it was found that the number of mutations in full-length NS5A, particularly at N-terminus from relapsers were significantly greater than those from non-responders, *P*=0.046 and 0.017, respectively.

Study of effects of NS5A proteins on IFN-α induced Jak-STAT signaling pathway was done by using both NS5A expressing plasmids and NS5A recombinant viruses. In order to express NS5A protein in cell cultures, a mammalian expression vector, pCAGGS-V5/His, was generated and used to construct a recombinant plasmid encoding the HCV NS5A of genotypes 1a, 1b, 3a, and 3b. Expression of NS5A was performed by transfecting the recombinant plasmid DNAs into Huh7.5.1 cells and the viral protein products were detected by Western blot analysis using both anti-V5 and anti-NS5A monoclonal antibodies. The effects of NS5A protein on the IFN signaling were investigated in the presence of IFN-α treatment. Whole cell lysates were harvested to measure relative luciferase activity and to perform Western blot analysis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and immunoprecipitation (IP) assay, and mRNAs were collected for performing real time PCR in order to examine expression levels of interferon-stimulated genes (ISGs). The results showed that the expressed NS5A proteins of HCV genotypes 1a, 1b, 3a, and 3b significantly inhibited IFN-induced ISRE promoter activity, STAT1 phosphorylation (P-STAT1) levels, and ISG expression. In addition, NS5A proteins of genotypes 1a and 1b had stronger inhibitory effects against IFN than those of genotypes 3a and 3b. IP assay demonstrated that NS5A proteins of genotype 1 exhibited stronger binding to STAT1 than those of genotype 3. Domain mapping study revealed, for the first time, that the C-terminal NS5A conferred these inhibitory effects on IFN signaling through binding to STAT1 protein. Further experiments were performed using NS5A/JFH1 recombinant virus replication model in which complete NS5A in J6/JFH1 virus was replaced with NS5A of genotype 1a or 3a to generate infectious recombinant viruses H77 (1a NS5A-J6/JFH1) and S52 (3a NS5A-J6/JFH1), respectively. Huh7.5.1 cells were infected with recombinant viruses and the inhibitory effects of NS5A on IFN signaling were examined. The results demonstrated that H77 recombinant virus conferred more resistance to IFN treatment than S52 through stronger reduction of IFN-induced ISRE signaling, P-STAT1 levels, and ISG expression. These findings lead us to propose a model in which HCV mediates its antagonistic effects on IFN treatment through C-terminal NS5A binding to STAT1 which results in the reduction of ISRE promoter activity, P-STAT1, and ISG expression, and therefore, leads to inhibition of IFN activity.

In conclusion, this study provides a clue for better understanding of the role of aa mutations in the core and NS5A proteins of HCV genotypes 1a, 1b, 3a, 3b, and 6f in responding or non-responding to Peg-IFN-α and RBV therapy and provides a new insights into the mechanisms by which NS5A protein from different genotypes influence IFN signaling. These observations may account for genotype-related differences in the response of HCV to IFN and RBV treatment.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	กลไกระดับโมเลกุลในการดื้อต่ออินเตอร์เฟียรอนที่เป็นผลจากยีน NS5A และ ยีนคอร์ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและผล ของโปรตีน NS5A ต่อการควบคุมวิถีส่งสัญญาณอินเตอร์ เฟียรอน
ผู้เขียน	นางสาวแคทรียา คำทิพย์
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. นิวัตน์ มณีกาญจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รศ. นพ. ศตวรรษ ทองสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อ. ดร. อมรรัตน์ โอไบรอัน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การตอบสนองหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยอินเตอร์เฟียรอน (IFN) ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งจากตัวผู้ป่วยเองและจากเชื้อไวรัสซึ่งรวมไปถึงจีโนไทป์ของเชื้อไวรัสด้วย การกลายพันธุ์ภายในยีโนมของเชื้อไวรัสก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตอบสนองต่อการรักษาด้วย IFN การศึกษานี้ได้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ภายในยีน core และ NS5A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจีโนไทป์ต่างๆ ได้แก่ 1a, 1b, 3a, 3b และ 6f กับผลการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีด้วย pegylated interferon-alpha (Peg-IFN-α) ร่วมกับยาไรบาไวริน (RBV) โดยทำการเพิ่มปริมาณยีน core และ NS5A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีที่อยู่ในซีรั่มของผู้ป่วยโดยวิธี nested RT-PCR และทำการถอดรหัสพันธุกรรมของยีนโดยวิธี direct DNA sequencing แล้วนำรหัสพันธุกรรมที่ได้ไปแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้ออ้างอิงที่อยู่ในจีโนไทป์เดียวกัน จากการวิเคราะห์พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน core ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยก่อนทำการรักษาด้วยยามีความคงตัวสูงมากและค่อนข้างเหมือนกันในหลายๆ จีโนไทป์ ได้แก่ 1a, 1b, 3a และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3b และไม่พบความแตกต่างของไวรัสในผู้ป่วยที่ตอบสนอง (responders) ผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนอง (non-responders) และผู้ป่วยที่มีการกลับเป็นซ้ำ (relapsers) ยกเว้นในจีโนไทป์ 6f ที่พบว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนของไวรัสในผู้ป่วย responders มีจำนวนมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสในผู้ป่วยกลุ่มที่ล้มเหลวในการรักษา (treatment failure) ซึ่งได้แก่ผู้ป่วยกลุ่ม non-responders และ relapsers อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.023) จากการวิเคราะห์โปรตีน NS5A พบว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในหลายๆบริเวณ ได้แก่ full-length, C-terminus, ISDR, V3, and V3 plus flanking region ของไวรัสตับอักเสบซีจีโนไทป์ 1b และ PKRBD ของจีโนไทป์ 6f ในผู้ป่วย responders มีจำนวนสูงกว่าในผู้ป่วยกลุ่ม treatment failure อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.010, 0.031, 0.046, 0.020, 0.006, และ 0.022 ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งจำเพาะในโปรตีน NS5A ได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 78 และ 305 ของจีโนไทป์ 1b กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 64 ของจีโนไทป์ 1a และ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 52 ของจีโนไทป์ 6f ของไวรัสตับอักเสบซีในผู้ป่วยกลุ่ม treatment failure มีความสัมพันธ์กับผลการรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.028, 0.028, 0.033, และ 0.045 ตามลำดับ) โดยสรุปข้อมูลแสดงให้เห็นว่า การเกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนของโปรตีน NS5A มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วย Peg-IFN-α และยา RBV และอาจจะใช้เป็นค่าที่ใช้ในการทำนายผลการตอบสนองการรักษาล่วงหน้าได้ การศึกษาเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนทั้งก่อนและหลังการรักษาด้วย Peg-IFN-α และยา RBV ของไวรัสในผู้ป่วย non-responders และ relapsers พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน core และบริเวณ ISDR, PKRBD, V3 ของโปรตีน NS5A มีความคงตัวสูงมากและค่อนข้างเหมือนกันทั้งก่อนและหลังการรักษา อย่างไรก็ตามพบว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนของโปรตีน NS5A โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณปลาย N-terminus ในผู้ป่วย relapsers มีจำนวนมากกว่าในผู้ป่วย non-responders อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.046 และ 0.017 ตามลำดับ)

การศึกษานี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ผลของโปรตีน NS5A ต่อการส่งสัญญาณอินเตอร์เฟียรอนที่กระตุ้นผ่านทางวิถี Jak/STAT (IFN-α induced Jak/STAT signaling pathway) โดยศึกษาทั้งโปรตีนที่แสดงออกจากพลาสมิดและจากไวรัสลูกผสม เพื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีน NS5A ในเซลล์เพาะเลี้ยง จึงได้มีการสร้างพลาสมิดลูกผสมซึ่งกำหนดการสร้างโปรตีน NS5A ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจีโนไทป์ 1a, 1b, 3a และ 3b โดยอาศัย pCAGGS-V5/His ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่สามารถสร้างโปรตีนในเซลล์เพาะเลี้ยง Huh7.5.1 เมื่อได้พลาสมิดที่มียีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน NS5A แล้วจึงนำพลาสมิดนั้น transfect เข้าสู่เซลล์ Huh7.5.1 และตรวจสอบโปรตีนที่แสดงออกโดยวิธี Western blotting โดยใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แอนติบอดีที่จำเพาะในการตรวจหา จากนั้นจึงดูผลของโปรตีน NS5A ต่อ IFN signaling ในสภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นด้วย IFN-α โดยเก็บเอาโปรตีนภายในเซลล์มาวัดปริมาณโปรตีนที่จำเพาะที่เกิดจากการกระตุ้นของ IFN-α โดยวิธี relative luciferase activity, Western blotting และ immunoprecipitaion (IP) และเก็บ mRNA เพื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนที่ถูกกระตุ้นโดย IFN (ISGs) โดยใช้เทคนิค real time PCR ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของโปรตีน NS5A ของไวรัสตับอักเสบซีจีโนไทปย์ 1a, 1b, 3a และ 3b สามารถยับยั้งการทำงานของ IFN ที่ไปกระตุ้น ISRE promoter activity, STAT1 phosphorylation (P-STAT1) และการแสดงออกของ ISGs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าโปรตีน NS5A ของไวรัสจีโนไทปย์ 1 สามารถยับยั้ง IFN ได้ดีกว่าจีโนไทปย์ 3 จากการศึกษาโดยใช้เทคนิค IP พบว่าโปรตีน NS5A สามารถจับได้กับโปรตีน STAT1 โดยที่จีโนไทปย์ 1 จับกับ STAT1 ได้ดีกว่าจีโนไทปย์ 3 รายงานนี้นับเป็นรายงานแรกที่แสดงให้เห็นว่าบริเวณปลาย C-terminus ของโปรตีน NS5A เป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของ IFN โดยเป็นบริเวณที่ไปจับกับโปรตีน STAT1 นอกจากนี้การศึกษานี้ยังได้ศึกษาบทบาทของโปรตีน NS5A ที่แสดงออกจากเชื้อไวรัสโดยใช้ไวรัสลูกผสม H77 และ S52 ซึ่งไวรัสลูกผสมนี้มีต้นแบบเป็นไวรัสตับอักเสบซี J6/JFH1 ซึ่งโปรตีน NS5A ของไวรัสนี้ได้ถูกตัดต่อและแทนที่ด้วย NS5A ของจีโนไทปย์ 1a หรือ 3a เพื่อสร้างเป็นไวรัสลูกผสมที่มีการแสดงออกของโปรตีน NS5A ของจีโนไทปย์ 1a (H77; 1a NS5A-J6/JFH1) หรือ 3a (S52; 3a NS5A-J6/JFH1) ตามลำดับ จากนั้นไวรัสลูกผสมนี้ได้ถูกนำพาเข้าสู่เซลล์ Huh7.5.1 และดูผลต่อการยับยั้งการทำงานของ IFN ผลการศึกษาพบว่าไวรัส H77 มีความสามารถในการยับยั้ง IFN signaling ได้ดีกว่าไวรัส S52 โดยดูจากการลดลงของ ISRE promoter activity, P-STAT1 และการแสดงออกของ ISGs การศึกษานี้ได้เสนอโมเดลว่าเชื้อไวรัสตับอักเสบซียับยั้งการทำงานของ IFN โดยอาศัยการจับกันระหว่างปลาย C-terminus ของโปรตีน NS5A ของไวรัสกับ STAT1 ซึ่งส่งผลทำให้ไปลดระดับของ ISRE promoter activity, P-STAT1 และการแสดงออกของ ISGs ดังนั้นจึงส่งผลให้มีการยับยั้งการทำงานของ IFN ในที่สุด

สรุปสุดท้าย การศึกษาในครั้งนี้ทำให้เข้าใจบทบาทของการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนของโปรตีน core และ NS5A ของไวรัสตับอักเสบซีจีโนไทปย์ 1a, 1b, 3a, 3b และ 6f ในการตอบสนองหรือไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วย Peg-IFN-α และยา RBV และยังให้ข้อมูลใหม่ทำให้เข้าใจถึงกลไกในการยับยั้ง IFN ของโปรตีน NS5A ของไวรัสจีโนไทปย์ต่างๆและอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยให้ไวรัสมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วย IFN และ RBV ที่แตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องภาษาไทย กลไกระดับโมเลกุลในการดื้อต่ออินเตอร์เฟียรอนที่เป็นผลจากยีน NS5A และ ยีนคอร์ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและ ผลของโปรตีน NS5A ต่อการควบคุมวิถีส่งสัญญาณอินเตอร์ เฟียรอน

ชื่อเรื่องภาษาไทย กลไกระดับโมเลกุลในการดื้อต่ออินเตอร์เฟียรอนที่เป็นผลจากยีน NS5A และ ยีนคอร์ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและ ผลของโปรตีน NS5A ต่อการควบคุมวิถีส่งสัญญาณอินเตอร์ เฟียรอน

ชื่อเรื่องภาษาไทย กลไกระดับโมเลกุลในการดื้อต่ออินเตอร์เฟียรอนที่เป็นผลจากยีน NS5A และ ยีนคอร์ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและ ผลของโปรตีน NS5A ต่อการควบคุมวิถีส่งสัญญาณอินเตอร์ เฟียรอน

ชื่อเรื่องภาษาไทย กลไกระดับโมเลกุลในการดื้อต่ออินเตอร์เฟียรอนที่เป็นผลจากยีน NS5A และ ยีนคอร์ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและ ผลของโปรตีน NS5A ต่อการควบคุมวิถีส่งสัญญาณอินเตอร์ เฟียรอน

ชื่อเรื่องภาษาไทย กลไกระดับโมเลกุลในการดื้อต่ออินเตอร์เฟียรอนที่เป็นผลจากยีน NS5A และ ยีนคอร์ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและ ผลของโปรตีน NS5A ต่อการควบคุมวิถีส่งสัญญาณอินเตอร์ เฟียรอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องภาษาไทย กลไกระดับโมเลกุลในการดื้อต่ออินเตอร์เฟียรอนที่เป็นผลจากยีน NS5A และ ยีนคอร์ ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและ ผลของโปรตีน NS5A ต่อการควบคุมวิถีส่งสัญญา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved