

Thesis Title	Correlation Between Mutations in the E1/E2 and NS5B Genes of Hepatitis C Virus and Clinical Outcomes of Peginterferon Alfa and Ribavirin Combination Therapy	
Author	Miss Chansom Pantip	
Degree	Master of Science (Microbiology)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Niwat Maneekarn	Chairperson
	Assoc.Prof. Satawat Thongsawat, M.D.	Member

ABSTRACT

Mutations in several genomic regions of hepatitis C virus (HCV) have been implicated in influencing the response to interferon (IFN)-based therapy. The present study analysed the correlation between amino acid mutations in the E1/E2 and NS5B regions of HCV genotypes 1a, 1b, 3a, 3b, and 6f and clinical outcome in HCV-infected patients treated with pegylated interferon-alpha (PEG-IFN- α) and ribavirin. The full-length E1/E2 and NS5B genes of HCV in the pretreatment sera were amplified by using nested RT-PCR and then the PCR products were sequenced by direct sequencing method. The nucleotide sequences of each HCV genotype was translated into amino acid sequences and compared with the consensus sequence of corresponding genotype.

Analysis of E1/E2 revealed that the number of aa mutations in the E1/E2 of HCV genotype 1b was significantly lower in non-responders and relapsers than in responders ($P = 0.040$). However, this finding was not observed in genotypes 1a, 3a,

3b, and 6f. Furthermore, attention had been focused on specific regions in E2 protein, PePHD and HVR, which were reported to play a significant role in responding to IFN treatment. Analysis of PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain (PePHD) of E2 protein revealed that there was no correlation between aa substitutions in PePHD and response to IFN therapy. Additionally, analysis of hypervariable regions (HVR) of E2 was also revealed no relationship between mutations in HVR1 and HVR2 domains and clinical outcome. Nevertheless, the correlation of aa mutations and responsiveness to IFN treatment was observed in HVR3 of HCV genotype 3a. It was found that aa mutations in HVR3 of HCV genotype 3a in the responders were significantly higher than those of relapsers ($P = 0.043$). To our knowledge, this is the first report to demonstrating the relationship of mutations in HVR3 of HCV genotype 3a and the response to IFN treatment. Moreover, the putative CD81 binding regions of E2 protein was also being analysed and found that the number of aa mutations within the putative CD81 binding regions of E2 protein of HCV genotype 1b in responders were also significantly higher than those of non-responder and relapsers ($P = 0.044$). Altogether, the data implied that aa mutations in the E1/E2 proteins of HCV correlated with the response to PEG-IFN- α and ribavirin treatment.

Analysis of NS5B sequences of HCV genotypes 1a, 1b, 3a, and 3b revealed that aa changes in responders, non-responders and relapsers were not significantly different. However, analysis of the last 21 aa residues at the C-terminus of NS5B of HCV genotype 3a provided an interesting data that the viruses from relapsers showed no mutation in this region, while most of those from responders had 1-3 mutations ($P = 0.010$). The data indicated that mutations within the last 21 aa residues of the C-terminus of NS5B of HCV genotype 3a might be a predictor for the clinical outcome.

In conclusion, the present study provide a clue for better understanding of the role of aa mutations in the E1/E2 and NS5B proteins of HCV genotypes 1a, 1b, 3a, 3b, and 6f in responding or non-responding to IFN and ribavirin therapy.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ในยีน E1/E2 และ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี กับผลการรักษาด้วย Peginterferon Alfa ร่วมกับยา Ribavirin

ผู้เขียน นางสาวจันทร์สม ปันต๊ะ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศ. ดร. นิวัฒน์ มณีกาญจน์ ประธานกรรมการ
รศ. นพ. ศตวรรษ ทองสวัสดิ์ กรรมการ

บทคัดย่อ

การกลายพันธุ์ภายในยีนโนมของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี (HCV) เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตอบสนองต่อการรักษาด้วย Interferon (IFN) การศึกษานี้ได้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการกลายพันธุ์ภายในยีน E1/E2 และ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี genotype ต่างๆ ได้แก่ 1a, 1b, 3a, 3b และ 6f กับผลการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีด้วย pegylated interferon-alpha (PEG-IFN- α) ร่วมกับยา ribavirin โดยทำการเพิ่มปริมาณยีน E1/E2 และ NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซีที่แยกได้จากซีรัมของผู้ป่วย โดยวิธี nested RT-PCR และทำการถอดรหัสพันธุกรรมของยีน E1/E2 และ NS5B โดยวิธี direct sequencing แล้วนำรหัสพันธุกรรมนั้นไปแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ consensus sequence ของเชื้อใน genotype เดียวกัน

จากการวิเคราะห์พบว่า การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในโปรตีน E1/E2 ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี genotype 1b ในผู้ป่วย non-responders และ relapsers มีจำนวนต่ำกว่าในผู้ป่วย responders

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.040$) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างนี้ในเชื้อไวรัสตับอักเสบซี genotypes 1a, 3a, 3b และ 6f นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน E2 ในบริเวณที่เคยมีรายงานมาก่อนว่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการรักษาด้วย IFN ได้แก่ บริเวณที่เรียกว่า PePHD และ HVR ผลการศึกษาพบว่า การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในบริเวณ PePHD ไม่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วย IFN และพบว่า การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในบริเวณ HVR1 และ HVR2 ของโปรตีน E2 ก็ไม่มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วย IFN เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามพบว่า การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนในบริเวณ HVR3

ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี genotype 3a มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วย IFN โดยพบว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนของไวรัสในผู้ป่วย responders มีจำนวนมากกว่าผู้ป่วย relapsers อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.043$) รายงานนี้จึงนับเป็นครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่า การกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนบริเวณ HVR3 ของเชื้อไวรัส genotype 3a มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วย IFN นอกจากนี้การศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์กรดอะมิโนของโปรตีน E2 บริเวณที่ใช้จับกับ CD81 บนผิวเซลล์โฮสต์ พบว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนของไวรัส genotype 1b ในผู้ป่วย responders มีจำนวนสูงกว่าของไวรัสในผู้ป่วย non-responders และ relapsers อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.044$) โดยสรุปข้อมูลแสดงให้เห็นว่าการเกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนของโปรตีน E1/E2 มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อการรักษาด้วย PEG-IFN- α และยา ribavirin

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NS5B ของเชื้อไวรัสตับอักเสบซี genotypes 1a, 1b, 3a และ 3b พบว่าการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนของโปรตีน NS5B ของไวรัสในผู้ป่วย responders, non-responders และ relapsers ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวิเคราะห์เฉพาะกรดอะมิโน 21 ตัวสุดท้ายด้านปลาย C-terminus ของโปรตีน NS5B ของเชื้อ genotype 3a พบข้อมูลที่น่าสนใจมากโดยพบว่าไวรัสจากผู้ป่วย relapsers จะไม่มีการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนบริเวณนี้เลย แต่ไวรัสส่วนใหญ่จากผู้ป่วย responders จะมีการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน 1-3 ตำแหน่ง เป็นความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.010$) ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าการเกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโน 21 ตัวสุดท้ายด้านปลาย C-terminus ของโปรตีน NS5B อาจจะใช้เป็นค่าที่ใช้ในการทำนายผลการตอบสนองการรักษาล่วงหน้าได้

สรุปสุดท้าย การศึกษาในครั้งนี้ทำให้เข้าใจบทบาทของการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนของโปรตีน E1/E2 และ NS5B ของไวรัสตับอักเสบซี genotypes 1a, 1b, 3a, 3b และ 6f ในการตอบสนอง หรือไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วย IFN และยา ribavirin