NUCLEAR LOCALIZATION OF DENGUE VIRUS NONSTRUCTURAL PROTEIN 5: THE INDUCTION OF RANTES PRODUCTION BY ACTIVATION OF NF-κB

SASIPRAPA KHUNCHAI 5136951 SIIM/D

Ph.D. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PA-THAI YENCHITSOMANUS, Ph.D., THAWORNCHAI LIMJINDAPORN, M.D., Ph.D., SANSANEE NOISAKRAN, Ph.D.

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) infection can cause a severe and potentially life-threatening disease – dengue hemorrhangic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS). Currently, no licensed vaccine or specific drug is available and the pathogenic mechanism of DENV infection is still unclear. Excessive cytokine secretion – the so called 'cytokine storm', positively correlating with increased vascular permeability, leading to plasma leakage – a hallmark of DHF/DSS. Among ten DENV proteins, non-structural protein 5 (NS5) shows a predominant role in several types of cytokine production including IL-6, IL-8, IP-10, and IFN-γ. DENV NS5 also activates the NF-κB function involved in cytokine production. Even though some cytokine genes have been found to be induced by DENV NS5, other DHF/DSS-immunopathogenic mediators have remained mysterious. Therefore, this work aims to investigate the induction of other cytokines by DENV NS5 and study the molecular mechanism how DENV NS5 mediates the cytokine production. Inflammatory cytokine gene expression profiles in HEK 293 cells infected with DENV 2 were screened by RT^2 Profiler PCR Array. The cytokines that were up-regulated were studied in HEK 293 cells transfected with plasmid constructs expressing wild-type NS5 (WT-NS5) or mutated NS5 (MT-NS5). MT-NS5 was mutated at its nuclear localization sequences (NLS) to inhibit the protein entering into the nucleus. Then, DENV NS5-induced cytokines were selected and tested for differential expression when DENV NS5 is located both within and outside or only outside the nucleus. The luciferase reporter gene assay was performed to determine the influence of DENV NS5 on the cytokine gene promoter and NF-κB involvement. In addition, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay was employed to examine the DNA-binding ability of NF-κB on such a gene promoter. The results demonstrated that RANTES, which can increase vascular permeability, was predominantly induced by DENV WT-NS5, but not by MT-NS5, at both mRNA and protein levels. Nuclear DENV WT-NS5 activated the RANTES promoter as detected by luciferase reporter assay. Increased DNA-binding activity of NF-κB on the RANTES promoter was also demonstrated by ChIP assay. Furthermore, nuclear DENV WT-NS5 interacted with an NF-κB inhibitor, Daxx, suggesting that this interaction may liberate NF-κB to activate the RANTES promoter. Taken together, DENV NS5 can activate RANTES production via its interaction with Daxx which may then liberate NF-κB to bind and activate the RANTES promoter.

KEY WORDS: DENGUE VIRUS / NONSTRUCTURAL PROTEIN 5 / NS5 / Daxx / RANTES

195 pages

การแสดงออกของโปรตีนเอ็นเอส 5 ของไวรัสเด็งกี่ในนิวเคลียส: การเหนี่ยวนำการสร้างสารซัยโตไคน์ RANTES โดยการกระตุ้นการทำงานของ NF-κB

NUCLEAR LOCALIZATION OF DENGUE VIRUS NONSTRUCTURAL PROTEIN 5: THE INDUCTION OF RANTES PRODUCTION BY ACTIVATION OF NF-κB

ศศิประภา ขุนชัย 5136951 SIIM/D

ปร.ด. (วิทยาภูมิคุ้มกัน)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: เพทาย เย็นจิตโสมนัส, ปร.ด., ถาวรชัย ลิ้มจินดาพร, พ.บ., ปร.ด., ศันสนีย น้อยสคราญ, ปร.ด.

บทคัดย่อ

การติดเชื้อไวรัสเด็งกี่อาจจะทำให้เกิดโรคที่รุนแรงและเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต คือ โรคไข้เลือดออก (DHF) และโรคไข้เลือดออกที่มีภาวะช็อกร่วมด้วย (DSS) ในปัจจุบัน ยังไม่มีวัคซีนที่ได้รับการขึ้นทะเบียน หรือยาที่จำเพาะในการรักษา และกลไกพยาธิกำเนิดของโรคยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การหลั่งซัยโตไคน์ที่มากผิดปกติ ซึ่งเรียกว่า 'พายุซัยโตไคน์' มีความสัมพันธ์กับการผ่านของสารน้ำออกนอกหลอดเลือด นำไปสู่ภาวะรั่วของพลาสมา ซึ่งเป็นอาการสำคัญที่พบในผู้ป่วยโรคไข้เลือดออก และโรคไข้เลือดออกที่มีภาวะช็อกร่วมด้วย เมื่อมีการศึกษาว่าโปรตีนชนิดใดของไวรัสเด็งกีมีบทบาทในการกระตุ้นการสร้างซัยโตไคน์ พบว่าจากโปรตีนทั้งหมด 10 ชนิดของไวรัสเด็งกี โปรตีนที่ไม่ได้เป็นส่วนประกอบของไวรัส ชนิดที่ 5 หรือโปรตีนเอ็นเอส 5 (NS5) มีความสามารถที่เด่นชัดที่สุดในการกระตุ้นการสร้างซัยโตไคน์หลายชนิด อาทิเช่น IL-6 IL-8 IP-10 และ IFN-γ นอกจากนี้ โปรตีนเอ็นเอส 5 ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีน NF-κB ซึ่งมีบทบาทควบคุมการสร้างซัยโตไคน์ แม้ว่าซัยโตไคน์ดังกล่าว จะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างโดยโปรตีนเอ็นเอส 5 แต่ยังมีซัยโตไคน์ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อพยาธิกำเนิดของโรคอีกหลายชนิด ที่ยังไม่ทราบว่าโปรตีนชนิดใดของไวรัสเป็นตัวกระตุ้น ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทดสอบว่าโปรตีนเอ็นเอส 5 สามารถเหนี่ยวนำการสร้างซัยโตไคน์ชนิดอื่นด้วยหรือไม่ และกลไกระดับอณูในการเหนี่ยวนำการสร้างซัยโตไคน์ของโปรตีนเอ็นเอส 5 เกิดขึ้นได้อย่างไร การตรวจกรองการสร้างซัยโตไคน์ของเซลล์ HEK 293 ที่ติดเชื้อไวรัสเด็งกี กระทำโดยใช้วิธี RT^2 Profiler PCR Array ซัยโตไคน์ชนิดที่พบว่ามีการกระตุ้นให้สร้างมากขึ้น จะนำมาศึกษาอีกครั้งหนึ่งในเซลล์ HEK 293 ทำให้มีการสร้างโปรตีนเอ็นเอส 5 ที่แตกต่างกัน 2 แบบ คือ โปรตีนเอ็นเอส 5 แบบปกติ ซึ่งมีการแสดงออกทั้งในไซโตพลาสมและนิวเคลียส และโปรตีนเอ็นเอส 5 แบบที่ไม่สามารถเข้าสู่นิวเคลียสได้ ซัยโตไคน์ที่ถูกกระตุ้นโดยโปรตีนเอ็นเอส 5 จะถูกเลือกเพื่อศึกษาต่อถึงกลไกกระตุ้นด้วยโปรตีนเอ็นเอส 5 การแสดงออกของโปรตีนเอ็นเอส 5 ที่มีต่อ promoter ของซัยโตไคน์ ทำการศึกษาโดย Luciferase reporter gene system บทบาทของโปรตีน NF-κB ในการจับบน promoter ทำการศึกษาโดยวิธี chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay ผลการศึกษาพบว่าซัยโตไคน์ RANTES ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการผ่านของสารน้ำออกนอกหลอดเลือด ถูกกระตุ้นโดยโปรตีนเอ็นเอส 5 ในนิวเคลียส ให้มีการสร้างเพิ่มขึ้นทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและโปรตีนอย่างโดดเด่นกว่าซัยโตไคน์ชนิดอื่น และพบว่าโปรตีนเอ็นเอส 5 กระตุ้นการทำงานของ RANTES promoter เมื่อศึกษาด้วยวิธี luciferase reporter assay และพบว่าโปรตีน NF-κB มีการจับบน promoter มากขึ้นในเซลล์ที่มีโปรตีนเอ็นเอส 5 โดยการตรวจด้วยวิธี ChIP assay นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนเอ็นเอส 5 ที่อยู่ในนิวเคลียส มีจับกับโปรตีน Daxx ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน NF-κB ซึ่งอาจจะทำให้โปรตีน NF-κB หลุดออกมาเป็นอิสระจากโปรตีน Daxx ดังนั้นจึงสรุปจากผลการทดลองทั้งหมดได้ว่า โปรตีนเอ็นเอส 5 สามารถกระตุ้นการสร้างซัยโตไคน์ RANTES-ผ่านทางการจับกับโปรตีน Daxx ซึ่งทำให้โปรตีน NF-κB หลุดออกเป็นอิสระจากโปรตีน Daxx และเมื่อโปรตีน NF-κB เป็นอิสระจึงจับและกระตุ้นการทำงานของ RANTES promoter ในการสร้างซัยโตไคน์ RANTES

195 หน้า