Thesis Title	Study of the Nucleotide Polymorphism of CCR5 Promoter, CCR5Δ32 and CCR5-m303 Mutations and Their Protein Density Expressed on the Surface of CD4+ Lymphocytes and Monocytes from HIV Highly Exposed Persistently Seronegative (HEPS) Persons
Author	Miss Tanawan Samleerat
Degree	Master of Science (Medical Technology)
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Pranee Leechanachai — Chairperson Asst. Prof. Sakchai Dettrairat — Member Asst. Prof. Dr. Wasna Sirirungsi — Member

ABSTRACT

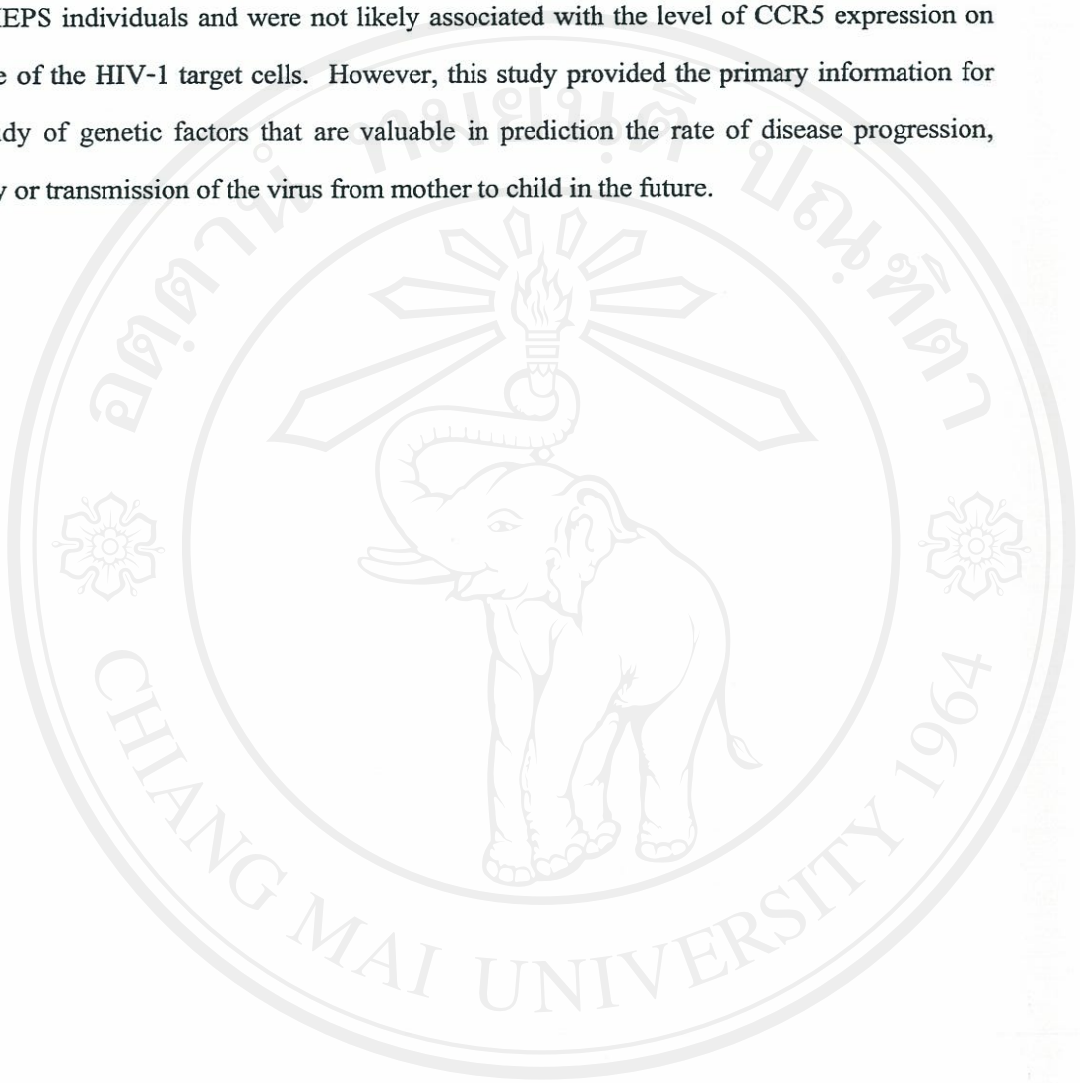
Some individuals who are repeatedly exposed to HIV-1 through unprotected sexual intercourse could be uninfected by HIV-1. Understanding factors that influence resistibility to HIV-1 infection in highly exposed persistently seronegative (HEPS) individuals means a great deal to the development of new preventive measures and vaccines applicable for HIV-1 infection. CCR5, a chemokine receptor expressed on the surface of T cells and monocytes/macrophages also functions as the principal co-receptor for macrophage (M)-tropic strains of HIV-1. A number of genetic variations within promoter region and coding region of CCR5 gene that are significantly associated with HIV-1 infection and disease progression have been identified. Role in controlling infection and disease progression of CCR5 in HIV-1 infection in HEPS individuals demands clearer understanding.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

To understand the genetic variations within the coding region and the promoter region of CCR5 gene that influence resistibility to HIV-1 infection in HEPS individuals, the mutation on the CCR5 coding region: CCR5Δ32 and CCR5-m303, the nucleotide polymorphisms on the CCR5 promoter region and the CCR5 density expressed on the surface of HIV-1 target cells: CD4+ lymphocytes and monocytes were determined. Twenty couples of HEPS individuals and their HIV-1 seropositive spouses who were attended to the Sunpatong Hospital and the Doisaket Hospital, Chiang Mai province during 2001 to 2002 and also 10 healthy HIV-1 seronegative individuals were enrolled into the study under the inclusion criteria. Genomic DNA from all subjects were extracted and purified from blood samples. The CCR5Δ32 mutation was determined by using PCR technique, while CCR5-m303 mutation was determined by using Nested-PCR technique then followed by *Hinc*II restriction endonuclease digestion. The results showed the absent of CCR5Δ32 and CCR5-m303 mutations in all study subjects. The nucleotide polymorphisms in the CCR5 promoter region were determined by using the nucleotide sequencing technique. The sequencing results of each HEPS individuals and their HIV-1 seropositive spouses were determined. Eighteen of 19 HEPS individuals and all 16 HIV-seropositive spouses were classified as CCR5P4 haplotype while 1 of 19 HEPS individuals was the CCR5P2 haplotype. Moreover, CCR5-59029G, a point mutation associated with slow progression to AIDS was found in linkage with CCR5P4 haplotype, while CCR5-59029A, an accelerated allele of progression to AIDS was found in CCR5P2 haplotype. The CCR5 expression on the surface of CD4+ T lymphocytes and monocytes was observed by using direct immunofluorescent technique and flow cytometry. The results showed the median of CCR5 density on the surface of CD4+ T lymphocytes and monocytes from HEPS and healthy HIV-1 seronegative individuals had been significantly lower than those found in HIV-1 seropositive individuals ($p<0.05$). The increase in expression of CCR5 on the cell surface from HIV-infected persons may directly induce by HIV-1. In contrast to the protein density, the number of the CD4+ lymphocytes expressed CCR5 protein from HIV-1 seropositive individuals had been significantly lower than those found in HEPS and healthy HIV-1 seronegative individuals ($p<0.05$), while the number of the monocytes expressed CCR5 protein from HEPS and HIV-1 seropositive individuals had been significantly higher than those found in healthy HIV-1 seronegative individuals ($p<0.05$).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

These results revealed that the mutation in CCR5 coding region and nucleotide polymorphisms on the promoter region observed in this study were not affected with resistibility of these HEPS individuals and were not likely associated with the level of CCR5 expression on the surface of the HIV-1 target cells. However, this study provided the primary information for further study of genetic factors that are valuable in prediction the rate of disease progression, resistibility or transmission of the virus from mother to child in the future.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การศึกษาความหลากรูปของลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน ซีซีอาร์5, การกลายพันธุ์แบบ ซีซีอาร์5 เดลต้า32 และ ซีซีอาร์5-เอ็ม303 และความหนาแน่นของโปรตีน ซีซีอาร์5 ที่ปรากฏขึ้นบนผิว เซลล์ซีดี4+ ลิมโฟซัยท์ และโมโนซัยท์ ในผู้สัมผัสเชื้อเอชไอวีบ่อยแต่ไม่สร้างแอนติบอดี
ผู้เขียน	นางสาว ธนวรรณ สำลีรัตน์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. ปราณี ลี้ชนะชัย	ประธานกรรมการ
	ผศ. ศักดิ์ชัย เดชตรัยรัตน์	กรรมการ
	ผศ. ดร. วาสนา ศิริรังษี	กรรมการ

บทคัดย่อ

ผู้ที่สัมผัสกับเชื้อเอชไอวีบ่อยและเป็นเวลานานโดยไม่มีการป้องกันบางคนไม่สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี การทำความเข้าใจในกลไกที่มีผลต่อการป้องกันการติดเชื้อเอชไอวีในคนกลุ่มที่สัมผัสกับเชื้อบ่อยแต่ไม่สร้างแอนติบอดี (Highly exposed persistently seronegative; HEPS) มีความสำคัญนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาและวัคซีนที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี มีการศึกษาจำนวนมากพบว่าการกลายพันธุ์บนยีน CCR5 ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้าง chemokine receptor ที่ปรากฏบนผิวเซลล์ลิมโฟซัยท์ และโมโนซัยท์ และทำหน้าที่เป็น co-receptor ของเชื้อเอชไอวี ทั้งในส่วนยีนถอดรหัสและยีนควบคุม มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันการติดเชื้อและการดำเนินโรคเอดส์ ดังนั้น การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีนดังกล่าวในคนกลุ่ม HEPS จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการเข้าใจกลไกดังกล่าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อทำความเข้าใจผลของการกลายพันธุ์บนยีน CCR5 ทั้งในส่วนยีนถอดรหัสและยีนส่วนควบคุม ต่อการต้านทานการติดเชื้อเอชไอวีในคนกลุ่ม HEPS ผู้วิจัยจึงทำการตรวจหาการกลายพันธุ์ ชนิด CCR5Δ32 และ CCR5-m303 ในส่วนของยีนถอดรหัส และความหลากรูปของลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณควบคุมของยีน CCR5 และตรวจวัดความหนาแน่นของโมเลกุล CCR5 ที่สร้างขึ้นบนผิวเซลล์ชนิด CD4+ ลิมโฟซัยท์ และโมโนซัยท์ ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายของเชื้อเอชไอวี โดยคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างได้แก่ ผู้ที่สัมผัสเชื้อเอชไอวีบ่อยแต่ไม่สร้างแอนติบอดี และสามีหรือภรรยาที่ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 20 คู่ ที่เข้ารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลสันป่าตอง และโรงพยาบาลดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างปี พ.ศ. 2544-2545 และผู้ที่มีสุขภาพดีไม่ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 10 คน เก็บตัวอย่างเลือด และสกัดแยก DNA แล้วนำไปตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิด CCR5Δ32 ด้วยวิธี PCR และ CCR5-m303 ด้วยวิธี Nested-PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hinc*II ผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการกลายพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดในทุกตัวอย่าง และเมื่อทำการตรวจหาความหลากรูปของลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณยีนส่วนควบคุมโดยเทคนิคการหาลำดับนิวคลิโอไทด์ ซึ่งสามารถตรวจพบความหลากรูปของลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณส่วนควบคุมของยีน CCR5 ลักษณะต่างๆ โดยตรวจพบลักษณะการหลากรูปเป็นชนิด CCR5P4 haplotype ในกลุ่ม HEPS จำนวน 18 จาก 19 ตัวอย่าง และจากสามีหรือภรรยาของคนกลุ่ม HEPS ที่ติดเชื้อเอชไอวีทุกตัวอย่าง จำนวน 16 ตัวอย่าง ในขณะที่พบ CCR5P2 haplotype ในกลุ่ม HEPS เพียง 1 ตัวอย่าง นอกจากนั้นยังตรวจพบการกลายพันธุ์แบบ point mutation ในตำแหน่งสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคหลายตำแหน่ง เช่น CCR5-59029G ที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคช้าพบร่วมกับ CCR5P4 haplotype และ CCR5-59029A ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดำเนินโรคเร็วพบร่วมกับ CCR5P2 haplotype เป็นต้น เมื่อทำการตรวจวัดความหนาแน่นของโมเลกุล CCR5 บนผิวเซลล์ชนิด CD4+ ลิมโฟซัยท์ และโมโนซัยท์ ด้วยวิธี direct immunofluorescent และ flow cytometry พบว่าค่ามัธยฐานของความหนาแน่นของโมเลกุล CCR5 บนผิวเซลล์ชนิด CD4+ ลิมโฟซัยท์ และโมโนซัยท์ ในกลุ่ม HEPS และกลุ่มผู้ที่มีสุขภาพดีไม่ติดเชื้อเอชไอวี ต่ำกว่าค่ามัธยฐานที่ได้จากกลุ่มสามีหรือภรรยาของคนกลุ่ม HEPS ที่ติดเชื้อเอชไอวี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ซึ่งอาจเป็นผลโดยตรงจากการกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีน CCR5 เพิ่มขึ้นโดยเชื้อเอชไอวี ในขณะเดียวกันพบว่าจำนวน CD4+ ลิมโฟซัยท์ ที่มีโปรตีน CCR5 ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี ต่ำกว่าในกลุ่ม HEPS และกลุ่มผู้ไม่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ขณะที่จำนวนโมโนซัยท์ที่มีโปรตีน CCR5 ในกลุ่ม HEPS และกลุ่มผู้ติดเชื้อสูงกว่ากลุ่มผู้ไม่ติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าชนิดและความหลากรูปของลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณส่วนควบคุมของยีน CCR5 ที่พบในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา ไม่มีผลต่อการต้านทานการติดเชื้อเอชไอวีใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คนกลุ่ม HEPS และการสร้างโมเลกุล CCR5 บนผิวเซลล์ CD4+ ลิมโฟซัยท์ และโมโนซัยท์ ซึ่งเป็นเซลล์เป้าหมายของเชื้อเอชไอวี อย่างไรก็ตามผลการศึกษาที่ได้นี้น่าจะใช้เป็นแนวทางในการขยายงานวิจัยเพื่อศึกษาลักษณะการกลายพันธุ์ที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้หรือทำนายการดำเนินโรคและความเสี่ยงในการแพร่เชื้อเอชไอวีจากแม่สู่ลูกได้ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved