

Thesis Title	Analysis of Gene Encoding Extracellular Domains of CD4 Molecule in HIV-1 Highly Exposed Persistently Seronegative (HEPS) Individuals	
Author	Ms. Nilnara Chanowanna	
Degree	Master of Science (Microbiology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Niwat Maneekarn	Chairperson
	Prof. Dr. Sanit Makonkawkeyoon	Member
	Assoc. Prof. Dr. Nopporn Sittisombut	Member
	Dr. Chaisuree Suphavitai	Member

ABSTRACT

HIV infection of host cell is a multistep process that involves the interactions of the envelope protein, gp120, of HIV with its receptor (CD4 molecule) and coreceptor (CCR5, CXCR4, etc) on the cell surface. Conceivably, any defect that occurs either on the gp120 or on the CD4 molecule, which is the main receptor for HIV, could result in the failure of HIV infection. It has been well documented of an existence of a group of individuals who have been repeatedly exposed to HIV but remain persistently seronegative (HEPS) for an extended period of time. The mechanism(s) underlying the resistance to HIV infection in these individuals remains unclear. The present study had determined the nucleotide sequences of the extracellular domains of CD4 gene of HEPS subjects and compared to those of the HIV-infected subjects as well as to the reference sequence of human CD4 gene from the GenBank database. The exons 2-7 of the extracellular domains of CD4 gene were amplified from the genomic DNA derived from 18 HEPS and 17 HIV-infected subjects by polymerase chain reaction (PCR) using Lex 2-3 and Rex 2-3, Lex 4-5 and Rex 4-5, and Lex 6-7 and Rex 6-7 primer pairs, which were specific for the exons 2 and 3, the exons 4 and 5, and the exons 6 and 7, respectively. The nucleotide sequences of these exons were

determined and comparisons were made between HEPS and HIV-infected individuals as well as the reference sequences. It was found that the nucleotide sequences of exons 2-7 of all the HEPS and HIV-infected subjects were identical to the reference sequences of exons 2-7 of human CD4 gene. When the nucleotide sequences of these exons were compared between HEPS and HIV-infected individuals, the sequence identity was also demonstrated. It is apparent that there was no difference between the nucleotide sequences of the extracellular domains of CD4 gene from the HEPS and HIV-infected individuals. It seems, therefore, unlikely that the resistance to HIV infection observed in the HEPS group is due to the structural defect of CD4 molecule. Interestingly, this study identified a new single nucleotide polymorphism within the intron 2 of CD4 gene. A deletion of G at the nucleotide 12227, which has not been reported in the literature, was detected in 9 out of 18 HEPS subjects and 7 out of 17 HIV-infected subjects. In addition, a transition of A to G at the nucleotide 12234, which was reported previously, was also detected in 19 subjects (10 HEPS and 9 HIV-infected) and 2 subjects that their exons 2 and 3 has been cloned and sequenced in this study.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การวิเคราะห์ยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุล ซีดี4 ส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ในผู้ที่สัมผัสเชื้อเอชไอวี-1 บ่อย แต่มีผลเลือดเป็นลบ

ผู้เขียน

นางสาวนิลนรา ชโนวรรณะ

ปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. นวัตกรรม มณีกาญจน์	ประธานกรรมการ
ศ.ดร. สนิท มกรแก้วเกยูร	กรรมการ
รศ.ดร. นพพร สิทธิสมบัติ	กรรมการ
ดร. ฉายสุรีย์ ศุภวิไล	กรรมการ

บทคัดย่อ

การติดเชื้อ HIV ในเซลล์โฮสต์ ประกอบด้วยหลายขั้นตอนซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยากันระหว่าง gp 120 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวของเชื้อ HIV กับตัวรับ (receptor) สำหรับเชื้อ HIV ได้แก่โมเลกุลซีดี4 ร่วมกับตัวรับร่วม (coreceptor) ได้แก่ CCR5, CXCR4, และอื่นๆ ที่อยู่บนผิวของเซลล์โฮสต์ จะเห็นได้ว่าหากมีความผิดปกติเกิดขึ้นกับ gp 120 หรือต่อโมเลกุลซีดี 4 ซึ่งเป็นตัวรับที่สำคัญสำหรับเชื้อ HIV จะส่งผลให้การติดเชื้อไม่สามารถเกิดขึ้นได้ จากการศึกษาการติดเชื้อ HIV ในคนได้มีการรายงานว่ามียีนกลุ่มคนที่ได้รับเชื้อ HIV บ่อยแต่มีผลเลือดเป็นลบ (HEPS) โดยการเฝ้าติดตามเป็นเวลามากกว่า 10 ปีแล้ว กลไกที่บุคคลเหล่านี้สามารถต้านทานต่อการติดเชื้อ HIV นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด ในการศึกษาในครั้งนี้ ได้มีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุลซีดี 4 ส่วนที่ยื่นออกไปภายนอกเซลล์ในคนกลุ่ม HEPS และในคนกลุ่มที่ได้รับเชื้อ HIV แล้วมีการติดเชื้อ (HIV-infected) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเดียวกันในคนทั้งสองกลุ่ม รวมถึงการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุลซีดี 4 ในคนปกติที่ไม่มีการติดเชื้อที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วย วิธีการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวน exons 2-7 ของ ยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุลซีดี 4 จาก genomic DNA ที่เตรียมจากกลุ่มทดลอง HEPS จำนวน 18 ราย และกลุ่มทดลอง HIV-infected จำนวน 17 ราย โดยวิธีการ PCR และใช้ primers Lex 2-3 และ Rex 2-3, Lex 4-5 และ Rex 4-5, Lex

6-7 และ Rex 6-7 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ exons 2-7 ตามลำดับ แล้วจึงนำ PCR products ของแต่ละ exon ของกลุ่มทดลองทั้งสองกลุ่มไปทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละคนมาเปรียบเทียบกันเป็นคู่ๆ ระหว่างกลุ่ม HEPS และกลุ่ม HIV-infected และในขณะเดียวกันก็นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองกลุ่มไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (reference sequences) การศึกษาในครั้งนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ exons 2-7 ของกลุ่ม HEPS และกลุ่ม HIV-infected เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงทุกประการ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่มทดลอง HEPS เปรียบเทียบกับของกลุ่มทดลอง HIV-infected ก็พบว่าไม่มีความแตกต่างเลยเช่นเดียวกัน จากหลักฐานที่พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่กำหนดการสร้าง โมเลกุลซีดี 4 ของกลุ่มทดลอง HEPS ไม่มีความแตกต่างจากของกลุ่มทดลอง HIV-infected แสดงว่าความต้านทานต่อการติดเชื้อ HIV ที่สังเกตพบในคนกลุ่ม HEPS จึงไม่น่าเกิดจากความผิดปกติของโครงสร้างของ โมเลกุลซีดี 4 นอกจากนี้ในการศึกษาในครั้งนี้ได้ค้นพบสิ่งใหม่ที่ที่น่าสนใจ คือความหลากหลายรูปแบบ (polymorphism) ของยีนที่กำหนดการสร้างโมเลกุลซีดี 4 บริเวณ intron 2 โดยพบมีการขาดหายไป (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ G ตรงตำแหน่งที่ 12227 ซึ่งเป็นรูปแบบที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน ความผิดปกตินี้พบ 9 คนใน 18 คนของกลุ่ม HEPS และ 7 คนใน 17 คนของกลุ่ม HIV-infected นอกจากนี้ที่กล่าวแล้ว การศึกษาในครั้งนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง (transition) จาก A เป็น G ที่ตำแหน่ง 12234 ซึ่งเป็นตำแหน่งความผิดปกติที่เคยมีผู้รายงานมาก่อนแล้ว และการศึกษานี้ก็พบการเปลี่ยนแปลงนี้เช่นกันใน 19 คนของกลุ่มศึกษา (10 คนในกลุ่ม HEPS และ 9 คนในกลุ่ม HIV-infected) และอีก 2 คนที่ exon 2 และ 3 ได้ถูก cloned และ sequenced ในการศึกษาในครั้งนี้