

Thesis Title The Influence of Cytokine, Chemokine and Chemokine Receptor Gene Polymorphisms and Their Expression on HIV Disease Progression

Author Mrs. Doungnapa Kingkeow

Degree Doctor of Philosophy (Microbiology)

Thesis Advisory Committee

Professor Emeritus Dr. Sanit Makonkawkeyoon Chairperson

Professor Dr. Niwat Maneekarn Member

Associate Professor Dr. Nopporn Sittisombat Member

Assistant Professor Dr. Sumalee Pruksakorn Member

ABSTRACT

Single nucleotide polymorphisms (SNPs), which are substitutions of one nucleotide for another in a DNA sequence, are frequently used in several kinds of genetic analysis including disease association. SNPs in promoter, coding and 3' untranslated regions, which are gene regulatory regions, may influence protein production. Many previous studies have reported the relationship of the level of TNF- ζ , IFN- ν , IL-4, IL-10, RANTES, SDF-1, CCR5 and CCR2 with varying rates of

HIV-1 disease progression. The association of SNPs that affect the level of these cytokine, chemokine and chemokine receptor genes with the rate HIV-1 disease progression is expected. While the influence of SNPs at position -308 of *TNF ζ* gene, +874 of *IFN ν* gene, -589 of *IL4* gene, -1082, -819, -592 of *IL10* gene, 59029 of *CCR5* promoter, 190 of *CCR2* gene, -28 of *RANTES* gene and 801 of *SDF1* gene on HIV-1 disease progression was mostly studied in individuals infected with subtype B, they were rarely studied in persons infected with other HIV-1 subtypes. We evaluated the effect of these SNPs on HIV-1 disease progression in northern Thais where CRF01_AE dominates. These SNPs were defined in 259 subjects with HIV-1 infection due to heterosexual behavior. While SNPs of *TNF ζ* , *IFN ν* , *IL4*, *CCR5* and *CCR2* genes were genotyped by PCR-SSP, that of *IL10* gene was genotyped by multiplex PCR-SSP. SNPs of *RANTES* and *SDF1* gene were genotyped by sequencing and tetra-primer PCR-SSP, respectively. Kaplan-Meier survival curves and Cox proportional hazards models were used to demonstrate the effect of these SNPs on HIV-1 disease progression. The baseline viral replication at enrollment provided additional information to support interpretation of these effects. Associations of all cytokine SNPs with HIV-1 disease progression were demonstrated, except that of *TNF ζ* SNP. The highly tendency of the ATA haplotype of *IL10* SNPs to delayed HIV-1 disease progression was shown by a marginally statistically significant better survival and lower risk of progression to death together with a tendency for lower baseline viral replication in subjects with the ATA haplotype of *IL10* SNPs than those without this haplotype ($P = 0.052$, $P = 0.054$ and $P = 0.062$, respectively). Also, the IL-10 mRNA expression study showing that LPS stimulated PBMCs from LTNP tended to expressed lower IL-10 mRNA than those from NP ($P = 0.165$) implies a

strong tendency of the ATA haplotype to delay HIV-1 disease progression possible via low IL-10 mRNA production. A weak tendency of *IL4*-589T allele to delay HIV-1 disease progression was shown by the non-significant trend toward lower risk of progression to death and the lower baseline viral replication in subjects with the TT genotype than those without this genotype ($P = 0.120$ and $P = 0.164$, respectively). A weak tendency of *IFN* ν +874T allele to delay HIV-1 disease progression was also demonstrated by a non-significant trend toward lower risk of progression to death in subjects with the *IFN* ν +874 TT or TA genotype than those without this genotype ($P = 0.133$). No relationship of chemokine and chemokine receptor SNPs with HIV-1 disease progression were observed. Therefore, our study demonstrated that the ATA haplotype of *IL10* SNPs has the strongest tendency to delay HIV-1 disease progression followed by non-statistically significant trends with *IL4*-589T and *IFN* ν +874T alleles, respectively.

The identification of an association between the ATA haplotype of *IL10* SNPs and non-significant trends of *IL4*-589T and *IFN* ν +874T alleles with delayed HIV-1 disease progression encourages more studies in other HIV-1 cohorts differing in HIV-1 subtypes, study design, ethnic groups, population characteristics, allele and haplotype frequencies to test the validity of these haplotype and alleles on HIV-1 disease progression. More genetic studies may provide more precise markers of HIV-1 disease progression which will offer a new opportunity to improve the effectiveness of therapeutic strategies.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ อิทธิพลของภาวะพหุสัญญาณของยีนไซโตไคน์ เคโมไคน์และตัวรับ
เคโมไคน์ และการแสดงออกของยีน ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี

ผู้เขียน นางดวงนภา กิ่งแก้ว

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร. สนิท มกรแก้วเกษร

ประธานกรรมการ

ศาสตราจารย์ ดร. นิวัฒน์ มณีกาญจน์

กรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร. นพพร สิริธิตสมบัติ กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พฤษภากร

กรรมการ

บทคัดย่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Single nucleotide polymorphisms (SNP) ซึ่งเป็นการแทนที่นิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งด้วย

นิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่งที่เกิดขึ้นบนลำดับของ ดี เอ็น เอ ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางด้าน genetic

หลายชนิด รวมถึงความสัมพันธ์ของ SNPs กับโรคต่างๆ ด้วย SNPs ที่เกิดขึ้นบนบริเวณ promoter, coding และปลาย 3' ของยีนซึ่งเป็นตำแหน่งที่ควบคุมการทำงานของยีนอาจมีผลต่อปริมาณการผลิต

โปรตีนจากยีนนั้นๆ การศึกษาก่อนหน้านี้ได้พบความสัมพันธ์ของระดับ TNF- ζ , IFN- ν , IL-4,

IL-10, RANTES, SDF-1, CCR5 และ CCR2 กับการดำเนินโรครายหลังการติดเชื้อเอชไอวี 1

ทำให้คาดว่า SNPs ที่มีผลต่อระดับการผลิตโปรตีนจากยีน ไซโตไคน์ เคโมไคน์ และตัวรับเคโมไคน์ เหล่านี้จะมีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 การศึกษาอิทธิพลของ SNPs ณ ตำแหน่ง -308 ของยีน *TNF α* , +874 ของยีน *IFN γ* , -589 ของยีน *IL4*, -1082, -819, -592 ของยีน *IL10*, 59029 ของยีน *CCR5*, 190 ของยีน *CCR2*, -28 ของยีน *RANTES* และ 801 ของยีน *SDF1* ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในผู้ที่ติดเชื้อสายพันธุ์ B แต่ไม่ค่อยมีการศึกษาในผู้ที่ติดเชื้อสายพันธุ์อื่น การศึกษานี้จึงได้ศึกษาถึงผลของ SNPs เหล่านี้ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ CRF01_AE ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี จำนวน 259 คน ที่ได้รับเชื้อจากการมีเพศสัมพันธ์กับคู่นอนต่างประเทศ การตรวจหาจีโนไทป์ของ SNPs ของยีน *TNF α* , *IFN γ* , *IL4*, *CCR5* และ *CCR2* ใช้วิธี PCR-SSP ส่วนการตรวจหาจีโนไทป์ของ SNPs ของยีน *IL10* ใช้วิธี multiplex PCR-SSP การตรวจหาจีโนไทป์ของ SNPs ของยีน *RANTES* และยีน *SDF1* ใช้วิธี sequencing และ วิธี tetra-primer PCR-SSP ตามลำดับ จากนั้นได้ใช้ Kaplan-Meier survival curves และ Cox proportional hazard models ในการวิเคราะห์ผลของ SNPs เหล่านี้ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 โดยใช้ปริมาณการเพิ่มจำนวนของไวรัสในวันที่อาสาสมัครเข้าร่วมการศึกษากลับเป็นข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อสนับสนุนการแปลผลของ SNPs ต่อการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ผลการศึกษาพบว่า SNPs ของไซโตไคน์ยีนทุกตัว มีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ยกเว้น SNP ของยีน *TNF α* โดยผู้ติดเชื้อที่มี ATA haplotype ของ *IL10* SNPs มีชีวิตรอดดีกว่า มีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตต่ำกว่าและมีแนวโน้มที่จะมีการเพิ่มจำนวนของไวรัสในวันที่เข้าร่วมการศึกษาต่ำกว่าผู้ติดเชื้อที่ไม่มี haplotype นี้ ($P = 0.052$, $P = 0.054$ และ $P = 0.062$ ตามลำดับ) แสดงว่า ATA haplotype มีแนวโน้มสูงที่จะทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง การศึกษาหาปริมาณ IL-10 mRNA ที่ผลิตจาก PBMCs หลังจากการกระตุ้นด้วย LPS พบว่าผู้ติดเชื้อที่มีการดำเนินของโรคช้า มีแนวโน้มที่จะสร้าง IL-10 mRNA ต่ำกว่าผู้ติดเชื้อที่มีการดำเนินของโรคปกติ แสดงว่าแนวโน้มของ ATA haplotype ในการทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง อาจจะเป็นผลมาจาก

การผลิต IL-10 mRNA ในปริมาณที่ลดลง สำหรับ SNP ของยีน *IL4* นั้นพบว่าผู้ติดเชื้อที่มี *IL4-589* TT จีโนไทป์ มีแนวโน้มจะมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตและการเพิ่มจำนวนของไวรัสในวันที่เข้าร่วมการศึกษาต่ำกว่าผู้ติดเชื้อที่ไม่มีจีโนไทป์นี้ ($P = 0.120$ และ 0.164 ตามลำดับ) แสดงว่า *IL4-589T* อัลลิล มีแนวโน้มที่จะทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ติดเชื้อที่มี *IFN γ -874* TT หรือ TA จีโนไทป์มีแนวโน้มจะมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตต่ำกว่าผู้ติดเชื้อที่มี *IFN γ -874* AA genotype ($P = 0.133$) แสดงว่า *IFN γ -874T* อัลลิล มีแนวโน้มทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง สำหรับ SNPs ของยีนเคโมไคน์และตัวรับเคโมไคน์นั้นไม่พบความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ATA haplotype ของ *IL10* SNPs มีแนวโน้มมากที่สุดในการทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง ตามด้วย *IL4-589T* และ *IFN γ -874T* อัลลิล ตามลำดับ

การศึกษาที่พบว่า ATA haplotype ของ *IL10* SNPs มีแนวโน้มสูงและ *IL4-589T* และ *IFN γ -874T* อัลลิล มีแนวโน้มในระดับหนึ่งที่จะทำให้การดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 ช้าลง จะเป็นแรงกระตุ้นให้มีการศึกษาอื่นๆ ที่มีความแตกต่างกันในด้าน สายพันธุ์ของเชื้อเอชไอวี การออกแบบการศึกษา เชื้อชาติ ลักษณะของกลุ่มประชากร ความถี่ของอัลลิล และความถี่ของ haplotype เพื่อยืนยันถึงบทบาทของ haplotype และ อัลลิล เหล่านี้ต่อการดำเนินของโรครายหลังการติดเชื้อ เอช ไอ วี 1 ซึ่ง

อาจทำให้ทราบ markers ที่ถูกต้องของการดำเนินโรคติดเชื้อเอชไอวี 1 เพื่อปรับปรุงการวางแผนการรักษาให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น