ความชุกของการกลายพันธุ์ใน CCR2 และ SDF-1 genes ในกลุ่มคนไทยที่ตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี

นายสมบูรณ์ หนูไข่

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-649-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19253692

PREVALENCE OF MUTATION IN CCR2 AND SDF-1 GENES IN HIV-SERONEGATIVE THAIS

Mr. Somboon Nookhai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1999

ISBN 974-333-649-4

Thesis Title	Prevalence of mutation in CCR2 and SDF-1 genes in HIV-seronegative Thais
By	Mr. Somboon Nookhai
Inter-department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of Graduate School

(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Associate Professor Pornthep Thiansiwakul, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.)

.....Member

(Associate Professor Ruengpung Sutthent, M.D., Ph.D.)

นายสมบูรณ์ หนูไข่ : ความชุกของการกลายพันธุ์ใน CCR2 และ SDF-1 gene ในกลุ่มคนไทยที่ตรวจไม่พบแอนติบอดีต่อเชื้อเอชไอวี อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม, 70 หน้า. ISBN 974-333-649-4

Chemokines และ Chemokines receptors เริ่มมีบทบาทเกี่ยวข้องกับโรคเอดส์ตั้งแต่ปี 2538 เมื่อถูกค้นพบว่า Chemokine receptors ทำหน้าที่เป็น coreceptors สำหรับการเข้าเซลล์ของเชื้อ HIV และ Chemokines บางชนิดทำหน้าที่ขัดขวางการเข้าเซลล์ของเชื้อได้ จากการค้นคว้าศึกษาในปัจจุบันพบว่ามีการกลายพันธุ์ที่เกิดใน Chemokine และ chemokine receptors อยู่ 4 แบบพบว่าเกี่ยวข้องกับการชลอการดำเนินของโรคเอดส์ ได้แก่ การกลายพันธุ์ชนิด CCR5Δ32, CCR5m303, CCR2-64I และ SDF1-3'A ทั้งนี้กระจายตัวของการกลายพันธุ์ชนิด CCR5Δ32 พบส่วนใหญ่ในกลุ่มคนผิวขาว และพบได้น้อยหรือไม่พบเลยในชาวแอฟริกันและเอเชีย ส่วนการกลายพันธุ์ชนิด CCR2-64I สามารถที่จะพบได้ในทุกกลุ่มโดยการกระจายตัวของการกลายพันธุ์ชนิดนี้อยู่ระหว่างร้อยละ 10-26 สำหรับการกระจายของ SDF1-3'A นั้นพบมีการกระจายตัวตั้งแต่ร้อยละ 3 ถึง ร้อยละ 71 อย่างไรก็ตามการสำรวจการกระจายตัวของการกลายพันธุ์ชนิด CCR2-64I และ SDF1-3'A ที่มีรายงานนั้นไม่มีการศึกษาในกลุ่มของประชากรคนไทยแต่อย่างไร ทั้งที่ยังมีปัญหาการระบาดของโรคเอดส์อยู่โดยเฉพาะทางเพศสัมพันธ์ชนิดต่างเพศ การศึกษานี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการกระจายตัวของการกลายพันธุ์ของ CCR2-64I และ SDF1-3'A ในประเทศไทยโดยทำการศึกษาจากการสุ่มตัวอย่างในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตที่มีผลการตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV เป็นลบ

สารพันธุกรรมชนิด DNA จากตัวอย่างเลือดของอาสาสมัคร 200 รายที่สุ่มจากผู้บริจาคโลหิตของศูนย์บริจาคโลหิต สภากาชาดไทย ที่ผลตรวจแอนติบอดีต่อเชื้อ HIV เป็นลบ ทำการสกัดแยก DNA โดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAamp (QIAGEN Gmbh, เยอรมัน) วิธีที่ใช้สำหรับการตรวจหาการกลายพันธุ์คือ Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) การเพิ่มจำนวน DNA ที่จำเพาะโดยใช้ Primers ที่จำเพาะต่อ CCR2 ยีน หรือ SDF1 ยีน จากนั้นนำผลิตผล PCR มาทำให้บริสุทธิโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป QIAquick (QIAGEN Gmbh, เยอรมัน) แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsa BI* และ *Msp I* สำหรับการหาการกลายพันธุ์ชนิด CCR2-64I และ SDF1-3'A ตามลำดับ การแปลผลของการ กลายพันธุ์เป็น Wild type heterozygous และ homozygous นั้นทำโดยการนำผลิตผล PCR ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดที่จำเพาะแล้วทำ Gel electrophoresis ใน 4% agarose gel และอ่านผลโดยพิจารณาจากลักษณะรูปแบบของขนาดโมเลกุลของ band ที่เกิดขึ้น

ผลการศึกษาการกระจายตัวของ CCR2-64I และ SDF1-3'A โดยวิธี PCR-RFLP ดังกล่าวพบว่าจากจำนวน 200 ตัวอย่างมีการกระจายตัวของ CCR-64I ในการศึกษานี้เท่ากับ 0.1575 โดยพบ 4 ตัวอย่างที่เป็นการกลายพันธุ์แบบ Homozygous และ 55 ตัวอย่างเป็นการกลายพันธุ์แบบ Heterozygous ส่วนการกระจายตัวของการกลายพันธุ์ชนิด SDF1-3'A นั้นมีค่าการกระจายตัวเท่ากับ 0.3325 ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์แบบ Homozygous จำนวน 27 ตัวอย่างและแบบ Heterozygous จำนวน 79 ตัวอย่าง จากการคำนวณค่าของ Hardy-Weinberg equilibrium พบว่าค่าการกระจายตัวของการกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดนี้อยู่ระหว่างค่าที่คำนวนได้ การศึกษาการกระจายตัวของการกลายพันธุ์ชนิด CCR2-64I และ SDF1-3'A นี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในกลุ่มประชากรคนไทยซึ่งผลการศึกษาพบว่าการกระจายตัวของการกลายพันธุ์ทั้งสองชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างกับการกระจายของที่พบในกลุ่มประชากรในแถบเอเชีย จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าร้อยละ 13.5 ของกลุ่มประชากรคนไทยที่ศึกษามีการกลายพันธุ์ของ SDF1-3'A แบบ homozygous ทำให้คาดการณ์ว่าถ้าประชากรกลุ่มนี้ติดเชื้อ HIV น่าจะมีการดำเนินโรคช้ากว่าอัตราเฉลี่ยทั่วไป

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

3971966630 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEYWORD : CCR2-64I / SDF1-3'A/ ALLELE FREQUENCE
SOMBOON NOOKHAI: PREVALENCE OF MUTATION IN CCR2 AND SDF1 GENE IN HIV-SERONEGATIVE THAIS. THESIS ADVISOR: ASSISTANT PROFESSOR KIAT RUXRUNGTHAM, 70 pp. ISBN 974-333-649-4.

In a series of important discoveries since 1995, chemokines and their receptors have been shown to act as competitive inhibitors and co-receptors for HIV infection respectively. Recently, four polymorphisms in the genes encoding these molecules have been identified and correlated with a delayed HIV-1 disease progression rate, namely: CCR5Δ32, CCR5m303, CCR2-64I, and SDF1-3'A. Several reports have shown that the CCR5-Δ32 allelic form is virtually absent among African and Asian populations. CCR2-64I allele is found in all racial groups tested at the frequency of 10% to 26%. For the SDF1-3'A allele frequency ranges widely across ethnic groups from 3-71%. Thais are distinct ethnically and geographically from previously studied cohorts, and they comprise a distinct population in South East Asia. In addition, this population is experiencing an HIV-1 epidemic, spreading largely through heterosexual contact. However, previous studies of the allele frequency of CCR2-64I and SDF1-3'A have not contained Thai subjects. This study was undertaken to determine the frequency of the polymorphism alleles of these 2 genes in the healthy HIV-seronegative Thai population.

Blood samples were randomly collected from 200 blood donors, who were anti-HIV negative, at the Thai Red Cross, National Blood Centre. Genomic DNA was extracted from whole blood. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assays were used to analyze the CCR2-64I and SDF1-3'A genetic polymorphisms. In brief, the genomic DNA was amplified by using the specific primers for CCR2 and SDF-1. PCR products were then purified, followed by digestion with specific restriction enzymes. The products were visualized in an agarose gel and classified as wild type, heterozygous or homozygous for the mutation by the digestion pattern.

Among the 200 subjects examined, four homozygous and 55 heterozygous for the CCR2-64I allele were observed; and 27 homozygous and 79 heterozygous for SDF1-3'A were detected. The calculated allele frequencies were 0.1575 and 0.3325, respectively. The distributions of these two genotypes were in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium. This is the first genetic survey that has undertaken to examine the frequency of the CCR2-64I and SDF1-3'A alleles in the Thai population. Our results document that the frequencies of these alleles in Thai population are not significantly different from those in other South East Asian populations and indicate that these alleles are likely to be having an impact on the natural history of HIV-1 infection in Thailand. Approximately 13.5 % of Thais showed SDF1-3'A homozygous mutation of which has shown associated with a marked slowing in disease progression if one was HIV infection.

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENTS

The present investigator wishes to express his deep gratitude to the followings, who had in making this thesis possible.

Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, of the Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the advisor, for his excellent and invaluable advice, indispensable help, constructive criticism and encouragement through the period of this study;

Dr. Robert Oelrichs for providing the primers and the help to set up the assays.

Miss Sunee Sirivichayakul for her kindly advice the PCR technique

Dr. Mana Khongphattanayothin for statistical advice

All the staffs at The Thai Red Cross Nation Blood Center, for providing the blood sample specimens

Finally, the investigator is deeply indebted to his family for their understanding and support during his study period

CONTENT

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
ABBREVIATIONS	xi
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II LITERATURE REVIEW	
The Chemokines	4
Chemokine Families	4
Chemokine Function	5
Chemokine Receptors	5
Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)	13
CC Chemokine Receptor 2 (CCR-2)	13
Acquired Immunodeficiency Syndrome	14
HIV-1 Biology	14
The HIV Life Cycle	15
M-tropic and T-tropic HIV	18
The Immunopathogenesis of HIV Infection	18
Mechanisms of CD4 T Lymphocyte Dysfunction	22
The Host Response to HIV Infection	24
Cytokines and HIV Disease	25
Chemokines and HIV Disease	28
Chemokine Receptors as HIV Coreceptors	29
Genetic Polymorphisms that Delay AIDS Progression	29
HIV/AIDS Epidemic	32
III MATERIALS AND METHODS	
Study group	34

Genomic DNA preparation by QIAamp Blood Kits..... 34
Polymerase Chain Reaction amplification..... 34
PCR for genotyping of the CCR2-64I polymorphism.... 34
PCR for genotyping of the SDF1-3'A polymorphism.... 35
Purified PCR product by QIAquick PCR Purification Kit..... 35
Fragment Length Polymorphism (RFLP) for detection
CCR2-64I and SDF1-3'A polymorphism..... 35
Analysis of digestion products..... 36
Genotype classification..... 37
Statistical Analysis..... 38
IV RESULTS..... 41
V DISCUSSION..... 48
VI CONCLUSION..... 54
REFERENCE..... 56
APPENDIX..... 65
APPENDIX I..... 66
APPENDIX II..... 68
BIOGRAPHY..... 70

TABLE LIST

Tables		Page
I	The CXC Chemokines.....	8
II	The CC chemokines.....	9
III	CXC Chemokine receptors and their ligands.....	12
IV	The CC Chemokine receptors.....	12
V	Sequence of primer and size of PCR products.....	40
VI	Size of the bands characteristic for different genotypes.....	40
VII	Frequency of CCR2-64I and SDF1-3'A in Thai population.....	42
VIII	Comparison between CCR264I and SDF1-3'A genotype.....	42
IX	CCR2-64I allele frequencies in world population.....	51
X	SDF1-3'A allele frequencies in world population.....	52.
XI	The percentage of genotype that influence in delay progression to AIDS.....	53

FIGURE LIST

Figures		Page
I	The structural classification of chemokines.....	10
II	Diagram for the *Bsa BI* digestion patterns of CCR2-64I in agarose gel electrophoresis	37
III	Diagram for the *Msp I* digestion patterns of SDF1-3'A in agarose gel electrophoresis	39
IV	PCR-RFLP pattern of CCR2-64I genotype analysis.....	43
V	Analysis of CCR2-64I polymorphism in samples No. 173 – 178.....	44
VI	PCR-RFLP pattern of SDF-3'A genotype analysis.....	45
VII	Analysis of SDF1-3'A polymorphism in samples No. 1 – 7.....	46
VIII	Percent of CCR2-64I and SDF1-3' A polymorphism.....	47

ABBREVIATIONS

A	=	Adenine
ADCC	=	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
AIDS	=	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ARC	=	AIDS Related Complex
ARV	=	AIDS-associated retrovirus
B-cells	=	Bursa-derived lymphocytes
bp	=	base pair
^{o}C	=	Degree Celsius
CAF	=	Cell antiviral factor
CCR	=	CC chemokines Receptor
CD	=	Cluster of Differentiation
CDC	=	Centers of Disease Control
CI	=	Confidence interval
CTL	=	Cytotoxic T-lymphocytes
CXCR	=	CXC chemokines Receptor
DDW	=	Deionized distilled water
DNA	=	Deoxynucleotidetriphosphate
dNTPs	=	Deoxyribonucleotidetriphosphate
DW	=	Distilled water
ENA	=	Epithelial Cell-derived Neutrophil Activating protein
env	=	envelope
et al.	=	et alii
G	=	guanine
g	=	gram
GCP-2	=	Granulocyte chemotactic protein 2
gp	=	glycoprotein
GRO	=	Growth Related Oncogene
HCC-1	=	Hemofilltrate CC chemokine1
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
i.e.	=	id est

IFN-γ	=	Interferon ga□mm
Ig	=	Immunoglobuli
IP-10	=	IFN–γ Inducible Protein 1
IVDU	=	Intravenous drug use
kD	=	kilo Dalton
LTRs	=	Long terminal repeat
LAV	=	lymphadenopathy-associated virus
M	=	Molar
MCP	=	Monocyte chemoattractant protein
mg/L	=	milligram per liter
$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
MIG	=	Monokine Induced by IFN-γ
min	=	minute
MIP	=	Macrophage Inflammatory Protein
mL	=	milliliter
$cumm^3$	=	cubic millimeter
NAP	=	Neutrophil Activating peptide
nm	=	nanometer
NK cells	=	Natural Killer cells
nt	=	nucleotide
NSI	=	Non syncytia-inducing formation
PBMCs	=	Peripheral Blood Mononuclear cells
PBSF	=	pre-B cells growth stimulating factor
PCR	=	polymerase Chain Reaction
PF	=	Platelet Factor
pol	=	polymerase
RANTES	=	regulated upon activation, normal T expressed and secreted
RFLP	=	Restriction fragment length polymorphism
RNA	=	Ribonucleic acid
rpm	=	round per minute
RT	=	Reverse Transcriptase

T	=	Thymidine
TACK	=	Thymus expressed chemokine
T-cells	=	Thymus- derived lymphocytes
TRAC	=	Thymus and Activation –Regulated Chemokine
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)- aminoethane
SDF	=	Stromal-derived factor
SI	=	syncytia-inducing formation
SSCP	=	Single-stand conformation polymorphism
μg/mL	=	microgram per milliliter
μL	=	microliter
UV	=	Ultraviolet
WHO	=	World Health Organization