

รายงานการวิจัย

การค้นหาลิวเลกุลเพื่อการตรวจวินิจฉัยและพยากรณ์โรคในผู้ป่วยโรคเอส
แอล อีโดยวิธีการทางอีโนม และเมทิลเลชัน

Biomarker discovery in systemic lupus
erythematosus: genome-methylation approaches

รศ.นพ.ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์

รศ.ดร.พญ.จงกลณี วงศ์ปิยะบวร

รศ.ดร.พญ.ณัฐฐิยา หิรัญกาญจน์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the National Research Council of Thailand.

We would like to thank all the people who contributed to this study. Firstly, Chutima Rukrung, RN and Sujinda Pipopsuthipibul, RN for collecting the blood samples from the patients and management of the clinical database. Secondly, Supranee Buranapraditkun, MSc. and Preecha Raungwetworachai MSc. for excellent technical assistance and Panita Lertwiriyananthakul for the pathology database. Lastly, Pisut Katavetin and Pirapon June Ohata for critical reading and editing our paper.

Moreover, we also thank Lupus Research Unit team for laboratory supported, and Division of Nephrology for referring the patients to our study.

ABSTRACT

Discovery of novel biomarkers in lupus nephritis

Biomarkers are needed for making diagnosis and prognosis. In lupus nephritis, conventional tests like urinalysis or serum creatinine remain inadequate for patient care. In this proposal, we focused on non-invasive tools like blood and urine mRNAs or proteins. We chose candidate genes involving regulatory T-cell, B-lymphocyte signatures or vascular protective factors.

Expression of regulatory cell signature (FOXP3) in peripheral blood mononuclear cells is associated with activity of lupus nephritis. We found FOXP3 mRNA levels in PBMCs from patients with active lupus nephritis were significantly lower than inactive lupus nephritis. Expression levels of FOXP3 mRNA were associated with pathological activity index, cellular crescent and fibrinoid necrosis.

BLyS and APRIL are B-lymphocyte related cytokines that play an important role in generating and maintaining the mature B-cell pool. In this study, we found blood APRIL correlated with activity of lupus nephritis. Blood APRIL levels could precisely predict failure of standard treatment treatment. APRIL is a potential biomarker for predicting treatment failure.

Lastly, we found an expression of VEGF in renal tissue may serve as a molecular marker of renal damage from LN and may be a predictive factor for short-term loss of kidney function in lupus nephritis patients. We proposed that reduction of intra-renal VEGF level caused by losses of podocyte cells.

Genetic polymorphism of drug toxicity or pharmacokinetics in SLE patients

We began to explore the pharmacokinetics and pharmacogenomics of two important immunosuppressants, azathioprine and mycophenolate. In this study, we report TPMT polymorphisms and TPMT enzyme activity were important predictors of AZA-induced myelosuppression. The tests are available for routine care.

Mycophenolic acid (MPA) is active metabolite of mycophenolate. We found MPA levels is important predictor of therapeutic response. The therapeutic drug monitoring is now an important issue of patient care. We found UGT1A9 polymorphism may play a pivotal role in drug metabolisms.

Methylation study

We examined and compared the methylation levels of long terminal repeats (LTRs) and non-LTR retroelements in normal and SLE CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes and B lymphocytes. Hypomethylation of LINE-1 but not Alu was found in CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, and B lymphocytes of SLE patient.

Moreover, when the SLE patients were divided into active and inactive groups, LINE-1 hypomethylation was more significantly distinguished in both CD4+ and CD8+ T lymphocytes of patients from the active SLE group when compared to the controls.

Genome-wide scanning using SNP microarrays

In this study, we applied case-control association study including pooling genome wide association (GWA) and candidate gene association studies to search for SNPs associated with SLE susceptibility and/or severity. We could not identify any SNPs with distinct p-value or odds ratio from our pooling GWA result due to limited power.

We selected *IFIX* for further study in candidate gene's part. Besides *IFIX*, we also focus on *MNDA*, *IFI16* and *AIM2* genes which located in the same region and are all IFN-inducible genes. They are important SLE susceptibility genes due to several reasons including 1) genetic mapping from lupus murine model and 2) an upregulated IFN-inducible genes in patients with SLE from microarray studies and 3) *IFI16* was identified as new autoantigen for patients with SLE. We genotyped 10 SNPs from these 4 genes and found that SNP within *IFIX* and *IFI16* are independently important.

TABLE OF CONTENTS

CHAPTER

I.	Project Output Summary	1
II.	Discovery of novel biomarkers from urinary messenger RNAs (mRNAs) in lupus nephritis	4
	- FOXP3 Messenger RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is Associated with Activity of Lupus Nephritis	5
	- B Lymphocyte (BLyS) Related Signatures are Associated with Active Lupus Nephritis	16
	- Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a Molecular Prognostic Marker of Lupus Nephritis	36
III.	Genetic polymorphism of drug toxicity or pharmacokinetics in SLE patients	59
IV.	The characterization of DNA methylation patterns in c-IAP1, c-IAP2 and FUT8 genes: Role of DNA methylation in lupus T cells	89
V.	Genome-wide scanning for SLE disease using SNP microarrays and pooling approach	182
	- Functional Characterization of Genetic Polymorphisms (IFI16, MND4 AND AIM2) Associated with SLE Disease	183

LIST OF TABLES

CHAPTER II. Discovery of novel biomarkers from urinary messenger RNAs

(mRNAs) in lupus nephritis

- Part I: FOXP3 Messenger RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is Associated with Activity of Lupus Nephritis

Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients	9
Table 2. Comparison of parameters between patients with cellular crescents and without cellular crescents	11
Table 3. Comparison of parameters between patients with fibrinoid necrosis and without fibrinoid necrosis	12

- Part II: B Lymphocyte (BLyS) Related Signatures are Associated with Active Lupus Nephritis

Table 1 patient characteristics at the time of kidney biopsy.	23
Table 2 Serum levels of BLyS and APRIL	24
Table 3 Correlations of blood BLyS and APRIL levels with lupus activity parameters, pathological score and prior treatment classify in renal and systemic involvement.	24
Table 4 Baseline biological and histological variables at the time of biopsy and on the next 6-month of follow up between CR and non CR groups (P.34)	29

- Part III: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a Molecular Prognostic Marker of Lupus Nephritis

Table 1 Clinical and histological variables at the time of biopsy	43
---	----

CHAPTER III. Genetic polymorphism of drug toxicity or pharmacokinetics in SLE patients

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย	68
ตารางที่ 2 แสดง pharmacokinetic parameters ของ mycophenolic acid แยกตามชนิดของยา mycophenolate ที่ผู้ป่วยจำนวน 20 รายได้รับ	69

ตารางที่ 3 แสดงค่า correlation coefficient (r) ของความสัมพันธ์ระหว่าง MPA AUC ₀₋₁₂ และ clinical outcomes ในผู้ป่วยจำนวน 20 ราย	72
ตารางที่ 4 แสดงค่า correlation coefficient (r) ของความสัมพันธ์ระหว่าง MPA AUC ₀₋₁₂ และ clinical outcomes ในผู้ป่วยที่ได้รับยา mycophenolate สำหรับการรักษาในช่วง induction จำนวน 18 ราย	72
ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ MPA AUC ₀₋₁₂ และขนาดของยาที่ได้รับต่อน้ำหนักตัวในผู้ป่วยที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษาหลังการได้รับยา mycophenolate นาน 6 เดือนสำหรับการรักษาในช่วง induction	74
ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อการรักษาหลังได้รับยา mycophenolate จำแนกเป็น 3 กลุ่มตามค่าของ MPA AUC ₀₋₁₂ ในผู้ป่วยจำนวน 18 รายที่ได้รับยา mycophenolate สำหรับการรักษาในช่วง induction	75
ตารางที่ 7 แสดงค่า correlation coefficient (r) ระหว่าง MPA AUC ₀₋₁₂ กับ dosage/kg IBW ในผู้ป่วยจำนวน 20 รายแยกตามชนิดของยา mycophenolate ที่ได้รับ	75
ตารางที่ 8 แสดงค่า correlation coefficient (r) และค่า r ² ของความสัมพันธ์ระหว่าง MPA AUC ₀₋₁₂ กับค่า MPA ที่จุดเวลาต่างๆ ในผู้ป่วยจำนวน 20 รายที่ได้รับยา mycophenolate mofetil (MMF) หรือ enteric-coated mycophenolate sodium (EC-MPS)	76
ตารางที่ 9 แสดงค่า r ² ในการใช้ค่า MPA ที่จุดเวลาต่างๆ ในการสร้าง model เพื่อทำนายค่า MPA AUC ₀₋₁₂ ในผู้ป่วยที่ได้รับยา MMF หรือ EC-MPS จำนวน 20 ราย	77
ตารางที่ 10 แสดงค่า correlation coefficient (r) ของความสัมพันธ์ระหว่าง MPA AUC ₀₋₁₂ กับ ค่า MPA ที่จุดเวลาต่างๆ แยกตามชนิดของยาที่ได้รับคือ Mycophenolate mofetil (MMF) และ enteric coated mycophenolate sodium (EC-MPS)	78
ตารางที่ 11 แสดงค่า r ² ในการใช้ค่า MPA ที่จุดเวลาต่างๆ ในการสร้าง model เพื่อทำนายค่า MPA AUC ₀₋₁₂ ในผู้ป่วยที่ได้รับยา MMF จำนวน 14 ราย	79
ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ C ₀ และ C ₁ ในผู้ป่วยที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษาภายหลังการได้รับยา MMF นาน 6 เดือนสำหรับการรักษาในช่วง induction	80
ตารางที่ 13 แสดงค่าร้อยละของผู้ป่วยจำนวน 20 รายที่มีผลข้างเคียงของยา mycophenolate จำแนกตามประเภทของผลข้างเคียงของยาที่ได้รับ	80

ตารางที่ 14	แสดงความชุกของผู้ป่วยที่มีความหลากหลายของรูปแบบยีน UGT1A9*22	81
ตารางที่ 15	แสดง pharmacokinetic parameters ของ mycophenolic acid ที่ผู้ป่วยจำนวน 40 รายได้รับ	82
ตารางที่ 16	Characteristic of Thai patients with Rheumatologic disease.	83
ตารางที่ 17	Genotype and allele frequency for TPMT*3C polymorphism at position 719 A/G, exon 10 in Rheumatologic disease patients.	84
ตารางที่ 18.	อุบัติการณ์ในการเกิดการกดการทำงานของไขกระดูก (myelosuppression) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มคนไข้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกัน	85

CHAPTER IV. The characterization of DNA methylation patterns in c-IAP1, c-IAP2 and FUT8 genes:

Role of DNA methylation in lupus T cells

- Hypomethylation of LINE-1 but not Alu in lymphocyte subsets of systemic lupus erythematosus patients

Table 1. Patient demographics and medications. 94

Table 2. Correlation between DNA Methylation levels with clinical characteristics. 97

CHAPTER V. Genome-wide scanning for SLE disease using SNP microarrays and pooling approach

- Part I: Expression profile of HIN200 in leukocytes and renal biopsy of SLE patients by real-time RT-PCR

Table 1 Demographic characteristics of SLE patients and healthy controls 107

- Part II: Association of IFI200 Gene Polymorphisms with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus

Table 1. Putative functional single-nucleotide polymorphisms (SNP) and genotyping methods. 120

Table 2. Linkage disequilibrium coefficients (D' and r^2) among single-nucleotide polymorphisms (SNP) within MNDA, IFIX, IFI16, and AIM2. 121

Table 3. Genotype and allele frequencies for MNDA, IFIX, IFI16, and AIM2 polymorphisms in SLE patients and healthy controls. Significant results (p value < 0.05) indicated in bold type. 123

- Part III: Polymorphisms of the CTLA-4 Gene in Systemic Lupus Erythematosus and Graves' disease

Table 1 Genotype and allele frequencies of CTLA4 gene polymorphisms in SLE, GD patients and control subjects	132
Table 2 Haplotype analysis for +49 A/G (rs231775) and CT60 A/G (rs3087243)	133

LIST OF ILLUSTRATORS

CHAPTER II. Discovery of novel biomarkers from urinary messenger RNAs (mRNAs) in lupus nephritis

Part I: FOXP3 Messenger RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is Associated with Activity of Lupus Nephritis

- Figure 1 . The correlation between pathological activity index score and FOXP3 mRNA levels (log scale) ($r = -0.330$, $P = 0.04$). 10
- Figure 2. The correlation between percentage of cellular crescents and FOXP3 mRNA levels (log scale) ($r = -0.479$, $P = 0.02$). 10
- Figure 3 . The correlation between percentage of fibrinoid necrosis and FOXP3 mRNA levels (log scale) ($r = -0.461$, $P = 0.03$) (P.17) 11
- Figure 4. FOXP3 mRNA levels in active patients (all patients defined active by pathological criteria) and inactive patients (3 patients defined inactive by pathological criteria and 5 patients defined by clinical remission) 12
- Figure 5. Probability of stable or improved renal function by MDRD formula in high FOXP3 mRNA levels (> 0.305 log scale) and low FOXP3 mRNA levels (< 0.305 log scale) 13

Part II: B lymphocyte (BLyS) Related Signatures are associated with Active Lupus Nephritis

- Figure 1: The correlation between bloods APRIL levels with activity indices ($r = 0.34$; p -value = 0.02) and 24-hour urine protein ($r = 0.44$; p -value < 0.01). 25
- Figure 2: ROC curve of blood APRIL levels in predicting failure to treatment. Cut-off point 3.6 ng/ml (sensitivity 64.0%; specificity 78.0%). Area under the ROC curve: 0.691 (95% CI: 0.499 - 0.884; $p = 0.079$). 26
- Figure 3: Blood APRIL in predicting failure to treatment by cut-off point 3.6 ng/ml 27
- Figure 4: Blood APRIL levels among CR and non CR groups at baseline and on the next day 180 of follow-up. 28

Part III: Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a Molecular Prognostic Marker of Lupus Nephritis

Figure 1. Intra-renal vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA and renal pathology.	45
Figure 2. Coordinated expression of intra-renal VEGF and related genes.	46
Figure 3. Immunohistochemistry localization of VEGF within renal biopsies of patients with lupus nephritis or kidney donors (implantation biopsy)	47
Figure 4. Analysis of the relationship between VEGF mRNA levels and a loss of renal function in 12 months.	49
Figure 5. Study of a podocyte marker (WT-1) and VEGF from urine samples of lupus nephritis patients.	50

CHAPTER III. Genetic polymorphism of drug toxicity or pharmacokinetics in SLE patients

รูปที่ 1 กราฟแสดงค่าของ plasma MPA concentration ณ เวลาต่างๆ ภายหลังจากการรับประทานยา MMF และ EC-MPS	71
รูปที่ 2 การทำงานของเอนไซม์ TPMT ภายในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย SLE จำแนกตามลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT	86

CHAPTER IV. The characterization of DNA methylation patterns in c-IAP1, c-IAP2 and FUT8 genes: Role of DNA methylation in lupus T cells

- Hypomethylation of LINE-1 but not Alu in lymphocyte subsets of systemic lupus erythematosus patients

Figure 1. DNA methylation levels in SLE CD4+ T cells, CD8+ T cells, and B cells compared to normal control of (A) LINE-1 and (B) Alu were shown in Mean±SEM.	97
--	----

CHAPTER V. Genome-wide scanning for SLE disease using SNP microarrays and pooling approach

- Part I: Expression profile of HIN200 in leukocytes and renal biopsy of SLE patients by real-time RT-PCR

Figure 1 Comparison of IFN-inducible gene expressions in leukocytes from 10 normal controls and 20 SLE patients.	109
--	-----

Figure 2 Comparison of IFIX and IFI16 isoform expressions in leukocytes from 10 normal controls and 20 SLE patients. 110

Figure 3 Correlation analyses between MND A expression and clinical assessments in 20 SLE patients. 111

- **Part II: Association of IFI200 Gene Polymorphisms with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus**

Figure 1. A. The effect of SNP rs866484 genotypes on apoptotic response of healthy PBMC treated with 10 μ g/ml doxorubicin for 24 h. B, C, D. The ratio of short product/full-length product grouped by SNP rs856084 genotypes of IFIX and SNP rs1772414 genotypes of IFI16 123

- **Part III: Polymorphisms of the CTLA-4 Gene in Systemic Lupus Erythematosus and Graves' disease**

Table 1 Genotype and allele frequencies of CTLA4 gene polymorphisms in SLE, GD patients and control subjects 132

Table 2 Haplotype analysis for +49 A/G (rs231775) and CT60 A/G (rs3087243) 133

CHAPTER I

Project Outputs Summary

ARTICLE PUBLICATIONS

Original Articles

- 1) Yingyos Avihingsanon, Thitima Benjachat, Adis Tassanarong, Pimpayao Sodsai1, Vipawee Kittikovit and Nattiya Hirankarn. Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney International* (2009) 75, 1340–1348. (IF = 6.418)
- 2) Kimkong, Y Avihingsanon and N Hirankarn. Expression profile of HIN200 in leukocytes and renal biopsy of SLE patients by real-time RT-PCR. *Lupus* 2009 18: 1066. (IF = 2.244)
- 3) Kimkong, Y Avihingsanon and N Hirankarn. Association of IFI200 Gene Polymorphisms with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2010; 37:7. (IF = 4.136)
- 4) Paungpaga Lertdumrongluk, Poorichaya Somparn, Wonngarm Kittanamongkolchai, Opas Traitanon, Somratai Vadcharavivad and Yingyos Avihingsanon. Pharmacokinetics of mycophenolic acid in severe lupus nephritis. *Kidney International* (2010) 78, 389–395. (IF = 6.193)
- 5) Jeerawat Nakkuntod, Yingyos Avihingsanon, Apiwat Mutirangura and Nattiya Hirankarn. Hypomethylation of LINE-1 but not Alu in lymphocyte subsets of systemic lupus erythematosus patients. *Accepted in Clinica Chimica Acta* 2011. (IF = 2.535)
- 6) Ingorn Kimkong, Jeerawat Nakkuntod, Siritwalee Sae-Ngow, Thiti Snabboon, Yingyos Avihingsanon and Nattiya Hirankarn. Polymorphisms of the CTLA-4 Gene in Systemic Lupus Erythematosus and Graves' Disease (submitted)

Review Article

Y. Avihingsanon and N. Hirankarn. Major lupus organ involvement: severe lupus nephritis. *Lupus* 2010 19: 1391(IF = 2.586)

CHAPTER II

Discovery of novel biomarkers from urinary messenger RNAs (mRNAs) in lupus nephritis

FOXP3 Messenger RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is Associated with Activity of Lupus Nephritis

Thongboon A, Avihingsanon Y, Benjachat T, Hirankarn N, Townamchai N, Traitanon O, Kanjanabuch T, Praditpornsilpa K, Tungsanga K, Eiam-Ong S

ABSTRACT

Background: Regulatory T cells play a central role in pathogenesis of autoimmunity in particular lupus. The Forkhead/winged Helix Transcription Factor (FOXP3) regulates functions of regulatory T cells. We evaluated the association between FOXP3 expression and pathologic activity of lupus nephritis.

Methods: Thirty nine patients with clinically active lupus nephritis underwent renal biopsy. All patients received standard immunosuppressive treatment. The patients had regular clinic visits monthly. FOXP3 messenger RNA levels in PBMCs were determined by real-time quantitative polymerase chain reaction.

Results: FOXP3 mRNA levels in PBMCs from patients with active lupus nephritis were significantly lower than inactive lupus nephritis (0.42 ± 0.46 vs 1.09 ± 0.65 ; p value =0.001). Expression levels of FOXP3 mRNA were associated with pathological activity index (R=-0.330, p value =0.04), cellular crescent (R=-0.479, p value = 0.02) and fibrinoid necrosis (R=-0.461, p value = 0.03), but not associated with chronicity index or steroid dosage. FOXP3 mRNA levels could accurately predict a stable/improved renal function (MDRD GFR) after treatment (positive and negative predictive value of 81.3% and 33%, respectively)

Conclusion: Expression of FOXP3 in peripheral blood mononuclear cells is associated with activity of lupus nephritis. This method may provide a non-invasive assessment of lupus nephritis and predict short-term renal outcomes.

INTRODUCTION

Lupus nephritis is a prototypic autoimmune disease characterized by the production of autoantibodies and the development of immune complex glomerulonephritis. The precise pathogenesis of lupus nephritis has remained elusive. Regulatory T cells (Tregs) play a central role in controlling self - tolerance. Recently several groups identified the forkhead family transcription factor forkhead box protein P3 (FOXP3) as a specific marker of regulatory T cells that programs the development and function of these cells. In mice, the lack of foxp3 expressing Tregs is sufficient to break down self - tolerance and induced autoimmune disease, so we think the loss of self-tolerance is attractive hypothesis to explain the pathogenesis of lupus nephritis.

Clinical manifestation of lupus nephritis were variable. There were limitation of routine clinical and laboratory indices eg. clinical activity index, proteinuria, serum creatinine , complement levels to assess the activity of disease. Although, renal pathological finding is the gold standard to diagnostic the severity of lupus nephritis, repeated renal biopsy is not practical due to its invasiveness and potential unacceptable complications. Therefore, a noninvasive tool to evaluated activity of lupus nephritis is extremely warranted. We aimed to assay the correlation of FOXP3 messenger RNA levels and pathological activities of lupus nephritis patients .

MATERIALS AND METHODS

Patients

In total, 39 patients who had been diagnosed with SLE according to the American College of Rheumatology diagnostic criteria for SLE and all patients had renal involvement. Renal involvement was documented by having two of the following criteria: a total urinary protein levels of more than 0.5 g/day, urinary RBC more than 5 cells/HPF, an increment of serum creatinine

levels of more than 0.5 mg/dl from baseline or serum creatinine levels more than 1.3 mg/dl. All patients underwent renal biopsy.

Collection of blood sample and RNA isolation

Blood samples were collected in EDTA tube from each individual patient at renal biopsy period.

Quantitation of mRNA by quantitative PCR

Total RNA was isolated from PBMCs, quantified and reverse transcribed to complementary DNA (cDNA). We designed and synthesized oligonucleotide primers and fluorogenic probes for the measurement of mRNA levels of FOXP3 and 18S ribosomal RNA (rRNA)

PCR analysis was performed by a two-step process, a preamplification step followed by measurement of mRNA with Light Cycler machine. Transcript levels were calculated by a standard curve method then transformed in log-scale and mRNA copy numbers were normalized with the use of 18S rRNA copy numbers.

Kidney biopsy

The findings of the kidney biopsy were evaluated according to the ISN/RPS 2003 classification. The pathological activity index is the sum of semiquantitative manual scores (each ranging 0-3) for the following parameters: endocapillary hypercellularity, leukocyte infiltration, subendothelial deposits, interstitial inflammation, fibrinoid necrosis or karyorrhexis, cellular crescents. Scores of the last 2 parameters are counted double, making a total activity index of 0-24. The chronicity index is the sum of semiquantitative manual scores (each ranging 0-3) for the following parameters: glomerular sclerosis, fibrous crescents, tubular atrophy, and interstitial fibrosis. The maximum score of the chronicity index is 12. Evaluation of biopsy specimens was performed by single pathologist.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS software (version 11.5). The results are presented as the mean \pm SD unless specified otherwise. Correlation analysis used Pearson's correlation in continuous data, spearman's rank correlation in ordinal scale. Comparison analysis used Student's t- test in normal distribution data, Mann- Whitney U test in non normal distribution .P values less than 0.05 were considered significant. All probabilities were 2-tailed.

RESULTS

Patient characteristics

We studied blood samples from 39 patients. Their demographic and clinical data are summarized in Table 1. The subsequent renal diagnosis of these 39 patients were focal proliferative lupus nephritis in 13 patients, diffuse proliferative lupus nephritis in 20 patients, pure membranous lupus nephritis in 3 patients and sclerosing lupus nephritis in 3 patients. The mean \pm SD pathological activity and chronicity indices as scored on the renal biopsy specimens were 6.9 ± 5.1 and 3.0 ± 2.6 , respectively. Cellular crescents and fibrinoid necrosis were presented in 13 patients (33%) and 14 patients (36%) , respectively.

FOXP3 mRNA expression in PBMCs and severity of lupus nephritis

There were inverse correlation between FOXP3 mRNA in PBMCs and pathological activity index, percentage of cellular crescents and percentage of fibrinoid necrosis ($r = -0.330$; $P = 0.04$, $r = -0.479$; $P = 0.02$, $r = -0.461$; $P = 0.03$, respectively) (Figure 1,2 and 3) . No correlation between FOXP3 mRNA and chronicity index.

Subgroup analysis showed that the gene expression of FOXP3 in cellular crescentic group or fibrinoid **necrosis** group was significantly lower than that in non -cellular crescentic group or non fibrinoid **necrosis** group (0.2 ± 0.5 vs 0.6 ± 0.5 ; $P = 0.04$ and 0.2 ± 0.5 vs 0.6 ± 0.4 ;

P=0.03) ,respectively. There were no significant differences in other conventional indices eg. SLEDAI clinical activity index, serum creatinine, urine protein, complement levels (Table 2 and 3) and then we found that FOXP3 mRNA levels were significantly different in active patients and inactive patients (0.42 ± 0.46 vs 1.09 ± 0.65 ; P= 0.001), respectively (Figure 4).

Table 1. Demographic and clinical characteristics of patients

Parameters	Number	Mean \pm SD
Gender (F : M)	36 : 3	-
Age (years)	39	30.92 \pm 7.29
ISN/RPS classification 2003		
- Class III (A), (A/C)	13	-
-Class IV (A), (A/C)	20	-
- Class III (C) or IV (C)	3	-
- Pure Class V	3	-
Acivity score	39	6.85 \pm 5.09
Chronicity score	39	2.97 \pm 2.60
SLEDAI - 2K score	34	15.82 \pm 5.07
SCr (mg/dL)	39	1.15 \pm 0.89
MDRD GFR (mL/min)	39	86.54 \pm 43.73
Proteinuria (g/d)	39	4.03 \pm 2.82
C3 (mg/dl)	36	65.66 \pm 30.49
C4 (mg/dl)	35	12.54 \pm 6.71
CH50 (U/ml)	36	12.96 \pm 9.48
Anti dsDNA	35	262.76 \pm 411.29
(positive : negative)	(29:6)	
WBC (cells/ul)	39	9,888.46 \pm 4,982.39
Absolute lymphocyte count (cells/ul)	39	1,482.69 \pm 745.37

SLEDAI = SLE Disease Activity Index

ds DNA = double strand DNA

WBC = White Blood Cells

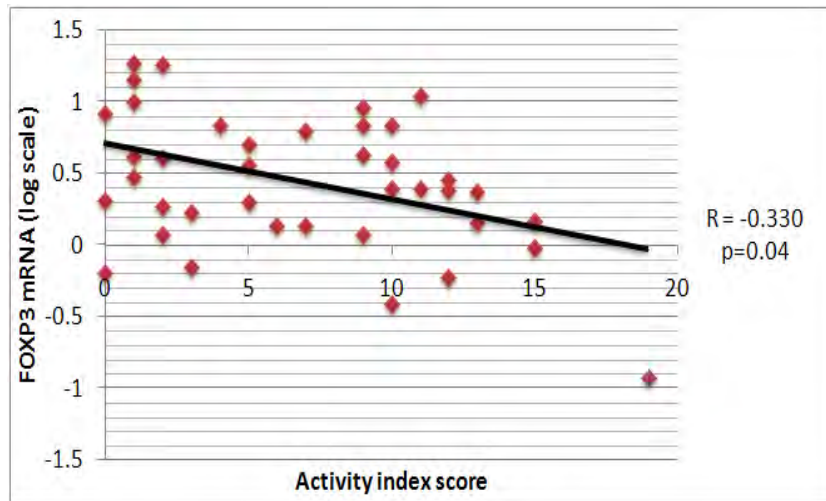


Figure 1 . The correlation between pathological activity index score and FOXP3 mRNA levels (log scale) ($r = -0.330$, $P = 0.04$).

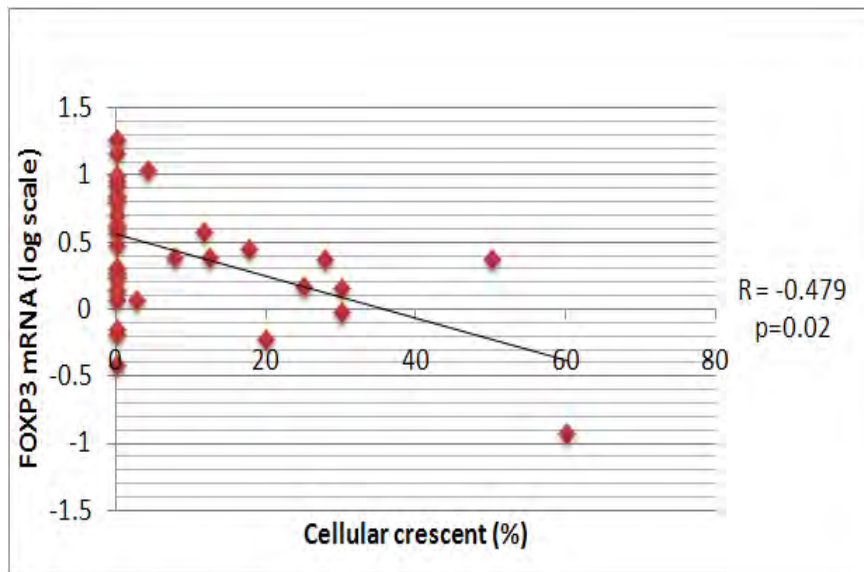


Figure 2. The correlation between percentage of cellular crescents and FOXP3 mRNA levels (log scale) ($r = -0.479$, $P = 0.02$).

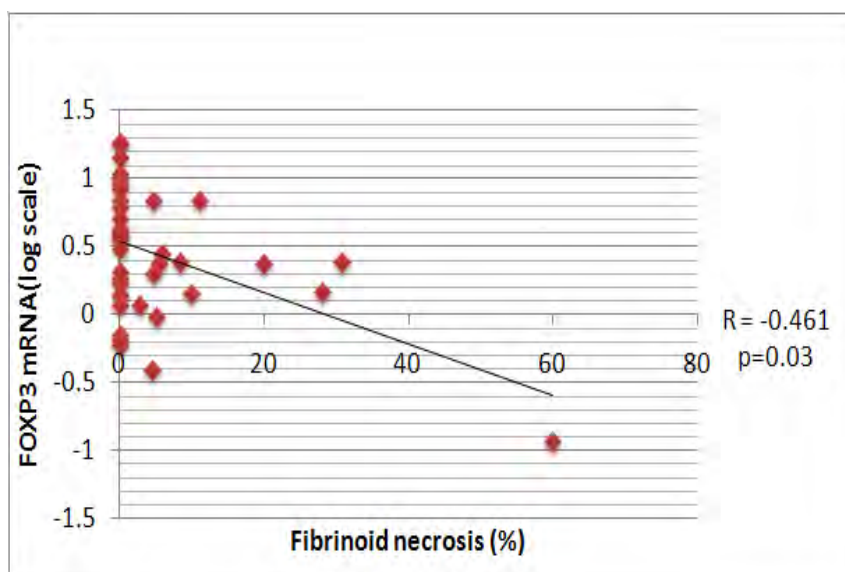


Figure 3 . The correlation between percentage of fibrinoid necrosis and FOXP3 mRNA levels (log scale) (r = -0.461, P=0.03)

Table 2. Comparison of parameters between patients with cellular crescents and without cellular crescents

Parameters	Crescent +ve (N=13)	Crescent -ve (N=26)	P value
FOXP3 mRNA	0.2 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.04
SLEDAI-2K	15.4 ± 3.9	16.0 ± 5.7	0.99
Urine protein	4.9 ± 3.3	3.5 ± 2.5	0.06
SCr	1.1 ± 0.5	1.2 ± 1.0	0.31
MDRD GFR	78.8 ± 35.5	90.4 ± 47.5	0.44
C3	61.1 ± 29.3	68.2 ± 31.5	0.51
C4	10.5 ± 6.3	13.6 ± 6.8	0.31
CH50	12.7 ± 10.1	13.1 ± 9.3	0.89
Anti-ds-DNA	323.3 ± 398.9	192.2 ± 386.9	0.045

Table 3. Comparison of parameters between patients with fibrinoid necrosis and without fibrinoid necrosis

Parameters	Fibrinoid +ve(N=14)	Fibrinoid -ve (N=25)	P value
FOXP3 mRNA	0.2 ± 0.5	0.6 ± 0.4	0.03
SLEDAI-2K	14.8 ± 3.9	16.4 ± 5.7	0.37
Urine protein	4.9 ± 3.2	3.5 ± 2.5	0.06
SCr	1.0 ± 0.5	1.2 ± 1.0	0.91
MDRD GFR	87.9 ± 42.7	85.8 ± 45.1	0.89
C3	60.2 ± 28.9	69.1 ± 31.6	0.40
C4	9.4 ± 5.5	14.4 ± 6.7	0.05
CH50	11.9 ± 10.5	13.6 ± 9.0	0.61
Anti ds-DNA	290.8 ± 391.0	205.4 ± 395.6	0.051

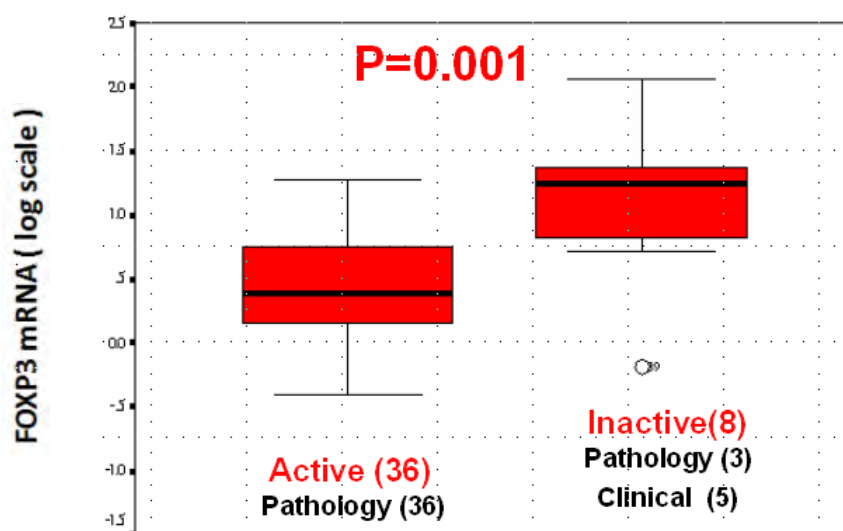


Figure 4. FOXP3 mRNA levels in active patients (all patients defined **active** by pathological criteria) and inactive patients (3 patients defined **inactive** by pathological criteria and 5 patients defined by **clinical remission**)

Prediction of renal function by FOXP3 mRNA expression

The receiver-operator characteristic (ROC) curves, the maximized and combined sensitivity and specificity was 0.305 (log scale). When we used this cut-off to define high FOXP3 group (≥ 0.305) and low FOXP3 group (<0.305), patients in high FOXP3 group showed a trend to had more stable or improved renal function at follow up period ($P=0.051$) (Figure 5).

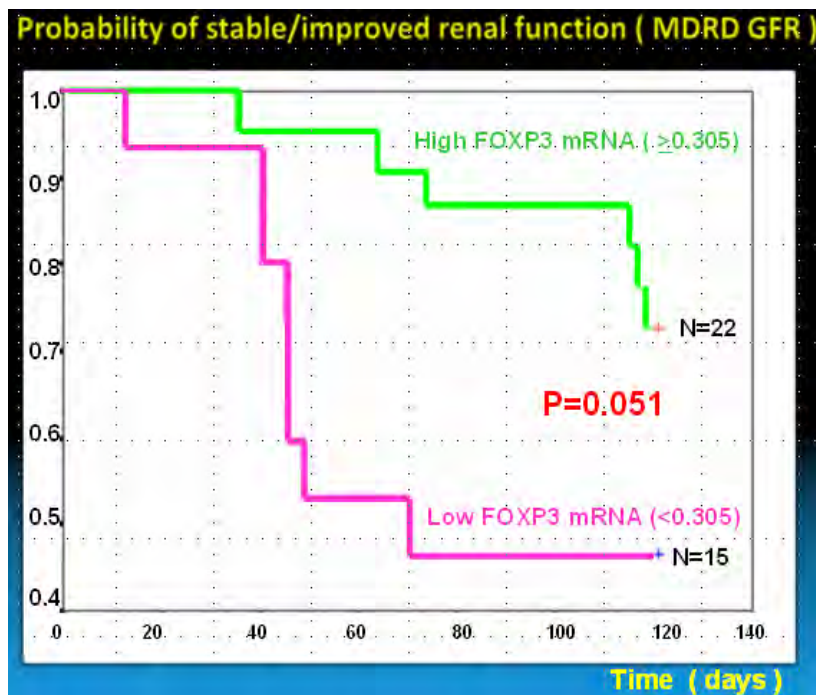


Figure 5. Probability of stable or improved renal function by MDRD formula in high FOXP3 mRNA levels (≥ 0.305 log scale) and low FOXP3 mRNA levels (< 0.305 log scale)

Steroid and FOXP3 mRNA expression

No correlation between FOXP3 mRNA in PBMCs and steroid dosage ($r=-0.04, P=0.81$)

DISCUSSION

Lupus nephritis is characterized by loss of immune tolerance to self-antigens with deposition of immune complexes in renal tissues. There are controversial data regarding the association of disease activity and the level of regulatory T cells in patients with lupus nephritis. We found the inverse correlation between FOXP3 mRNA in PBMCs and severity of lupus nephritis which defined by pathological findings eg. pathological activity index, cellular crescents and fibrinoid necrosis. The mRNA levels of FOXP3 was significantly decreased in patients who had more severe pathological findings, but the other conventional markers such as clinical activity index (SLEDAI-2K), urine protein, serum creatinine, complement levels etc. cannot discriminate in these patients. These results further support the hypothesis that loss of self-tolerance is the pathogenesis of lupus nephritis by decreasing of regulatory T cells that detected with downregulation of FOXP3 mRNA which associated the severity of lupus nephritis. We found that FOXP3 mRNA expression may predict stable or improved renal function, which the baseline characteristic in both groups no significant difference. We explained these results by regulatory T cells in high FOXP3 group could control the activity of lupus nephritis, although all patients received standard immunosuppressive drugs.

The effect of steroids to increase FOXP3 gene expression in asthmatic patients receiving inhaled glucocorticoids was reported by Karagiannidis et al. We did not found the correlation between steroid and FOXP3 mRNA levels, the precised conclusion will need further investigation.

This study showed the association between FOXP3 mRNA and pathological findings which are the gold standard for evaluated severity of lupus nephritis that differ from other studies.

The fact, FOXP3 mRNA expressed as the specific marker of regulatory T cells then we studied in PBMCs. We know that SLE is systemic disease, the conclusion of FOXP3 mRNA for specific diagnostic test in lupus nephritis will need further study in other conditions such as active SLE

without renal involvement and serial change of FOXP3 expression would be required to explore its role in the monitoring of lupus nephritis patients.

In summary, our study suggests that levels of FOXP3 mRNA in PBMCs by real-time PCR may be a useful noninvasive biomarker for assessment the activity of lupus nephritis.

B Lymphocyte (BLyS) Related Signatures are Associated with Active Lupus Nephritis

Worapot Treamtrakanpon, MD¹, Thitima Benjachat, MSc², Purida Sompachai, MSc², , Vipawee Kittikovit, MD³, Somchai Eiam-ong, MD¹, Yingyos Avihingsanon, MD¹

¹Division of Nephrology, Department of Medicine, ²Lupus Research Unit, ³Department of Pathology; Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

ABSTRACT.

BLyS and APRIL are tumor necrosis factor-family cytokines that play an important role in generating and maintaining the mature B-cell pool. There were higher blood levels of BLyS and APRIL mRNAs in SLE patients with higher disease activity, and strong expression of BLyS and APRIL mRNA was also found in renal tissues of lupus nephritis patients. BLyS blockade has now been shown to be a new effective therapeutic modality. So, we aim to conduct a longitudinal study to assess correlation between blood levels of BLyS and APRIL and the severity of lupus nephritis. Fifty-two lupus nephritis patients that underwent kidney biopsy were evaluated prospectively for at least 6 months. Renal SLEDAI score, anti-dsDNA, complements, blood BLyS and APRIL on biopsy day and renal pathological score were assessed. All patients were treated with the standard therapy. Reevaluation for response to treatment at 6 months was done. APRIL levels were correlated with activity index of renal pathology ($r=0.34$; $p\text{-value}=0.02$) and proteinuria ($r=0.44$; $p\text{-value}<0.01$) whereas BlyS level were correlated with all serum complement levels ($r=0.60$; $p\text{-value}<0.01$), WBC ($r=-0.485$; $p\text{-value}<0.001$), dose of steroid usage ($r=-0.54$; $p\text{-value}<0.01$). Blood APRIL levels could precisely predict failure of standard treatment (ROC-AUC 0.69(0.50-0.88): PPV 92%;NPV 35%). In conclusion, Blood APRIL correlated with activity of lupus nephritis. APRIL is a potential biomarker for predicting treatment failure.

INTRODUCTION

Lupus nephritis, the most common complication of systemic lupus erythematosus (SLE), needs rapidly intensive treatment. The early detection and prompt treatment with standard regimen can prevent the loss of kidney function. Today, there is no precised biomarker to evaluate the severity of lupus nephritis and to predict the treatment response. For this purpose, there are many studies attempting to find out the relationship between some protein levels in blood and urine and clinical outcome of lupus nephritis eg. mRNA of chemokine/ growth factors in urine (1), proteomic study by gel electrophoresis or desorption /ionization method (2-3). In addition, the evidence that abnormal immune tolerance by T cell regulation leading lupus flare, high blood FOXP3 mRNA have shown to be a good predictor for a stable or improved renal function after treatment.

B-cell regulation plays a pivotal role in mechanism of SLE with nephritis. Abnormality of humoral immunity leads to antibody production and formed immune complexes(4-5). Specific Selective B cell blockade by different approaches have been evaluated for the treatment of the disease. B lymphocyte stimulator (BLyS), B cell–Activating Factor . BLyS gene expression and levels of membrane-associated soluble BLyS are regulated by cytokines, in particular interferon- γ and to a lesser extent interleukin-10 (7).The biologically active soluble form of BLyS binds to 3 receptors expressed primarily on B lymphocytes: TACI (TNF transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor), BCMA (B lymphocyte maturation antigen), and BR3 (BAFF/BLyS receptor 3) (8-9). Activation of the BLyS receptors leads to B cell and plasma cell proliferation, differentiation, and survival and IgG class switching (6,10-11). A related TNF family member, APRIL (a proliferation-inducing ligand), can also bind TACI and BCMA. At the same time they can also mediate effects similar to those of BLyS, but their biological action may be primarily on memory plasma cells. BLyS–APRIL heterotrimers have also been characterized (12), but their function in vivo is unclear.

In a murine model of lupus, the expression of BLyS and APRIL is up-regulated in B cell concomittent with the onset of disease(13). Overexpression of BAFF in mice leads to autoimmunity with SLE-like symptoms. In contrast, mice deficient for APRIL have normal peripheral B cell populations but increased numbers of effector/memory T cells. Mice

overexpressing APRIL have an increased frequency of B cells and an increased level of serum IgM(12). Selective blockade of BLyS alone resulted in B cell depletion and splenic collapse and was sufficient to prevent and treat lupus nephritis in mice (14).

High levels of both blood BLyS and APRIL have been observed in patients with SLE. Blood APRIL levels in SLE patients were higher than in rheumatoid group of patients and normal healthy controls. Moreover, blood APRIL levels correlated significantly with musculoskeletal manifestations among patients with SLE (15-16). Furthermore, strong expression of BLyS and APRIL was found in plasma cells from the lymph node, bone marrow, and kidney. The levels of BLyS and APRIL mRNA in CD19+ B cells also correlated both with the titer of anti-double stranded DNA antibodies and with the SLE Disease Activity Index(17). Moreover, In neuropsychiatric lupus patients, the levels of APRIL in CSF that were 24-fold higher than those of healthy controls(18). There's also strong expression of APRIL and BLyS mRNA in renal tissue of patients with proliferative lupus nephritis(19). Nowadays, Belimumab, a fully human anti-BLyS monoclonal antibody, was approved by FDA in indication of add-on standard therapy for non-nephritis lupus(20). However, the relationship between circulating BLyS and APRIL levels and lupus nephritis activity has not been adequately clarified. So we designed the 6-month prospective study to assess the correlation between blood BLyS and APRIL concentrations and disease activity, pathological score, lab investigation and treatments received for SLE.

METHODS

Research design

A longitudinal study was conducted from March 2005 through June 2010 (complete the study) at Department of Medicine, King Chulalongkorn memorial Hospital (KCMH).

Study population

52 patients in the study, recruited from KCMH, must fulfill the 1997 American College Rheumatology revisited criteria for the classification of SLE and the patients are 18 years of age or older. They also have undergone kidney biopsy with adequate number of glomeruli (more than 10) for evaluate severity of lupus nephritis. All of them were treated with the standard

regimen and were monitored continuously. The SLE patients who have no renal involvement or pregnant are excluded.

Data collection

Participation in the study consisted of several parts: a clinical assessment with SLEDAI, laboratory determinations, histological parameters and blood levels of BLYS and APRIL on the kidney biopsy day or no more than 2 weeks apart and on the next 6-month day of follow up.

ELISA for measurement of BLYS

The collected plasma samples were assayed for BLYS by an antigen-capture enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). ELISA plates (Quntikine by R&D Systems, Inc.) were coated with mouse antihuman BLYS polyclonal antibody. Standards and samples were pipetted into the wells and any BLYS present were bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, polyclonal antibodies against BLYS conjugated to horseradish peroxidase were added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate (tetramethylbenzidine) was added to the wells and color develops in proportion to the amount of BLYS bound in the initial step. After incubation at room temperature and protection from light, the color was changed from blue to yellow. The color development was stopped with sulfuric acid and the intensity of the color is reading at the wavelength of 540 nm or 570 nm.

ELISA for measurement of APRIL

The collected plasma samples were assayed for APRIL by ELISA method, with similar construction as BLYS measurements. The kit reagents were produced by Bender MedSystems GmbH.

Renal histology

Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff, trichrome, and silver for light microscopy. The specimens were scored for activity and chronicity indices as described by Austin criteria (24). The maximum scores of the activity index and chronicity index were 24 and 12, respectively. The activity index was the sum of semiquantitative scores of the following parameters: endocapillary proliferation, fibrinoid necrosis, cellular crescents, leukocyte infiltration, hyaline thrombi, and interstitial infiltration. The chronicity index was the sum of semiquantitative scores of the following parameters: glomerular sclerosis, fibrous crescents, interstitial fibrosis, and tubular atrophy. A percentage of each parameter was calculated by the equations:

$$\text{Percentage of each pathology} = \frac{\text{Number of involved glomeruli} \times 100\%}{\text{Total number of obtained glomeruli}}$$

All biopsies were examined by one pathologist (VK) who was not aware of the results of the molecular studies. The samples were classified according to the histological types of LN using the ISN/RPS classification (25).

Renal SLEDAI

Renal SLE disease activity index at the time SLE patients visit are measured by the using MEX-SLEDAI scoring system (26).

As for MEX-SLEDAI scoring system, renal disease activity was scored on a 0-16 point scale according to the MEX-SLEDAI index. A higher score implies greater disease activity.

- Urinary casts (heme-granular or red blood cell casts)
- Hematuria (>5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection, or other cause)
- Proteinuria (>0.5 gram/ 24 hours)
- Pyuria (>5 white blood cells/high power field. Exclude infection)

Weight 4 score for each item

Endpoints

The primary endpoint was the correlation between blood BLYS level and the severity of lupus nephritis (disease activity, pathological score, lab investigation and treatments received for SLE). Secondary endpoint included the correlation between Blood BLYS level and blood APRIL, long term renal outcome and treatment response at the sixth month. Renal SLEDAI scored 0 for consecutive 3 months after 6-month treatment means complete remission.

Data analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS software (version 16, SPSS Inc, Chicago, IL) Continuous variables were summarized as mean \pm SE or median where appropriate and categorical variables used as frequency and percentage. Significant differences were calculated using Mann-Whitney tests for continuous variables. Correlation coefficients were calculated by Spearman's test. Failure to complete remission was determined by renal SLEDAI score > 0 at 6 months after standard treatment.

The box plot graph was done by GraphPad Prism (version 4.03).The ROC curve of APRIL levels was plotted using SPSS software. Differences of p-Value < 0.05 are considered statistically significance.

RESULTS

Patient characteristics

All patients (n=52) were active lupus nephritis defined by clinical and histological criteria (table 1). They were biopsy-proven class III or IV by the ISN/RPS classification. Mean ages were 32.9 years. The studied patients were predominantly female (96%).The mean disease duration before kidney biopsy was 5.9 years. Median Renal SLEDAI score in the active group were 12. Median daily prednisolone dosage was 22.5 mg. The immunosuppressive drugs were either oral mycophenolate or pulse intravenous cyclophosphamide (11.5% for both).

Most of them had nephrotic range proteinuria with normal serum creatinine. The serum complements (C3, C4 and CH50) were low while the ANA and anti-dsDNA titers were high. Mean activity score and chronicity score in the study group were 7.83 ± 0.7 and 3.01 ± 0.37 .

Serum levels of BlyS are associated with SLE disease activity

Serum levels of BlyS were increased as compared with inactive disease or healthy control (1.32 ± 0.15 vs. ng/ml) (Table 2).

BlyS levels were correlated well with serum complement level ($R_s = 0.6$; p-value < 0.01), total white cell count ($R_s = -0.485$; p-value < 0.001) and low dose steroid usage ($R_s = 0.543$; p-value < 0.001) (Table 3). However, there were no association between serum levels of BlyS and any parameters of nephritis.

Serum levels of APRIL are associated with renal histology

Serum levels of APRIL were increased as compared to inactive disease or healthy control (4.10 ± 0.30 vs ng/ml) (Table 2 and Table 3). APRIL levels were correlated with urine protein ($R_s = 0.438$, p-Value = 0.002) and renal pathology ($R_s = 0.335$; p-value = 0.017) as shown in figure 1. Patients with high serum levels of APRIL (≥ 3.6 ng /ml) have more severe pathologic features as compared with patients with low serum APRIL.

Table 1: patient characteristics at the time of kidney biopsy.

	(n=52)
Age, years	
Mean \pm SE	32.90 \pm 1.29
Range, years	26-39
Sex, no.	
Female	50 (96)
Duration of SLE, years	
Mean \pm SE	5.90 \pm 0.62
Renal-SLEDAI score \ddagger	
Median	12
Range	8-12
Prednisone use, no.(%)	47 (90)
Median dosage, mg/day	22.5
Dosage range, mg/day	7.5 – 50
Immunosuppressive drug use	
intravenous methylprednisolone	3
intravenous cyclophosphamide	6
cyclophosphamide	0
Mycophenolate mofetil	6
Azathioprine	1
Hydroxychloroquine	2
Extrarenal manifestation, no.(%)	12 (23)

\ddagger Renal-SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Score) use 4 end points as follows, UPCI or 24-hour urine protein \geq 0.5 g/day, urinary RBCs \geq 5/hpf, urinary WBCs \geq 5/hpf and urinary cellular casts \geq 1/hpf., and 4 points for each score (hpf = high-power field)

\dagger Significance of the difference among active and remission group, by Mann-Whitney U test.

Table 2 Serum levels of BLyS and APRIL

	Active LN*
BLyS, ng/ml ^a	1.32 ± 0.15
APRIL, ng/ml ^a	4.10 ± 0.30
Serum creatinine, mg/dl	1.06 ± 0.08
Proteinuria, g/day	3.59 ± 0.31
Urinary erythrocyte count, per high power field	50.84 ± 11.96
Immunological parameters ^a	
C3 (n=29)	53.98 ± 5.32
C4 (n=22)	10.21 ± 1.40
CH50 (n=25)	13.50 ± 2.94
ANA, titer (by IF) (n=30)	1,731.20 ± 606.29
Anti-dsDNA, titer (by IF) (n=23)	355.26 ± 92.44
Histological parameters	
Activity score	7.83 ± 0.70
Chronicity score	3.01 ± 0.37

^a Data are expressed as mean±SE.

* Include only lupus nephritis class **III** or **IV** by ISN/RPS 2003 criteria

Table 3: Correlations of blood BLyS and APRIL levels with lupus activity parameters, pathological score and prior treatment classify in renal and systemic involvement.

	BLyS			APRIL	
	Spearman	p-value		Spearman	p-value
	<i>r</i>			<i>r</i>	
R_SLEDAI	- 0.167	0.262	R_SLEDAI	0.219	0.148
SCr	0.065	0.649	SCr	0.063	0.666
Urbc	- 0.131	0.360	Urbc	0.062	0.674
Uprotein	-0.051	0.728	Uprotein	0.439	0.002*
A	- 0.111	0.432	A	0.335	0.017*
C	0.249	0.075	C	0.208	0.147

	BLYS	
	Spearman	p-value
	<i>r</i>	
ANA	- 0.201	0.286
Anti-dsDNA	- 0.362	0.002*
C3	0.560	0.002*
C4	0.621	0.003*
CH50	0.568	<0.001*
WBC	- 0.485	<0.001*
PMN	- 0.402	0.002*
Lymphocyte	- 0.417	<0.001*
Prednisolone	0.543	
(dose)		0.007*
Mycophenolate	0.369	
(dose)		0.0051
ACEI (dose)	0.272	0.005*
BLYS at 6 mo.	0.580	

	APRIL	
	Spearman	p-value
	<i>r</i>	
ANA	0.020	0.917
Anti-dsDNA	- 0.014	0.950
C3	- 0.340	0.071
C4	- 0.323	0.143
CH50	- 0.070	0.741
WBC	0.266	0.062
PMN	0.180	0.212
Lymphocyte	- 0.138	0.338
Prednisolone	0.077	0.595
(dose)		
Mycophenolate	- 0.091	0.528
(dose)		
ACEI (dose)	0.004	0.980
APRIL at 6 mo	0.573	0.001*

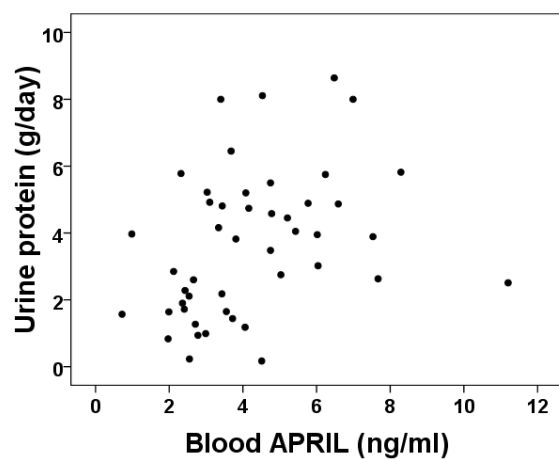
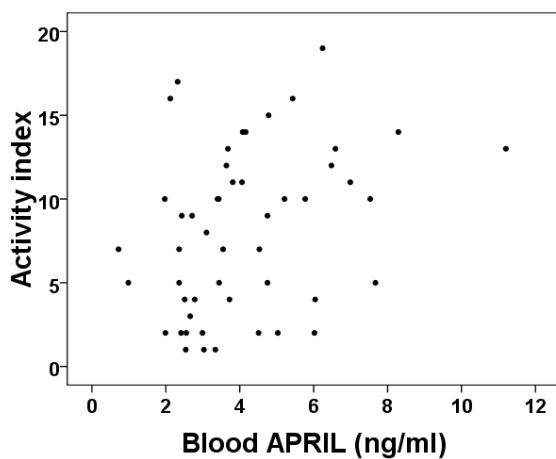


Figure 1: The correlation between blood APRIL levels with activity indices ($r=0.34$; $p\text{-value}=0.02$) and 24-hour urine protein ($r=0.44$; $p\text{-value}<0.01$).

Serum levels of APRIL predicted failure to immunosuppressive treatment

All patients with biopsy-proven class III / IV LN were treated with immunosuppressive drugs for six months after kidney biopsy. Twenty percent (9 of 45) achieved complete response to treatment within 6 months. We performed ROC analysis to determine the best cut-off that had the maximal sensitivity and specificity based on response to treatment (Figure 2). The blood cut-off level of 3.6 ng/ml could predict failure to treatment at 6 month with sensitivity of 64% and specificity of 78%, respectively (Figure 3). The patients with high levels of APRIL had a trend to failure to treatment (vs. % $P=0.05$).

After combined cut-off level of urine protein ≥ 2.5 g/day and blood APRIL ≥ 3.6 ng/ml, the sensitivity was % and specificity was 95.7% (figure 2, 3).

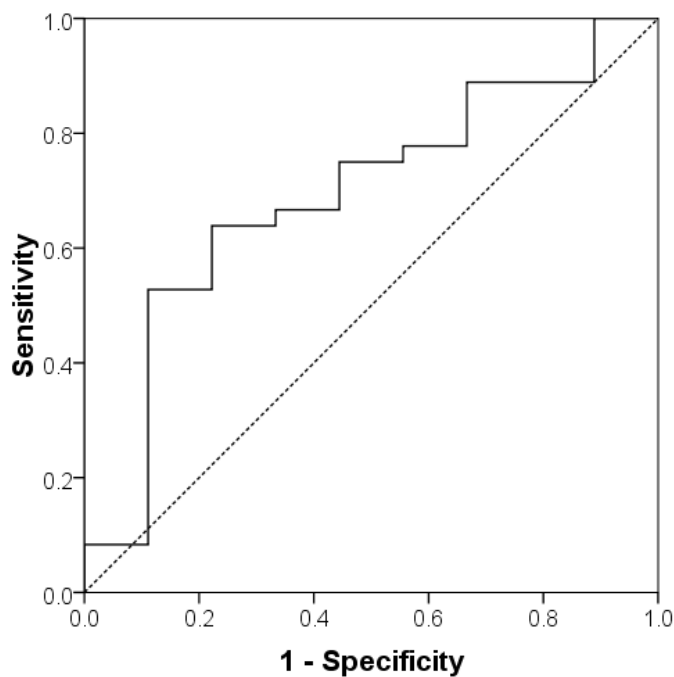


Figure 2: ROC curve of blood APRIL levels in predicting failure to treatment. Cut-off point 3.6 ng/ml (sensitivity 64.0%; specificity 78.0%). Area under the ROC curve: 0.691 (95% CI: 0.499 - 0.884; $p=0.079$).

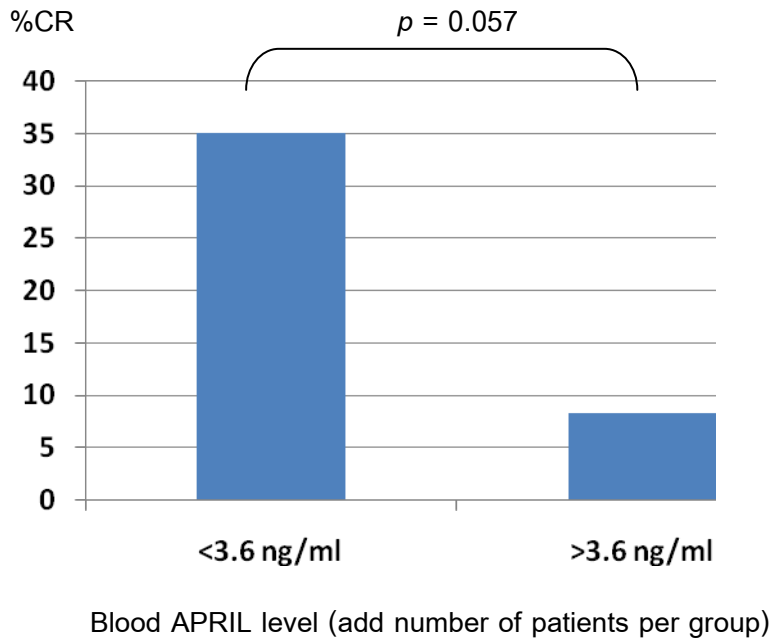


Figure 3: Blood APRIL in predicting failure to treatment by cut-off point 3.6 ng/ml

Serum levels of BLys and APRIL responded to immunosuppressive treatment

Serum levels of APRIL, but not BLys, were reduced at 6 months after immunosuppressive treatment. Serum levels of BLyS were not different between responder and nonresponder groups. The levels were not changed after 6-month of treatment (Table 4 and Figure 4).

Blood APRIL in the CR group were lower than non CR group in both time points and the levels at 6 month follow-up were significantly lower than those measured before treatment in both CR and non CR group ($p = 0.012$ and $p < 0.001$ in figure 4). So all of these results confirm that high level of blood APRIL was associated with active lupus nephritis

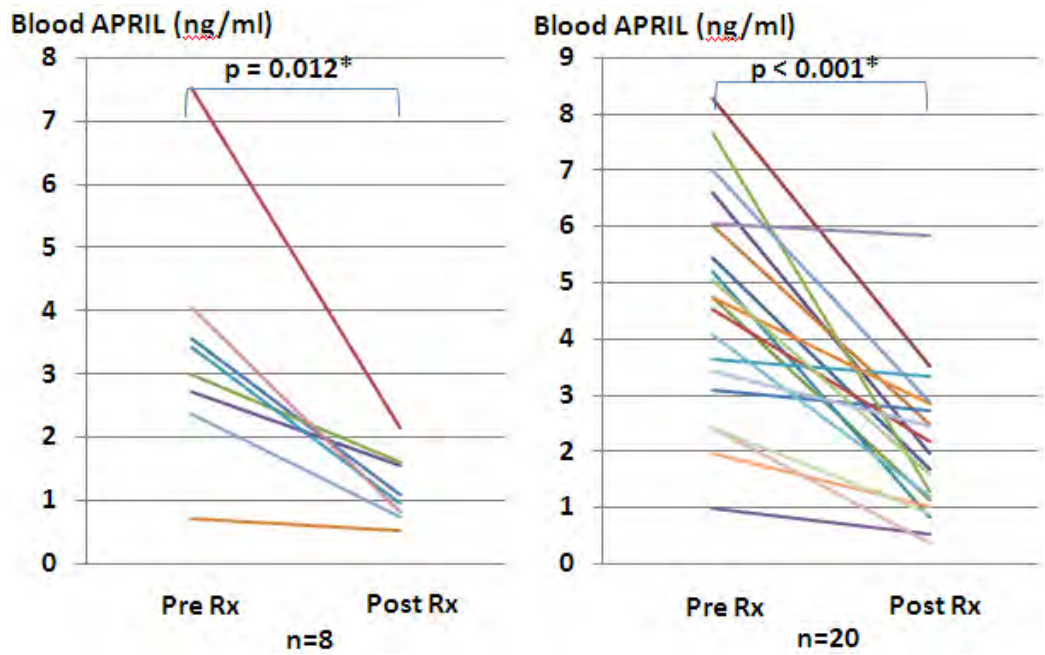


Figure 4: Blood APRIL levels among CR and non CR groups at baseline and on the next day 180 of follow-up.

Table 4: Baseline biological and histological variables at the time of biopsy and on the next 6-month of follow up between CR and non CR groups

	Day 0			Day 180		
	CR	Non CR	p-Value	CR	Non CR	p-Value
BLyS, ng/ml ^a	1.50 ± 0.50	1.50 ± 0.26	0.987	2.15 ± 0.64	2.06 ± 0.31	0.942
APRIL, ng/ml ^a	3.42 ± 0.69	4.65 ± 0.44	0.143	1.06 ± 0.20	2.25 ± 0.31	0.033†
Clinical parameters ^a						
Serum creatinine, mg/dl	0.91 ± 0.08	0.96 ± 0.11	0.799	0.80 ± 0.05	0.82 ± 0.07	0.845
Proteinuria, g/day	1.83 ± 0.32	4.23 ± 0.41	0.002†	0.32 ± 0.10	2.60 ± 0.60	0.001†
Urinary erythrocyte count, per HPF	45.88 ± 24.85	35.03 ± 9.31	0.617	2.25 ± 0.59	29.45 ± 13.37	0.056
Immunological parameters ^a						
C3 (n=5;12) (n=4;12)	52.6 ± 17.61	58.8 ± 8.15	0.717	84.75 ± 12.29	86.41 ± 7.56	0.913
C4 (n=5;9) (n=3;7)	10.27 ± 4.11	9.64 ± 1.71	0.869	18.7 ± 3.38	21.47 ± 5.00	0.743
CH50 (n=6;9) (n=3;5)	13.55 ± 3.84	16.50 ± 7.32	0.763	24.97 ± 3.87	20.82 ± 7.03	0.687
ANA (n=6;11) (n=3;5)	560.00 ± 229.09	1,469.09 ± 459.73	0.184	280.00 ± 183.30	912.00 ± 471.66	0.364
Anti-dsDNA (n=5;10) (n=3;6)	544.20 ± 223.88	302.00 ± 135.62	0.346	69.67 ± 46.05	11.05 ± 1.70	0.334
Histological parameters						
Activity score	7.88 ± 1.01	7.60 ± 1.01	0.875			
Chronicity score	2.25 ± 0.59	3.15 ± 0.70	0.449			

^a Data are expressed as mean±SE., * Include only lupus nephritis class **III** or **IV** by ISN/RPS 2003 criteria, † Significance of the difference among active and remission group, by Mann-Whitney U test., N/A, not applicable, CR = complete remission

Discussion

In this study we aimed to investigate the relationship between blood BLyS level and severity of lupus nephritis. We found that BLyS levels had correlation with all complement levels but inverse correlation with prior steroid dosage. Many previous literatures in the past had shown that BLyS expression and BLyS levels were correlated with SLE activity (17) and were suppressed rapidly in those taking steroid (21-22). The conflicting result could be explained by the steroid dosage that patients took before investigation. In group of patients that received steroid equivalent to prednisolone dose more than 30 mg/day had low blood BLyS level (<1pg/ml) (data not shown). And almost all of active lupus nephritis patients (>90%) have steroid exposed with dose varied more or less. Thus the mean levels of blood BLyS in the active group were lower than in the remission grouped and also had a pararell correlation with complements.

No study explored the relationship between the blood BLyS level and white blood cell counts. But in this study, we found that soluble BLyS that we detected had inverse correlation with total white cell counts, total polymorphonuclear (PMN) cells and total lymphocytes. On the basis, BLyS are produced and secreted by T cells, myeloid cells and dendritic cells. B cell can also produce small amount of BLyS to activate them as autocrine function. We knew that the blood BLyS level could be maintained by two factors, first the production rate and second the consumption rate. So we could expect to see high BLyS levels in the presence of neutrophilia and B cell lymphopenia. In acute phase of lupus nephritis flare, B cells play a major role in promoting the proinflammatory state, therefore we could speculate that there is an increasing of B cell numbers in this situation and the amount of B cells could not be the main factor to explain the association. We are unable to interpret why the BLyS levels have inverse correlation with total PMN but we believe that the answers are more complicated and need further investigations. These may be some reasons.

- BLyS levels depend on net balance of the production and consumption rate. And the blood sample we took for measuring BLyS level and white cell counts were not from the same time.
- Low BLyS levels may not represent true remission episode. Strong expression of BLyS mRNA could be the answer (23).
- Glomerulonephritis may increase BLyS excretion in the urine, thereby resulting in lower blood BLyS level. Future analyses of urine BLyS protein may prove to be highly informative.

Furthermore, we found the correlation between blood BLyS levels and mycophenolate (MMF) dose usage. After follow up, patients that maintain MMF for 6 months had high level of BLyS than patients whom maintained by other regimen (data not shown, p-Value =0.021). In our opinion, MMF had specific antiproliferative effect for lymphocytes, so B cell numbers should be suppressed and the rate of BLyS consumption would be low.

From the study, the BLyS levels were associated with systemic manifestation of SLE but had no association with all renal SLEDAI parameters and the renal pathology. We also found that BLyS levels at 6 months had parallel correlation with BLyS level at the baseline value, so the rate of change of BLyS was slow. In conclusion, BLyS levels are sensitive to steroid and MMF. In conclusion, blood BLyS is not good for determining the severity of lupus nephritis.

Although blood BLyS levels were associated with systemic lupus not nephritis, blood APRIL levels were associated with lupus nephritis (as shown in the result). Many literatures revealed that serum APRIL levels were correlated significantly with musculoskeletal manifestation of SLE, mostly arthritis (15-16). The levels of APRIL mRNA in CD19+ B cells correlated both with the titers of anti-double stranded DNA antibodies and with the SLE disease activity index. Furthermore, there was an overexpression of APRIL in kidney tissue from SLE patients (17,19). Similar to other studies, we found that blood APRIL levels were correlated significantly with the levels of proteinuria and activity score after being adjusted for immunosuppressive drugs by multivariate analysis. However, we did not find the

relationship between blood APRIL level and systemic parameters. It was difficult to make the interpretation due to the small size of population or it has been proven to be the truth that APRIL was found high level in local tissue inflammation particular nephritis. This was the first study that described the association between the blood APRIL level and severity of lupus nephritis (both clinical and pathological parameters).

There were some significant differences in active features of pathological indexes such as endocapillary proliferation, fibrinoid necrosis, PMN infiltrations and hyaline deposits between the active lupus nephritis patients that had blood APRIL levels above and below 3.6 ng/ml. After following up for 6 months, we also found that the active lupus nephritis patients who had baseline blood APRIL above 3.6 ng/ml, developed remission after standard treatment for less than 5%. Moreover, regard to data on the 6-month follow-up day, the clinical response of lupus nephritis to treatment was improved and the blood APRIL levels of that day were decreased in the indifferent rate among responder and non-responder group.

In lupus nephritis, proteinuria is a component of composite outcomes. It's associated with increasing incident of thromboembolic disease and cardiovascular events. Regression of proteinuria appears to be stronger predictor of prognosis. The knowledge about true mechanism of APRIL and how to develop proteinuria could help us understanding the pathophysiology of lupus nephritis and develop new strategies to attack APRIL for decreasing disease activity. Blood APRIL may be the other seromarker that use in determining the severity of lupus nephritis.

In conclusion, this study demonstrated the pivotal role of BLYS ligands in human lupus. Blood BLYS was associated with systemic manifestation whereas blood APRIL was associated with local manifestation (lupus nephritis). Blood APRIL levels may become the noninvasive approach serving as a practical tool in management of lupus nephritis. APRIL antagonists may be a new treatment for lupus nephritis.

REFERENCE

- [1] Oates JC, Varghese S, Bland AM, et al. Prediction of urinary protein markers in lupus nephritis. *Kidney Int.* 2005 Dec;68(6):2588-2592.
- [2] Avihingsanon Y, Benjachat T, Tassanarong A, et al. Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney Int.* 2009 Jun;75(12):1340-1348.
- [3] Zhang X, Jin M, Wu H, et al. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney Int.* 2008 Sep;74(6):799-807.
- [4] Tanaka Y. Anti CD-20 and other novel biotherapies for SLE. *APLAR journal of rheumatology [reviews]*. 2006;9:413-418.
- [5] Browning JL. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Jul;5(7):564-576.
- [6] Moore PA, Belvedere O, Orr A, et al. BLYS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science.* 1999 Jul 9;285(5425):260-263.
- [7] Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood.* 2001 Jan 1;97(1):198-204.
- [8] Gross JA, Johnston J, Mudri S, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature.* 2000 Apr 27;404(6781):995-999.
- [9] Thompson JS, Bixler SA, Qian F, et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science.* 2001 Sep 14;293(5537):2108-2111.
- [10] Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med.* 1999 Dec 6;190(11):1697-1710.
- [11] Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol.* 2002 Sep;3(9):822-829.
- [12] Dillon SR, Gross JA, Ansell SM, et al. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Mar;5(3):235-246.
- [13] Mackay F, Schneider P, Rennert P, et al. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:231-264.

- [14] Ramanujam M, Bethunaickan R, Huang W, et al. Selective blockade of BAFF for the prevention and treatment of systemic lupus erythematosus nephritis in NZM2410 mice. *Arthritis Rheum.* 2010 May;62(5):1457-1468.
- [15] Koyama T, Tsukamoto H, Miyagi Y, et al. Raised serum APRIL levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2005 Jul;64(7):1065-1067.
- [16] Hegazy M, Darwish H, Darweesh H, et al. Raised serum level of APRIL in patients with systemic lupus erythematosus: correlations with disease activity indices. *Clin Immunol.* 2010 Apr;135(1):118-124.
- [17] Chu VT, Enghard P, Schurer S, et al. Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009 Jul;60(7):2083-2093.
- [18] George-Chandy A, Trysberg E, Eriksson K. Raised intrathecal levels of APRIL and BAFF in patients with systemic lupus erythematosus: relationship to neuropsychiatric symptoms. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):R97.
- [19] Neusser MA, Lindenmeyer MT, Edenhofer I, et al. Intrarenal production of B-cell survival factors in human lupus nephritis. *Mod Pathol.* 2010 Oct 1.
- [20] Looney RJ. B cell-targeted therapies for systemic lupus erythematosus: an update on clinical trial data. *Drugs.* 2010 Mar 26;70(5):529-540.
- [21] Petri M, Stohl W, Chatham W, et al. Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008 Aug;58(8):2453-2459.
- [22] Stohl W, Metyas S, Tan SM, et al. B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations. *Arthritis Rheum.* 2003 Dec;48(12):3475-3486.
- [23] Collins CE, Gavin AL, Migone TS, et al. B lymphocyte stimulator (BLyS) isoforms in systemic lupus erythematosus: disease activity correlates better with blood leukocyte BLyS mRNA levels than with plasma BLyS protein levels. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(1):R6.
- [24] Austin HA, 3rd, Muenz LR, Joyce KM, et al. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int.* 1984 Apr;25(4):689-695.
- [25] Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Feb;15(2):241-250.

[26] Guzman J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, et al. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol.* 1992 Oct;19(10):1551-1558.

Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a Molecular Prognostic Marker of Lupus Nephritis

Yingyos Avihingsanon, MD^{1,2}, Thitima Benjachat, MSc¹, Adis Tassanarong, MD³, Pimpayoa Sodsai, MSc¹, Vipawee Kittikovit, MD^{1,4}, Nattiya Hirankarn, MD PhD^{1,5}

ABSTRACT

Recent studies have indicated that vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a crucial role in the preservation of renal function and may serve as a useful biomarker in monitoring the progression of lupus nephritis (LN). We sought to characterize a potential correlation between the intra-renal expression of VEGF and the renal histopathology and the prognosis of LN. We collected renal tissue from patients with active LN and measured mRNA and protein expression in the renal tissue by quantitative polymerase chain reaction and immunohistochemistry, respectively. All Class III or IV lupus nephritis by the ISN/RPS classification displayed a decreased level of intra-renal VEGF compared to those of kidney donors at the time of transplantation. Furthermore, VEGF mRNA levels were negatively correlated with certain histopathologic features, including glomerular endocapillary proliferation, crescent formation, and a high histological activity index. Interestingly, the reduction in intra-renal VEGF level was associated with increase in number of podocyte cells in the urine of patients with LN. Moreover, the level of intra-renal VEGF mRNA precisely predicted the deterioration of renal function in these patients within twelve months. In conclusion, expression of VEGF in renal tissue may serve as a molecular marker of renal damage from LN and may be a predictive factor for short-term loss of kidney function in lupus nephritis patients.

INTRODUCTION

Proliferative lupus nephritis (LN) is the most common and severe histology of lupus nephritis.(1) Steroids and cytotoxic drugs remain the most commonly used treatments despite the many associated adverse events.(2) Renal histology is essential for the selection of proper treatment and prognostication of the disease.(3) Specific histological findings, such as crescent formation, may determine prognosis.(3) However, immunosuppressive therapy could mitigate such pathology and therefore improve the renal prognosis.(4) Since the discovery of the molecular mechanisms of SLE, novel immunosuppressive therapies have been introduced.(5) Nevertheless, the mechanism of the loss of renal function remains unknown.(6) Studies of intra-renal molecular signatures could reveal the molecular mechanism of the disease and predict renal prognosis.(7-9) Finally, molecular classification may be integrated into the histological classification of lupus nephritis.

The integrity of the glomerular and peritubular capillaries is vital for renal function. Progressive capillary loss, with obliteration of the microvasculature, frequently accompanies fibrosis, which is a characteristic feature of progressive renal disease.(10, 11) Progression of glomerulopathy is, at least in part, due to loss of glomerular integrity. VEGF promotes survival, proliferation, and differentiation of glomerular endothelial cells.(12) Decreased expression of VEGF has been associated with various glomerulopathies such as crescentic glomerulonephritis, focal glomerulosclerosis, IgA nephropathy, pre-eclampsia, and aging kidneys.(10, 13, 14) Administration of VEGF has been shown to stabilize kidney function in many models including the remnant model, thrombotic microangiopathy, and chronic cyclosporine nephropathy.(15-18) The protective actions were principally mediated through preservation of glomerular and peritubular capillary structures.(18) A recent study in human diabetic nephropathy has confirmed the role of VEGF in maintaining renal vasculature and identified it as a novel biomarker.(19) Growing evidence supports the potential role of VEGF in SLE and nephritis, but the studies remain inconclusive.(13, 20-23)

Intra-renal quantitative gene expression may be used for grading of disease severity.(8) For instance, intra-renal TGF-beta gene expression could determine progression of chronic kidney disease.(9) In lupus nephritis, it is difficult to determine prognosis at the time of the renal flare. In a previous study, we suggested a serial non-invasive measurement of urinary mRNA for chemokines and growth factors that could predict the prognosis of this disease.(24) In this study, we aim to determine an association between intra-renal molecular signatures and renal histology. Furthermore, we determined whether the molecular signature in the kidney could predict the progression of lupus nephritis.

MATERIAL AND METHODS

Patients.

A total of 51 patients underwent renal biopsy for diagnostic evaluation of active lupus nephritis between 2002 and 2005. All patients had been diagnosed with SLE according to the 1997 American College of Rheumatology criteria. All biopsies were examined by one pathologist (VK) who was not aware of the results of the molecular study. The samples were classified according to the histologic types of LN using the ISN/RPS classification.(40) Six samples from patients with LN class V were excluded from the study. Ten samples were excluded due to inadequate number of glomeruli (less than five) or chronic scarring glomeruli. In class III or IV LN, patients were treated with oral prednisolone plus a six-month course of intravenous cyclophosphamide (41) or oral mycophenolate mofetil.(42) In rapidly progressive renal failure from crescentic LN, three consecutive doses of intravenous methylprednisolone were given and three sessions of plasmapheresis were performed. The patients then received oral prednisolone plus a six-month course of intravenous cyclophosphamide.(43)

The control group consisted of kidney samples from implantation biopsies after re-perfusion of kidney allografts. Inclusion criteria were living or deceased donors with normal serum

creatinine levels and donor age of less than 55 years. Kidney samples from patients with delayed graft function or prolonged ischemia time were excluded.

The study was approved by the Ethics Committee for Human Research of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and written informed consent was obtained from all patients.

Renal Histology

Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff, trichrome, and silver for light microscopy. The specimens were scored for activity and chronicity indices as described previously.(1) The maximum scores of the activity index and chronicity index were 24 and 12, respectively. The activity index was the sum of semiquantitative scores of the following parameters: endocapillary proliferation, fibrinoid necrosis, cellular crescents, leukocyte infiltration, hyaline thrombi, and interstitial infiltration. The chronicity index was the sum of semiquantitative scores of the following parameters: glomerular sclerosis, fibrous crescents, interstitial fibrosis, and tubular atrophy. A percentage of each parameter was calculated by the equation:

Percentage of each pathology = (Number of involved glomeruli / Total number of obtained glomeruli) x 100 %

RNA isolation from renal biopsy samples.

Diagnostic renal biopsy specimens from lupus nephritis patients were obtained and stored at -80 °C. RNA isolation, quantification, and reverse-transcription into complementary DNA were performed as described previously.(8)

Quantification of mRNA.

The mRNA of 18s rRNA, VEGF, ANGPT-1, TGF-beta, and HO-1 were measured using a Light Cycler machine (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). The sequences of primers and fluorescence probes are as follows: 18s rRNA sense, 5'gcc cga agc gtt tac ttt

ga 3'; 18s rRNA antisense, 5'tcc att att cct agc tgc ggt atc 3'; 18s rRNA probe, 5'FAM aaa gca ggc ccg agc cgc c TAMRA3'; VEGF sense, 5'cct aca gca caa caa atg tga atg 3'; VEGF antisense, 5'caa atg ctt tct ccg ctc tga 3'; VEGF probe, 5'FAM caa gac aag aaa atc cct gtg ggc ct TAMRA3'; ANGPT-1, sense 5'tgc aaa tgt gcc ctc atg tta 3'; ANGPT-1 antisense, 5'tcc cgc agt ata gaa cat tcc a 3'; TGF-beta sense, 5'ccc tgc ccc tac att tgg ag 3'; TGF-beta antisense, 5'ccg ggt tat gct ggt tgt aca 3'; TGF-beta probe, 5'FAM cac gca gta cag caa ggt cct ggc c TAMRA 3'; HO-1 sense, 5'gcc ctt cag cat cct cag ttc 3'; HO-1 antisense, 5'ggt ttg aga cag ctg cca cat 3'; HO-1 probe, 5'FAM tgc agc aga gcc tgg aag aca ccc TAMRA 3'. All primer pairs were designed to span across an intron-exon boundary to distinguish amplification of genomic DNA. Each PCR reaction was carried out in a 20 µl reaction volume composed of 2 µl of cDNA template and 18 µl of a real-time PCR mastermix that contained 10 µl of 2xQuantiTech Probe Mastermix (Qiagen Inc., CA, USA), 0.5 µM forward primer, 0.5 µM reverse primer, and 0.2 µM probe. No fluorescent signal was generated by these assays when genomic DNA was used as a substrate, which confirmed that the assays measured only mRNA. Levels of mRNA were analyzed by a comparative method.(44) The reference RNA was a pool of RNA from implantation kidney biopsies of live-donors. To control possible variation among PCR runs, VEGF and an 18s rRNA plasmid (housekeeping gene) were used as calibrators. The PCR amplicon for 18s rRNA was used for developing standard curves. The standard curves were based on the principle that a plot of the log of the initial target copy of a standard versus threshold cycles results in a straight line. Levels of mRNA were expressed as the number of copies per microgram of total RNA isolated from renal biopsy tissues.

Immunohistochemistry.

For immunohistochemistry, tissue samples were fixed in 4% buffered paraformaldehyde and embedded in paraffin. Deparaffinized sections were heated in a microwave oven with sodium citrate buffer. The rabbit anti-VEGF-A antibody sc152 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA; dilution of 1:100) and an Envision reagent kit (Dako, California, USA) were

used. The color product of peroxidase was developed by the 3,5 diaminobenzidine (DAB) substrate and counterstaining with hematoxylin. Negative controls included normal rabbit IgG.

Quantitation of the urine podocyte marker (WT-1) and VEGF.

To properly compare intra-renal and urinary gene expression, a 50 mL urine sample was collected on the day of kidney biopsy. The urine sample was immediately centrifuged after collection at 1000 g for 30 min at 4° C. Total RNA was isolated from the cell pellets using an RNA blood mini kit (Qiagen, Chatworth, CA), measured for concentration, and reverse-transcribed into complementary DNA as described previously.(24, 45) The mRNA levels of VEGF, WT-1 (podocyte marker), and 18s rRNA (housekeeping gene) were measured as described above.

Statistical Analysis.

Statistical analysis was performed using the SPSS software (version 11.5, SPSS Inc, Chicago, IL). The levels of mRNA deviated significantly from the normal distribution ($p < 0.001$) and were reduced by log-transformation. All data are given as mean and SE. The Mann-Whitney test was used for comparison between the two groups. The relationship between the mRNA levels of each group was estimated with Spearman's rho correlation. A loss of renal function was determined by a doubling of serum creatinine calculated from the renal biopsy date or end-stage renal disease. The criteria of ESRD included having a calculated MDRD-GFR below 15 mL/min or initiation of renal replacement therapy (dialysis or transplantation). To distinguish patients who had a loss of renal function, a receiver operating characteristic curve of mRNA levels was used to determine the cutoff levels that maximized the combined sensitivity and specificity. We estimated the probabilities of a loss of renal function using the Kaplan-Meier method and compared them using a log-rank test. All p-values below 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Patients.

Fifty-one biopsy samples were obtained during a diagnostic process of clinically active lupus nephritis. Ten samples were excluded due to an inadequate number of glomeruli (less than five) or chronic scarring glomeruli. Six samples from patients with LN class V were excluded. Thirty-four samples were from female patients. Mean (SE) age was 31 (1.27) years. The mean (SE) SLE disease activity index (SLEDAI) (25) and level of serum creatinine, 24 hour urine protein, and erythrocyturia were 10.58 (0.91), 1.74 (0.26) mg/dL, 3.53 (0.47) g/day, and 32.70 (15.47) cells/high power field, respectively (Table 1).

Ten samples of implantation biopsies from donor kidneys were used as controls. Six kidney samples were from living donors, and four were from deceased donors (Table 1). Histological examination of the wedge-biopsies revealed unremarkable findings except for minimal tubular injury.

Renal histology of lupus nephritis

Eight samples were class III and twenty-seven were class IV by the ISN/RPS classification of lupus nephritis (LN), respectively. More details of renal histology are demonstrated in Table 1. The mean (SE) of renal activity and chronicity indices were 7.49 (0.85) and 4.06 (0.53), respectively. Crescent formation was observed in 12 samples (34%). Other pathologies observed in the samples were endocapillary proliferation (82%), fibrinoid necrosis(34%), glomerular neutrophil infiltration(65%), and thrombotic microangiopathy (16%).

Table 1. Clinical and histological variables at the time of biopsy^a

	Controls ^b	Patients	p-value
Number	10	35	
Gender (Female/Male)	2/8	34/1	
Age (years)	33.40±3.76	31.74±1.27	0.74
Clinical parameters			
- Serum creatinine (mg/dl)	1.18±0.13	1.74±0.26	0.93
- Proteinuria (g/day)	0	3.53±0.47	<0.001
- Urinary erythrocyte count (per high power)	0	32.70±15.47	<0.001
- MDRD GFR (ml/min/1.73 m ²) ^c	81.10 ± 9.80	66.36±6.84	0.49
SLEDAI ^d	N/A	10.58±0.91	
Steroid dose (mg/day)	0	32.20±6.64	<0.001
Activity index	N/A	7.49±0.85	
Chronicity index	N/A	4.06±0.53	
Renal Histology			
III (S), (G) ^e	N/A	7, 1	
IV (S), (G) ^e	N/A	10, 17	
III (A), (A/C) ^e	N/A	4, 4	
IV (A), (A/C) ^e	N/A	16, 11	
Intra-renal mRNA levels			
VEGF	-0.08±0.13	-0.64±0.05	<0.001
HO-1	0.30±0.26	-0.45±0.06	0.002
TGF-beta	-0.03±0.15	-0.13±0.06	0.22
Angiopoeitin-1	0.16±0.38	0.60±0.08	0.44

^a Data are expressed as mean ± SE., ^b Control: implantation biopsy from 6 living donors and 4 deceased donors., ^c MDRD GFR, glomerular filtration rate at the time of biopsy., ^d SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index [25]., ^e S, segmental. G, global. A, active. C, chronic

N/A, not applicable, mg/dl, milligram per decilitre

Intra-renal expression of VEGF in lupus nephritis.

Levels of VEGF mRNA in the kidneys of lupus nephritis patients (n=35) were decreased as compared to the implantation biopsies of kidney donors (n=10) (-0.64±0.05 vs. -0.08 ± 0.13 log copies; p < 0.001) (Table 1). The levels of HO-1 were decreased in lupus nephritis (-

0.45± 0.06 vs. 0.30 ± 0.26 log copies; p=0.002), whereas the levels of transforming growth factor-beta (TGF- β) and angiotensin (ANGPT-1) were not different between patients and controls (-0.13 ± 0.06 vs. -0.03 ± 0.15 log copies; p= 0.22 and (0.60 ± 0.08 vs. 0.16 ± 0.38 log copies; p= 0.44).

Intra-renal VEGF mRNA levels were lower in samples with crescent formation (-0.98± 0.03 vs. -0.62±0.05 log copies; p=0.04). The biopsy samples with diffuse endocapillary proliferation (\geq 25 % of glomeruli) expressed lower VEGF levels (-0.72± 0.05 vs. -0.44 ± 0.06 log copies; p=0.003). Samples with a high activity score (score \geq 3 of total 24) expressed lower VEGF levels (-0.70 ± 0.05 vs. -0.40 ± 0.07 log copies; p=0.009). However, samples with glomerular neutrophil infiltration (\geq 25% of glomeruli) showed no difference in VEGF levels (-0.67 ± 0.08 vs. -0.62 ± 0.05 log copies; p=0.09). Fig. 1(A-D) shows that the presence of crescent formation, endocapillary proliferation, and a high activity index were associated with decreased VEGF mRNA levels.

Correlation between VEGF, transforming growth factor-beta (TGF- β), angiotensin-1 (ANGPT-1), and heme-oxygenase-1 (HO-1).

Since there is a functional relationship among genes in the hypoxia-inducible pathway such as VEGF, TGF- β , ANGPT-1, and HO-1, we attempted to determine the association between each mRNA level in the biopsy tissues. Fig 2 A-C shows that mRNA levels of VEGF were associated with TGF- β (R=0.41, p=0.02), and HO-1 (R=0.65, p < 0.0001), but not ANGPT-1 (R=0.15, p=0.41) mRNA levels.

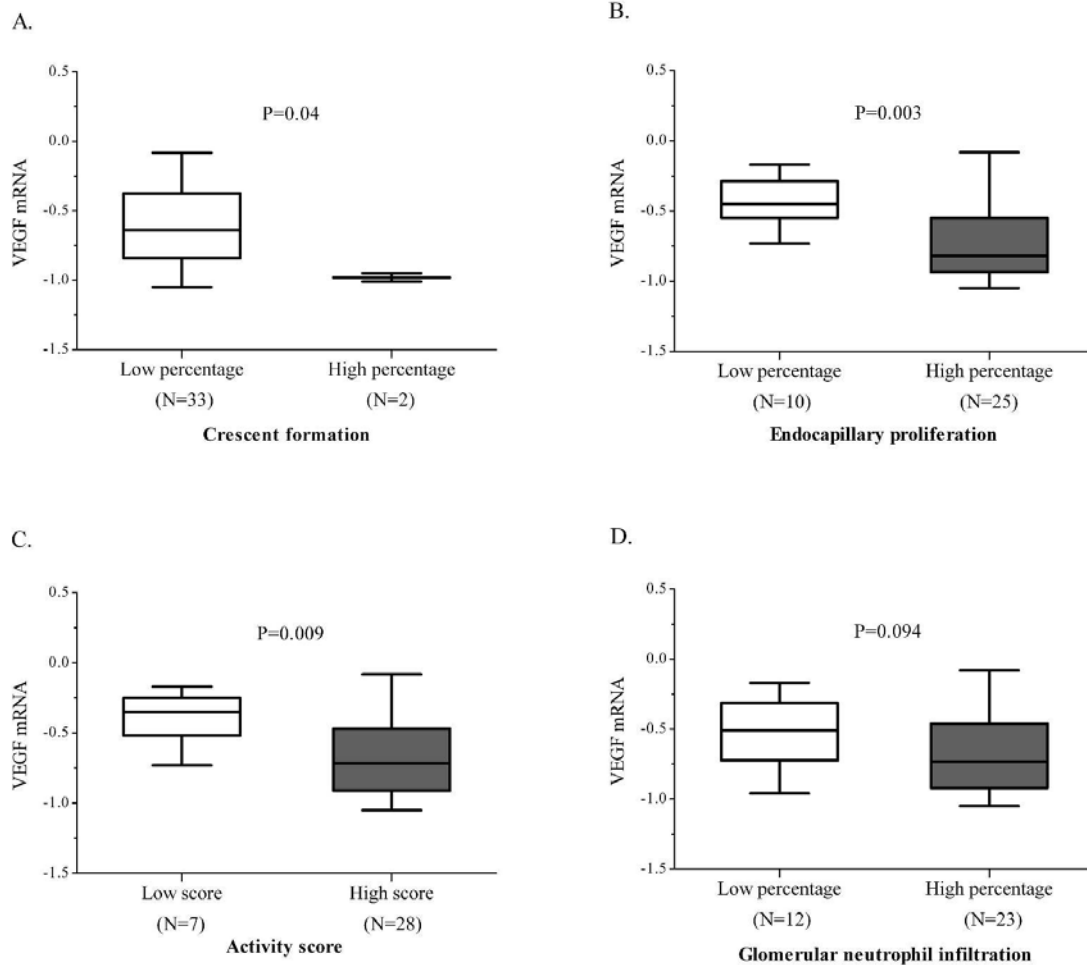


Figure 1. Intra-renal vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA and renal pathology. Box and whisker plots show the 10th, 25th, 50th (median), 75th, and 90th percentiles of values (log) for VEGF mRNA levels in the kidney tissue of patients with class III / IV lupus nephritis. The levels of VEGF mRNA were significantly lower in samples with the presence of crescentic formation (A), endocapillary proliferation ($\geq 25\%$ of glomeruli) (B), and high activity index (AI ≥ 3) (C), but not glomerular neutrophil infiltration ($\geq 25\%$ of glomeruli) (D). (p-value by Mann-Whitney test). Numbers in the parentheses indicate the number of biopsy samples.

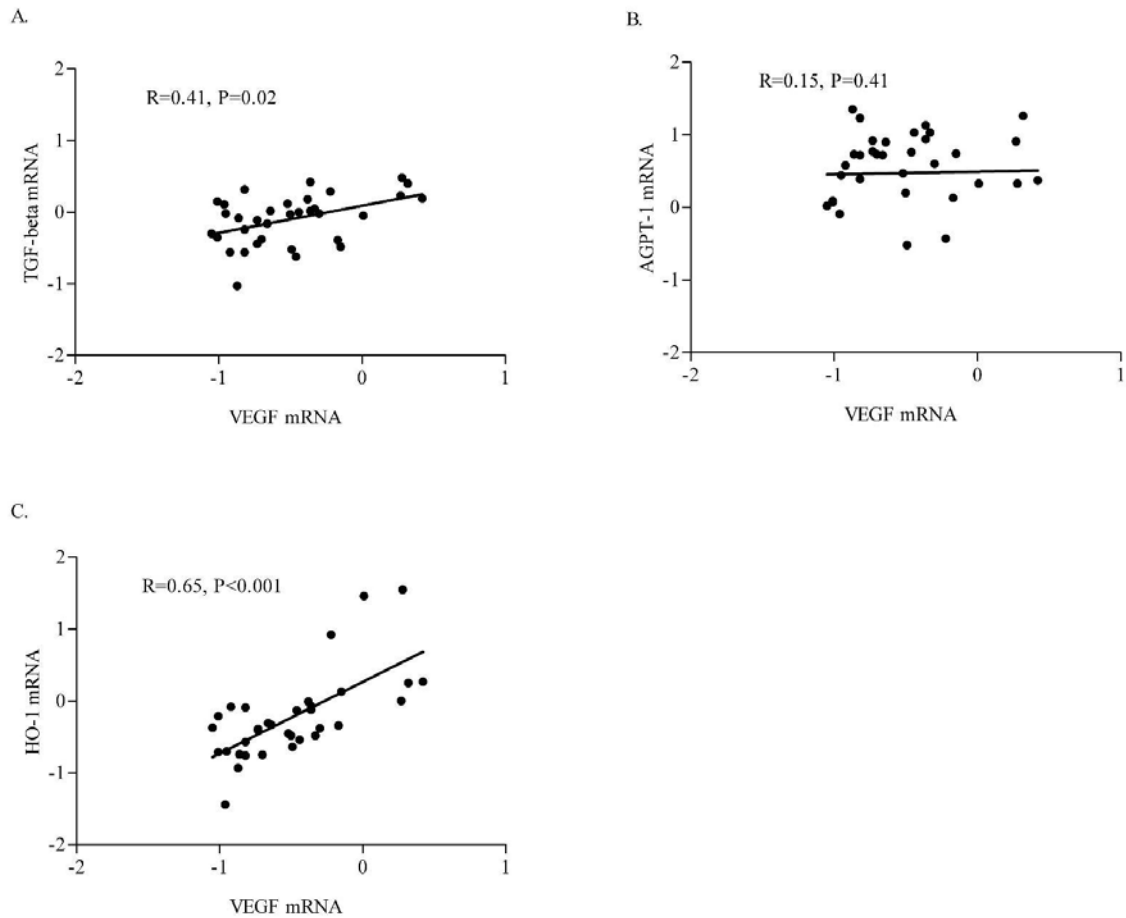


Figure 2. Coordinated expression of intra-renal VEGF and related genes. (A) The relationship between the levels of VEGF and TGF- β was significant at $P=0.02$ ($R=0.41$). (B) The relationship between the levels of VEGF and ANGPT-1 was not significant ($P=0.41$, $R=0.15$). (C) The relationship between the levels of VEGF and HO-1 was significant at $P < 0.0001$ ($R=0.65$).

Immunohistochemistry localization of VEGF within renal biopsies.

In kidney donors, the VEGF protein was expressed on podocytes and markedly expressed on tubular epithelial cells (Fig 3 C, E). In lupus nephritis, weak VEGF staining was observed in all samples (Fig 3 B, D, F). The VEGF protein was scarcely seen on glomeruli and tubular epithelial cells of samples with diffuse endocapillary proliferation (Fig 3B) or crescent formation (Fig 3D).

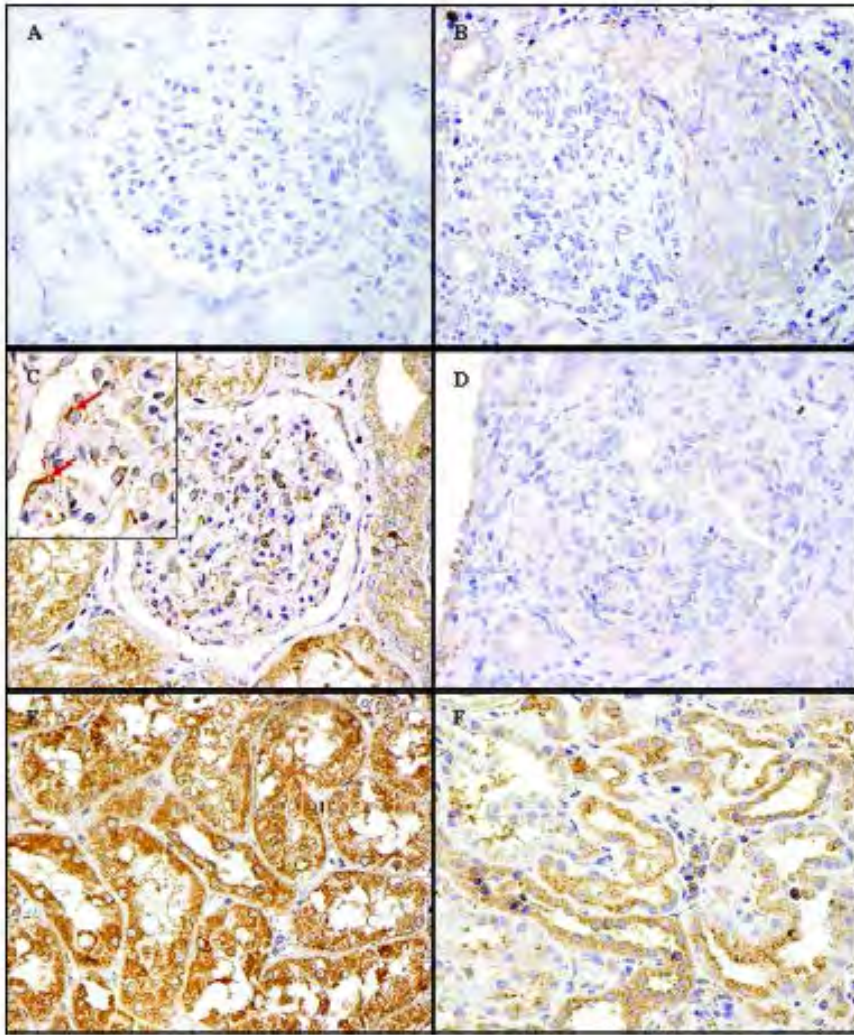


Figure 3. Immunohistochemistry localization of VEGF within renal biopsies of patients with lupus nephritis or kidney donors (implantation biopsy).

Sections were not stained with control monoclonal antibodies (A). VEGF protein was absent in crescentic glomeruli of patients with lupus nephritis (B) but markedly expressed in glomeruli of implantation biopsies of kidney donors (C); inset shows VEGF+ podocyte cells (arrows). VEGF was scarcely seen in glomeruli with endocapillary proliferation of lupus nephritis (D). VEGF was ubiquitously expressed on tubular epithelial cells of donor kidney tissues (E) but was reduced in the tubulointerstitium of kidneys of patients with lupus nephritis (F). (Original magnification x 400 except inset x 600)

Intra-renal VEGF mRNA levels predict a loss of renal function within twelve months.

Active lupus nephritis patients were treated with standard therapy (see Methods) and were followed for twelve months after kidney biopsy. Of all 35 patients, 10 patients experienced a loss of their renal function within 12 months (doubling serum creatinine levels or end-stage renal disease). We performed ROC analysis to determine the best cutoff that had the maximal sensitivity and specificity based on a loss of renal function. The mRNA cutoff level of -0.63 log copies could predict a loss of renal function with negative and positive predictive values of 100 and 53 percent, respectively. We observed that 53% of patients with low VEGF mRNA levels, but none of the patients with high levels, experienced loss of their renal function within 12 months. Patients with low VEGF mRNA levels had a significantly increased risk of loss of renal function, including doubling serum creatinine levels, end-stage renal disease (ESRD), or both events combined ($p < 0.001$ by log-rank test) (Fig 4 A-C). In contrast, crescent formation and a high renal activity index were not associated with ESRD (data not shown).

Urinary loss of podocytes is associated with active lupus nephritis (Fig 5).

In a previous study, we reported an increase in urinary VEGF levels in patients with biopsy-proven proliferative lupus nephritis.(24) Although tubular epithelial cells are the main source of VEGF in the kidney, we hypothesized that the reduction of intra-renal VEGF in this study may partly be explained by a loss of podocyte cells into the urine. We therefore analyzed the relationship between mRNA levels from urine cells and renal tissue during active lupus nephritis. To perform a proper comparison, urine samples were collected from patients (n=21) on the day of renal biopsy. There was a significant association between urinary WT-1 and VEGF mRNA levels (Fig 5A) ($R=0.51$; $p= 0.02$). Urine WT-1 and VEGF mRNA levels were increased in active LN (urine WT-1= 2.88 ± 0.25 and VEGF 2.14 ± 0.23 log copies). In contrast, intra-renal WT-1 and VEGF mRNA levels were decreased in active LN (renal WT-1= -0.56 ± 0.08 and VEGF= -0.73 ± 0.14 log copies) (Fig 5B).

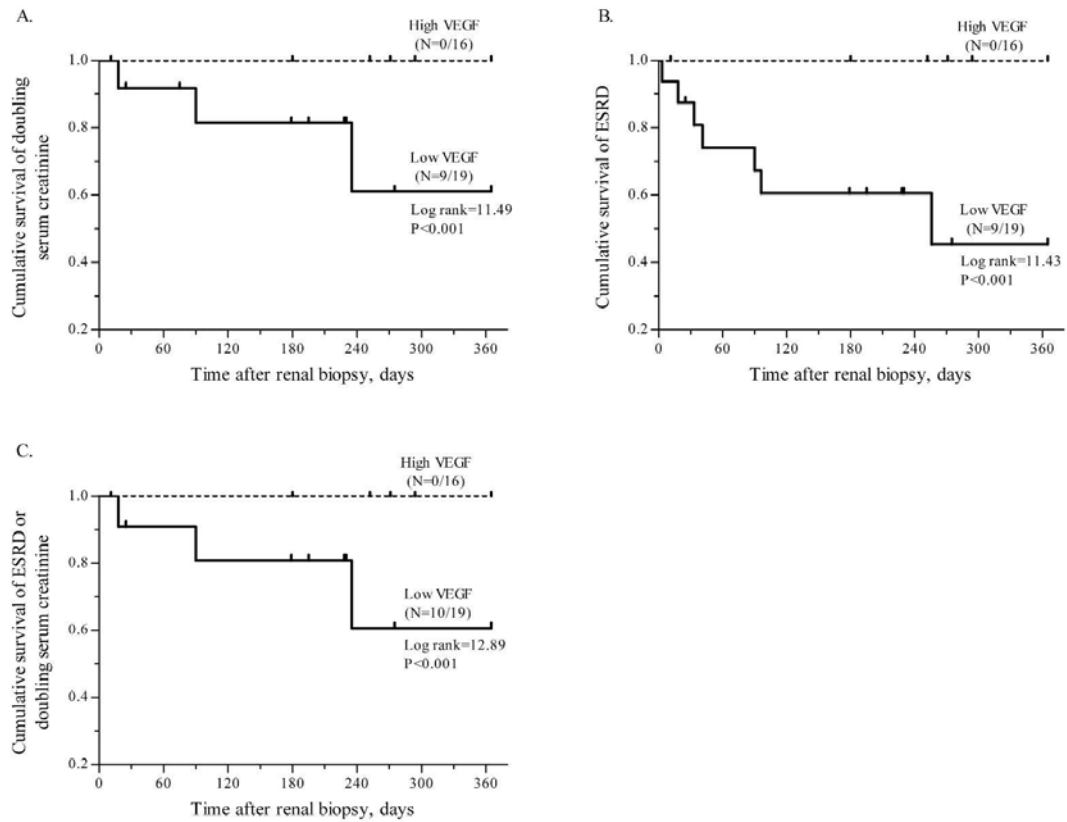


Figure 4. Analysis of the relationship between VEGF mRNA levels and a loss of renal function in 12 months. Panel A shows Kaplan-Meier estimates of the time to doubling serum creatinine in all patients with class III/IV LN, as defined by two groups of VEGF mRNA levels (the best cutoff mRNA level identified by ROC analysis). Panel B shows Kaplan-Meier estimates of the time to end-stage renal disease. Panel C shows Kaplan-Meier estimates of the time to both outcomes combined (doubling serum creatinine or end-stage renal disease) (C). According to log-rank analysis, p-values were < 0.001 for the model based on the two groups shown in all panels.

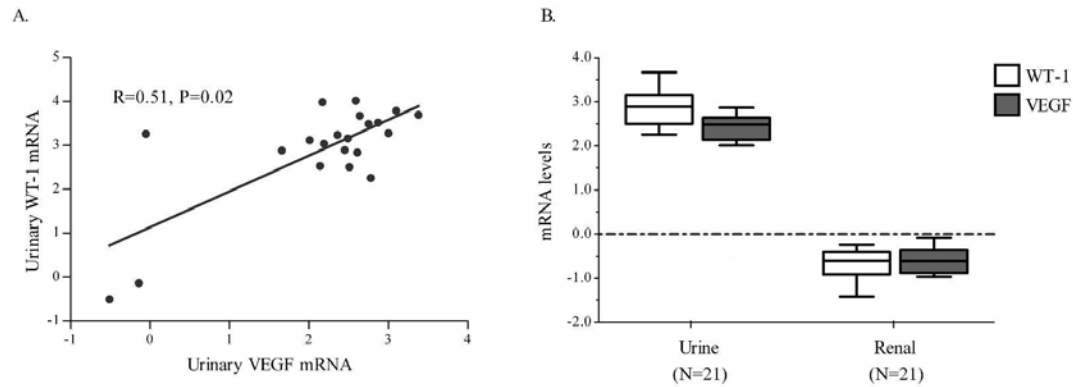


Figure 5. Study of a podocyte marker (WT-1) and VEGF from urine samples of lupus nephritis patients. (A) The relationship between the levels of VEGF and WT-1 was significant at $P=0.02$ ($R=0.51$). (B) Box and whisker plots show the 10th, 25th, 50th (median), 75th, and 90th percentiles of values (log) for WT-1 and VEGF mRNA levels in the urine as compared to their levels in the kidney tissue of patients with class III / IV lupus nephritis ($n=21$). The dotted line represents normal values.

DISCUSSION

Renal histology study is essential for guidance of patient management and for predicting prognosis of renal disease.(26) Patients with proliferative lupus nephritis (ISN/RPS class III or IV) are inevitably destined for chronic or end-stage kidney disease.(27, 28) The use of currently available immunosuppressive treatment has significantly improved renal prognosis.(29) However, physicians have been unable to readily predict individual responses until patients finish a six-month course of immunosuppressive treatment.(28) In general, a loss of renal function within six months after induction of treatment could determine long-term prognosis.(3) In this retrospective study, intra-renal VEGF expression was decreased in severe lupus nephritis. Moreover, VEGF expression at the time of renal flare may be a useful predictor of poor renal function within twelve months. Molecular biomarkers may be useful in the diagnosis and prognosis of lupus nephritis in the future.

Several studies have suggested that VEGF plays a key role in endothelial cell proliferation and capillary repair.(16, 18, 30) In the model of membranoproliferative GN, blockade of the VEGF₁₆₅ protein could lead to progressive renal damage.(31) In the remnant kidney model, VEGF is reduced in both glomeruli and tubular cells, which could be corrected by VEGF replacement.(17) VEGF could enhance endothelial cell repair as well as increase angiogenic response of peritubular capillaries.(32) It is known that VEGF can alter endothelial cell growth, integrity, and function and may eventually contribute to glomerulopathy.(12, 18, 30) It is expected for reduced endocapillary proliferation to be associated with decreased VEGF. This study could not determine such an association.

VEGF has been shown to stabilize kidney function in animal models of thrombotic microangiopathy(16) and chronic cyclosporine nephropathy.(17) The protective actions were principally mediated through preserved glomerular and peritubular capillary structures.(18) This may help to preserve GFR by maintaining glomerular capillary filtration surface area as well as preventing tubulointerstitial fibrosis.(18) This vascular protective action of VEGF could explain, in this study, an association between intra-renal VEGF and a loss of renal function in twelve months. Furthermore, histological evidence in this study showed expression of VEGF in both the glomeruli and the tubular cells of kidney donors, whereas there was a marked reduction of VEGF in both structures of kidneys with active lupus nephritis.(13, 33) A study of renal tubular cell lines found that VEGF acts as a survival factor by induction of cell proliferation and anti-apoptotic responses.(34) Expression of VEGF in renal tubules may result in order to protect against injury such as hypoxia, ischemia/reperfusion, hypokalemia, or oxidative stress.(34-36)

In this study, intra-renal HO-1 expression was well correlated with VEGF expression. The mRNA levels of both genes were decreased in lupus nephritis as compared to kidney donors. In human kidney transplantation, both HO-1 and VEGF mRNA levels have been shown to be decreased in deceased donors (prolonged ischemia time) as compared to living donors (short ischemia time).(33) In this study, the levels of VEGF decreased as the

severity increased; therefore, further studies are needed to clarify the role of hypoxic injury in lupus nephritis.

Studies of serum VEGF in SLE patients have demonstrated higher levels in patients with active SLE than in patients with inactive SLE or healthy individuals.(20-22) It is difficult to compare VEGF expression among the studies, since the quantification methods and studied samples (serum versus tissue) were different.(23) The local effects of VEGF may be different from the systemic responses. The variation of patients' characteristics and immunosuppressive treatments may be considered to be confounding factors. It should be noted that patients received a moderately high doses of steroids in this study, although we did not find a relationship between steroid dose and molecular profiling. Furthermore, serum VEGF levels may not be associated with intra-renal VEGF levels, since we may detect VEGF expression from different cell sources. For instance, the serum VEGF may originate from vascular endothelial cells, whereas renal VEGF, in this study, originates from tubular epithelial cells and podocytes.(34, 37) Lastly, patients with different stages and levels of severity of SLE may show different patterns of VEGF expression.(13, 22)

We previously reported an association between urinary VEGF expression and active proliferative lupus nephritis,(24) whereas in this study, an inverse relationship between intra-renal VEGF and histological activity was found. This has been validated by performing mRNA studies from same-day collection of urine and renal tissue. Figure 5 demonstrates an inverse relationship between urine and intra-renal VEGF mRNA levels. We hypothesize that there may be a significant urinary podocyte loss in active lupus nephritis.(37) Although tubular epithelial cells are the main source of VEGF in the kidney, urinary podocyte loss may partly contribute to a reduction of VEGF in crescent formation.(37) Selective knockout of VEGF in the podocyte showed impaired glomerular capillary formation due to a loss of endothelial cells, supporting the important role of VEGF in podocytes in maintaining capillary integrity.(38) Yu D et al showed that urinary podocyte loss is associated with glomerular damage in both primary and secondary glomerulonephritis in mice.(39) We confirmed that

there was urinary podocyte loss in lupus nephritis by demonstrating an increase in urinary WT-1 mRNA levels of patients with active nephritis (Fig 5). It would be interesting to further determine whether urinary podocyte numbers might be a functional biomarker for disease activity.

In conclusion, this study demonstrates the pivotal role of renal VEGF expression in human lupus nephritis. Patients with proliferative LN who had decreased intra-renal VEGF expression are at risk for a rapid decline of renal function. At the time of renal flare, the combination of renal pathology like class III/IV LN and reduced VEGF expression could predict poor renal survival. Intra-renal VEGF may become a candidate surrogate marker for targeting therapy and in development of clinical trials.

REFERENCES

1. Austin HA, 3rd, Muenz LR, Joyce KM, *et al.*: Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int* 1984; **25**: 689-695.
2. Shayakul C, Ong-aj-yooth L, Chirawong P, *et al.*: Lupus nephritis in Thailand: clinicopathologic findings and outcome in 569 patients. *Am J Kidney Dis* 1995; **26**: 300-307.
3. Austin HA, 3rd, Boumpas DT, Vaughan EM, *et al.*: Predicting renal outcomes in severe lupus nephritis: contributions of clinical and histologic data. *Kidney Int* 1994; **45**: 544-550.
4. Traitanon O, Avihingsanon Y, Kittikovit V, *et al.*: Efficacy of enteric-coated mycophenolate sodium in patients with resistant-type lupus nephritis: a prospective study. *Lupus* 2008; **17**: 744-751.
5. Ronnblom L, Alm GV: Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system. *Arthritis Res Ther* 2003; **5**: 68-75.
6. Tang S, Lui SL, Lai KN: Pathogenesis of lupus nephritis: an update. *Nephrology (Carlton)* 2005; **10**: 174-179.
7. Avihingsanon Y, Ma N, Csizmadia E, *et al.*: Expression of protective genes in human renal allografts: a regulatory response to injury associated with graft rejection. *Transplantation* 2002; **73**: 1079-1085.
8. Avihingsanon Y, Ma N, Pavlakis M, *et al.*: On the intraoperative molecular status of renal allografts after vascular reperfusion and clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 1542-1548.
9. Eikmans M, Baelde HJ, Hagen EC, *et al.*: Renal mRNA levels as prognostic tools in kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 899-907.

10. Kang DH, Anderson S, Kim YG, *et al.*: Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001; **37**: 601-611.
11. Nangaku M, Nishi H, Miyata T: Role of chronic hypoxia and hypoxia inducible factor in kidney disease. *Chin Med J (Engl)* 2008; **121**: 257-264.
12. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Zeeuw D: The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int* 2004; **65**: 2003-2017.
13. Shulman K, Rosen S, Tognazzi K, *et al.*: Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 1996; **7**: 661-666.
14. Maynard SE, Min JY, Merchan J, *et al.*: Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; **111**: 649-658.
15. Kang DH, Hughes J, Mazzali M, *et al.*: Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 1448-1457.
16. Kim YG, Suga SI, Kang DH, *et al.*: Vascular endothelial growth factor accelerates renal recovery in experimental thrombotic microangiopathy. *Kidney Int* 2000; **58**: 2390-2399.
17. Kang DH, Kim YG, Andoh TF, *et al.*: Post-cyclosporine-mediated hypertension and nephropathy: amelioration by vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **280**: F727-736.
18. Kang DH, Johnson RJ: Vascular endothelial growth factor: a new player in the pathogenesis of renal fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; **12**: 43-49.
19. Lindenmeyer MT, Kretzler M, Boucherot A, *et al.*: Interstitial vascular rarefaction and reduced VEGF-A expression in human diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007; **18**: 1765-1776.

20. Robak E, Sysa-Jedrzejewska A, Robak T: Vascular endothelial growth factor and its soluble receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Mediators Inflamm* 2003; **12**: 293-298.
21. Heshmat NM, El-Kerdany TH: Serum levels of vascular endothelial growth factor in children and adolescents with systemic lupus erythematosus. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; **18**: 346-353.
22. Navarro C, Candia-Zuniga L, Silveira LH, *et al.*: Vascular endothelial growth factor plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2002; **11**: 21-24.
23. Aringer M, Smolen JS: Cytokine expression in lupus kidneys. *Lupus* 2005; **14**: 13-18.
24. Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, *et al.*: Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int* 2006; **69**: 747-753.
25. Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB: Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002; **29**: 288-291.
26. Schwartz MM: The pathology of lupus nephritis. *Semin Nephrol* 2007; **27**: 22-34.
27. Schwartz MM: The pathological classification of lupus nephritis, chap. 5, in *Lupus nephritis*, edited by Lewis EJ, Schwartz MM, Korbet SM, New York: Oxford University Press 1999, pp126-158.
28. Cameron JS: Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: 413-424.
29. Austin HA, Balow JE: Natural history and treatment of lupus nephritis. *Semin Nephrol* 1999; **19**: 2-11.
30. Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; **25**: 581-611.
31. Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, *et al.*: VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest* 1999; **104**: 913-923.

32. Kang DH, Joly AH, Oh SW, *et al.*: Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 1434-1447.
33. Lemos FB, Ijzermans JN, Zondervan PE, *et al.*: Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 3278-3287.
34. Kanellis J, Fraser S, Katerelos M, *et al.*: Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; **278**: F905-915.
35. Rosenberger C, Griethe W, Gruber G, *et al.*: Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction. *Kidney Int* 2003; **64**: 874-886.
36. Reungjui S, Roncal CA, Sato W, *et al.*: Hypokalemic nephropathy is associated with impaired angiogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 125-134.
37. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, *et al.*: Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci* 2000; **320**: 112-116.
38. Eremina V, Wong MA, Cui S, *et al.*: Glomerular-specific gene excision in vivo. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 788-793.
39. Yu D, Petermann A, Kunter U, *et al.*: Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 1733-1741.
40. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, *et al.*: The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004; **65**: 521-530.
41. Boumpas DT, Austin HA, 3rd, Vaughn EM, *et al.*: Controlled trial of pulse methylprednisolone versus two regimens of pulse cyclophosphamide in severe lupus nephritis. *Lancet* 1992; **340**: 741-745.

42. Chan TM, Li FK, Tang CS, *et al.*: Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. Hong Kong-Guangzhou Nephrology Study Group. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1156-1162.
43. Austin HA, 3rd, Klippel JH, Balow JE, *et al.*: Therapy of lupus nephritis. Controlled trial of prednisone and cytotoxic drugs. *N Engl J Med* 1986; **314**: 614-619.
44. Biosystems A: User Bulletin #2 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. 2001; **2**: 1-36.
45. Li B, Hartono C, Ding R, *et al.*: Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001; **344**: 947-954.

CHAPTER III

Genetic polymorphism of drug toxicity or pharmacokinetics in SLE patients

Genetic polymorphism of drug toxicity or pharmacokinetics in SLE patients

บทนำ (Introduction)

ศาสตร์ทาง pharmacogenetics เป็นศาสตร์ใหม่ที่เกิดจากการรวมศาสตร์ทางด้าน พันธุศาสตร์และเภสัชศาสตร์เข้าด้วยกัน จึงทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับการออกฤทธิ์และการเกิดพิษของยามากขึ้น ช่วยให้มีการใช้ยาที่เหมาะสมตามพันธุกรรมของแต่ละบุคคล เพื่อให้ได้ผลในการรักษาสูงสุด โดยการเกิดอาการพิษต่ำที่สุด (1) ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกใช้ยาและจัดขนาดยา ให้เหมาะสมได้

Lupus nephritis (LN) เป็นพยาธิสภาพที่ไตซึ่งพบมากที่สุดในโรค SLE เป็นการอักเสบของหลอดเลือดฝอย (glomerulus) และหน่วยไต (nephron) ที่เรียกว่า glomerulonephritis ซึ่งเกี่ยวเนื่องกับ immune complex โดยเริ่มจากการที่มี immune complex เกาะอยู่ที่ mesangial cell เพียงเล็กน้อย จนถึงเกิดการแบ่งตัวของผนังเส้นเลือดฝอยและเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อที่ glomerulus และ nephron ทำให้ immune complex (2) เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้เกิดความรุนแรงของโรคเพิ่มมากขึ้นด้วยการรักษาโรค SLE ในอดีตนิยมใช้ cyclophosphamide ร่วมกับ corticosteroid ซึ่งผลการรักษาด้วยยานานนี้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ (3) แต่ยา cyclophosphamide มีผลข้างเคียงที่ส่งผลเสียต่อผู้ป่วยคือกดภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงจึงก่อให้เกิดการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับยาและกดการทำงานของรังไข่ในผู้หญิง (4) ดังนั้นจึงได้มีการการค้นหายาใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นและลดผลข้างเคียงที่น้อยกว่า เช่น mycophenolate mofetil (MMF) และ azathioprine (Aza) อย่างไรก็ตามยา Aza เป็นยาที่มีดัชนีความปลอดภัย (therapeutic index) ต่ำ สามารถก่อให้เกิดอาการ ไม่พึง ใ้แก่การกดการทำงานของไขกระดูก (myelosuppression) (5) ทำให้ผู้ป่วยเกิดการติดเชื้อ และมีเลือดออกผิดปกติ ในขณะที่ยา MMF แม้จะไม่มีผลข้างเคียงที่อันตรายถึงแก่ชีวิต แต่สามารถก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่สำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถทนต่อการรับยาได้ เช่น อาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง (6) เป็นต้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจเอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดยา MMF และ Aza ออกจากร่างกาย คือ เอนไซม์ glucuronosyltransferase (UGT) และ thiopurine S-methyltransferase (TPMT) ตามลำดับ

ความสำคัญของยา mycophenolate mofetil

MMF เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกดูดซึมที่กระเพาะอาหารแล้วเกิดขบวนการไฮโดรไลซิสได้เป็น MPA หลังจากนั้น MPA จะถูกเอนไซม์ uridine diphosphate glucuronosyl transferase (UGT) เปลี่ยนเป็น MPAG ซึ่งจะไม่มีการดูดซึมที่ทางเดินอาหาร และส่วนน้อยจะถูกเปลี่ยนเป็น acyl glucuronide (AcMPAG) (7, 8) ดังนั้นผู้ที่มีความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ UGT ต่ำจึงมีโอกาสได้รับพิษจากการรับประทานยา MMF ได้มากกว่าผู้ที่มีความสามารถในการทำงานของเอนไซม์นี้สูง เอนไซม์ UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 (9) ที่พบในเนื้อเยื่อตับ ไต และลำไส้ (10-12) เป็นเอนไซม์หลัก ในการเปลี่ยนเป็น MPA เป็น MPAG ซึ่งหมดฤทธิ์ทางเภสัชและขับออกจากร่างกาย และพบว่าเอนไซม์ UGT2B7 เป็นเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อตับที่เป็น MPA เป็น Ac-MPAG (8) ได้มีรายงานว่า การเพิ่มของเบส T หนึ่งเบส ที่บริเวณ -109 ถึง -98 และให้ชื่อรูปแบบของยีนว่า UGT1A9*22 (13) เมื่อนำไปทดสอบด้วย luciferase assay และดูการแสดงออกใน Hepatoma (HepG2 cell) พบว่า UGT1A9*22 มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกมากกว่า wild type เป็น 2.6 เท่า นอกจากนั้นยีน UGT1A9 ที่ตำแหน่ง promoter ของประชากรชาว Caucasian ซึ่งมีการกลายพันธุ์ของ nucleotide ตำแหน่งที่ -275 จาก T เป็น A และที่ตำแหน่ง -2152 จาก C เป็น T ซึ่งเป็นผลให้มีความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนั้นยังมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนลำดับที่ 98 จาก methionine เป็น threonine เป็นผลให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลง (14)

ความสำคัญของยา Azathioprine

Azathioprine เมื่อให้เข้าไปในร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์หลัก ได้แก่ hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), thiopurine S-methyltransferase (TPMT) และ xanthine oxidase โดยเอนไซม์ HGPRT จะทำหน้าที่เปลี่ยน thiopurine ให้อยู่ในรูป thioguanine nucleotide (TGN) ซึ่งเป็นเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยจะออกฤทธิ์ยับยั้ง การเจริญและการแบ่งเซลล์ รวมทั้งกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์ TPMT และเอนไซม์ xanthine oxidase จะทำหน้าที่เปลี่ยน thiopurine ให้อยู่ในรูปเมแทบอลิต์ที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เป็นที่น่าสังเกตว่าเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic tissues) จะไม่มีเอนไซม์ xanthine oxidase ดังนั้นเอนไซม์ TPMT จึงเป็นเอนไซม์หลักเพียงเอนไซม์เดียวที่ทำหน้าที่กำจัดยาเหล่านี้ออกจากร่างกาย ดังนั้นผู้ที่มีความสามารถการทำงานของเอนไซม์ TPMT ต่ำ จึงมี

โอกาสได้รับพิษจากการกดทำงานของไขกระดูกของยากลุ่มนี้สูงกว่าปกติ (15-18) ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ถูกควบคุมด้วยลักษณะพันธุกรรมของยีน TPMT โดย TPMT*1 เป็น wild type ที่ควบคุมการสร้างสังเคราะห์เอนไซม์ให้มีการทำงานเป็นปกติ ในขณะที่ TPMT*3A เป็น mutant allele ที่พบมากที่สุดในกลุ่มประชากร Caucasian ซึ่งมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 460G>A และที่ตำแหน่ง 719A>G ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนลำดับที่ 154 จาก Alanine เป็น Threonine และมีการเปลี่ยนกรดอะมิโนลำดับที่ 240 จาก tyrosine เป็น cysteine เป็นผลให้มีความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลง (18-20) ส่วน TPMT*3C เป็น mutant allele ที่พบมากที่สุดในกลุ่มประชากร Asia และ African มีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง 719A>G ซึ่งทำให้มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนลำดับที่ 240 จาก tyrosine เป็น cysteine เป็นผลให้มีความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลง นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาความหลากหลายของเอนไซม์ TPMT (18-20) ในกลุ่มผู้ป่วย SLE ที่ได้รับยา Azathioprine ในผู้ป่วยชาว American พบว่าคนไข้ที่มี homozygous TPMT*3A มีการทำงานของเอนไซม์ต่ำ มีความสัมพันธ์กับการเกิด severe marrow suppression แต่ไม่สามารถทำนายการเกิด myelosuppressive และยังไม่สามารถใช้แทนการทดสอบการทำงานของเอนไซม์จากเลือดโดยตรงได้ (21) ต่อมาได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดการกลายพันธุ์กับผลข้างเคียงในผู้ป่วย SLE ที่ได้รับยา Azathioprine ในผู้ป่วยชาวเกาหลีพบการกลายพันธุ์แบบ heterozygous ของ TPMT*3C และ TPMT*6 โดยพบว่าผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์แบบ TPMT*3C พบอาการ severe nausea และผู้ป่วยที่มีการกลายพันธุ์แบบ TPMT*6 พบอาการของ severe bone marrow toxicity และมีผู้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ของ genotype และ phenotype ในคนไข้ SLE ประเทศญี่ปุ่น โดยพบว่าการกลายพันธุ์แบบ TPMT*3C มีการทำงานของเอนไซม์ TPMT ต่ำกว่าในคนไข้ wild type และคนไข้ที่มีการกลายพันธุ์และได้รับยา Azathioprine พบการแสดงอาการ leucopenia (22)

ดังนั้นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของยา MMF และ azathioprine บนพื้นฐานทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปของเอนไซม์ UGT1A9 และ TPMT (genetic polymorphism) น่าจะมีบทบาทสำคัญที่สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการบริหารยาให้มีความเหมาะสมกับแต่ละบุคคลเพื่อลดอาการเกิดพิษที่เกิดจากการใช้ยาในผู้ป่วย SLE

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของความหลากหลายของยีน UGT1A9 ต่อเภสัชจลนศาสตร์และเมตาโบไลต์ในผู้ป่วย SLE ที่ได้รับการรักษาด้วยยา MMF
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของ UGT1A9 กับผลการรักษาและการเกิดพิษ ในผู้ป่วย SLE ที่ได้รับการรักษาด้วยยา MMF
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน TPMT ในผู้ป่วย SLE ที่ได้รับการรักษาด้วยยา azathioprine และการเกิดพิษจากการใช้ยา
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการทำงานของเอนไซม์ TPMT ในเม็ดเลือดแดงกับลักษณะทางพันธุกรรมในผู้ป่วย SLE ที่ได้รับการรักษาด้วยยา azathioprine

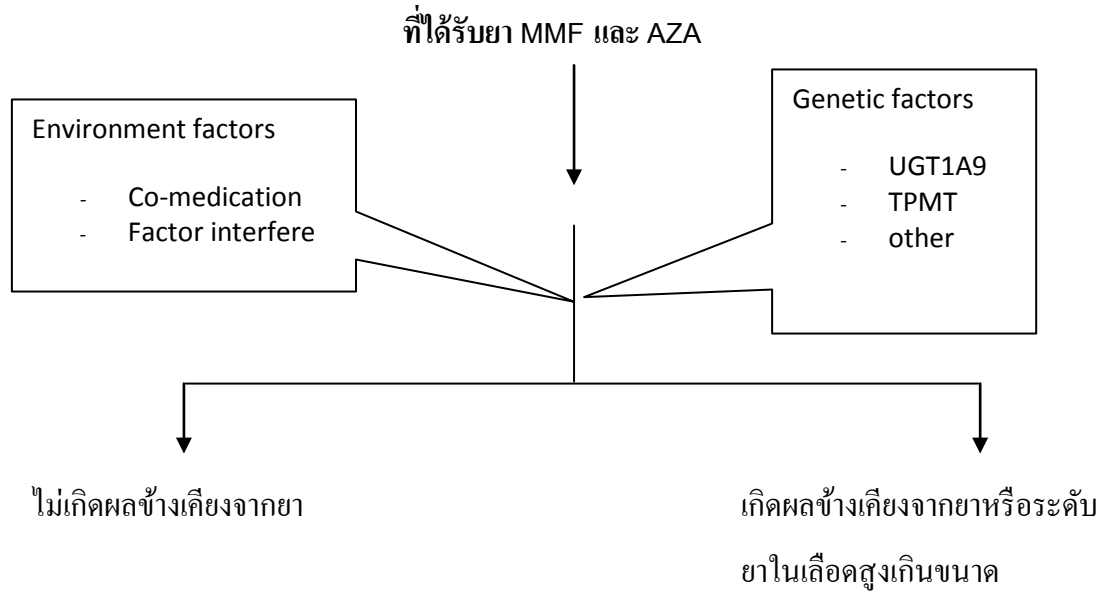
ขอบเขตของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของความหลากหลายของยีน UGT1A9 ต่อเภสัชจลนศาสตร์และเมตาโบไลต์ของยา MMF และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความหลากหลายของยีน UGT1A9 กับผลการรักษาและการเกิดพิษจากการใช้ยา MMF ในผู้ป่วย SLE

โดยเป็นการศึกษาแบบ Cohort study และเป็นการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีนโดยศึกษาในรูปแบบของ haplotype เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดและมีประโยชน์ในการช่วยค้นหา clinical association genes

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ผู้ป่วยโรค SLE ที่มีอาการในระยะกำเริบ



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่ให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของรูปแบบของยีน UGT1A9 กับ TPMT กับอาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้ยาที่ใช้รักษาโรค SLE ในประชากรไทย

- เพื่อหาขนาดยาที่เหมาะสมกับลักษณะพันธุกรรมของแต่ละบุคคลเพื่อลดอาการไม่พึงประสงค์จนทำให้ผู้ป่วยต้องถอนยา

- การเสนอผลงานวิชาการในระดับชาติและนานาชาติไม่ต่ำกว่า 2 เรื่อง

- ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติไม่ต่ำกว่า 2 เรื่อง

- การพัฒนาบัณฑิต ในระดับมหาบัณฑิต 1 คนและดุษฎีบัณฑิต 1 คนในหลักสูตร

วิทยาศาสตร์ทางการแพทย์กับหลักสูตรชีวเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. เนื้อเรื่อง (Main body)

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

วิธีการทดลองของความหลากหลายของยีน UGT1A9 ต่อเภสัชจลนศาสตร์

1.1 กลุ่มประชากรที่ศึกษา

เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้า

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น SLE ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้รับยา mycophenolate mofetil

เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยออก

ผู้ป่วยได้รับยารักษาทางเดินอาหาร รวมทั้งยาลดกรด และผู้ป่วยที่รับยารักษาโรคเบาหวาน ซึ่งยาไปรบกวนการดูดซึม การกระจายตัว การเปลี่ยนแปลง และการขับยาออกจากร่างกายของยา MMF

1.2 การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบระดับ MPA ในพลาสมา

เจาะเลือดผู้ป่วยก่อนรับประทานยา MMF และหลังจากรับประทาน 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 8, 12 ชั่วโมง ในหลอดทดลองที่มีสาร heparin หลังจากนั้นปั่นแยกเอาพลาสมาและนำไป เก็บไว้ในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวัดค่าของ MPA โดยใช้วิธี high performance liquid chromatography (HPLC)

1.3 การเก็บตัวอย่างเลือดและสกัด DNA และการวินิจฉัยลักษณะทางพันธุกรรมของยีน

UGT1A9

เก็บตัวอย่างเลือด 5 มล. ใน EDTA tube ปั่นแยก buffy coat นำ buffy coat มาสกัด DNA ด้วยวิธี salting out และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 °C ส่วนการศึกษา SNP ตำแหน่ง -2152 C>T, -275T>A และตำแหน่งของ exon ที่ 3 ซึ่งพัฒนาจากวิธี PCR/RFLP ของ Girard *et al* และวิธี SSCP-PCR พัฒนาจาก Yamanaka *et al* เพื่อหาตำแหน่ง -109 – (-98) base pair insertion

วิธีการทดลองความสัมพันธ์ของการทำงานของเอนไซม์ TPMT ในเม็ดเลือดแดงกับลักษณะทางพันธุกรรมในผู้ป่วย SLE ที่ได้รับการรักษาด้วยยา azathioprine

1.1 กลุ่มประชากรที่ศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้จากผู้ป่วยไทยที่เป็นโรค SLE ที่ได้รับการรักษาด้วยยา azathioprine ในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ที่ได้รับความยินยอมให้ทำการศึกษา

1.2 ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบความชุก (Prevalence) ของประชากรที่มีความผิดปกติของยีน TPMT เท่ากับ 10% และ allowable error เท่ากับ 5% ขนาดตัวอย่างคำนวณที่ความเชื่อมั่น 95% จากสูตร

$$N = \frac{(Z_{\alpha/2})^2 P(1-P)}{d^2}$$

ขนาดของตัวอย่างเท่ากับ 140 ราย

1.3 การวัดการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT

วิธีการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT โดย HPLC ซึ่งจะได้ถูกพัฒนาจาก โดย Wush B. และคณะ

1.4 การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT

อาสาสมัครได้รับการเก็บตัวอย่างจากหลอดเลือดที่แขนประมาณ 10 ml. โดยใช้หลอดเก็บเลือดที่มีสาร EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดและแยกเม็ดเลือดขาวด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 g เป็นเวลา 15 นาที ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี salting out ที่ได้รับการพัฒนามาจากวิธีของ S.A.Miller และคณะ การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*3C ด้วยเทคนิค RT-PCR

ผลการวิจัยการศึกษาระดับของ MPA ต่อการรักษาของผู้ป่วยที่ได้รับ mycophenolate mophetil

การศึกษานี้มีผู้ป่วยซึ่งเข้าร่วมการศึกษาและติดตามครบ 6 เดือนจำนวน 20 คน เป็นผู้ป่วยหญิง 18 คน และผู้ป่วยชาย 2 คน ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษามีอายุเฉลี่ย 32.50 ± 7.47 ปี มีค่า serum creatinine อยู่ระหว่าง 0.43 ถึง 2.3 mg/dl มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.22 ± 0.55 mg/dl เมื่อประเมินการทำงานของไตด้วยวิธี MDRD และ Cockcroft-Gault ค่าเฉลี่ย estimated glomerular filtration rate (eGFR) เท่ากับ 71.54 ± 40.5 ml/min/1.73 m² และ 71.36 ± 40.82 ml/min ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยโปรตีนในปัสสาวะ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 5.86 ± 4.4 กรัมต่อวัน ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา 20 คนมีผลพยาธิสภาพของเนื้อไต (จำแนกตาม ISN/RPS classification 2003) [37] ที่เข้าได้กับ class III, IV และ IV+V คิดเป็นร้อยละ 20, 55 และ 25 (จำนวน 4, 11 และ 5 คน)ตามลำดับ สำหรับความรุนแรงของพยาธิสภาพของเนื้อไต มีค่าเฉลี่ยของ activity index และ chronicity index เท่ากับ 12.06 ± 4.84 และ 2.83 ± 2.06 ตามลำดับ 90%ของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาได้รับยา mycophenolate สำหรับการรักษาในช่วง induction phase ขณะที่ 10% ของผู้ป่วยได้รับยา mycophenolate สำหรับ maintenance treatment ผู้ป่วยจำนวน 17 คน (คิดเป็นร้อยละ 85) มีประวัติการได้รับยา cyclophosphamide มาก่อน มีผู้ป่วยจำนวน 14 คนได้รับยา mycophenolate mofetil (MMF) และมีผู้ป่วยจำนวน 6 คนได้รับยา enteric-coated mycophenolate sodium (EC-MPS) ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาทุกคนไม่มีอาการแสดงของตาเหลือง ผู้ป่วยจำนวน 17 คนซึ่งได้รับการเจาะเลือดตรวจการทำงานของตับมีค่าของ serum bilirubin อยู่ในเกณฑ์ปกติ แต่ผู้ป่วยมีระดับของ serum albumin ต่ำมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.74 ± 0.79 g/dl ภายหลังการรักษานาน 6 เดือนมีผู้ป่วยจำนวน 10 รายได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตเพื่อประเมินความรุนแรงของพยาธิสภาพของเนื้อไตพบว่ามีค่าเฉลี่ยของ activity index และ chronicity index เท่ากับ 2.8 ± 2.39 และ 4.8 ± 2.04 ตามลำดับ ไม่มีผู้ป่วยรายใดที่มีการเพิ่มขึ้นของค่า serum creatinine เป็น 2 เท่าของค่า serum creatinine ที่ก่อนเริ่มการรักษา ข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วยมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลพื้นฐานของผู้ป่วย

ตัวแปร	จำนวนผู้ป่วย	Mean \pm SD.
เพศ (หญิง : ชาย)	18 : 2	-
อายุ (ปี)	20	32.50 \pm 7.47
Body mass index	19	21.9 \pm 3.92
ระยะเวลาที่เป็นโรคไตอักเสบเอสแอลอี (ปี)	20	7.07 \pm 4.65
SLEDAI-2K score	19	Median 16
Serum creatinine (mg/dl)	20	1.22 \pm 0.55
eGFR (CG) (ml/min)	20	71.36 \pm 40.82
eGFR (MDRD) (ml/min/1.73 m ²)	20	71.54 \pm 40.5
Serum albumin (g/dl)	19	2.74 \pm 0.79
24 hour urine protein (gram/day)	20	5.86 \pm 4.4
Previous cyclophosphamide treatment	17 (85%)	
Hemoglobin level (g/dl)	20	10.57 \pm 1.78
White blood cell (cells/mm ³)	20	8,710 \pm 4,649.41
Serum total bilirubin (mg/dl)	17	0.32 \pm 0.11
ISN/RPS classification		
-class III	4 (20%)	-
-class IV	11 (55%)	-
-class V + IV	5 (25%)	-
Activity index (0-24) (ก่อนรักษา)	18	12.06 \pm 4.84
Chronicity index (0-12) (ก่อนรักษา)	18	2.83 \pm 2.06
Activity index (0-24) (หลังรักษา)	10	2.8 \pm 2.39
Chronicity index (0-12) (หลังรักษา)	10	4.8 \pm 2.04

Indication for mycophenolate treatment		
-Induction therapy	18 (90%)	-
-Maintenance therapy	2 (10%)	-
Average dosage of MMF (mg) per IBW (kgs.)	14	26.84 ± 5.9
	6	25.37 ± 7.19
Average dosage of EC-MPS per IBW (kgs.)	0	
Doubling serum creatinine (at 6 months)		

eGFR: estimated glomerular filtration rate; MDRD: Modification of Diet in Renal Disease; CG:

Cockcroft-Gault formula; MMF: mycophenolate mofetil; EC-MPS: enteric coated mycophenolate sodium

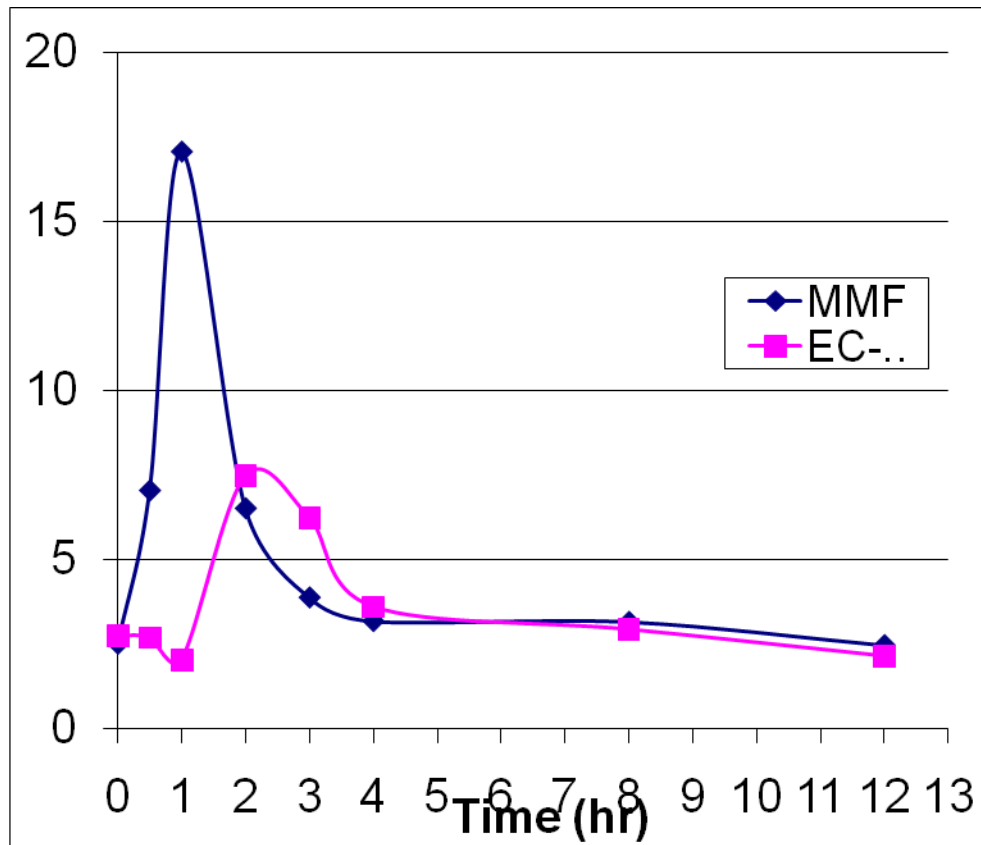
ตารางที่ 2 แสดง pharmacokinetic parameters ของ mycophenolic acid แยกตามชนิดของยา mycophenolate ที่ผู้ป่วยจำนวน 20 รายได้รับ

	Means ± SD.	
	MMF (N=14)	EC-MPS (N=6)
C ₀ (mg/L)	2.49 ± 1.23	2.73 ± 1.46
C _{0.5} (mg/L)	7.03 ± 6.79	2.68 ± 1.46
C ₁ (mg/L)	17.06 ± 12.69	2.02 ± 0.7
C ₂ (mg/L)	6.5 ± 2.23	7.47 ± 5.83
C ₃ (mg/L)	3.86 ± 2.5	6.23 ± 4.85
C ₄ (mg/L)	3.16 ± 2.04	3.59 ± 1.98
C ₈ (mg/L)	3.14 ± 2.11	2.92 ± 2.03
C ₁₂ (mg/L)	2.45 ± 1.78	2.13 ± 1.54

AUC ₀₋₁₂ (h*mg/L)	54.55 ± 28.56	42.44 ± 9.86
Cmax (mg/L)	18.08 ± 11.64 (range: 4.81-41.4)	10.12 ± 5.13 (range: 4.22-18.59)
Tmax (hours)	1.57 ± 0.94 (median: 1) (range: 0.5-4)	3.25 ± 2.52 (median: 3) (range: 0.5-8)
Dosage (mg.)	1,357.14 ± 234.4 (median 1,500)	1,260 ± 197.18 (median 1,260)
Dosage/ IBW (kg.)	26.84 ± 5.9	25.37 ± 7.19
MPA dose		

MMF: mycophenolate mofetil; EC-MPS: enteric coated mycophenolate sodium; C₀: trough plasma concentration of mycophenolic acid; C_{0.5}, C₁, C₂, C₃, C₄, C₈ and C₁₂: plasma concentration of mycophenolic acid at 0.5, 1, 2, 3, 4, 8 and 12 hours post dose respectively; AUC₀₋₁₂: area under the concentration time curve of mycophenolic acid (0-12 hours); Cmax: maximal plasma concentration of mycophenolic acid; Tmax: time to maximal plasma concentration of mycophenolic acid; IBW: ideal body weight

จากตารางที่ 2 พบว่ามีความแตกต่างของ pharmacokinetics study ระหว่างยา MMF และ ยา EC-MPS หลังรับประทานยา MMF ระดับของ MPA concentration จะมีค่าสูงสุดที่ประมาณ 1 ชั่วโมง (Tmax) ขณะที่ระดับของ MPA concentration จะมีค่าสูงสุดที่ประมาณ 3 ชั่วโมงภายหลังการรับประทานยา EC-MPS โดยที่ค่า Tmax ของ EC-MPS มี variation มากกว่า Tmax ของ MMF ค่าสูงสุดของ MPA concentration (Cmax) หลังได้รับยา MMF มีค่าสูงกว่าค่าสูงสุดของ MPA concentration ภายหลังการได้รับยา EC-MPS ทั้งที่ผู้ป่วยได้รับขนาดของยาต่อน้ำหนักตัวในปริมาณใกล้เคียงกัน กราฟแสดงค่า MPA concentration ณ เวลาจุดต่างๆหลังจากการรับประทานยา MMF เทียบกับยา EC-MPS แสดงรายละเอียดในรูปแบบที่ 1



รูปที่ 1 กราฟแสดงค่าของ plasma MPA concentration ณ เวลาต่างๆ ภายหลังจากการรับประทานยา MMF และ EC-MPS

ตารางที่ 3 แสดงค่า correlation coefficient (r) ของความสัมพันธ์ระหว่าง MPA AUC₀₋₁₂ และ clinical outcomes ในผู้ป่วยจำนวน 20 ราย

Clinical Outcomes	r (correlation coefficient)	p-value
-การเปลี่ยนแปลงในปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง	0.394	0.085
-การเปลี่ยนแปลงใน eGFR (CG)	0.164	0.489
-การเปลี่ยนแปลงใน eGFR (MDRD)	0.167	0.482
-การเปลี่ยนแปลงใน activity index (N=10)	0.322	0.166
-การเปลี่ยนแปลงใน chronicity index (N=10)	0.310	0.184

eGFR: estimated glomerular filtration rate; CG: Cockcroft-Gault formula; MDRD: Modification of Diet in Renal Disease

ตารางที่ 4 แสดงค่า correlation coefficient (r) ของความสัมพันธ์ระหว่าง MPA AUC₀₋₁₂ และ clinical outcomes ในผู้ป่วยที่ได้รับยา mycophenolate สำหรับการรักษาในช่วง induction จำนวน 18 ราย

Clinical Outcomes	r (correlation coefficient)	p-value
-การเปลี่ยนแปลงในปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง	0.315	0.203
-การเปลี่ยนแปลงใน eGFR (CG)	0.108	0.668
-การเปลี่ยนแปลงใน eGFR (MDRD)	0.113	0.656
-การเปลี่ยนแปลงใน activity index (N=10)	0.269	0.281

eGFR: estimated glomerular filtration rate; CG: Cockcroft-Gault formula; MDRD: Modification of Diet in Renal Disease

ภายหลังการได้รับยา mycophenolate นาน 6 เดือน มีผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษา [48] จำนวน 12 ราย และผู้ป่วยจำนวน 8 รายไม่ตอบสนองต่อการรักษา มีผู้ป่วยจำนวน 10 รายได้รับการเจาะชิ้นเนื้อไตก่อนการรักษา และหลังการรักษานาน 6 เดือนเพื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของพยาธิสภาพของเนื้อไต จากตารางที่ 3 พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างค่า MPA AUC₀₋₁₂ กับการเปลี่ยนแปลงในปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ 24 ชั่วโมง, การเปลี่ยนแปลงค่า estimated glomerular filtration ที่ประเมินด้วยวิธี Cockcroft-Gault และ Modification of Diet in Renal Disease, การเปลี่ยนแปลงใน activity index และ chronicity index ของพยาธิสภาพของชิ้นเนื้อไตภายหลังการได้รับยา mycophenolate นาน 6 เดือน และเมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า MPA AUC₀₋₁₂ กับการเปลี่ยนแปลงทั้งทางคลินิกและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อไตเฉพาะในผู้ป่วยที่ได้รับยา mycophenolate สำหรับการรักษาในช่วง induction ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า MPA AUC₀₋₁₂ กับการเปลี่ยนแปลงของ outcomes ดังกล่าวเช่นกันดังแสดงในตารางที่ 4 อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ MPA AUC₀₋₁₂ ในผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษากับผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาหลังได้รับยานาน 6 เดือนในผู้ป่วยจำนวน 18 รายที่ได้รับยา mycophenolate สำหรับการรักษาในช่วง induction ผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาจำนวน 11 ราย (ผู้ป่วยจำนวน 3 รายและ 8 รายตอบสนองต่อการรักษาโดยเข้าสู่ระยะ complete remission และ partial remission ตามลำดับ) มีค่าเฉลี่ยของ MPA AUC₀₋₁₂ เท่ากับ 65.98 ± 23.77 h*mg/L ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยของ MPA AUC₀₋₁₂ ในกลุ่มผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาจำนวน 7 รายซึ่งมีค่าเท่ากับ 32.08 ± 7.97 h*mg/L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value 0.002) แต่ไม่มีความแตกต่างของขนาดยาที่ได้รับต่อน้ำหนักตัวและไม่มีความแตกต่างของ mycophenolate preparations ที่ได้รับในผู้ป่วยที่ตอบสนองต่อการรักษาเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษา รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ MPA AUC₀₋₁₂ และขนาดของยาที่ได้รับต่อน้ำหนักตัวในผู้ป่วยที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษาหลังการได้รับยา mycophenolate นาน 6 เดือนสำหรับการรักษาในช่วง induction

Variables	Responders (N=11)	Non-responders (N=7)	p-value
Mean MPA AUC ₀₋₁₂	65.98 ± 23.77	32.08 ± 7.97 (N=7)	0.002
Mean dosage/IBW (kgs.)	27.69 ± 5.85	28.84 ± 5.05 (N=4)	0.079
For MMF (N=12)	(N=8)	31.51 ± 2.17 (N=3)	(responders vs. non-responders)
Mean dosage/IBW (kgs.)	19.24 ± 3.4 (N=3)		0.227 (MMF vs. EC-MPS)
For EC-MPS (N=6)			

MPA: mycophenolic acid; AUC₀₋₁₂: area under the concentration time curve of mycophenolic acid (0-12 hours); IBW: ideal body weight; MMF: mycophenolate mofetil; EC-MPS: enteric-coated mycophenolate sodium

ผู้ป่วยที่มีค่าของ MPA AUC₀₋₁₂ สูงมีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อการรักษาสูงกว่าผู้ป่วยที่มีค่า MPA AUC₀₋₁₂ ที่ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากตารางที่ 6 พบว่าผู้ป่วยที่มีค่า MPA

AUC₀₋₁₂ น้อยกว่า 30 h*mg/L มีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อการรักษา 0% เมื่อผู้ป่วยมีค่า MPA AUC₀₋₁₂ อยู่ระหว่าง 30-60 และ มากกว่า 60 h*mg/L ผู้ป่วยมีเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อการรักษาเพิ่มเป็น 60% และ 100% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าของ MPA AUC₀₋₁₂ กับขนาดของยาที่ผู้ป่วยได้รับต่อน้ำหนักตัวทั้งในผู้ป่วยที่ได้รับยา MMF และ EC-MPS ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การตอบสนองต่อการรักษาหลังได้รับยา mycophenolate จำแนกเป็น 3 กลุ่มตามค่าของ MPA AUC₀₋₁₂ ในผู้ป่วยจำนวน 18 รายที่ได้รับยา mycophenolate สำหรับการรักษาในช่วง induction

MPA AUC ₀₋₁₂ (h*mg/L)	Response rates	Non-response rates
<30 (N=3)	0	3 (100%)
30-60 (N=10)	6 (60%)	4 (40%)
>60 (N=5)	5 (100%)	0

p-value: 0.009

MPA: mycophenolic acid; AUC₀₋₁₂: area under the concentration time curve of mycophenolic acid (0-12 hours)

ตารางที่ 7 แสดงค่า correlation coefficient (r) ระหว่าง MPA AUC₀₋₁₂ กับ dosage/kg IBW ในผู้ป่วยจำนวน 20 รายแยกตามชนิดของยา mycophenolate ที่ได้รับ

Preparations	N	r	p-value
MMF	14	-0.054	0.855
EC-MPS	6	-0.765	0.076

MPA: mycophenolic acid; AUC₀₋₁₂: area under the concentration time curve of mycophenolic acid (0-12 hours); IBW: ideal body weight; MMF: mycophenolate mofetil; EC-MPS: enteric-coated mycophenolate

ตารางที่ 8 แสดงค่า correlation coefficient (r) และค่า r^2 ของความสัมพันธ์ระหว่าง MPA AUC₀₋₁₂ กับค่า MPA ที่จุดเวลาต่างๆ ในผู้ป่วยจำนวน 20 รายที่ได้รับยา mycophenolate mofetil (MMF) หรือ enteric-coated mycophenolate sodium (EC-MPS)

Model	r	r^2	p-value
C ₀	0.601	0.361	0.005
C _{0.5}	0.325	0.106	0.161
C ₁	0.858	0.736	< 0.001
C ₂	0.160	0.026	0.5
C ₃	0.178	0.032	0.452
C ₄	0.616	0.379	0.004
C ₈	0.712	0.507	< 0.001
C ₁₂	0.609	0.371	0.004

C₀: trough plasma concentration of mycophenolic acid; C_{0.5}, C₁, C₂, C₃, C₄, C₈ and C₁₂: plasma concentration of mycophenolic acid at 0.5, 1, 2, 3, 4, 8 and 12 hours post dose respectively; AUC₀₋₁₂: area under the concentration time curve of mycophenolic acid (0-12 hours)

ตารางที่ 9 แสดงค่า r^2 ในการใช้ค่า MPA ที่จุดเวลาต่างๆในการสร้าง model เพื่อทำนายค่า MPA AUC₀₋₁₂ ในผู้ป่วยที่ได้รับยา MMF หรือ EC-MPS จำนวน 20 ราย

Model Summary^f

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.858 ^a	.736	.721	13.10559
2	.931 ^b	.867	.851	9.56750
3	.974 ^c	.948	.938	6.16590
4	.985 ^d	.970	.962	4.86776
5	.989 ^e	.979	.972	4.19025

a. Predictors: (Constant), C1

b. Predictors: (Constant), C1, C4

c. Predictors: (Constant), C1, C4, C8

d. Predictors: (Constant), C1, C4, C8, C2

e. Predictors: (Constant), C1, C4, C8, C2, C0

f. Dependent Variable: AUC

จากตารางที่ 8 ผู้ป่วยที่ได้รับยา MMF หรือ EC-MPS ค่า plasma MPA concentration ที่ 1, 8 และ 4 ชั่วโมง หลังการรับประทานยา มีความสัมพันธ์ดีกับค่า MPA AUC₀₋₁₂ เรียงลำดับจากมากไปน้อย ตารางที่ 9 ได้แสดง การสร้าง model ต่างๆเพื่อใช้ค่า plasma MPA concentration ที่จุดเวลาต่างๆในการทำนายค่า MPA AUC₀₋₁₂ พร้อมทั้งได้แสดงค่า correlation coefficient ของแต่ละ model ในการใช้ทำนายค่า MPA AUC₀₋₁₂ เนื่องจาก ยา MMF และ EC-MPS มีคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่แตกต่างกันจึงได้แยกวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ

plasma MPA concentration ที่จุดเวลาต่างๆกับ MPA AUC₀₋₁₂ ในผู้ป่วยที่ได้รับยา MMF กับยา EC-MPS ดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่าง plasma MPA concentration ที่จุดเวลาต่างๆกับ MPA AUC₀₋₁₂ ในผู้ป่วยที่ได้รับยา EC-MPS แต่พบความสัมพันธ์ระหว่าง plasma MPA concentration ที่จุดเวลาต่างๆโดยเฉพาะ C₀, C₁, C₄ และ C₈ กับ MPA AUC₀₋₁₂ ในผู้ป่วยที่ได้รับยา MMF นอกจากนี้ได้แสดงการสร้าง model ต่างๆเพื่อใช้ทำนายค่า MPA AUC₀₋₁₂ ในผู้ป่วยที่ได้รับยา MMF โดยอาศัยข้อมูลจากผู้ป่วยจำนวน 14 ราย พร้อมทั้งแสดงค่า correlation coefficient ของแต่ละ model ไว้ในตารางที่ 11 พบว่าค่าเฉลี่ยของ C₀ และ C₁ ในผู้ป่วยที่ต้องสนองต่อการรักษามีค่าสูงกว่าในผู้ป่วยที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในผู้ป่วยที่ได้รับยา MMF สำหรับการรักษาในช่วง induction ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 10 แสดงค่า correlation coefficient (r) ของความสัมพันธ์ระหว่าง MPA AUC₀₋₁₂ กับ ค่า MPA ที่จุดเวลาต่างๆแยกตามชนิดของยาที่ได้รับคือ Mycophenolate mofeti (MMF) และ enteric coated mycophenolate sodium (EC-MPS)

Models	MMF (N=14)	p-value	EC-MPS (N=6)	p-value
C ₀	0.828	0.000	-0.083	0.876
C _{0.5}	0.284	0.324	-0.186	0.724
C ₁	0.925	0.000	-0.048	0.928
C ₂	0.321	0.262	0.178	0.736
C ₃	0.326	0.256	0.441	0.382
C ₄	0.728	0.004	0.481	0.334
C ₈	0.82	0.000	0.299	0.564
C ₁₂	0.644	0.012	0.525	0.286

MPA: mycophenolic acid; AUC₀₋₁₂: area under the concentration time curve of mycophenolic acid (0-12 hours); C₀: trough plasma concentration of mycophenolic acid; C_{0.5}, C₁, C₂, C₃, C₄, C₈ and C₁₂: plasma concentration of mycophenolic acid at 0.5, 1, 2, 3, 4, 8 and 12 hours post dose respectively

ตารางที่ 11 แสดงค่า r² ในการใช้ค่า MPA ที่จุดเวลาต่างๆในการสร้าง model เพื่อทำนายค่า MPA AUC₀₋₁₂ ในผู้ป่วยที่ได้รับยา MMF จำนวน 14 ราย

Model Summary

					Change Statistics				
					R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	.925 ^a	.856	.844	11.28691	.856	71.262	1	12	.000
2	.964 ^b	.929	.916	8.27900	.073	11.304	1	11	.006
3	.987 ^c	.974	.967	5.21529	.045	17.720	1	10	.002

a. Predictors: (Constant), C1

b. Predictors: (Constant), C1, C4

c. Predictors: (Constant), C1, C4, C8

MPA: mycophenolic acid; AUC₀₋₁₂: area under the concentration time curve of mycophenolic acid (0-12 hours)

การคำนวณหาค่า MPA AUC₀₋₁₂ โดยใช้สูตรที่สร้างจากความเข้มข้นของ MPA ณ จุดเวลาต่างๆได้แก่

$$1. \text{ Predicted MPA AUC}_{0-12} = 19.035 + 2.082 \times C_1$$

$$(r = 0.925, r^2 = 0.856, \text{ adjusted } r^2 = 0.844, \text{ p-value} < 0.001)$$

$$2. \text{ Predicted MPA AUC}_{0-12} = 11.472 + 1.691 \times C_1 + 4.508 \times C_4$$

($r = 0.964$, $r^2 = 0.929$, adjusted $r^2 = 0.916$, p-value <0.001)

3. Predicted MPA AUC₀₋₁₂ = 7.517 + 1.261 x C₁ + 4.056 x C₄ + 4.052 X C₈

($r = 0.987$, $r^2 = 0.974$, adjusted $r^2 = 0.967$, p-value <0.001)

ตารางที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ C₀ และ C₁ ในผู้ป่วยที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษา
ภายหลังการได้รับยา MMF นาน 6 เดือนสำหรับการรักษาในช่วง induction

Variables	Responders (N=8)	Non-responders (N=4)	p-value
Mean C ₀ (mg/L)	24.48 ± 11.82	5.96 ± 3.93	0.014
Mean C ₁ (mg/L)	3.09 ± 1.07	1.23 ± 0.85	0.013

ตารางที่ 13 แสดงค่าร้อยละของผู้ป่วยจำนวน 20 รายที่มีผลข้างเคียงของยา mycophenolate จำแนกตาม
ประเภทของผลข้างเคียงของยาที่ได้รับ

อาการไม่พึงประสงค์	จำนวนผู้ป่วย	ร้อยละของผู้ป่วย	จำนวนผู้ป่วยที่มีค่า MPA AUC>60 h*mg/L
Gastrointestinal symptoms	9	45%	3
Hematologic side effects (anemia, leucopenia)	6	30%	3
infection	2	10%	1

จากตารางที่ 13 ร้อยละ 45, 30 และ 10 ของผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษามีผลข้างเคียงของยา mycophenolate ได้แก่ อาการในระบบทางเดินอาหาร (เช่น ถ่ายอุจจาระเหลว, คลื่นไส้ และ อาเจียน), ความผิดปกติในระบบเลือด (เช่น ภาวะซีด และเม็ดเลือดขาวต่ำ) และการติดเชื้อตามลำดับ จากผู้ป่วยที่มีค่า MPA AUC > 60 h*mg/L ทั้งสิ้น 5 รายมีจำนวน 3 ราย, 3 รายและ 1 รายที่มีผลข้างเคียงของยาในระบบทางเดินอาหาร, ความผิดปกติในระบบเลือดและการติดเชื้อตามลำดับ ไม่มีผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาที่มีผลข้างเคียงรุนแรงถึงแก่ชีวิต

กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการศึกษาหาความสัมพันธ์ระดับยา MPA กับรูปแบบยีน UGT1A9*22 พบว่าผู้ป่วยทั้งหมด 40 โดยวิธี sequencing พบว่าเป็นผู้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบปกติ (wild type) T9/T9 จำนวน 6 ราย คิดเป็น 15% ลักษณะทางพันธุกรรมแบบ T9/T10 จำนวน 17 ราย และผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ T10/T10 17 ราย คิดเป็น 42.5% ทั้งสองกลุ่มในการศึกษานี้ (ตาราง 14) ซึ่งผู้ป่วยทั้งหมดได้รับการเจาะเลือดทั้งหมด 8 จุด คือ 0, 0.30, 1, 2, 4, 8, 12 ชั่วโมงเพื่อนำมาหาค่าระดับยาภายใต้กราฟ (AUC) ดังที่แสดงตารางที่ 15 ผู้ป่วยทั้งหมดได้รับทั้งยา cellcept และ myfortic

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับยา MPA กับลักษณะทางพันธุกรรมของ UGT1A9*22

การจากที่คนไข้ได้รับยาในปริมาณที่เท่ากันแต่การตอบสนองต่อการรักษาไม่เหมือนกัน จากผลการทดลองข้างบน ซึ่งปัจจัยหลักที่น่าจะเกี่ยวข้องคือลักษณะทางพันธุกรรมที่ใช้ในการเปลี่ยนรูปแบบ active ของ MPA ให้เป็นตัว inactive เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบทั้งสามแบบของยีน UGT1A9*22 กับระดับยา MPA พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ นอกจากนั้นยังหาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของยีนกับ ระดับยา MPA จากช่วงเวลาต่างๆ ดังตาราง15

ตารางที่ 14 แสดงความชุกของผู้ป่วยที่มีความหลากหลายของรูปแบบยีน UGT1A9*22

ลักษณะทางพันธุกรรม UGT1A9*22	ความชุกที่พบในผู้ป่วย
T9/T9	6 (15%)
T9/T10	17 (42.5%)
T10/T10	17 (42.5%)

ตารางที่ 15 แสดง pharmacokinetic parameters ของ mycophenolic acid ที่ผู้ป่วยจำนวน 40 รายได้รับ

ระดับยาที่เวลาต่างๆ	Means \pm SD.
C ₀ (mg/L)	2.64 \pm 1.71
C _{0.5} (mg/L)	10.02 \pm 8.26
C ₁ (mg/L)	12.54 \pm 10.31
C ₂ (mg/L)	8.17 \pm 6.00
C ₃ (mg/L)	4.32 \pm 2.89
C ₄ (mg/L)	3.13 \pm 1.87
C ₈ (mg/L)	2.95 \pm 2.28
C ₁₂ (mg/L)	2.36 \pm 1.41
AUC ₀₋₁₂ (h*mg/L)	49.97 \pm 24.55

Cmax (mg/L)	15.70 ± 8.29
Tmax (hours)	1.37 ± 0.92
Dosage (mg.)	1,514.28 ± 410.98

ผลการวิจัยความสัมพันธ์ของการทำงานของเอนไซม์ TPMT ในเม็ดเลือดแดงกับลักษณะทางพันธุกรรมในผู้ป่วย SLE ที่ได้รับการรักษาด้วยยา azathioprine

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันตนเองบกพร่อง (Systemic Lupus Erythematosus; SLE) ที่ทำการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ โรงพยาบาลนพรัตน์ราชธานี จำนวน 121 ราย ได้รับการรักษาด้วยยาazathioprine โดยมีอายุเฉลี่ยอยู่ที่ 38.45±13.92 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 38.45 ±13.92 กิโลกรัม และมีปริมาณยาที่ได้รับในระหว่างการรักษาอยู่ที่ 1.5±0.52 มก./กก./วัน ระดับยาของ AZA ที่ได้รับจากโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลนพรัตน์ราชธานีไม่ได้มีความแตกต่างกัน ตารางที่ 16 แสดงค่าข้อมูลพื้นฐานคนไข้ของโรงพยาบาลทั้งสองแห่ง

ผลการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของยีน thiopurine S-methyltransferase (TPMT)

จากการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติทางพันธุกรรมของยีน TPMT ที่มีรูปแบบ *3C โดยอาศัยเทคนิคPCR-RFLP พบว่าเป็นผู้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบปกติ (wild type) TPMT*1/*1 จำนวน 104 ราย คิดเป็น 92.86% และลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C จำนวน 8 ราย คิดเป็น 7.24% โดยไม่พบผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*3C/*3C ในการศึกษาครั้งนี้ (ตาราง 17)

Table 16 Characteristic of Thai patients with Rheumatologic disease.

Demographic of subjects	King Chulalongkorn Memorial hospital	Nopparatrajchatanee hospital	Total
Gender (males/females)	-/40	1/71	1/112
Age (Mean± SD, range; yr)	34.41± 10.96 (20 – 65)	40.66 ±14.94 (13 – 76)	38.45 ± 13.92 (13 – 76)
Weight (Mean ± SD, range; kg)	55.59 ± 9.09 (43.6 – 84.2)	54.73 ± 10.01 (40 – 77)	55.05 ± 9.62 (40 – 84)
Dose(mg) /kg/day (Mean ± SD, range; mg)	1.47 ± 0.46 (0.77 – 2.29)	1.53 ± 0.55 (0.65 – 2.5)	1.51 ± 0.52 (0.65 – 2.5)
Dose(mg) /kg/day (Median, mg)	1.53	1.56	1.78

ตารางที่ 17 Genotype and allele frequency for TPMT*3C polymorphism at position 719 A/G, exon 10 in Rheumatologic disease patients.

Genotyping	King Chulalongkorn Memorial hospital	Nopparatrajchatan ee hospital	Total
G/G (TPMT*3C/*3C)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
A/G (TPMT*1/*3C)	4 (3.57%)	4 (3.57%)	8 (7.14%)
A/A (TPMT*1/*1)	36 (32.14%)	68 (60.72%)	104 (92.86%)

อุบัติการณ์ของการรุดการทํางานของไขกระดูก

จากการใช้ยา AZA ในกลุ่มผู้ป่วย SLE ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT ที่แตกต่างกันเกณฑ์ในการเกิดการรุดการทํางานของไขกระดูกจากการใช้ยา AZA ได้แก่ ระดับเม็ดเลือดขาวต่ำหรือระดับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำ หรือเกล็ดเลือดต่ำ ใดๆอย่างหนึ่งหรือมากกว่า รวมจำนวนทั้งสิ้น 10 รายจากทั้งสิ้น 91 รายที่มีข้อมูลทางคลินิก คิดเป็น 89 % โดยกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C จำนวน 8 ราย โดย 5 ราย เกิดการรุดการทํางานของไขกระดูก คิดเป็น 11 % และกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 จำนวน 83 ราย มี 5 ราย เกิดการรุดการทํางานของไขกระดูกจำนวน 6 % เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Fisher's exact test พบว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT แตกต่างกัน พบว่าเกิดอุบัติการณ์ของการเกิดการรุดการทํางานของไขกระดูกจากการใช้ยา AZA ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C มากกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบปกติ (TPMT*1/*1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.001$) เมื่อแยกออกเป็นผู้ป่วยที่มีระดับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำพบว่า กลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C มี 2 รายจากทั้งหมด 8 ราย ที่มีระดับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำ คิดเป็น 25% และกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 จำนวน 83 ราย มีเพียง 3 ราย ที่มีระดับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำคิดเป็น 3.6% เมื่อทดสอบทางสถิติด้วย Fisher's exact test พบว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT แตกต่างกัน มีอุบัติการณ์ของระดับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำจากการใช้ยา AZA ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C มากกว่าในกลุ่มผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบปกติ (TPMT*1/*1) อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.06$)

ตารางที่ 18. อุบัติการณ์ในการเกิดการกดการทำงานของไขกระดูก (myelosuppression) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มคนไข้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกัน

TPMT genotype	AZA-induced myelosuppression in SLE patients			
	Leucopenia	Neutropenia	Missing	Total
*1/*1 (wild type)(N)	2 (63.0%)	1 (3.1%)	4 (11.11%)	36
*1/*3C (N)	3 (75.0%)	2 (50.0%)	0 (0.00%)	4
Total	5 (13.89%)	3 (8.33%)	4 (10.0%)	40
p-value	0.005	0.027		
Odd ratio	45 เท่า	31 เท่า		

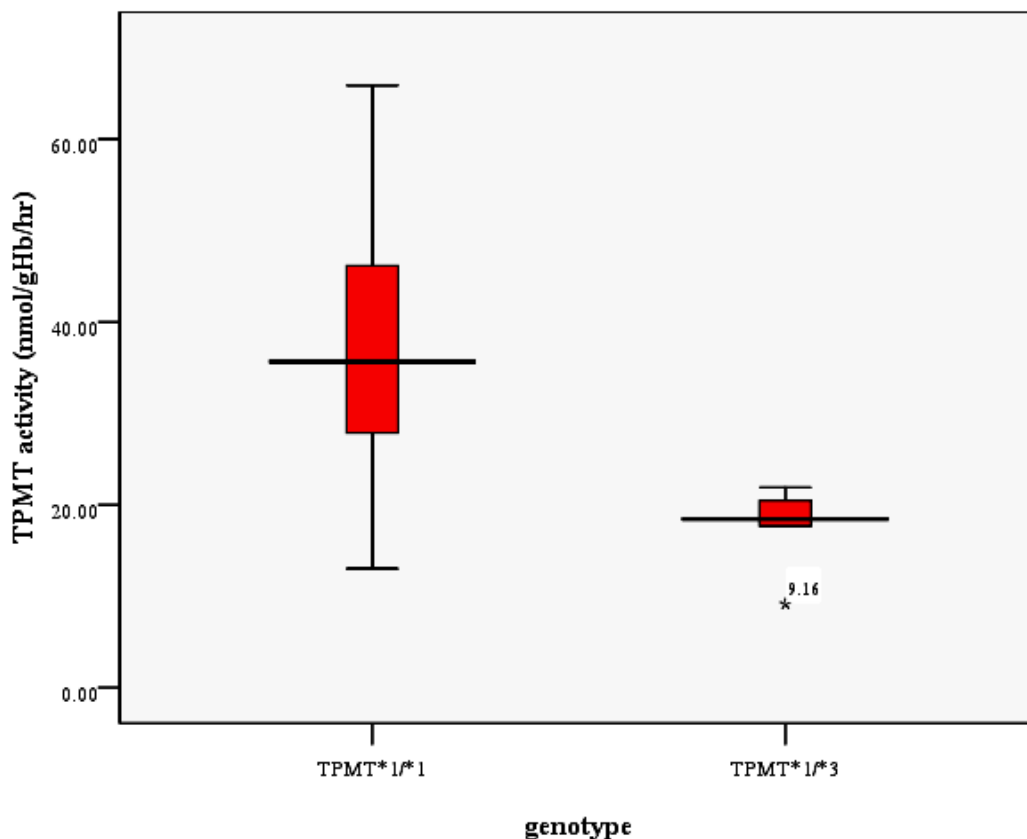
(95%CI 3.092 – 654.900, p = 0.000) (95%CI 1.896 – 506.771, p = 0.000)

ผลการศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย SLE

ผู้ป่วยจำนวน 62 รายที่สามารถตรวจวัดการทำงานในเม็ดเลือดแดง พบว่าข้อมูลดังกล่าวมีการกระจาย

ตัวปกติ ($p = 0.20$) มีค่าอยู่ระหว่าง 9.16 – 65.89 nmol 6-MTG/gHb/hr มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36.26 ± 13.403 (SD) nmol 6-MTG/gHb/hr (95%CI 32.86 – 39.67) และค่าค่ามัธยฐาน (median) เท่ากับ 38.224 nmol 6-MTG/gHb/hr ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 จำนวน 57 ราย มีค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 37.90 ± 12.64 (SD) และ TPMT*1/*3C จำนวน

5 ราย มีค่าเฉลี่ย (mean) เท่ากับ 17.53 ± 4.96 (SD) เมื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ในคนไข้ทั้งสองกลุ่มโดยใช้สถิติ t-test พบว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C มีความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ TPMT ในเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบปกติ (wild type) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.001$), ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 การทำงานของเอนไซม์ TPMT ภายในเม็ดเลือดแดงของผู้ป่วย SLE จำแนกตามลักษณะทางพันธุกรรมของยีน TPMT

อภิปรายผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้พบผู้ป่วย SLE ที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมแบบ heterozygous TPMT*1/*3C มีความถี่ของยีนเท่ากับ 10% และมีความถี่ของ alleles เท่ากับ 5% พบว่ามีความถี่เท่ากับการศึกษาในกลุ่มประชากรสุขภาพดีเชื้อสายไทยอีสาน (18) การศึกษาครั้งนี้พบว่ามีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ภายในเม็ดเลือดแดงที่ต่ำกว่าปกติและพบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำจากการใช้ยา AZA มากกว่าผู้ป่วย SLE ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 (wild type) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีความเสี่ยงสัมพันธ์ (OR) เท่ากับ 45 เท่า ($p < 0.001$) และภาวะเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลต่ำมากกว่าผู้ป่วย SLE ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 (wild type) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($p = 0.027$) ซึ่งมีความเสี่ยงสัมพันธ์เท่ากับ 31 เท่า ($p < 0.001$) จากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าแตกต่างจากการศึกษาผู้ป่วย SLE ในประเทศสหรัฐอเมริกาในปีค.ศ. 1999 (22) และปีค.ศ. 2005 ในประเทศญี่ปุ่น (16) ที่สรุปว่าความผิดปกติทางพันธุกรรม

ของยีน TPMT ไม่สามารถใช้ในการทำนายการเกิดพิษจากการใช้ยา AZA ในผู้ป่วยที่ได้รับการศึกษาในครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากการศึกษาแบบ retrospective ทำให้ไม่สามารถ วัดการทำงานของเอ็นไซม์ในผู้ป่วยได้ทุกราย มีเพียง 18 รายเท่านั้นที่สามารถวัดการทำงานของเอ็นไซม์ได้ และเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมพบว่าลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C มีการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ในเม็ดเลือดแดงต่ำกว่าในผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบปกติ (wild type) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.026$) ถึงอย่างไรก็ตามยังมีผู้ป่วยที่พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมเป็นแบบ TPMT*1/*1 แต่มีการทำงานของเอ็นไซม์อยู่ในระดับเดียวกับลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C จำนวน 1 ราย แต่ไม่พบว่าเกิดการกดการทำงานของไขกระดูกอาจเกิดจากแพทย์สั่งหยุดการใช้ยา AZA ก่อนที่จะเกิดเหตุการณ์เนื่องจากคนไข้มีอาการของโรคกำเริบ และเหตุที่มีการทำงานของเอ็นไซม์ต่ำแต่ไม่พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมปกติอาจเนื่องมาจากการทดสอบครั้งนี้เป็นการทดสอบเพียง TPMT*3C เท่านั้นปัจจุบันพบว่ามีความผิดปกติที่ผิดปกติไปในส่วนของยีนมากถึง 27 รูปแบบ ในปี ค.ศ. 2009 พบผู้ป่วยเปลี่ยนไตในประเทศไทยมีลักษณะพันธุกรรมแบบ TPMT*27 ซึ่งยังไม่เคยพบมาก่อนและพบว่ามีการทำงานของเอ็นไซม์ต่ำกว่า wild type (19) นอกจากนี้ยังมี TPMT*6 มีอุบัติการณ์ต่ำในกลุ่มประเทศเกาหลี (Korean) และ ญี่ปุ่น (Japanese) (23, 24) ซึ่งไม่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

นอกจากนี้ยังมีผลจากความผิดปกติทางพันธุกรรมในส่วนของ promoter ของยีน TPMT (variable number of tandem repeats; VNTR) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าจำนวนชุดของ tandem repeats ส่งผลกระทบต่อการถอดรหัสทางพันธุกรรม (transcription) ส่งผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ (25) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*1 และมีการทำงานของเอ็นไซม์ปกติแต่เกิดการกดการทำงานของไขกระดูกจำนวน 1 รายอาจเกิดจากการทำงานของเอ็นไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงยา AZA ในร่างกายมีความผิดปกติได้แก่ การศึกษาในกลุ่มผู้ป่วย IBD และ rheumatoid arthritis พบว่ายีน ITPA ที่มีรูปแบบ ITPA94C>A ส่งผลให้การทำงานของเอ็นไซม์ ITPA ต่ำ ส่งผลให้ 6-TIMP สูงขึ้นทำให้เกิดพิษจากการใช้ยาเพิ่มมากขึ้น (26) และยังพบว่าในผู้ป่วย IBD ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมของยีน GST เป็นแบบ GST-M1 อาจทำให้มี 6-MP ในเซลล์สูงขึ้น จึงเสี่ยงต่อภาวะการเกิดเม็ดเลือดขาวต่ำมากขึ้น (27) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในประชากรชาวคอเคเซียนและชาวญี่ปุ่นพบว่าประมาณ 20% และ 11% มีการทำงานของเอ็นไซม์ XO ต่ำ (28) ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องเหล่านี้ในประเทศไทย นอกจากการทำงานของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกันแล้วยังมีปัจจัยแวดล้อมอื่นเช่น การให้เลือดกับคนไข้ทำให้ค่าการทำงานที่วัดได้ไม่ตรงกับความเป็นจริง การใช้ยาร่วมมีรายงานพบว่ามียาหลายชนิดทำให้การทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ต่ำลง เช่น salphasalazine, olalazine, mesalamine, balsazide (15, 29-31), furosemide, bendoflumethiozide, trichlormethiozide (32) เป็นต้น ซึ่งการศึกษากครั้งนี้ไม่ได้ทำการเก็บข้อมูลในส่วนนี้ และยังสามารถเกิดจากการกำเริบของโรค, การติดเชื้อไวรัสและการใช้ชีวิตประจำวันของคนไข้ นอกจากนี้ยังมีคนไข้ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ TPMT*1/*3C ที่ไม่เกิดพิษจากการใช้ยาจำนวน 1 ราย และไม่มีข้อมูลการทำงานของเอ็นไซม์ไม่สามารถติดตามคนไข้มารับการตรวจวิเคราะห์ได้และเหตุที่ไม่เกิดพิษจากการใช้ยาอาจเป็นเพราะคนไข้ไม่ได้ใช้ยาตามแพทย์สั่งหรือได้รับยาในปริมาณที่ต่ำกว่าความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์ TPMT ในแต่ละคนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามลักษณะของพันธุกรรมที่ปรากฏ ทั้งนี้การตรวจระดับเม็ดเลือดในกระแสเลือดของผู้ป่วยเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอที่จะป้องกันพิษที่เกิดจากการใช้ยา AZA ได้เนื่องจากเราไม่สามารถวัดระดับเม็ดเลือดของผู้ป่วยได้ตลอดเวลา จึงต้องทำการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมก่อนการใช้ยาเพื่อใช้เป็นเครื่องมือประกอบการตัดสินใจของแพทย์ในการปรับขนาดยาหรือเลือกให้ยาให้เหมาะสมกับคนไข้ เพื่อให้ได้รับผลการรักษาสูงสุดทั้งในด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัย

CHAPTER IV

Hypomethylation of LINE-1 but not Alu in lymphocyte subsets of systemic lupus erythematosus patients

Hypomethylation of LINE-1 but not Alu in lymphocyte subsets of systemic lupus erythematosus patients

Jeerawat Nakkuntod , Yingyos Avihingsanon, Apiwat Mutirangura, Nattiya Hirankarn

ABSTRACT

Background: T lymphocytes from SLE patients have a global decrease in the 5-methylcytosine content. Previous studies have identified hypomethylation in the promoter of several genes but there is limited study in the interspersed repetitive sequences (IRSs).

Methods: We examined and compared the methylation levels of long interspersed nuclear element 1 s (LINE-1) and Alu elements in normal and SLE CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes and B lymphocytes by the combined bisulfite restriction analysis-interspersed repetitive sequences (COBRA-IRS).

Results: Hypomethylation of LINE-1 but not Alu was found in CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, and B lymphocytes of SLE patient ($P=0.005$, 0.002 , and 0.007 , respectively). Moreover, when the SLE patients were divided into active and inactive groups, LINE-1 hypomethylation was more significantly distinguished in both CD4+ and CD8+ T lymphocytes of patients from the active SLE group when compared to the controls. Surprisingly, Alu hypomethylation was also observed in CD8+ T lymphocytes from the inactive SLE group when compared to the normal controls ($P=0.0056$).

Conclusions: The hypomethylation in each lymphocyte subset of SLE was IRSs specific, mainly found in LINE-1 rather than Alu.

1.INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a detrimental autoimmune disease that produces various antibodies against the person's own cells, organs and body. The effects of SLE on selected organs and cells can cause death or seriously reduce a person's quality of life. Even though there are many studies investigating the pathogenesis of SLE, but it is uncertain what exactly causes the disease, whether it's environmental, genetic or other unknown factors. Some have suggested that epigenetic changes may contribute to the pathogenesis of SLE. Several studies have shown a reduction of 5-methylcytosine content in T lymphocytes from SLE patients [1,2]. These hypomethylations were associated with decreasing Dnmt1 mRNA levels [3–5]. Moreover, the adoptive transfers of 5-azacytidine or procainamide-treated T lymphocytes to syngeneic recipient mice caused a lupus-like disease [6,7]. Therefore, CD4+ T lymphocyte hypomethylation has been hypothesized to be a major contributor to the development of SLE by affecting some important genes. For instance, the CD4+ T lymphocyte autoreactivity was found to be partly due to an overexpression of the adhesion molecule lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1), perforin and CD70. The increased expression of these genes in CD4+ T lymphocytes observed in SLE patients was related with demethylation at the promoter sequence [8–10]. In addition, the overexpression and demethylation of CD40LG located in chromosome X was found only in CD4+ T lymphocyte from female with SLE. This result raises a question that demethylation in X inactivation chromosome may be an important factor result in highly incidence of SLE in female than male [11]. Besides the CpG-rich sequences within genes, most of the methylated cytosines can be found in the interspersed repetitive sequences (IRSs) [12,13].

Human genome contains approximately 41% of IRSs [14], which can be divided into, the non-LTR and LTR retroelements [15]. Two high copy numbers of non-LTR retroelement are long interspersed nuclear elements (LINEs) (20.1%) and short interspersed nuclear elements (SINEs e.g. ALU) (13.1%) [14]. While, the majority of LTR retroelements is human endogenous retroviruses (HERVs) (8.2%) [14]. Presently IRSs are not “junk DNA” because they affect the human genome in many way including generating insertion mutations, genomic instability and altering gene expression [16]. Normally, IRSs were inactivated by DNA methylation processes. Therefore,

changes in IRSs methylation should alter cellular functions. A number of studies have reported the hypomethylation of LINE1 and Alu in cancer cells [17–22] and hypomethylation of Alu but not LINE1 in peripheral mononuclear cells (PBMCs) of aging process [23,24].

So far there is limited information about methylation profile of IRSs in SLE. One recent study conducted in twins and sibling pairs discordant for SLE attempted to identify the region within the genome where DNA methylation has become aberrant. They reported a significant reduction in methylation of 18S and 28S ribosomal genes but no other differences were detected in non-LTR retrotransposons such as LINE-1, Alu, satellite 2 repeats, NBL2 and D4Z4 non-satellite subtelomeric repeats methylation levels [5]. However, they used mixed WBCs to detect the methylation changes in certain genes or regions. DNA methylation are cell-type specific and requires investigations of each cell type individually. Aside from this one study, there is scarce information on the location and correlation of hypomethylation to the exact patho-etiology of SLE. Therefore, in this study, we investigated the methylation status of LINE-1 and Alu in CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes and B lymphocytes in SLE patients and normal controls.

2. MATERIAL AND METHOD

2.1. Patients

Twenty-three patients with SLE were recruited from King Chulalongkorn Memorial Hospital (Table 1). SLE patients with at least 4 of the American College of Rheumatology (ACR) criteria for the classification of SLE were enrolled into the study. Disease activity was assessed by the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) [25]. Inactive disease (n=9) was defined as SLEDAI-2K score ≤ 4 whereas active disease (n=14) had to have SLEDAI-2K score ≥ 4 . Ten healthy female volunteers with no history of any autoimmune disease served as normal controls. The average age of the inactive SLE, active SLE and normal control was 30 ± 7.1 , 31.4 ± 7.7 and 28.2 ± 1.9 , respectively (mean \pm SD). Informed consent was obtained from each patient before entering the study. The trial was approved by the Institutional Review Board of the Faculty of

Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Table 1 Patient demographics and medications.

Table 1 Patient demographics and medications.

Patient	Group	Age	Sex	SLEDAI-2 K	Medications
1	Active	35	F	10	Oral Prednisolone 20 mg/day, Cellcept 1.5 g/day
2	Inactive	35	F	4	Oral Prednisolone 5 mg/day, Cellcept 500 g/day
3	Active	33	F	8	Oral Prednisolone 25 mg/day, Endoxan 50 mg/day
4	Active	33	F	10	Oral Prednisolone 15 mg/day
5	Active	33	F	8	Imuran 75 mg/day
6	Active	38	F	12	Oral Prednisolone 5 mg/day
7	Active	30	F	16	Oral Prednisolone 10 mg/day, Cellcept 1.5 g/day
8	Active	24	F	16	Oral Prednisolone 10 mg/day
9	Inactive	25	F	4	Oral Prednisolone 10 mg/day
10	Inactive	36	F	4	Oral Prednisolone 7.5 mg/day, Imuran 50 mg/day
11	Inactive	30	F	0	Oral Prednisolone 10 mg/day
12	Inactive	37	F	0	Oral Prednisolone 2.5 mg/day
13	Inactive	16	F	4	Oral Prednisolone 10 mg/day
14	Inactive	27	F	4	Oral Prednisolone 10 mg/day
15	Active	41	F	5	Oral Prednisolone 10 mg/day
16	Active	37	M	10	Oral Prednisolone 15 mg/day, Endoxan 1400 mg IV × 6 monthly
17	Active	15	F	12	Endoxan 1000 mg IV × 6 monthly
18	Active	42	F	16	Oral Prednisolone 5 mg/day
19	Inactive	27	F	4	Oral Prednisolone 10 mg/day
20	Inactive	37	F	0	None
21	Active	32	F	6	None
22	Active	27	F	16	None
23	Active	20	F	10	Oral Prednisolone 15 mg/day

2.2. Cell isolation PBMCs were isolated by Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation.

B and T lymphocyte subsets were isolated by magnetic beads. First, B lymphocytes were isolated from PBMCs by positive selection using Dynabeads CD19 (Pan B) (DynaL Biotech; Invitrogen). After B lymphocytes were collected, negative flow through was used to isolate T lymphocytes by negative selection using Dynal T Cell Negative Isolation Kit Ver II (DynaL Biotech; Invitrogen). Cells from the second negative flow through were used to isolate CD4+ T lymphocytes by positive selection using Dynal CD4 Positive Isolation Kit (DynaL Biotech; Invitrogen). Cells from

the third negative flow through, unbound cells or non-CD4+ T lymphocytes, were collected. The purity of the different cell types was evaluated by flow cytometry. The purity of CD3+ CD4+ T lymphocytes was more than 98%. Approximately 80% of the cells from the non-CD4+ T lymphocyte fraction were CD3+ CD8+ T lymphocytes. These cells were referred to as CD8+ T lymphocytes.

2.3. Combined bisulfite restriction analysis (COBRA) DNA was extracted from collected cells by using a salting out method [26].

Bisulfite conversion of DNA was performed using the EZ DNA methylation kit (Zymo Research), according to the manufacturer's protocol. Global assessment of LINE-1 and Alu was performed by the combined bisulfite restriction analysis-interspersed repetitive sequences (COBRA-IRS) as previously described [18,24].

2.4. Statistical analyses

Statistical significance was determined by applying an independent sample t-test. Pearson's correlation coefficient was used to examine the relationship between two continuous variables. All analyses were performed using SPSS, version 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. RESULTS

3.1. Differences in DNA methylation levels for LINE-1 and Alu between CD4+, CD8+ T lymphocytes and B lymphocytes from SLE patients versus normal controls

We compared methylation levels in different lymphocyte subsets from both SLE patients and the control group. Our study showed that SLE patients have hypomethylation of LINE-1 in CD4+, CD8+ T lymphocytes, and B lymphocytes when compared to normal controls ($P=0.005$, 0.002 , and 0.007 , respectively) (Fig. 1A). However, there were no differences in methylation profile for Alu between SLE patients and the normal controls for any lymphocyte subsets (Fig. 1B).

3.2. Changes in LINE-1 and Alu methylation levels in SLE patients according to disease and clinical parameters

Methylation levels of retroelements were correlated with white blood counts, % lymphocytes, platelet counts, anti-dsDNA and antinuclear antibodies titer, complement activity (CH50) and quantitative complement levels (C3) (Table 2). There were no significant correlations between methylation levels of LINE-1 and Alu to any of the clinical parameters studied.

However, when we divided SLE patients into active and inactive groups based on their SLEDAI-2K score, hypomethylation of LINE-1 was significantly observed in B lymphocytes from both groups ($P=0.0304$ and $P=0.0045$, respectively) (Fig. 1C). The hypomethylation in the active SLE group for CD4+ and CD8+ T lymphocytes was significantly different when compared to the normal controls ($P=0.0028$ and 0.0032 , respectively). Among the inactive SLE group, a trend of hypomethylation in CD4+ and CD8+ T lymphocytes was observed when compared to the normal controls ($P=0.1054$ and 0.1057 , respectively) but this was not statistically significant (Fig. 1C). There were no significant differences of LINE-1 and Alu methylation in CD4+, CD8+ T lymphocytes and B cell between inactive and active SLE (for LINE-1: $P=0.33$, $P=0.056$ and 0.97 , respectively, for Alu: $P=0.51$, $P=0.14$ and 0.41 , respectively). Surprisingly, Alu hypomethylation was detected in CD8+ lymphocytes from the inactive SLE group compared to the normal controls ($P=0.0056$) (Fig. 1D).

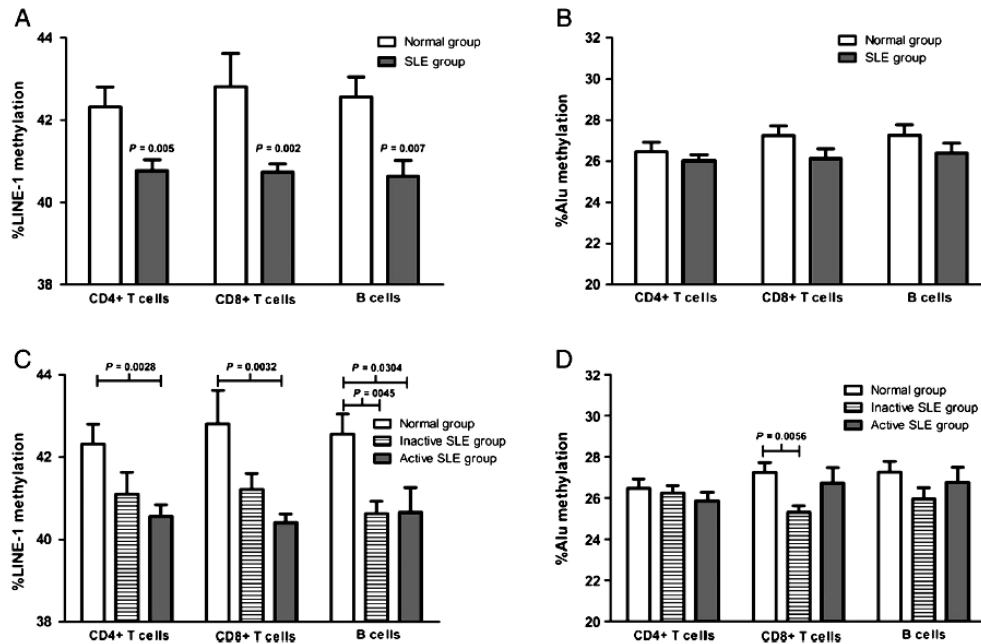


Figure. 1. DNA methylation levels in SLE CD4+ T cells, CD8+ T cells, and B cells compared to normal control of (A) LINE-1 and (B) Alu were shown in Mean±SEM. In addition, the methylation levels of (C) LINE-1 and (D) Alu in active and inactive SLE CD4+ T cells, CD8+ T cells, and B cells compared to normal control were shown in Mean±SEM. P-value calculated by unpaired t-test two-tailed analysis.

Table 2 Correlation between DNA Methylation levels with clinical characteristics.

		White blood counts (6755±586.5 cells/mm ³)		% Lymphocytes (20.8±2.02)		Platelet counts (252,587±22,447 cells/mm ³)		Anti-dsDNA titer (131.4±60.3)		ANA titer (1657±383.7)		CH50 (20.9±2.3 U/ml)		C3 level (77.6±5.9 mg/dl)	
		r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value
LINE-1	CD4+ T cells	0.08	0.72	0.18	0.43	0.10	0.66	0.12	0.62	0.06	0.77	-	0.93	-	0.38
	CD8+ T cells	0.36	0.10	0.05	0.80	0.25	0.27	-	0.74	0.15	0.49	-	0.78	-	0.69
	B cells	0.20	0.37	0.18	0.41	0.04	0.87	0.22	0.31	0.00	0.99	-	0.22	-	0.46
Alu	CD4+ T cells	0.31	0.21	-	0.71	0.33	0.20	-	0.57	0.02	0.92	0.30	0.21	-	0.27
	CD8+ T cells	0.06	0.80	0.09	0.48	0.16	0.54	0.14	0.91	0.02	0.51	-	0.41	-	0.36
	B cells	-	0.71	0.18	0.29	0.16	0.95	0.03	0.52	0.16	0.88	0.20	0.97	-	0.89
		0.10		0.27		0.02		0.16		0.04		0.01		0.03	

Relationship was calculated by Pearson's correlation (r) coefficient test.

Numbers in the parentheses indicate mean±SEM.

4. DISCUSSION

The exact patho-etiology of SLE is unknown. Many studies have suggested the potential role of IRS to regulate cellular functions. Therefore, hypomethylation of these retroelements may affect cellular gene expression and contribute to the pathogenesis and activity of SLE. Studies have shown that treating normal lymphocyte with 5-azacytidine can reactivate IRS transcript (HERV) [27] and some IRS (LINE-1 and HERV-E transcripts) were detected in patients with SLE [28,29]. As a result of this, it was hypothesized that the upregulation of LINE-1 or HERV was likely to have resulted from demethylation of these IRS sequences but there was no direct evidence to support this. Our study is the first of its kind to ascertain the location of DNA hypomethylation of IRS in each lymphocyte subset in patients with SLE by using a relatively new technique known as the COBRA-IRS instead of pyrosequencing.

For this study, we opted not to use pyrosequencing. The reason for this is because the COBRA-IRS can detect methylation of thousands of CpG loci by just using one set of conserved primers for each IRS. Aside from that, we have validated this method by comparing it to pyrosequencing and found that IRS-COBRA was very accurate and reliable [24]. We have previously tested the IRS-COBRA in normal controls, cancer patients and the elderly populations. Our results for LINE-1 and Alu methylation were the same to those studies using the pyrosequencing technique. In cancer cells, LINE-1 and Alu were detected by using both IRS-COBRA and pyrosequencing methods [18,30,31]. Once again in the PBMCs from the aging population, the hypomethylation of Alu was detected from both procedures [24].

It was hypothesized that the hypomethylation in aging might contribute to the pathogenesis of autoimmune diseases in elderly [32]. However, there was no significant difference of Alu methylation in different lymphocyte subsets of SLE patients. This may be due to the different pathogenesis seen in both groups. SLE, unlike in the aging population, predominantly develops in the younger age group. It is also possible that there may be other unknown factors aside from genetics and environment that may selectively influence certain IRS type. However, when we looked at the results obtained from the active, inactive SLE groups and normal controls, we noticed that Alu hypomethylation was significantly prominent in CD8+ lymphocytes of the inactive SLE group. Future studies are warranted to confirm the existence of Alu hypomethylation in CD8+ T

lymphocytes of patients with inactive SLE as well as investigate the functional consequences of Alu methylation.

In contrast with the results observed from the SLE twin discordant study [5], we detected significant hypomethylation changes in LINE-1 repeats in CD4+, CD8+ T and B lymphocyte subsets from patients with SLE when compared to normal controls. This discrepancy may be attributed to the WBCs that they had used to detect hypomethylation whereas in our study, we had separated our cells into CD4+, CD8+ T and B lymphocytes. Even though we were not able to detect Alu hypomethylation, but we were able to observe LINE-1 hypomethylation in the active group for both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. This methylation was significantly distinct when compared to normal controls. We were concerned that medications can be responsible for DNA hypomethylation. However, most of SLE patients in this study received steroid treatment. So, hypomethylation in SLE patients is not seemed to be the effect of medications as previously described [1,4]. Our result corroborates previous reports that T lymphocytes from active lupus have a reduced number in the total deoxymethylcytosine content [2]. This observation is correlated with the decreased DNMT transcripts and decreased ERK phosphorylation in T lymphocytes upon stimulation [2,3]. Our results suggest that the methylation of LINE-1 may contribute to the global hypomethylation in T lymphocytes of patients with active SLE. Future studies are in the works to look at LINE-1 transcripts in correlation with LINE-1 hypomethylation.

Although we do not know the significance of these observations, there are a number of possible consequences that can occur from the hypomethylation of LINE1. For example, it was recently suggested that the increased expression of LINE-1 transcripts in lupus patients could be the inducer of IFN type I [29]. Moreover, hypomethylation of these retroelements may affect expression or alternative splicing of cellular genes. For example, recent study showed that hypomethylation of a specific LINE-1 promoter can induce alternative transcript of MET oncogene in bladder tumors [33]. The identification of those affected genes might lead to the new mechanism that contributes to SLE pathogenesis.

REFERENCES

- [1] Luo Y, Li Y, Su Y, Yin H, Hu N, Wang S, et al. Abnormal DNA methylation in T cells from patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 2008;159:827–33.
- [2] Richardson B, Scheinbart L, Strahler J, Gross L, Hanash S, Johnson M. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1665–73.
- [3] Deng C, Kaplan MJ, Yang J, Ray D, Zhang Z, McCune WJ, et al. Decreased Rasmitogen- activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. *Arthritis Rheum* 2001;44:397–407.
- [4] Balada E, Ordi-Ros J, Serrano-Acedo S, Martinez-Lostao L, Rosa-Leyva M, Vilardell-Tarres M. Transcript levels of DNA methyltransferases DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 2008;124:339–47.
- [5] Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, et al. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. *Genome Res* 2010;20: 170–9.
- [6] Quddus J, Johnson KJ, Gavalchin J, Amento EP, Chrisp CE, Yung RL, et al. Treating activated CD4+ T cells with either of two distinct DNA methyltransferase inhibitors, 5-azacytidine or procainamide, is sufficient to cause a lupus-like disease in syngeneic mice. *J Clin Invest* 1993;92:38–53.
- [7] Yung R, Chang S, Hemati N, Johnson K, Richardson B. Mechanisms of drug-induced lupus. IV. Comparison of procainamide and hydralazine with analogs in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* 1997;40:1436–43.
- [8] Yung R, Powers D, Johnson K, Amento E, Carr D, Laing T, et al. Mechanisms of drug-induced lupus. II. T cells overexpressing lymphocyte function-associated antigen 1 become autoreactive and cause a lupuslike disease in syngeneic mice. *J Clin Invest* 1996;97:2866–71.

- [9] Kaplan MJ, Lu Q, Wu A, Attwood J, Richardson B. Demethylation of promoter regulatory elements contributes to perforin overexpression in CD4+ lupus T cells. *J Immunol* 2004;172:3652–61.
- [10] Lu Q, Wu A, Richardson BC. Demethylation of the same promoter sequence increases CD70 expression in lupus T cells and T cells treated with lupus-inducing drugs. *J Immunol* 2005;174:6212–9.
- [11] Lu Q, Wu A, Tesmer L, Ray D, Yousif N, Richardson B. Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. *J Immunol* 2007;179:6352–8.
- [12] Sugimura T, Ushijima T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutat Res* 2000;462:235–46.
- [13] Kaneda A, Tsukamoto T, Takamura-Enya T, Watanabe N, Kaminishi M, Sugimura T, et al. Frequent hypomethylation in multiple promoter CpG islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer Sci* 2004;95:58–64.
- [14] Levy S, Sutton G, Ng PC, Feuk L, Halpern AL, Walenz BP, et al. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* 2007;5:e254.
- [15] Bannert N, Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(Suppl 2):14572–9.
- [16] Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 2009;10:691–703.
- [17] Belgnaoui SM, Gosden RG, Semmes OJ, Haoudi A. Human LINE-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells. *Cancer Cell Int* 2006;6:13.
- [18] Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thong-ngam D, et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene* 2004;23:8841–6.
- [19] Estecio MR, Gharibyan V, Shen L, Ibrahim AE, Doshi K, He R, et al. LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability. *PLoS One* 2007;2:e399.

- [20] Shuangshoti S, Hourpai N, Pumsuk U, Mutirangura A. Line-1 hypomethylation in multistage carcinogenesis of the uterine cervix. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007;8: 307–9.
- [21] Tangkijvanich P, Hourpai N, Rattanatanyong P, Wisedopas N, Mahachai V, Mutirangura A. Serum LINE-1 hypomethylation as a potential prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2007;379:127–33.
- [22] Baba Y, Huttenhower C, Nosho K, Tanaka N, Shima K, Hazra A, et al. Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors. *Mol Cancer* 2010;9:125.
- [23] Bollati V, Schwartz J, Wright R, Litonjua A, Tarantini L, Suh H, et al. Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev* 2009;130:234–9.

CHAPTER V

Genome-wide scanning for SLE disease using SNP microarrays and pooling approach

Expression profile of HIN200 in leukocytes and renal biopsy of SLE patients by real-time RT-PCR

I Kimkong, Y Avihingsanon and N Hirankarn

ABSTRACT

HIN200 is a human IFN-inducible gene and homologous to murine IFI202 gene, which was identified as a candidate gene for SLE susceptibility in lupus mouse model. We determined these gene expressions in leukocytes from 20 SLE patients and 10 healthy controls and in renal biopsies from 29 SLE patients and 15 kidney donors using sensitive real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR). The expressions of MNDA, IFIX, IFI16 and AIM2 genes significantly increased in leukocytes but not in kidney biopsies from SLE patients as compared to the control individuals, with $P = 0.0003$, $P = 0.0056$, $P = 0.0002$ and $P < 0.0001$, respectively. We also assessed the expression profiles of IFIX and IFI16 isoforms using semi-quantitative RT-PCR. We found up-regulation of B isoform (short product) of IFI16 in SLE patients. In addition, the expression levels were analyzed in correlation with disease activity and clinical characteristics. Interestingly, higher expression of MNDA was observed in patients who were positive for anti-dsDNA antibodies than in patients who were negative ($P = 0.0276$). In conclusion, it is suggested that the HIN200 genes have a role in SLE pathogenesis. Our study also observed a possible important role of a specific short isoform of IFI16 as well as a link between MNDA and anti-dsDNA antibody production.

INTRODUCTION

MNDA (myeloid nuclear differentiation antigen), IFIX (IFN-inducible protein X), IFI16 (interferon-inducible protein 16), and AIM2 (absent in melanoma 2) are a group of IFN-inducible genes in human, whose products belong to haematopoietic interferon-inducible nuclear protein with 200 amino acid repeat (HIN200) gene family.(1) They are homologous to IFI200 in mouse in which a subset of genes within this family namely ifi202 was identified as a susceptibility gene in lupus mouse model.(2–4) However, physiological properties of this IFN-inducible gene group and its role in systemic lupus erythematosus (SLE) pathogenesis are still not clearly understood.(2) Most in-vitro studies suggested that these IFN-inducible genes play a role in regulating cell survival and apoptosis; thus, it was hypothesized that overexpression of ifi202 genes in immune cells of the B6.Nba2 congenic mice is associated with defects in T and B cell apoptosis.(5) There is less information on human homologues (HIN200) in SLE pathogenesis. Most studies focused on IFI16 protein since a number of SLE patients developed high titre autoantibodies to IFI16 protein, suggesting a role of IFI16 in SLE pathogenesis.(6) Although some studies reported an increased level of IFI16 mRNA in PBMCs or leukocytes from SLE patients, (7,8) the up-regulation of other genes within HIN200 are not striking and variable results in IFI16 expression exist in the SLE patients.(9–12) However, most information came from microarray results. There are limited information on IFI16, MNDA, IFIX and AIM2 gene expression in SLE by a rather highly sensitive assay than microarray such as real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) and no report of any correlation between their expression levels with the patients' clinical manifestation and disease activity. In the present study, we examined MNDA, IFIX, IFI16 and AIM2 gene expressions in leukocytes by real-time RT-PCR and correlate expression levels with clinical characteristics and SLE Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) scores. It is likely that the difference in expression might be limited to particular isoform. Therefore, we also performed an expression analysis of IFIX and IFI16 isoforms (α and β for IFIX; A, B and C for IFI16) in SLE patients compared with healthy controls.

Moreover, gene products of these four genes have been detected in other tissues and organs other than haematopoietic cells.(13–17) Lupus nephritis (LN) is one of the most severe

complications in SLE; thus, the expression of these four genes in renal biopsy tissues from LN patients was also studied using quantitative real-time RT-PCR.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

For expression study in leukocytes (buffy coat), 20 Thai SLE patients and 10 ethnically matched healthy controls were recruited. All SLE patients fulfilled the diagnostic criteria of the American College of Rheumatology (ACR).(18) For expression study in renal biopsies, 29 SLE patients underwent renal biopsy for diagnostic evaluation during 2002–2005. All patients have been diagnosed with SLE according to ACR criteria and have had at least one of the following criteria for renal involvement: a total urinary protein level of more than 0.5 g/day, an increment of serum creatinine levels of more than 0.5 mg/dL during the 1-month follow up or presence of pyuria, haematuria or urinary cast by microscopic examination. Only kidney biopsies of WHO class III and IV glomerulonephritis were included in the analysis. The control group consisted of 15 kidney samples from implantation biopsies after reperfusion of kidney allografts. Inclusion criteria were living or deceased donors with normal serum creatinine levels and donor age of less than 55 years. The kidney samples from patients with delayed graft function or prolonged ischemia time were excluded.(19)

All subjects were approved by the Ethic Committee for Human Research of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and written informed consents were obtained from all patients. Demographic characteristics of SLE patients and healthy controls are shown in Table 1.

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA from buffy coat and renal biopsy specimens were extracted by RNeasy mini kit (Qiagen, Chatworth, California, USA) according to the instruction of manufacturer. A 0.25 μ g sample of total RNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) using Taqman™ Reverse Transcriptase Reagent (Applied Biosystems, Roch Molecular Biochemical, New Jersey, USA). All RNA and cDNA samples were stored at -70 °C before use.

Table 1 Demographic characteristics of SLE patients and healthy controls

	<i>SLE</i> (n = 20) (<i>Leukocytes</i>)	<i>Controls</i> (n = 10) (<i>Leukocytes</i>)	<i>SLE</i> (n = 29) ^a (<i>Kidney</i>)	<i>Controls</i> (n = 15) (<i>Kidney</i>)
Mean age, years (range)	31 (22–47)	26.6 (21–35)	31.93 (21–45)	36.07 (13–53)
Female/male (female %)	19/1 (95)	10/0 (100)	27/2 (93.10)	7/8 (46.67)
Mean disease duration, years (range)	6.74 (1–17)	NA	9.41 (2–21)	NA
Mean SLEDAI-2K (range)	13.4 (0–30)	NA	10.52 (4–20)	NA
Immunosuppressive agent use				
Prednisolone dose range (mg/day), cases (%)	2.5–100, 18 (90)	NA	2.5–60, 27 (93.10)	NA
Cyclophosphamide dose range (mg/day), cases (%)	1000–1200, 3 (15)	NA	800–1000, 4 (13.79)	NA
Mycophenolate mofetil dose range (mg/day), cases (%)	720–1500, 4 (20)	NA	1000–1500, 6 (20.69)	NA
Enalapril dose range (mg/day), cases (%)	2.5–40, 8 (40)	NA	5–20, 10 (34.48)	NA
Azathioprine dose range (mg/day), cases (%)	—	NA	50, 2 (6.90)	NA
Lupus nephritis class				
Class III (%)	NA	NA	11 (37.93)	NA
Class IV (%)	NA	NA	18 (62.07)	NA

Abbreviations: SLE: systemic lupus erythematosus; SLEDAI-2K: SLE disease activity index 2000; Lupus nephritis class based on WHO classification; NA: not applicable.

^aPlease note that 60% of our kidney biopsies were obtained from the patients prior to changes in medication.

Quantification of mRNA

A real-time RT-PCR assay was used to quantify target gene transcripts using 18SrRNA as an endogenous control.(20) To avoid genomic DNA amplification, primers used in this study were designed to span intron–exon boundaries as follows: MND4 forward 5'-GGAAGAAGCATCCATTAAGG-3'; MND4 reverse 5'-GTTTGTCTAGACAGGCAAC-3'; IFIX forward 5'-GAGACTGGAACCAAAAGG-3'; IFIX reverse 5'-CGCGATTATTGGGTCTTC-3'; IFI16 forward 5'-CTGCACCCTCCACAAG-3'; IFI16 reverse 5'-CCATGGCTGTGGACATG-3'; AIM2 forward 5'-CAGGAGGAGAAGGAGAAAGTTG-3'; AIM2 reverse GTGCAGCACGTTGCTTTG-3'. PCR amplification was performed with 2x QuantiTect SYBRGreen PCR Master Mix with 0.5 μM primers, 16 ng cDNA and nuclease-free water according to the manufacturer's protocol (Qiagen). PCR conditions included an initial activation at 95 °C for 15 min, denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 55–58 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s followed 40–50 cycles of repeating. The mRNA levels were measured by a Light Cycler machine (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana). mRNA levels were expressed as threshold cycle (CT) and used comparative CT method for analysis. For relative quantification, the expression target genes were normalized by expression of 18S rRNA. The amount of target was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Expressions of IFIX and IFI16 isoforms were semiquantified by conventional RT-PCR using the following primers; 5' GGAACAGAGTCAGCATCC and 5' GTTATTTGATATCCTTGTC for IFIX13; 5' CATCTTCGGACTCCTCAG and 5' GTTCAGCACCATCACTTC for IFI16. The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation (94 °C, 30 s), annealing (60 °C for IFIX gene, or 62°C for IFI16 gene, 30 s), extension (72 °C, 30 s) and final extension at 72 °C for 7 min. Amplification was performed in PerkinElmer/GeneAmp PCR system 2400. The PCR products were loaded in 1.5% Tris-acetate agarose gel and analyzed using electrophoresis containing Tris acetate buffer at 100 V for 40 min followed by 50 µg/ml of ethidium bromide staining. The density of product bands was semiquantified using software of Gel Doc™ MZL (BIO-RAD).

Statistical analysis

The mRNA levels were expressed as logtransformation. The Mann-Whitney U test was used to compare data between two groups with GraphPad Prism, version 4.0 software (Graph-Pad Software, San Diego, California, USA). A P-value of <0.05 was considered as statistical significance. Correlations of mRNA expression levels with clinical characteristics of SLE and SLEDAI-2K scores were determined using Spearman's rank correlation coefficient.(21)

RESULTS

Increased expression of IFN-inducible genes in leukocytes from SLE patients

The MND4, IFIX, IFI16 and AIM2 gene expressions in leukocytes from 20 SLE patients and 10 normal controls were determined by quantitative real-time RT-PCR. Their expression levels were compared between normal controls and SLE patients. As shown in Figure 1A–D, the expression levels of all four genes in SLE patients were significantly higher than those in the normal controls with $P = 0.0003$, $P = 0.0056$, $P = 0.0002$ and $P < 0.0001$, respectively.

In addition, we measured the relative amount of IFIX and IFI16 isoforms in leukocytes from SLE patients and normal controls. In this study, B isoform (short product) of IFI16 was found

elevated in SLE patients as compared to control individuals ($P = 0.0235$) (Figure 2B). For IFIX isoform, there was no significant difference among the two groups (Figure 2A).

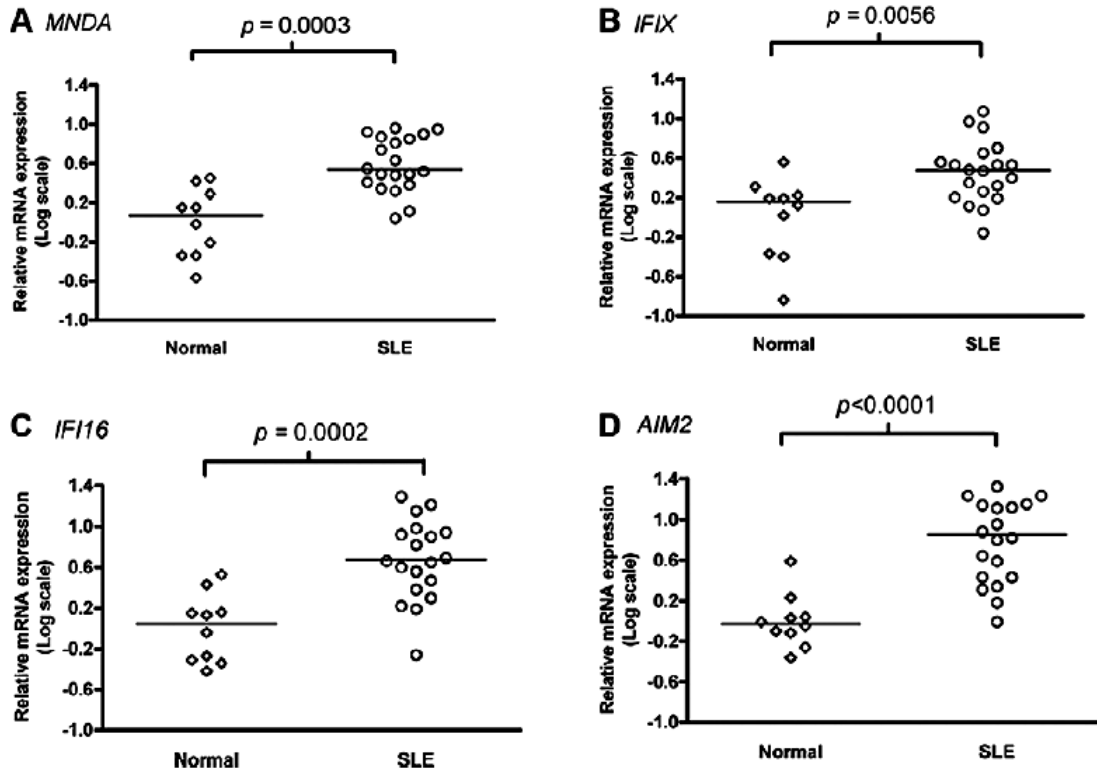


Figure 1 Comparison of IFN-inducible gene expressions in leukocytes from 10 normal controls and 20 SLE patients. Relative expression levels of MND A, IFIX, IFI16 and AIM2 genes are shown in (A), (B), (C) and (D), respectively. 18S rRNA was used as endogenous control. Each symbol represents an individual sample and horizontal lines show median values.

Increased expression of MND A is related with anti-dsDNA autoantibody in SLE

We determined correlations of mRNA expression levels of all four genes with SLEDAI-2K scores and clinical characteristics of SLE using Spearman's correlation analysis. We did not find any correlation of IFIX, IFI16 and AIM2 gene expression with scores of SLEDAI-2K and other clinical characteristics of SLE such as antinuclear antibody titre, anti-dsDNA autoantibody titre, complement C3, C4, CH50 level, mucocutaneous manifestation, musculoskeletal manifestation, haematological manifestation, and renal manifestation (data not shown). Interestingly MND A gene

expression significantly correlated with anti-dsDNA autoantibody titre ($r = 0.4982$ and $P = 0.0254$; Figure 3D). Higher MNDA expression level was significantly found in SLE patients who were positive for anti-dsDNA autoantibodies than patients who were negative ($P = 0.0276$; Figure 3E). Nevertheless, we did not find any correlation between MNDA gene expression with scores of SLEDAI-2K and other clinical characteristics of SLE (Figure 3).

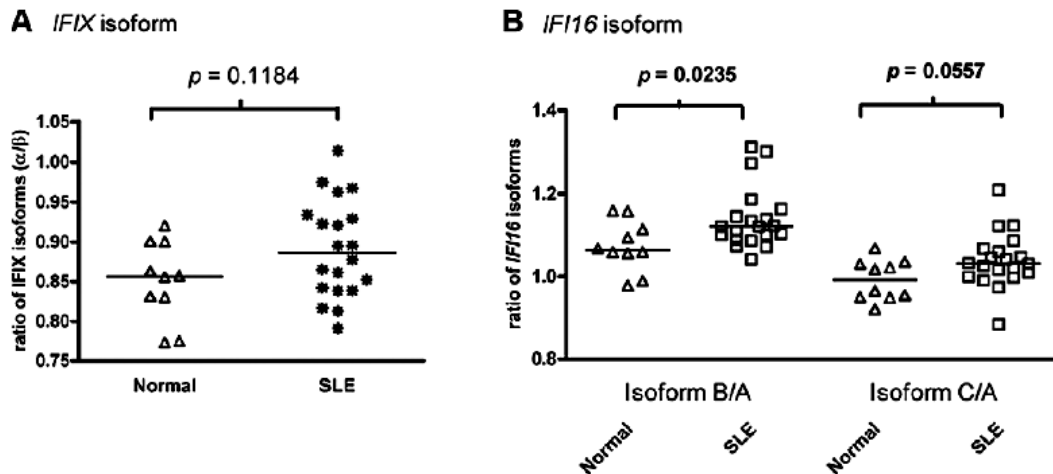


Figure 2 Comparison of IFIX and IFI16 isoform expressions in leukocytes from 10 normal controls and 20 SLE patients. (A) The ratio of IFIX isoforms (α/β); (B) the ratio of IFI16 isoforms. Each symbol represents an individual sample and horizontal lines show median values.

The expression of IFN-inducible genes in kidney from LN patients

In the present study, there were no significant differences of MNDA, IFIX, IFI16 and AIM2 gene expressions in renal biopsies between LN patients (WHO class III and IV glomerulonephritis) and normal controls (data not shown).

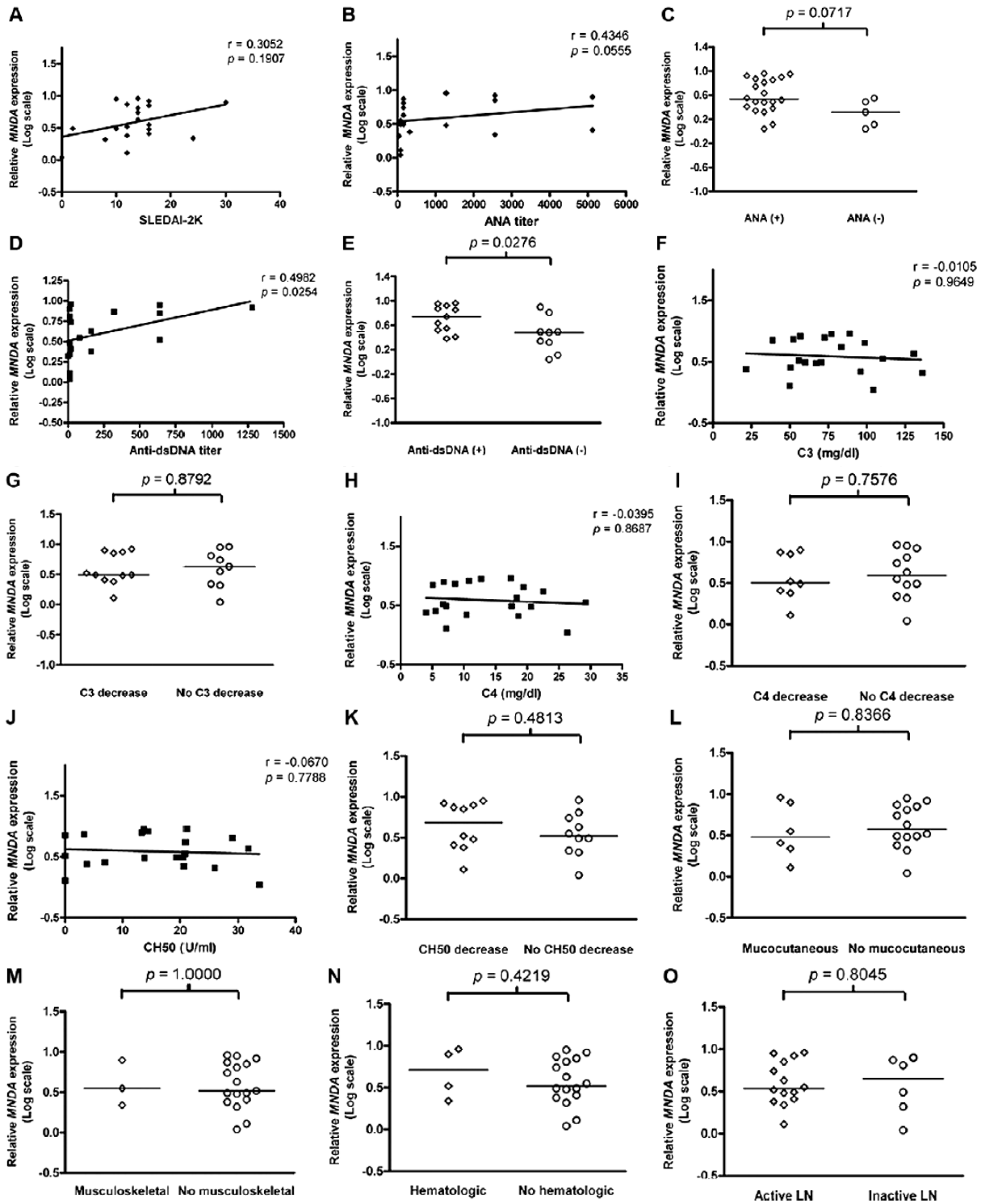


Figure 3 Correlation analyses between MND A expression and clinical assessments in 20 SLE patients. The relative MND A expression was plotted against the following: (A) SLEDAI-2K, (B) ANA

titre, (D) anti-dsDNA titre, (F) C3, (H) C4 and (J) CH50. Spearman's correlation test was used to analyze these data. The relative expression of MND A was compared between SLE patients who were positive and negative for the following: (C) ANA, (E) anti-dsDNA antibody, (G) C3 decrease, (I) C4 decrease, (K) CH50 decrease, (L) Mucocutaneous, (M) Musculoskeletal, (N) Haematological and (O) Active LN. Mann-Whitney test was used to analyze these data. Each symbol represents an individual sample and horizontal lines show median values.

DISCUSSION

Up-regulation of only IFI16 gene in SLE patients has been previously demonstrated using microarray analysis.(7,8) In the present study, with a more highly sensitive method, real-time RT-PCR, we demonstrated that all 4 genes (MND A, IFIX, IFI16 and AIM2) were significantly up-regulated in SLE patients.

In addition, IFI1X and IFI16 genes are known to encode six isoforms ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ and $\gamma 2$) and three isoforms (A, B and C) respectively, through mRNA alternative splicing.(13,22) The comparison of the short product (B and C isoform) to full-length product (A isoform) ratio of IFI16 gene showed that B isoform from SLE patients was significantly higher than normal controls. Although the functional role of different isoforms is still unknown, previous study suggested that the difference among each isoform locating in the hinge domain might affect different folding of IFI16 molecule.(22) Furthermore, they showed that B isoform of IFI16 can homodimerize via an amino terminal region and is also able to interact with A and C isoforms.(22) The B isoform itself or in combination with either A or C isoform might be responsible for IFI16 function. Further studies are required to elucidate the roles of each isoform that might affect biological functions and that may lead to the development of SLE.

There was no clear connection between HIN200 expression and disease activity by SLEDAI-2K and complement level. However, this might be confounded partly by medication that the patients received. Although we did not observe any correlation with disease activity, our study reported that one of the HIN200, MND A significantly correlated with anti-dsDNA autoantibody titre. A study in B6.Nba2 congenic mice that contains the Ifi200 gene cluster also produces higher levels of anti-dsDNA.3 MND A is a nuclear antigen expressed primarily in granulocytes and

monocytes.(23) The pyrin domain within MNDNA protein has a role in the regulation of programmed cell death in myeloid cells.(24) Interestingly, there are various reports of increased apoptosis of neutrophils in SLE patients, which is likely to be a result of an abnormal apoptosis control.(25,26) MNDNA may play a role in SLE pathogenesis via abnormal control of programmed cell death and may lead to the production of anti-dsDNA antibody. Recently, one of HIN200, AIM2 has been identified as a cytoplasmic DNA sensor, forming a caspase-1-activating inflammasome.(27–30) Other HIN200 family members including MNDNA might be involved in DNA sensing as well. However, unlike AIM2, they are mainly nuclear proteins. Burckstummer, et al.(27) proposes that “these proteins may act as inflammasome modulators in apoptosis when the nuclear envelope breaks down”. Therefore, it is possible that high expression of HIN200 might associate with abnormal inflammation and loss of tolerance to dsDNA observed in SLE. However, further studies are required to prove this hypothesis.

The role of IFI16 in controlling epithelial cell differentiation as well as a role in endothelial cells as inducer of inflammation via up-regulation of adhesion molecules and chemokines have been suggested.(31) Recently, it was demonstrated in skin lesions of SLE patients by immunohistochemistry that IFI16 has increased expression on both the epidermis and dermis layer (stratified squamous epithelial cells, lymphocytes, fibroblasts and endothelial cells).(14) It is likely that local production of type I IFN might lead to the up-regulation of IFI16 in skin lesions. This observation raises a possible role of IFI16 in determining clinical manifestation of SLE as well. In this study, we also investigated the correlation of HIN200 expression with specific clinical manifestation e.g. mucocutaneous, musculoskeletal, haematological and renal manifestation. No significant differences among disease subsets were observed in leukocytes. However, the small sample size is likely a limitation in this study. We are particularly interested in lupus nephritis, one of the most severe complications in SLE, so we further analyzed expression profile of HIN200 in kidney biopsies from 29 lupus nephritis patients. We did not observe any up-regulation of these four genes in renal biopsy tissues from LN patients. One previous study has found a slight increased level of MNDNA transcript from laser-captured glomeruli of LN patients by microarray, although that observation has not been validated by real time RT-PCR.³² If MNDNA mRNA is truly up-regulated in the glomeruli of LN, different finding in our study might be due to a diluted signal by other cell types in the kidney

biopsy. It is likely that leukocytes that have up-regulated level of MNDA observed in the peripheral blood did not infiltrate in the kidney tissue of LN patients.

In conclusion, our expression results suggested that HIN200 and a specific B isoform of IFI16 are upregulated in leukocytes of SLE patients. Our observation has also shown an association between MNDA with anti-dsDNA antibody titre.

REFERENCES

- 1 Ludlow LE, Johnstone RW, Clarke CJ. The HIN-200 family: more than interferon-inducible genes? *Exp Cell Res* 2005; 308: 1–17.
- 2 Choubey D, Panchanathan R. Interferon-inducible Ifi200-familygenes in systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 2008; 119:32–41.
- 3 Rozzo SJ, Allard JD, Choubey D, et al. Evidence for an interferoninducible gene, Ifi202, in the susceptibility to systemic lupus. *Immunity* 2001; 15: 435–443.
- 4 ChoubeyD, Kotzin BL. Interferon-inducible p202 in the susceptibility to systemic lupus. *Front Biosci* 2002; 7: e252–e262.
- 5 Panchanathan R, Xin H, Choubey D. Disruption of mutually negative regulatory feedback loop between interferon-inducible p202 protein and the E2F family of transcription factors in lupus-prone mice. *J Immunol* 2008; 180: 5927–5934.
- 6 Seelig HP, Ehrfeld H, Renz M. Interferon-gamma-inducible protein p16. A new target of antinuclear antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1672–1683.
- 7 Mandel M, Gurevich M, Puzner R, Kaminski N, Achiron A. Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2004; 138: 164–170.
- 8 Alcorta DA, Barnes DA, Dooley MA, et al. Leukocyte gene expression signatures in antineutrophil cytoplasmic autoantibody and lupus glomerulonephritis. *Kidney Int* 2007; 72: 853–864.

9 Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2610–2615.

10 Bennett L, Palucka AK, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 2003; 197: 711–723.

11 Han GM, Chen SL, Shen N, Ye S, Bao CD, Gu YY. Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes Immun* 2003; 4: 177–186.

12 Ishii T, Onda H, Tanigawa A, et al. Isolation and expression profiling of genes upregulated in the peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *DNA Res* 2005; 12: 429–439.

13 Ding Y, Wang L, Su LK, et al. Antitumor activity of IFIX, a novel interferon-inducible HIN-200 gene, in breast cancer. *Oncogene* 2004; 23: 4556–4566.

14 Mondini M, Vidali M, De Andrea M, et al. A novel autoantigen to differentiate limited cutaneous systemic sclerosis from diffuse cutaneous systemic sclerosis: the interferon-inducible gene IFI16. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3939–3944.

15 Wei W, Clarke CJ, Somers GR, et al. Expression of IFI 16 in epithelial cells and lymphoid tissues. *Histochem Cell Biol* 2003; 119: 45–54.

16 Gariglio M, Azzimonti B, Pagano M, et al. Immunohistochemical expression analysis of the human interferon-inducible gene IFI16, a member of the HIN200 family, not restricted to hematopoietic cells. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 815–821.

17 DeYoung KL, Ray ME, Su YA, et al. Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. *Oncogene* 1997; 15: 453–457.

18 Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271–1277.

19 Avihingsanon Y, Benjachat T, Tassanarong A, Sodsai P, Kittikovit V, Hirankarn N. Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney Int* 2009; 75: 1340–1348.

20 Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, et al. Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int* 2006; 69: 747–753.

21 Huang X, Shen N, Bao C, Gu Y, Wu L, Chen S. Interferon-induced protein IFIT4 is associated with systemic lupus erythematosus and promotes differentiation of monocytes into dendritic cell-like cells. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R91–102.

22 Johnstone RW, Kershaw MH, Trapani JA. Isotypic variants of the interferon-inducible transcriptional repressor IFI 16 arise through differential mRNA splicing. *Biochemistry* 1998; 37: 11924–11931.

23 Miranda RN, Briggs RC, Shults K, Kinney MC, Jensen RA, Cousar JB. Immunocytochemical analysis of MND1 in tissue sections and sorted normal bone marrow cells documents expression only in maturing normal and neoplastic myelomonocytic cells and a subset of normal and neoplastic B lymphocytes. *Hum Pathol* 1999; 30: 1040–1049.

24 Briggs RC, Shults KE, Flye LA, et al. Dysregulated human myeloid nuclear differentiation antigen expression in myelodysplastic syndromes: evidence for a role in apoptosis. *Cancer Res* 2006; 66: 4645–4651.

25 Ren Y, Tang J, MokMY, Chan AW, Wu A, Lau CS. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2888–2897.

26 Courtney PA, Crockard AD, Williamson K, et al. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 309–314.

27 Burckstummer T, Baumann C, Bluml S, et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol* 2009; 10: 266–272.

28 Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 2009; 458: 509–513.

29 Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; 458: 514–518.

30 Roberts TL, Idris A, Dunn JA, et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 2009; 323: 1057–1060.

31 Caposio P, Gugliesi F, Zannetti C, et al. A novel role of the interferon-inducible protein IFI16 as inducer of proinflammatory molecules in endothelial cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 33515–33529.

32 Peterson KS, Huang JF, Zhu J, et al. Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *J Clin Invest* 2004; 113: 1722–1733.

Association of IFI200 Gene Polymorphisms with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus

I Kimkong, Y Avihingsanon and N Hirankarn

INTRODUCTION

The MNDA (myeloid nuclear differentiation antigen), IFIX (interferon- inducible protein X), IFI16 (interferon-inducible protein 16), and AIM2 (absent in melanoma 2) are a group of interferon (IFN)-inducible genes whose products belong to the gene family denoted hematopoietic interferon-inducible protein with 200 amino acid repeat (IFI200). These genes map on chromosome 1q21-23, which is the major susceptibility locus of systemic lupus erythematosus (SLE). They are proposed as new candidate genes for SLE susceptibility for several reasons: (1) genetic mapping from a murine model of lupus^{1,2}; (2) upregulation of all 4 genes in patients with SLE³; (3) the role of IFI16 as autoantigen in patients with SLE^{4,5}; (4) the ability of IFI16 to bind single-strand DNA in a process of DNA repair⁶; and (5) the discovery of AIM2 as an intracellular DNA sensor leading to inflammation and apoptosis⁷. Therefore, IFI200 might be associated with abnormal inflammation and loss of tolerance to dsDNA observed in patients with SLE.

METHODS

We recruited 200 SLE patients (194 women, 6 men; mean age $36.21 \pm SD 10.76$ yrs) from King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, each having at least 4 of the American College of Rheumatology revised criteria for SLE⁸, and 200 ethnically matched healthy volunteer blood donors from the Thai Red Cross Society (147 women, 53 men; mean age $23 \pm SD 12.3$ yrs)⁹. The study was approved by the ethics committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and all subjects gave their informed consent.

Detection of apoptosis.

Within 60 minutes after blood draw, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 15 healthy donors containing different IFI16 genotypes were isolated by Ficoll-Hypaque gradient (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA) and resuspended in RPMI-1640 medium (Sigma, New York, NY, USA) with 10% fetal bovine serum (Gibco, Karlsruhe, Germany) and 100 U/ml penicillin (Gibco) and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco) at concentration 5×10^6 cells/ml. These cells were plated into 24-well plastic tissue culture plates. PBMC were treated with doxorubicin (Pharmacia and Upjohn GmbH, Freiburg, Germany) at a concentration of 10 μ g/ml and then cultured at 37°C in 5% CO₂ for 24 h. This condition was determined to be effective to induce highest p53 expression in dose (1, 10, and 100 μ g/ml) and time (8 and 24 h) response experiments. p53 mRNA expression was studied using real-time reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) with the following primers: 5'TGG CCA TCT ACA AGC AGT CAC A3' and 5'GCA AAT TTC CTT CCA CTC GGA T3', as described¹⁰. Finally, the percentage of apoptotic cells was measured by FACScan flow cytometry (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) for annexin V-FITC and propidium iodide binding according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Cells positive only for annexin V were counted as apoptotic.

Quantification of IFIX and IFI16 isoforms.

Expression of IFIX and IFI16 isoforms was semiquantified by conventional RT-PCR using the following primers: 5'GGA ACA GAG TCA GCA TCC and 5'GTT ATT TGA TAT CCT TGT CC for IFIX 11; and 5'CAT CTT CGG ACT CCT CAG and 5'GTT CAG CAC CAT CAC TTC for IFI16. cDNA from leukocytes of 19 SLE patients containing different genotypes was amplified in a Perkin Elmer/GeneAmp PCR 2400 system. The PCR conditions consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation (94°C, 30 s), annealing (60°C for IFIX gene, 62°C for IFI16 gene, 30 s), extension (72°C, 30 s), and final extension (72°C, 7 min). PCR products were loaded in 1.5% Tris-acetate agarose gel and analyzed by electrophoresis in Tris-acetate buffer at 100 volts for 40 min followed by staining with 50 μ g/ml ethidium bromide. The density of product bands was semiquantified using Gel Doc™ MZL software (Bio-Rad). Statistical analysis. The association between genotypes and the expression of isoforms or apoptosis was analyzed by

GraphPad Prism, version 4.0 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, USA). The Mann-Whitney U test was used in comparisons between 2 groups, while Kruskal-Wallis H was applied in case of analysis of more than 2 groups. A p value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Eleven putative functional single-nucleotide polymorphisms (SNP) were selected from *MNDA*, *IFIX*, *IFI16*, and *AIM2* genes according to computational prediction and genotyped as described in Table 1. The percentage of genotyping for each SNP was 100%. There were no missing genotyping data. All SNP were in Hardy-Weinberg equilibrium when we compared the observed with the expected genotype frequencies of each SNP ($p > 0.05$). PLINK v1.05 program¹² was used to calculate p values, empirical p values (100,000 permutations), and odds ratios (95% confidence intervals) for genotype and haplotype associations. Linkage disequilibrium was determined by JLIN, a Java-based linkage disequilibrium plotter¹³ (Table 2).

Table 1. Putative functional single-nucleotide polymorphisms (SNP) and genotyping methods.

Genes	SNP	Location and Functional Prediction	Genotyping Method	Sequence of primers (5'→3')	Restriction Enzyme
<i>MNDA</i>	A2706G (rs7513873)	Intron; A: strengthens donor site and creates cryptic acceptor site/G:–	PCR-RFLP	ACT CAT CCT CAC CAA CAC TGG CGA CAG GGC GAA ACT C	Nla III
	C16432T (rs2276403)	Exon; histidine → tyrosine	PCR-RFLP	GGA TCC ATG GAT GTA GTG ATG AGG AAC CTG GTG TTC	Rsa I
<i>IFIX</i>	G13792T (rs856084)	Intron; T: abolishes SC35 binding site/G:–	PCR-RFLP	GCA ACG ATT GCT GAC CAC CCA GTG ATG AGA TGG GAG AA	AhdI
	C-223T (rs16841336)	Promoter	Taqman SNP genotyping assay	–	–
	A40309G (rs10908697)	Intron	Taqman SNP genotyping assay	–	–
<i>IFI16</i>	C43235T (rs1615480)	Intron	Taqman SNP	–	–
	C-7217T (rs4657618)	Promoter; T: AML1a or RUNX1/C:–	PCR-RFLP	GCC AGC CTG AAA TAG AAG GTA ACT CTG GCT CTT GAG	Hae III
	C6771G (rs866484)	Exon; threonine → serine	PCR-RFLP	GCC GTT CCC CAT CTC CCA AGC ATC AAG TAT CCC TGT GAA AGC	HpyCH4 III
<i>AIM2</i>	A23201G (rs1772414)	Intron; A: abolishes donor site/G:–	PCR-FRLP	CCC ATT TCC CCT TTG CTT ATT CTG TGA ATT GGG GCA GAA T	Dra III
	G-151T (rs16841642)	Promoter; G: AP-1/T:–	PCR-RFLP	CAC TAG CAG CCA CAG AAG GGG TGT CGT TGG TTT TGC	Dra III
<i>AIM2</i>	C3452T (rs2276405)*	Exon; glutamic acid → lysine	PCR-SSP	GCC TGT GGC AAT ATT AAA CT C GCC TGT GGC AAT ATT AAA CT T GGC TGA TCC CAA AGT TGT GCC	–
	Internal control		PCR	TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT C	–

* Not polymorphic in the Thai population. PCR-FRLP: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; PCR-SSP: polymerase chain reaction-sequence specific primer.

A significant association of the minor allele frequency from 3 SNP of IFIX and IFI16 genes was found between SLE patients and healthy controls (Table 3). The G13792T (rs856084) in IFIX and the C6771G (rs866484) and A23201G (rs1772414) in IFI16 showed significant differences (OR 0.73, 95% CI 0.54–0.98, empirical p = 0.033; OR 1.33, 95% CI 1.00–1.75, empirical p = 0.05; and OR 1.37, 95% CI 1.03–1.80, empirical p = 0.030, respectively). The association of both SNP (rs866484 and rs1772414) in IFI16 gene seems to be a recessive effect model. The presence of 2 G alleles (GG) conferred a significant p = 0.009 (empirical p = 0.023) for rs866484 and p = 0.013 (empirical p = 0.032) for rs1772414. The marginal significance results are probably due to the limited sample size in this study. We performed haplotype analysis of significant SNP rs866484 and rs1772414 with the strongest linkage disequilibrium ($D' = 0.814$ and $r^2 = 0.643$) by comparing each haplotype with another 3 haplotypes between SLE patients and controls. Our finding showed that the GG was a risk haplotype (OR 1.41 and p = 0.017, empirical p = 0.031), whereas CA was a protective haplotype (OR 0.73 and p = 0.032, empirical p = 0.041).

Table 2. Linkage disequilibrium coefficients (D' and r^2) among single-nucleotide polymorphisms (SNP) within MND A, IFIX, IFI16, and AIM2.

	rs7513873 (MND A)	rs2276403 (MND A)	rs16841336 (IFIX)	rs856084 (IFIX)	rs10908697 (IFIX)	D' rs1615480 (IFIX)	rs4657618 (IFI16)	rs866484 (IFI16)	rs1772414 (IFI16)	rs16841642 (AIM2)
r^2 rs7513873 (MND A)	—	0.7741	0.8634	0.1401	0.2054	0.051	0.288	0.189	0.024	0.08
rs2276403 (MND A)	0.391	—	0.7808	0.0083	0.4456	0.139	0.117	0.38	0.268	0.23
rs16841336 (IFIX)	0.678	0.3469	—	0.0752	0.4062	0.065	0.256	0.3	0.114	0.08
rs856084 (IFIX)	0.004	0.00001	0.0005	—	0.9449	0.376	0.452	0.208	0.297	0.26
rs10908697 (IFIX)	0.008	0.022	0.0321	0.4237	—	0.189	0.307	0.042	0.051	0.03
rs1615480 (IFIX)	0.0009	0.0044	0.0017	0.0972	0.0117	—	0.738	0.899	0.836	0.55
rs4657618 (IFI16)	0.016	0.0017	0.015	0.1707	0.0547	0.309	—	0.413	0.498	0.33
rs866484 (IFI16)	0.004	0.0164	0.01	0.0345	0.0015	0.466	0.159	—	0.814	0.67
rs1772414 (IFI16)	0.0009	0.008	0.0016	0.0691	0.0016	0.367	0.224	0.643	—	0.78
rs16841642 (AIM2)	0.001	0.0061	0.0007	0.0542	0.0004	0.172	0.103	0.448	0.579	—

Regarding the selection as putative functional SNP, we tried to prove our hypothesis of 3 positive SNP as follows. SNP rs866484 (C6771G) of IFI16 is a nonsynonymous SNP whose amino acid is altered from threonine to serine. This SNP is located on an A-type repeat containing p53 binding site. Binding of IFI16 protein to the C-terminus of p53 has been reported to stimulate the transcription of p53-responsive reporter plasmids and leads to susceptibility to apoptosis of cells¹⁴. We hypothesized that the G risk allele may bind p53 with higher affinity and lead to more apoptosis. We conducted our experiment by inducing the highest p53 mRNA expression with doxorubicin at a concentration of 10 μ g/ml for 24 h. The association of SNP rs866484 and apoptosis rate was studied by flow cytometry analysis. We were unable to determine the association between SNP and apoptosis (Figure 1A). This negative finding may be because threonine and serine are in the same amino acid group. Nevertheless, further study should be performed using direct protein-protein interaction methods to prove the direct role of this SNP in protein structure that affects p53 binding. In addition, we tested the association of the 2 SNP within the intron of IFIX (rs856084) and IFI16 (rs1772414) genes with the expression of the isoforms (α and β for IFIX; A, B, and C for IFI16) by reverse transcription polymerase chain reaction, as described³. However, we found no differences in isoforms among the genotypes (Figure 1B, 1C, 1D). Our results suggest that these SNP are not likely to be functional SNP. We could not exclude the possibility that these SNP are in linkage disequilibrium with nearby causative SNP. Interestingly, one report in SLE in Caucasian patients also suggested an association signal in the IFIX-IFI16 intergenic region¹⁵. More extensive research using dense SNP and increased sample sizes is required to clarify the role of IFIX and IFI16 gene in SLE.

Table 3. Genotype and allele frequencies for MNDA, IFIX, IFI16, and AIM2 polymorphisms in SLE patients and healthy controls. Significant results (p value < 0.05) indicated in bold type.

Gene	SNP	Minor a	Major A	SLE, n = 200						Control, n = 200						Model of Inheritance (Recessive)		Allelic Test*	
				Genotype, n (%)			Allele, n (%)			Genotype, n (%)			Allele, n (%)			OR (95% CI)	Emp p	OR (95% CI)	Emp p
				aa	Aa	AA	a	A	aa	Aa	AA	a	A						
<i>MNDA</i>	rs7513873	A	G	1 (0.5)	50 (25)	149 (75)	52 (13)	348 (87)	1 (0.5)	45 (22.5)	154 (77)	47 (11.8)	353 (88.3)	NA	NA	1.12 (0.74–1.71)	0.571		
	rs2276403	T	C	1 (0.5)	37 (19)	162 (81)	39 (9.75)	361 (90.25)	0 (0)	32 (16)	168 (84)	32 (8)	368 (92)	NA	NA	1.24 (0.76–2.03)	0.372		
<i>IFIX</i>	rs16841336	C	T	4 (2)	53 (27)	143 (72)	61 (15.3)	339 (84.75)	3 (1.5)	55 (27.5)	142 (71)	61 (15.3)	339 (84.8)	NA	NA	1 (0.68–1.47)	1		
	rs856084	G	T	15 (7.5)	88 (44)	97 (49)	118 (29.5)	282 (70.5)	27 (14)	92 (46)	81 (40.5)	146 (36.5)	254 (63.5)	0.52 (0.25–1.06)	0.079	0.73 (0.54–0.98)	0.033		
	rs10908697	G	A	47 (24)	103 (52)	50 (25)	197 (49.3)	203 (50.75)	46 (23)	101 (50.5)	53 (26.5)	193 (48.3)	207 (51.8)	1.03 (0.63–1.68)	0.928	1.04 (0.79–1.37)	0.773		
<i>IFI16</i>	rs1615480	C	T	25 (13)	82 (41)	93 (47)	132 (33)	268 (67)	19 (9.5)	81 (40.5)	100 (50)	119 (29.8)	281 (70.3)	1.36 (0.69–2.68)	0.551	1.16 (0.86–1.57)	0.335		
	rs4657618	T	C	32 (16)	101 (51)	67 (34)	165 (41.3)	235 (58.75)	34 (17)	98 (49)	68 (34)	166 (41.5)	234 (58.5)	0.93 (0.53–1.63)	0.956	0.99 (0.75–1.31)	0.946		
	rs866484	G	C	57 (29)	87 (44)	56 (28)	201 (50.3)	199 (49.75)	35 (18)	103 (51.5)	62 (31)	173 (43.3)	227 (56.8)	1.88 (1.14–3.11)[†]	0.023	1.33 (1.00–1.75)	0.050		
<i>AIM2</i>	rs1772414	G	A	57 (29)	93 (47)	50 (25)	207 (51.8)	193 (48.25)	36 (18)	104 (52)	60 (30)	176 (44)	224 (56)	1.82 (1.10–3.00)^{††}	0.032	1.37 (1.03–1.80)	0.030		
	rs16841642	T	G	41 (21)	94 (47)	65 (33)	176 (44)	224 (56)	35 (18)	102 (51)	63 (31.5)	172 (43)	228 (57)	1.22 (0.72–2.07)	0.694	1.04 (0.79–1.38)	0.779		
	rs2276405	C	T	200 (100)	0 (0)	0 (0)	400 (100)	0 (0)	200 (100)	0 (0)	0 (0)	400 (100)	0 (0)	NA	NA	NA	NA		

* SNP were analyzed for association with disease by comparison of minor allele frequency in SLE patients and controls. [†] GG compared with CG+CC genotypes. ^{††} GG compared with AG+AA genotypes. NA: not applicable; SNP: single-nucleotide polymorphism; EMP p: empirical p value (100,000 permutations).

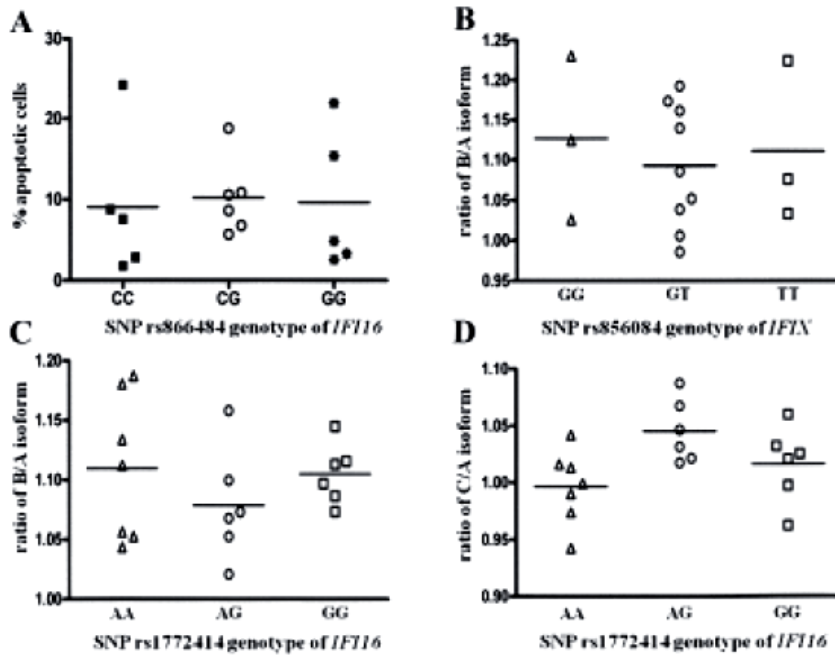


Figure 1. A. The effect of SNP rs866484 genotypes (CC, CG, and GG; n = 5, 6, and 5, respectively) on apoptotic response of healthy PBMC treated with 10 μ g/ml doxorubicin for 24 h. B, C, D. The ratio of short product/full-length product grouped by SNP rs856084 genotypes of IFIX (GG, GT, and TT; n = 3, 9, and 3) and SNP rs1772414 genotypes of IFI16 (AA, AG, and GG; n = 7, 6, and 6). Each data symbol represents an individual sample; horizontal lines show median values.

REFERENCES

1. Rozzo SJ, Allard JD, Choubey D, Vyse TJ, Izui S, Peltz G, et al. Evidence for an interferon-inducible gene, Ifi202, in the susceptibility to systemic lupus. *Immunity* 2001;15:435-43.
2. Choubey D, Panchanathan R. Interferon-inducible Ifi200-family genes in systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett* 2008;119:32-41.
3. Kimkong I, Avihingsanon Y, Hirankarn N. Expression profile of HIN200 in leukocytes and renal biopsy of SLE patients by real-time RT-PCR. *Lupus* 2009;18:1066-72.
4. Seelig HP, Ehrfeld H, Renz M. Interferon-gamma-inducible protein p16. A new target of antinuclear antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994;37:1672-83.
5. Mondini M, Vidali M, Airo P, De Andrea M, Riboldi P, Meroni PL, et al. Role of the interferon-inducible gene IFI16 in the etiopathogenesis of systemic autoimmune disorders. *Ann NY Acad Sci* 2007;1110:47-56.
6. Yan H, Dalal K, Hon BK, Youkharibache P, Lau D, Pio F. RPA nucleic acid-binding properties of IFI16-HIN200. *Biochim Biophys Acta* 2008;1784:1087-97.
7. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 2009;458:509-13.
8. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
9. Hirankarn N, Avihingsanon Y, Wongpiyabovorn J. Genetic susceptibility to SLE is associated with TNF-alpha gene polymorphism -863, but not -308 and -238, in Thai population. *Int J Immunogenet* 2007;34:425-30.
10. Yu L, Domann FE. Rapid and direct quantitative RT-PCR method to measure promoter activity. *Biotechnol Prog* 2006;22:1461-3.
11. Ding, et al. 2004.
12. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81:559-75.

13. Carter KW, McCaskie PA, Palmer LJ. JLIN: a Java based linkage disequilibrium plotter. *BMC Bioinformatics* 2006;7:60.
14. Johnstone RW, Wei W, Greenway A, Trapani JA. Functional interaction between p53 and the interferon-inducible nucleoprotein IFI 16. *Oncogene* 2000;19:6033-42.
15. Fernando MM, Rigby RJ, Robertson CA, Rioux JD, Vyse TJ. Interferon-inducible genes on chromosome 1 contribute to lupus susceptibility. *Rheumatology* 2006;45:i15-i16.

Polymorphisms of the CTLA-4 Gene in Systemic Lupus Erythematosus and Graves' Disease

Ingorn Kimkong, Jeerawat Nakkuntod, Siriwalee Sae-Ngow, Thiti Snabboon, Yingyos Avihingsanon, Nattiya Hirankarn

ABSTRACT

Background: Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) is a cell surface molecule involving in the regulation of T cells. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of CTLA-4 gene are known to be associated with susceptibility to several autoimmune diseases, including systemic lupus erythematosus (SLE) and Graves' disease (GD).

Objective: The aim of this study was to determine whether the common SNPs +49A/G on exon1 and CT60A/G in 3'UTR of the CTLA-4 gene are associated with susceptibility to SLE and GD in Thai population.

Methods: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to analyze these two SNPs in 151 patients with SLE, 132 patients with GD and 153 healthy controls.

Results: Our study showed that there were no statistically significant differences in the allele and genotype frequencies of +49A/G and CT60A/G SNPs between patients with SLE and healthy controls as well as patients with GD vs. healthy controls ($P > 0.05$). However, the GG genotype of +49A/G and CT60A/G was likely to be risk ($OR > 1$) in GD but not in SLE. The effect of +49G allele was similar to autosomal recessive in which the presence of GG genotype when compared to AA and AG conferred the OR of 1.58 (95% CI=0.95-2.61, $p=0.061$) in GD. We also observed a dose response effect of CT60G allele on GD susceptibility with OR of 1.43 for GG homozygous and 1.17 for AG heterozygous when compared to AA genotype, although these were not statistically significant ($P > 0.05$).

Conclusions: We found no association between two functional polymorphisms (+49A/G and CT60A/G) of CTLA-4 gene and the susceptibility to SLE and GD. However, the association study utilizing a larger sample size should be performed to further verify.

INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) and Graves' disease (GD) are autoimmune disorders in which the body produces autoantibodies against self-antigens. The characteristic of SLE is the production of autoantibodies directed to nuclear, cytoplasmic and cell surface autoantigens. These autoantibodies cause end-organ damage via inflammatory response to immune complex. In term of GD, the body produces autoantibodies to thyroid stimulating hormone receptor which lead to hyperthyroidism. Although the etiopathogenesis remains elusive, genetic factor seems to be important in the development of these two diseases. Twins studies show significantly higher concordance rate in monozygotic than in dizygotic twins over 10 times.^{1,2}

Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) is a member of the immunoglobulin superfamily, which is expressed on the surface of activated T cells. It shares sequence homology with T cell co-stimulatory protein CD28. Both molecules bind to the same ligands, B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86), but opposing functions. CD28 promotes a number of T-cell activities, whereas CTLA-4 is a negative regulator of T cell responses.³ Several studies have reported the association between CTLA-4 gene polymorphisms and several different autoimmune diseases including SLE and GD.⁴ There have been several single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with these two diseases such as CT60A/G in 3'-untranstrated region (3'UTR), +49A/G on exon 1, -1772T/C, -138C/T in promoter region and 106 bp allele of a dinucleotide repeat in 3' UTR.⁵⁻²³

However, those association studies have shown conflicting results. In addition, the susceptibility variants in the CTLA-4 gene might differ among the different ethnic groups. Thus, we performed association study about the role of CTLA-4 SNPs in Thai patients. The functional SNPs are believed to be mainly in +49A/G (rs231775) and CT60A/G (rs3087243). The +49A/G SNP

causes an amino acid change from threonine to alanine in the peptide leader sequence of the CTLA-4 protein.²⁴ Whereas CT60A/G is important in the efficiency of the splicing and production of soluble CTLA-4, and may play a role in mRNA stability of sCTLA-4.²⁵

Therefore, the aim of this study was to investigate the association between these two common SNPs (+49A/G and CT60A/G) within the CTLA-4 gene and the susceptibility to SLE and GD in Thai population.

METHODS

Subjects

One hundred and fifty-one Thai patients (148 women and 3 men: mean age \pm SD = 36.21 \pm 10.76 years) from King Chulalongkorn Memorial hospital, who fulfilled at least 4 of the American College of Rheumatology (ACR) revised criteria for SLE were included in this study.²⁶ Clinical and serological data were recorded as either absent or present, based on the data from the cumulative database obtained by chart review. In addition, we recruited 132 patients with GD (116 women and 16 men: mean age \pm SD = 38.27 \pm 12.41 years) followed up in an outpatient clinic at the Department of Endocrinology, Faculty of Medicine, King Chulalongkorn Memorial Hospital (Bangkok, Thailand). The diagnosis of GD was based on clinical features, diffuse enlargement of thyroid gland and the elevation of free thyroxine or triiodothyronine levels for more than 3 months with positive thyroid autoantibodies (TBI or TPO), thyroid eye disease or a diffuse increase in uptake on radionuclide scanning. For a control group, we recruited 153 ethnically matched healthy donors from the Thai Red Cross Society (97 women and 56 men: mean age \pm SD = 23 \pm 12.3 years). The ethics committee of the faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand approved the study and the subjects gave their informed consent.

DNA extraction and genotyping study

DNA was extracted from the buffy coat collected with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant, using a salting-out method.²⁷ DNA was aliquoted and stored at 20 °C until used. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to analyze the polymorphism of CTLA-4 at exon1 position +49A/G²⁸ and CT 60A/G in 3'UTR as previously described.¹⁰ Negative controls without DNA template were included in each experiment. Ten percent of the samples were confirmed by direct sequencing of PCR products to verify the accuracy of genotyping.

Statistical Analysis

Genotype frequencies were checked for consistency among normal controls with those expected from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). Allele and genotype frequencies were compared between groups using the chi-squared (χ^2) test or Fisher's exact probability test, where appropriate. The PLINK v1.07 program was used to calculate HWE, *P*-values, odds ratios and 95% confidence intervals, as well as for linkage disequilibrium (LD) and haplotype analysis.²⁹ A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant. In addition, the power for our genetic association study was calculated using the PS program.³⁰

RESULTS

The distribution of genotype and allele frequencies of CTLA-4 polymorphisms in patients with SLE, GD and control subjects is shown in Table 1. In the present study, both SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium when compared the observed and expected genotype frequencies of each SNP (*P* > 0.05). There were no statistically significant differences in the allele and genotype frequencies of +49A/G and CT60A/G SNPs within CTLA-4 between patients with SLE and healthy

controls as well as patients with GD vs. healthy controls ($P > 0.05$). However, the GG genotype of +49A/G and CT60A/G was likely to be risk ($OR > 1$) in GD, although this was not statistically significant ($P > 0.05$). The effect of +49G allele was similar to autosomal recessive in which the presence of GG genotype when compared to AA and AG conferred the OR of 1.58 (95% CI=0.95-2.61, $p=0.061$). Furthermore, we found a dose response effect of CT60G allele on GD susceptibility with OR of 1.43 for GG homozygous and 1.17 for AG heterozygous when compared to AA genotype.

Moreover, we performed haplotype analysis of these two SNPs with strong LD ($D' = 0.952$). There were three common haplotypes (minor haplotype frequency ≥ 0.05) including AA, AG and GG. To test the association of CTLA-4 haplotype and disease development, we compared each tested haplotype with other two haplotypes between patients and controls. In this study, we did not find any significant association between CTLA-4 haplotypes and both diseases (Table 2).

DISCUSSION

In the present study, we determined the association between the CTLA-4 polymorphisms and the susceptibility to SLE and GD. We focused on two functional polymorphisms comprising +49A/G SNP on exon 1(rs231775) and CT60A/G SNP in 3'UTR (rs3087243). Our results showed no significant association of +49A/G and CT60A/G polymorphisms with SLE. These results confirm six previous reports of no association of +49A/G SNP with SLE,^{7,9, 28, 31-33} although other two studies have found evidence for association.^{5,6} Their studies have been reported that the frequency of the +49G allele and GG genotype was significantly higher in SLE patients than in controls.^{5,6} This +49G allele was associated with decreased control of T lymphocyte proliferation.^{34,35} In addition, individuals carrying the GG genotype had reduced cell surface expression of CTLA-4 when compared to AA genotype.³⁶ In contrast to a study of Ulker M et al (2009), they showed a relationship between the AA genotype and development of SLE in Turkish patients.³⁷ With respect

to CT60A/G SNP, a study showed association for this SNP with Spanish patients with SLE. In that study, they found the frequency of CT60G allele was significantly increased among SLE patients compared with control subjects.¹⁰ However, this was not replicated in our Thai patients with SLE.

For our study in GD, there were no statistically significant differences in the allele and genotype frequencies of +49A/G and CT60A/G SNPs within CTLA-4 gene between patients with GD and healthy controls. However, the GG genotype of these two SNPs was likely to be risk in disease development, although this was not statistically significant. This might be due to limited sample size. The power for our genetic association study was calculated using the PS program,³⁰ based on our sample size (132 cases vs. 153 controls), probability of exposure among controls (0.383)¹⁹ and an odds ratio of 1.75.¹⁹ By this calculation, our study had a power of 60.0%, with $\alpha = 0.05$. To improve the power of detection, the sample sizes should be augmented in further study.

The CT60G allele has been shown to influence the efficiency of splicing and lower production of soluble CTLA-4 (sCTLA-4).²⁵ The sCTLA-4 has a B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) recognition site. The binding of sCTLA-4 to CD80/86 molecules inhibits T-cell proliferation *in vitro*.³⁸ Thus, the reduction of sCTLA-4 could lead to decreased impeding of CD80/CD86, resulting in an increasing of T cell activation. Association of CT60G allele with GD was reported in seven studies; although, it was not associated with GD in the study of Cho HJ et al.^{14-19,21,39} A meta-analysis suggests a strong evidence that CT60 GG genotype has the greatest risk than GA.⁴⁰ From our result, we do find a dose response effect of CT60G allele on GD susceptibility, but there was no statistical significance. The GG homozygous (OR = 1.43) has a greater tendency to cause GD than AG heterozygous (OR = 1.17) when compared to AA genotype. This result indicates that two G alleles are required to exhibit a risk effect, whereas one G allele might not be satisfactory. For our finding, the association study utilizing a larger sample size should be performed to further verify.

Table 1 Genotype and allele frequencies of *CTLA4* gene polymorphisms in SLE, GD patients and control subjects

SNP	Genotype /allele	SLE	GD	Healthy control	SLE vs. Healthy control		GD vs. Healthy control	
		N = 151 (%)	N = 132 (%)	N = 153 (%)	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
+49 A/G (rs231775)	AA	33 (21.85)	22 (16.67)	26 (16.99)	1.00		1.00	
	AG	77 (50.99)	49 (37.12)	73 (47.71)	0.83 (0.43-1.59)	0.549	0.79 (0.38-1.64)	0.500
	GG	41 (27.15)	61 (46.21)	54 (35.29)	0.60 (0.29-1.21)	0.123	1.34 (0.64-2.77) ^a	0.401
	A	143 (47.35)	93 (35.23)	125 (40.85)	1.00		1.00	
	G	159 (52.65)	171 (64.77)	181 (59.15)	0.77 (0.55-1.07)	0.106	1.27 (0.89-1.81)	0.168
CT60 A/G (rs3087243)	AA	10 (6.62)	8 (6.06)	12 (7.84)	1.00		1.00	
	AG	74 (49.01)	46 (34.85)	59 (38.56)	1.51 (0.56-4.08)	0.374	1.17 (0.4-3.45)	0.753
	GG	67 (44.37)	78 (59.09)	82 (53.59)	0.98 (0.37-2.63)	0.966	1.43 (0.51-4.07)	0.460
	A	94 (31.13)	62 (23.48)	83 (27.12)	1.00		1.00	
	G	208 (68.87)	202 (76.52)	223 (72.88)	0.82 (0.57-1.19)	0.277	1.21 (0.81-1.81)	0.320

SLE, Systemic lupus erythematosus; GD, Graves' disease; SNP, single nucleotide polymorphism; OR, odds ratio; CI, confidence interval

^a autosomal recessive model GG/AA+AG; OR (95% CI)= 1.58 (0.95-2.61), p=0.061

Table 2 Haplotype analysis for +49 A/G (rs231775) and CT60 A/G (rs3087243)

Haplotype (MHF \geq 0.05)	Haplotype frequency			SLE vs. Healthy control		GD vs. Healthy control	
	SLE	GD	Healthy control	OR (95%CI)	<i>P</i> value	OR (95%CI)	<i>P</i> value
AA	0.3020	0.2319	0.2712	1.15 (0.80 - 1.65)	0.4030	0.81 (0.56 - 1.18)	0.2823
AG	0.1779	0.1217	0.1373	1.35 (0.86 - 2.12)	0.1706	0.87 (0.53 - 1.42)	0.5817
GG	0.5201	0.6464	0.5915	0.72 (0.52 - 1.00)	0.0776	1.23 (0.89 - 1.70)	0.1794

MHF, Minor haplotype frequency; SLE, Systemic lupus erythematosus; GD, Graves' disease; OR, odds ratio; CI, confidence interval

REFERENCES

1. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1992 Mar;35(3):311-8.
2. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, Hegedus L. Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Feb;86(2):930-4.
3. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:65-97.
4. Gough SC, Walker LS, Sansom DM. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2005 Apr;204:102-15.
5. Pullmann R, Jr., Lukac J, Skerenova M, Rovensky J, Hybenova J, Melus V, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) dimorphism in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 1999 Nov-Dec;17(6):725-9.
6. Ahmed S, Ihara K, Kanemitsu S, Nakashima H, Otsuka T, Tsuzaka K, et al. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology (Oxford).* 2001 Jun;40(6):662-7.
7. Hudson LL, Rocca K, Song YW, Pandey JP. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet.* 2002 Oct;111(4-5):452-5.
8. Fernandez-Blanco L, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. A CTLA-4 polymorphism associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004 Jan;50(1):328-9.
9. Barreto M, Santos E, Ferreira R, Fesel C, Fontes MF, Pereira C, et al. Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet.* 2004 Aug;12(8):620-6.

10. Torres B, Aguilar F, Franco E, Sanchez E, Sanchez-Roman J, Jimenez Alonso J, et al. Association of the CT60 marker of the CTLA4 gene with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004 Jul;50(7):2211-5.
11. Yanagawa T, Taniyama M, Enomoto S, Gomi K, Maruyama H, Ban Y, et al. CTLA4 gene polymorphism confers susceptibility to Graves' disease in Japanese. *Thyroid.* 1997 Dec;7(6):843-6.
12. Allahabadia A, Heward JM, Nithiyananthan R, Gibson SM, Reuser TT, Dodson PM, et al. MHC class II region, CTLA4 gene, and ophthalmopathy in patients with Graves' disease. *Lancet.* 2001 Sep 22;358(9286):984-5.
13. Kouki T, Gardine CA, Yanagawa T, Degroot LJ. Relation of three polymorphisms of the CTLA-4 gene in patients with Graves' disease. *J Endocrinol Invest.* 2002 Mar;25(3):208-13.
14. Furugaki K, Shirasawa S, Ishikawa N, Ito K, Kubota S, Kuma K, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with Graves' disease and autoimmune thyroid disease in the Japanese. *J Hum Genet.* 2004;49(3):166-8.
15. Ban Y, Concepcion ES, Villanueva R, Greenberg DA, Davies TF, Tomer Y. Analysis of immune regulatory genes in familial and sporadic Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Sep;89(9):4562-8.
16. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M. Association of a CTLA-4 3' untranslated region (CT60) single nucleotide polymorphism with autoimmune thyroid disease in the Japanese population. *Autoimmunity.* 2005 Mar;38(2):151-3.
17. Weng YC, Wu MJ, Lin WS. CT60 single nucleotide polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with susceptibility to Graves' disease in the Taiwanese population. *Ann Clin Lab Sci.* 2005 Summer;35(3):259-64.

18. Petrone A, Giorgi G, Galgani A, Alemanno I, Corsello SM, Signore A, et al. CT60 single nucleotide polymorphisms of the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene region is associated with Graves' disease in an Italian population. *Thyroid*. 2005 Mar;15(3):232-8.
19. Han SZ, Zhang SH, Li R, Zhang WY, Li Y. The common -318C/T polymorphism in the promoter region of CTLA4 gene is associated with reduced risk of ophthalmopathy in Chinese Graves' patients. *Int J Immunogenet*. 2006 Aug;33(4):281-7.
20. Chen PL, Fann CS, Chang CC, Wu IL, Chiu WY, Lin CY, et al. Family-based association study of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 with susceptibility to Graves' disease in Han population of Taiwan. *Genes Immun*. 2008 Mar;9(2):87-92.
21. Tsai ST, Huang CY, Lo FS, Chang YT, Tanizawa T, Chen CK, et al. Association of CT60 polymorphism of the CTLA4 gene with Graves' disease in Taiwanese children. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2008 Jul;21(7):665-72.
22. Takahashi M, Kimura A. HLA and CTLA4 polymorphisms may confer a synergistic risk in the susceptibility to Graves' disease. *J Hum Genet*. 2010 May;55(5):323-6.
23. Zhao SX, Pan CM, Cao HM, Han B, Shi JY, Liang J, et al. Association of the CTLA4 gene with Graves' disease in the Chinese Han population. *PLoS One*. 2010;5(3):e9821.
24. Chistiakov DA, Turakulov RI. CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. *J Mol Endocrinol*. 2003 Aug;31(1):21-36.
25. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003 May 29;423(6939):506-11.
26. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982 Nov;25(11):1271-7.

27. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
28. Heward J, Gordon C, Allahabadia A, Barnett AH, Franklyn JA, Gough SC. The A-G polymorphism in exon 1 of the CTLA-4 gene is not associated with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1999 Mar;58(3):193-5.
29. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007 Sep;81(3):559-75.
30. Dupont WD, Plummer WD, Jr. Power and sample size calculations. A review and computer program. *Control Clin Trials.* 1990 Apr;11(2):116-28.
31. Matsushita M, Tsuchiya N, Shiota M, Komata T, Matsuta K, Zama K, et al. Lack of a strong association of CTLA-4 exon 1 polymorphism with the susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese: an association study using a novel variation screening method. *Tissue Antigens.* 1999 Dec;54(6):578-84.
32. Liu MF, Wang CR, Lin LC, Wu CR. CTLA-4 gene polymorphism in promoter and exon-1 regions in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2001;10(9):647-9.
33. Lee YH, Kim YR, Ji JD, Sohn J, Song GG. Polymorphisms of the CTLA-4 exon 1 and promoter gene in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2001;10(9):601-5.
34. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol.* 2000 Dec 1;165(11):6606-11.
35. Ban Y, Davies TF, Greenberg DA, Kissin A, Marder B, Murphy B, et al. Analysis of the CTLA-4, CD28, and inducible costimulator (ICOS) genes in autoimmune thyroid disease. *Genes Immun.* 2003 Dec;4(8):586-93.

36. Maurer M, Loserth S, Kolb-Maurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics*. 2002 Apr;54(1):1-8.
37. Ulker M, Yazisiz V, Sallakci N, Avcı AB, Sanlioglu S, Yegin O, et al. CTLA-4 gene polymorphism of exon 1(+49 A/G) in Turkish systemic lupus erythematosus patients. *Int J Immunogenet*. 2009 Aug;36(4):245-50.
38. Oaks MK, Hallett KM, Penwell RT, Stauber EC, Warren SJ, Tector AJ. A native soluble form of CTLA-4. *Cell Immunol*. 2000 May 1;201(2):144-53.
39. Cho HJ, Chung JH, Kim IS, Kim HJ, Cho SH, Ki CS, et al. Lack of a genetic association between the CTLA-4 gene and Graves' disease in Koreans. *Thyroid*. 2006 Mar;16(3):237-41.
40. Kavvoura FK, Akamizu T, Awata T, Ban Y, Chistiakov DA, Frydecka I, et al. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Aug;92(8):3162-70.

APPENDIX

ประวัติผู้รับผิดชอบแผนงานวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ-สกุล

(ภาษาไทย)

นาย ยิงยศ อวิหิงसानนท์

(ภาษาอังกฤษ)

YINGYOS AVIHINGSANON

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ

-

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

4. หน่วยงานที่สังกัด

สาขาวิชาโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพระรามสี่ กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-256-4251 ต่อ 204 โทรสาร 02-252-6920

E-mail : yingyos@hotmail.com, yingyos.a@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา	มหาวิทยาลัย	ปริญญา/วุฒิบัตร
2533	จุฬาลงกรณ์	แพทยศาสตรบัณฑิต
2537	จุฬาลงกรณ์	ประกาศนียบัตรวิทยาศาสตร์การแพทย์คลินิก
2539	จุฬาลงกรณ์	วุฒิบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพ สาขาอายุรศาสตร์
2541	จุฬาลงกรณ์	วุฒิบัตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพ สาขาอายุรศาสตร์โรคไต
2541	จุฬาลงกรณ์	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาอายุรศาสตร์โรคไต
2545	Harvard Medical School	Post-doctoral Fellow of Division of Immunology

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Nephrology, Renal Immunology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 โครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนของ Growth factor ในปีสภาวะกับการเกิดไตอักเสบจากโรค Lupus

7.2.2 โครงการศึกษาอุบัติการณ์ของการแสดงออกของยีนในภาวะ subclinical allograft rejection ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต

7.2.3 โครงการ A prospective, open label, multicenter to assess the efficacy and safety of Myfortic™ (ERL080) in De novo kidney transplant recipients

7.2.4 โครงการศึกษาบทบาทของกลุ่มยีนอินเทอเฟอรอนชนิดที่ 1 และทรานส์ฟอร์มโกรฟแฟกเตอร์ เบต้าในโรคเอสแอลอี- ความสัมพันธ์ระหว่างเวชพันธุศาสตร์ต่อลักษณะแสดงออกทางคลินิก พยาธิสภาพ และ ภาวะภูมิคุ้มกันโรคเอสแอลอี

7.2.5 โครงการบทบาทของยีนวาสคูลาร์เอนโดทีเลียล โกรฟแฟกเตอร์และตัวดอรับที่มีผลต่อการเกิดโรคและการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยโรคไตอักเสบลูปัส

7.2.6 โครงการค้นหาชีวโมเลกุลที่จำเพาะต่อการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคไตอักเสบลูปัส

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อข้อเสนอการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

7.3.1 การพัฒนาการตรวจหาระดับ messenger RNA โดยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล ได้แก่ Competitive Reverse Transcriptase PCR และ Quantitative renal-time PCR (ทุน International Society of Nephrology และทุน American Society of Transplantation ปี พ.ศ. 2543 – 2545 เป็นผู้วิจัยหลัก)

ผลงานตีพิมพ์

- Avihingsanon Y, Ma N, Csizmadia E, Wang C, Pavlakis M, Strom TB, Soares MP, Ferran C. Expression of Protective Genes In Human Renal Allografts : A

Regulatory Response To Injury Associated With Graft Rejection. **Transplantation** 2002; 73; 1079-85.

- Avihingsanon Y, Giraldo M, Schachter AD, Ma N, Shaffer D, Monaco AP, Uknis M, Ferran C, Stillman I, Pavlakis M, Strom TB. On the Importance of the Molecular Status of the Allograft at the Time of Implantation and Clinical Outcome. (abstract) **Nephrol Dial Transpl** 2003; suppl
- Ma N, Yu T, Avihingsanon Y, Mottley C, Strehlau J, Strom TB. Evaluation of mRNA Profiles of T-cell Related Growth Factors and Receptor for Diagnosis of Acute Renal Allograft Rejection in Human. (abstract) **Am J Transplantation** 2002; suppl 3(2): S377.

7.3.2 การศึกษาบทบาทของ Low-molecular weight heparin ในหนูทดลองที่เป็นโรคไตจากเบาหวาน (ทุนวิจัยหน่วยโรคไต และทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการเงิน พ.ศ. 2539 เป็นผู้วิจัยหลัก)

ผลงานตีพิมพ์

- Avihingsanon Y, Suwanwalaikorn S, Teerawatanapong S, Tungsanga K. The Role of Low Molecular Weight Heparin and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor in Uninephrectomized Diabetic Rat (abstract). **J Am Soc Nephrol** 1998 : 9 ; 124A. and **J Nephrol Soc Thai** 1998: 4(3); 340-349.

7.3.3 การศึกษาทางคลินิกต่างๆ ในผู้ป่วยปลูกถ่ายไต ได้แก่ เครื่องมือตรวจวินิจฉัยภาวะ acute allograft rejection และเภสัชจลนศาสตร์ของยา cyclosporine (ทุนวิจัยหน่วยโรคไตและทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการเงิน พ.ศ.2539 เป็นผู้วิจัยหลักและเป็นผู้ร่วมวิจัย)

ผลงานตีพิมพ์

- Chaiwatanarat T, Avihingsanon Y, Sirisalipoch S, Eiam-Ong S, Boonvisut S, Chusil S, Tungsanga K. Differentiation between acute renal allograft rejection and acute tubular necrosis by renal vascular transit time. **Chula Med J** 1999; 43(1): 873-883.

- Avihingsanon Y, Kungsamrith T, Eiam-Ong S, Chusilp S, Tungsanga K, Panomwanna D. Determination of Abbreviated Pharmacokinetic Profiles of Cyclosporine(Neoral) by Simple Linear Trapezoidal Rule. **Chula Med J** 1998: 42(5); 353-65.

7.3.4 โครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนของ growth factor ในปัสสาวะกับการเกิดไตอักเสบจากโรค Lupus (ทุนวิจัยอนุชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการเงิน พ.ศ.2546 และทุนมูลนิธิกระจกเงาฯ ปี 2546 เป็นผู้วิจัยหลัก)

ผลงานตีพิมพ์

- Avihingsanon Y, Phumesin P, Hemachudha T, Akkasilpa S, Praditpornsilpa K, Eiam-Ong S, et al. Quantitation of urinary TGF- β mRNA: an alternation to kidney biopsy in lupus nephritis.

7.3.5 โครงการบทบาทของยีนวาสคูลาร์เอนโดทีเลียลโกรฟแฟกเตอร์และตัวต่อรับที่มีผลต่อการเกิดโรคและการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยโรคไตอักเสบลูปัส

ผลงานตีพิมพ์

- Y Avihingsanon, P Phumesin, T Benjachat, S Akkasilpa, V Kittikowit, K Praditpornsilpa, J Wongpiyabavorn, S Eiam-Ong, T Hemachudha, K Tungsanga and N Hirankarn. Measurement of Urinary Chemokine and Growth Factor Messenger RNAs: A Non-invasive Monitoring in Lupus Nephritis. **Kidney International** 2006; 69 (Feb): 747-753. (Impact Factor 4.79)

7.3.6 โครงการศึกษาบทบาทของกลุ่มยีนอินเตอเฟอรอนชนิดที่1 และทรานส์ฟอร์มโกรฟแฟกเตอร์ เบต้าในโรคเอสแอลอี- ความสัมพันธ์ระหว่างเวชพันธุศาสตร์ต่อลักษณะแสดงออกทางคลินิก พยาธิสภาพ และ ภาวะภูมิคุ้มกันโรคเอสแอลอี

ผลงานตีพิมพ์

- Y Avihingsanon, P Phumesin, T Benjachat, S Akkasilpa, V Kittikowit, K Praditpornsilpa, J Wongpiyabavorn, S Eiam-Ong, T Hemachudha, K Tungsanga and N Hirankarn. Measurement of Urinary Chemokine and Growth Factor

Messenger RNAs: A Non-invasive Monitoring in Lupus Nephritis. **Kidney International** 2006; 69 (Feb): 747-753. (Impact Factor 4.79)

- N Hirankarn, J Wongpiyabovorn, O Hanvivatvong, J Netsawang, S Akkasilpa, J Wongchinsri, P Hanvivadhanakul, W Korkit and Y Avihingsanon. The Synergistic Effect of FC-gamma Receptor IIa and Interleulin-10 Genes on the Risk to Develop Systemic Lupus Erythematosus in Thai Population. **Tissue Antigens** 2006; 68: 399-406. (Impact Factor 2.75)
- M Tangwattanachuleeporn, P Sodsai, Y Avihingsanon, J Wongpiyabovorn, J Wongchinsri and N Hirankarn. Association of interferon-gamma gene polymorphism (+874A) with arthritis manifestation in SLE. **Clin Rheumatol.**, 2007; 26(11): 1921-1924. (Impact Factor 1.46)
- U Boonsrirat, S Angsuthum, S Vannaprasaht, J Kongpunvijit, N Hirankarn, W Tassaneeyakul and Y Avihingsanon. Azathioprine-induced fatal myelosuppression in systemic lupus erythematosus patient carrying TPMT*3C polymorphism. **Lupus** 2008; 17: 132–134 (Impact Factor 2.366)
- Nattiya Hirankarn, Yingyos Avihingsanon and Jongkonnee Wongpiyabovorn. Genetic Susceptibility to SLE is Associated with TNF-alpha Gene Polymorphism - 863, but not -308 and -238, in Thai Population. **Int J Immunogenetic** 2007; 34 (6): 425–430. (Impact Factor 1.33)
- Nattiya Hirankarna, Marut Tangwattanachuleepornb, Jongkonnee Wongpiyabovorna, Jeerapat Wongchinsric and Yingyos Avihingsanond. Genetic Association of Interferon Alpha Subtype 1, 2 and 5 in Systemic Lupus Erythematosus. (submitted to **Tissue Antigens**)
- Jongkonnee Wongpiyabovorna, Kriangsak Ruchusatsawatb, Phantipa Protjaroenc, Yuthana Onganantapongd, Yingyos Avihingsanon, Wannasri Sintupakd and Nattiya Hirankarna . Interferon Alpha mRNA level and Subtypes in lesion and non-lesion of Discoid Lupus Erythematosus Patients. (In preparation to submit to **Lupus**)

- Nattiya Hirankarna, Marut Tangwattanachuleepornb, Jongkonnee Wongpiyabavorna , Jeerapat Wongchinsric and Yingyos Avihingsanon. Association of IL-18 gene polymorphism (-137C) with arthritis manifestation in SLE: the synergistic effect with IFN gamma gene polymorphism (+874A). (In preparation to submit to **Clin Rheumatology**)
- Nattiya Hirankarna, Krongkamol Hemwijitb, Jongkonnee Wongpiyabavorna and Yingyos Avihingsanon. TGFB2 Haplotype Associated with Systemic Lupus Erythematosus Susceptibility. (In preparation to submit to **Arthritis Research and Therapy**)
- Ingorn Kimkong, Jongkonnee Wongpiyabavorn, Yingyos Avihingsanon and Nattiya Hirankarn. Association between polymorphisms within interferon (IFN)-inducible genes (MND A, IFI16 and AIM2) with susceptibility to systemic lupus erythematosus. (In preparation to submit to **Immunogenetics**)

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ข้อเสนอเสนอการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย

7.4.1 โครงการค้นหาชีวโมเลกุลที่จำเพาะต่อการวินิจฉัยและพยากรณ์โรคไตอักเสบรูมาตอยด์

ผลงานตีพิมพ์

- Avihingsanon Y, Lekprasert P, Benjachat T, Kongpunvijit J, Traitanon O, Hirankarn N. Urinary IP-10 Protein Is Associated with Active Lupus Nephritis. **J Am Soc Nephrol** 2007; 18: 779A. (Abstract)
- Yingyos Avihingsanon, Thitima Benjachat, Adis Tassanarong, Pimpayao Sodsai, Vipawee Kittikovit, and Nattiya Hirankarn. Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. **Kidney International** advance online publication, 18 March 2009. (Impact Factor 4.922)
- Pimpayao Sodsai, Nattiya Hirankarna, Yingyos Avihingsanon, and Tanapat Palaga. Defects in Notch1 Upregulation upon Activation of T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus are Related to Lupus Disease Activity. **Lupus** (2008) 17, 645–653. (Impact factor 2.248)

7.4.2 โครงการการค้นหาโมเลกุลเพื่อการตรวจวินิจฉัยและพยากรณ์โรคในผู้ป่วยโรคเอส แอล อี โดยวิธีการทางอีโนม และเมทิลเลชั่น (ทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2551 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผู้วิจัยหลัก) ขณะนี้งานได้ดำเนินไปแล้วประมาณ 70% และจะเสร็จสมบูรณ์ในเดือนกันยายน 2553

ผลงานตีพิมพ์

- Apiradee Thongboon, **Yingyos Avihingsanon**, Thitima Benjachat, Nattiya Hirankarn, Natavudh Townamchai, Talerngsak Kanjanabuch, Kearkiat Praditpornsilpa, Kriang Tungsanga, and Somchai Eiam-Ong. FOXP3 Messenger RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) is Associated with Severe Lupus. (*In manuscript preparation*).
- Ingorn Kimkong, **Yingyos Avihingsanon**, Nattiya Hirankarn. Expression profile of HIN200 in leukocytes and renal biopsy of SLE patients by real time RT-PCR. Lupus 2009 (*In revision*). (Impact Factor 2.366)
- Ingorn Kimkong, **Yingyos Avihingsanon**, Nattiya Hirankarn. Association of interferon (IFN)-inducible genes (IFI16, MNDNA, AIM2 and IFIX) with susceptibility to SLE disease (*In manuscript preparation*).
- Pongpaka Lertdumrongluk, Purichaya Somparn, Nattiya Hirankarn, and **Yingyos Avihingsanon**. The correlation between pharmacokinetics of mycophenolic acid in lupus nephritis. (*In manuscript preparation*).

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง นฤฤฎิยา หิรัญกาญจน์ รองศาสตราจารย์
(ภาษาอังกฤษ) Mrs Nattiya Hirankarn Associate Professor

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน

3100904730364

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่สังกัด

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนน พระรามสี่ กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-252-8181-9 ต่อ 3667 โทรสาร 02-252-5952

E-mail fmednpt@md.chula.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

	คุณวุฒิ	ปี พ.ศ. ที่จบ	ชื่อสถานศึกษาและประเทศ
1	แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับสอง)	2536	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, ประเทศไทย
2	Doctor of Philosophy (Immunology)	2542	Georgetown University, USA

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

Immunogenetic study, Autoimmune disease

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.2.1 โครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนภายใน HLA region (SC1, PRG1, และ HLA-E) กับความเสี่ยงทางพันธุกรรมของการเกิดโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก

7.2.2 โครงการศึกษาการตอบสนองทาง cytotoxic T lymphocyte ที่จำเพาะต่อ LMP1 pitopes ของ Epstein-Barr virus ในผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูกและคนปกติที่ติดเชื้อไวรัส

7.2.3 การพัฒนาการตรวจ HLA โดยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล ได้แก่ PCR-SSP และ PCR-direct sequencing

7.2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างยีนของที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกับการเกิดโรคเอดส์ในประเทศไทย

- 7.2.5 ปัจจัยทางพันธุกรรมทางภูมิคุ้มกันที่มีผลต่อการเกิดโรคและการดำเนินโรคของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง
- 7.2.6 บทบาทของกลุ่มยีนอินเตอเฟอรอนชนิดที่ 1 และทรานส์ฟอร์มโกรฟแฟกเตอร์ เบต้า ในโรคเอสแอลอี- ความสัมพันธ์ระหว่างเวชพันธุศาสตร์ต่อลักษณะแสดงออกทางคลินิก พยาธิสภาพ และภาวะภูมิคุ้มกัน ในโรคเอสแอลอี
- 7.2.7 การศึกษายีนใหม่สองยีน PTGS2 และ PSEN2 ที่เกี่ยวข้องกับ การตายของทีลิมโฟไซต์ ในผู้ป่วยลูปัส : บทบาทของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสและการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมที่ไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- 7.3.1 การพัฒนาการตรวจ HLA โดยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล ได้แก่ PCR-SSP และ PCR-direct sequencing (ทุนสนับสนุนพัฒนาอาจารย์ใหม่ / นักวิจัยใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการเงิน พ.ศ.2542 เป็นผู้วิจัยหลัก)

ผลงานตีพิมพ์

- Pimtanonthai N, Rizzuto GA, Slack R, Steiner NK, Kosman CA, Jones PF, Koester R, Ng J, Hartzman RJ, Hurley CK. 2000. Diversity of alleles encoding HLA-B40: relative frequencies in united states populations and description of five novel alleles. Hum Immunol, 61 (8): 808-815.
 - Pimtanonthai N, Charoenwongse P, Mutirangura A, Hurley CK. 2002. Distribution of HLA-B alleles in nasopharyngeal carcinoma patients and normal controls in Thailand. Tissue Antigens, 59 (3): 223-225.
- 7.3.2 โครงการศึกษาการตอบสนองทาง cytotoxic T lymphocyte ที่จำเพาะต่อ LMP1 epitopes ของ Epstein-Barr virus ในผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูกและคนปกติที่ติดเชื้อไวรัส (ทุนชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2543-2544 ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ ทุนมูลนิธิกระจกเงาฯ ปี 2544-2546 เป็นผู้วิจัยหลัก)

ผลงานตีพิมพ์

- Pimtanonthai N, Charoenwongse P, Mutirangura A, Hurley CK. 2002. Distribution of HLA-B alleles in nasopharyngeal carcinoma patients and normal controls in Thailand. Tissue Antigens, 59 (3): 223-225.
- Duraiswamy J, Burrows JM, Bharadwaj M, Burrows SR, Cooper L, Pimtanonthai NH, Khanna R. 2003 Preferential Targeting of C-Terminal Activator Region 1 and Transmembrane Domain of EBV-encoded Oncogene LMP1 by Virus-Specific T cell Responses. J Virol; 77: 7401-410.
- Pimtanonthai NH, Kangwanshiratada O, Charoenwongse P. 2003 Serological analysis of HLA-A and HLA-B antigens in Thai patients with Nasopharyngeal Carcinoma. J Med Assoc Thai; 86 (Suppl 2): S237-41.

- 7.3.3 โครงการการศึกษาาระบบ HLA class II (DR และ DQ) alleles ในคนไข้โรค rheumatoid arthritis (ทุนชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2543-2544 เป็นผู้ร่วมวิจัย)

ผลงานตีพิมพ์

- Pimtanonthai N., Kimkong I., Inwattana R., Deesomchok U., Charoenwongse P. 2002. DRB1*04 subtype in Thai patients with rheumatoid arthritis. J Med Assoc Thai, 85 (Suppl 1) (June): S366-370.

- 7.3.4 โครงการการตรวจหา *emm* type ของ *Streptococcus Group A, C and G* โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) และการหาลำดับเบสของ *emm* gene (ทุนชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2543-2544 เป็นผู้ร่วมวิจัย)

ผลงานตีพิมพ์

- Orataiwun P., Pimtanonthai N., et al. Outbreak of uncommon type of Group A Streptococcal Pharyngitis among Cadets at the Chulachomklao Royal Military Academy, Nakornnayok, Thailand. J Med Assoc Thai, 85 (Suppl 1) (June): S378-382.
- Pimtanonthai N., Orataiwun P., et al. *Emm* Types of Invasive Group A Streptococcal Isolates from Thai Patients at King Chulalongkorn Memorial Hospital from 1995-1999. J Med Assoc Thai, 85 (Suppl 1) (June): S371-377.
- Orataiwun P, Nunthapisud P, Pimtanonthai N 2002 *Emm* typing of streptococcus group C and group G from Thai patients by sequencing method. (abstract) เวชศาสตร์ร่วมสมัย 2545 การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 43 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 27 มิถุนายน 2545

- 7.3.5 โครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนภายใน HLA region (SC1, PRG1, และ HLA-E) กับความเสี่ยงทางพันธุกรรมของการเกิดโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก (ทุนชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2544-2545 เป็นผู้วิจัยหลัก)

ผลงานตีพิมพ์

- Kimkong I, Mutirangura A, Pimtanonthai N 2002 The association between HLA-E gene and genetic susceptibility of nasopharyngeal carcinogenesis. (abstract) เวชศาสตร์ร่วมสมัย 2545 การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 43 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 27 มิถุนายน 2545
- Kimkong I, Mutirangura A, Pimtanonthai NH. 2003 Distribution of HLA-E alleles in Thai population. J Med Assoc Thai; 86(Suppl 2): S230-36.
- Hirankarn N, Kimkong I, Mutirangura A. 2004 HLA-E polymorphism in patients with nasopharyngeal carcinoma. Tissue Antigens. 2004 Nov;64(5):588-92.

- 7.3.6 โครงการความสัมพันธ์ระหว่างยีนของที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกับการเกิด

โรคเกรฟในประชากรไทย (ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี2548 เป็นผู้วิจัยหลัก)

ผลงานตีพิมพ์

- Nakkuntod J, Wongsurawat T, Charoenwongse P, Snabboon T, Sridama V, **Hirankarn N**. No Association between an Interleukin 4 Gene Promoter (-589) Polymorphism and Graves' Disease in Thai Patients. J Med Assoc Thai. 2004 Sep;87 Suppl 2:S123-8.
- Wongsurawat T, Nakkuntod J, Charoenwongse P, Snabboon T, Sridama V, **Hirankarn N**. The association between HLA class II haplotype with Graves' disease in Thai population. Tissue Antigens. 2006 Jan;67(1):79-83.

7.3.7 โครงการปัจจัยทางพันธุกรรมทางภูมิคุ้มกันที่มีผลต่อการเกิดโรคและการดำเนินโรคของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (ทุนพัฒนานักวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2546-2548 เป็นผู้วิจัยหลัก)

ผลงานตีพิมพ์

- **Hirankarn N**, Kimkong I, Kummee P, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Interleukin-1beta gene polymorphism associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection. World J Gastroenterol. 2006 Feb 7;12(5):776-9.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.4.1 โครงการบทบาทของกลูเมออินอินเตอเฟอรอนชนิดที่1 และทรานส์ฟอร์มโกรฟแฟกเตอร์ เบต้า ในโรคเอสแอลอี- ความสัมพันธ์ระหว่างเวชพันธุศาสตร์ต่อลักษณะแสดงออกทางคลินิก พยาธิสภาพ และภาวะภูมิคุ้มกันในโรคเอสแอลอี (ทุนสนับสนุนงานวิจัยและพัฒนาด้านพันธุกรรมมนุษย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปี 2548-2550 เป็นผู้วิจัยหลัก)

ขณะนี้งานดำเนินไปแล้วประมาณ 70% และจะเสร็จสมบูรณ์ในเดือนมิถุนายน 2550

7.4.2 การศึกษาอินโหม่สองยีน PTGS2 และ PSEN2 ที่เกี่ยวข้องกับโรคต้อของทีลิมโฟไซต์ ในผู้ป่วยลูปีส : บทบาทของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสและการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมที่ไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสขณะนี้งานดำเนินไปแล้วประมาณ 70% และจะเสร็จสมบูรณ์ในเดือนมิถุนายน 2550

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล(ภาษาไทย) พญ.ดร.จงกลณี วงศ์ปิยะบวร
(ภาษาอังกฤษ) Jongkonnee Wongpiyabovorn, MD., Ph.D

2. ตำแหน่งปัจจุบัน(อาจารย์, ผศ., รศ., ศ.) รองศาสตราจารย์

3. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก

หน่วยภูมิคุ้มกัน ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330

โทรศัพท์ 0-22564132 โทรสาร 0-22525952

e-mail : fmedjwp@md.chula.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ	วุฒิการศึกษา	สถานศึกษา	ประเทศ
2530-2535	แพทยศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยม)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2537-2538	Diploma in Dermatology (อันดับ 1)	สถาบันโรคผิวหนังฯ	ไทย
2538-2541	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต อายุรศาสตร์ สาขาตจวิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2543	ผู้เชี่ยวชาญโรคผิวหนัง	แพทยสภา	ไทย
2544-2546	ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต (ตจวิทยา)	Juntendo University	ญี่ปุ่น

5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)ระบุนสาขาวิชาการ

Immunodermatology

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการ
ทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

1.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

2.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

- โครงการศึกษายีน IL-10 promoter polymorphism และความสัมพันธ์ระหว่างยีน IL-10 promoter polymorphism กับปริมาณ mRNA ของ IL-10 ที่ผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินในประชากรไทย(ทุนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย)

- ความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกับการเกิดโรคสะเก็ดเงินในประชากรไทย(ทุนงบประมาณแผ่นดิน)

3.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- **Wongpiyabovorn J**, Suto H, Ushio H, Izuhara K, Nakao A, Okumura K, Ogawa H. Up-regulation of interleukin-13 receptor α 1 on human keratinocyte in the skin of psoriasis and atopic dermatitis. *J Dermatol science* 2003;33:31-40(ทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)
- **Wongpiyabovorn J**. Psoriasis(review).*Thai J Dermatol* 2004;20:10-25
- Netsawang J,Tangwattanachuleeporn M, Hirankarn N, **Wongpiyabovorn J**. The distribution of IL-10 Promoter Polymorphism in Thais. *J Med Assoc Thai*. 2004;(Suppl 2):S117-22
- Ruchusatsawat K, **Wongpiyabovorn J**, Hirankarn N, Mutirangura. SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis. *J Mol Med*. 2006 Feb;84(2):175-82. Epub 2005 Dec 31.
- **Wongpiyabovorn J**, Puvabanditsin P. Result of standard patch test in patients suspected having allergic contact dermatitis. *J Med Assoc Thai*. 2005 Sep;88 Suppl 4:S177-83.
- [Avihingsanon Y](#), [Phumesin P](#), [Benjachat T](#), [Akkasilpa S](#), [Kittikowit V](#), [Praditpornsilpa K](#), **Wongpiyabovorn J**, [Eiam-Ong S](#), [Hemachudha T](#), [Tungsanga K](#), [Hirankarn N](#). Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney int*. 2006 Feb;69(4):747-53
- Hirankarn N , **Wongpiyabovorn J**, Hanvivatvong O, Netsawang J, Akkasilpa S, Wongchinsri J, Hanvivadhanakul P, Korkit W, Avihingsanon Y. The synergistic effect of FC gamma receptor IIa and interleukin-10 genes on the risk to develop systemic lupus erythematosus in Thai population. (in press)
- งานวิจัยที่กำลังทำ
 - โครงการศึกษาบทบาทของกลุ่มยีนอินเตอร์เฟอรอนชนิดที่1 และทรานส์ฟอร์มโกรฟแฟกเตอร์ เบต้าในโรคเอสแอลอี- ความสัมพันธ์ระหว่างเวชพันธุศาสตร์ต่อลักษณะแสดงออกทางคลินิก พยาธิสภาพ และ ภาวะภูมิคุ้มกัน ในโรคเอสแอลอี(ทุนสนับสนุนงานวิจัยและพัฒนาด้านพันธุกรรมมนุษย์BIOTEC เป็นผู้วิจัยร่วม)

ขณะนี้ดำเนินการไปแล้วประมาณ 30% และจะเสร็จสมบูรณ์ในเดือนมิถุนายน 2550

3 7007 00566 08 1

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

นักวิทยาศาสตร์

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

หน่วยวิจัยลูบีส คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพระรามที่ 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 02-252-8181-9 ต่อ 3558

โทรสาร 02-252-8089

E-mail thi_benja@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษาที่จบ	สถานศึกษา	ปริญญา/สาขา
2544	มหาวิทยาลัยศิลปากร	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

-

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่า เป็นผู้ดำเนินการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

-

7.3 ผู้ร่วมงานวิจัยโครงการที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อข้อเสนอการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

7.3.1 Avihingsanon Y, Phumesin P, **Benjachat T**, Akkasilpa S, Kittikowit V, Praditpornsilpa K, et al. Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int.* 2006 Feb;69(4):747-53.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาว พรรณทิพา พรตเจริญ

(ภาษาอังกฤษ) Miss Phantipa Protjaroen

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน

3 2201 00329 36 8

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

นักวิทยาศาสตร์

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

หน่วยวิจัยอุปัส คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพระรามที่ 4 แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กทม. 10330

โทรศัพท์ 02-252-8181-9 ต่อ 3558

โทรสาร 02-252-8089

E-mail thi_benja@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษาที่จบ	สถานศึกษา	ปริญญา/สาขา
2548	มหาวิทยาลัยศิลปากร	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

-

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่า เป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

-

7.3 ผู้ร่วมงานวิจัยโครงการที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อข้อเสนอการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

-

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นาย จีรวัดน์ นาคขุนทด

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Jeerawat Nakkuntod

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน

3301900151253

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

-

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนน พระรามสี่ กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-252-8181-9 ต่อ 3662 โทรสาร 02-252-5952

E-mail juvpop@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษาที่จบ	สถานศึกษา	ปริญญา/สาขา
2543	มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาจุลชีววิทยา)
2546	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

-

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัยเป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

-

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อข้อเสนอการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

7.3.1 **Nakkuntod J**, Wongsurawat T, Charoenwongse P, Snabboon T, Sridama V, Hirankarn N.

No Association between an Interleukin 4 Gene Promoter (-589) Polymorphism and Graves' Disease in Thai Patients. J Med Assoc Thai. 2004 September; 87 Suppl.2:S123-S128.

7.3.2 Hirankarn N, **Nakkuntod J**, Wongsurawat T, Snabboon T, Charoenwongse P. The

Association between Immunogenetics and Genetic Susceptibility of Graves' disease in Thai Population. Tissue Antigens. 2004 Oct; 64:404. (abstract)

7.3.3 Wongsurawat T, **Nakkuntod J**, Charoenwongse P, Snabboon T, Sridama V, Hirankarn N. The association between HLA class II haplotype with Graves'disease in Thai population. Tissue Antigens. 2004; 67:79-83.

7.3.4 **Nakkuntod J**, Sodsai P, Hirankarn N. Interferon - γ gene (+874) polymorphism in Thai Population. Chula Med J. 2006 Oct; 50(10): 685-94.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) น.ส. เจนจิรา กงพันธุ์วิจิตร
(ภาษาอังกฤษ) Miss. Janejira Kongpunvijit
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน
3 1206 00444 67 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
-
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนน พระรามสี่ กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-252-8181-9 ต่อ 3662 โทรสาร 02-252-5952
E-mail jikkonaruk@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษาที่จบ	สถานศึกษา	ปริญญา/สาขา
2544	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาชีววิทยา)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

-

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

-

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อข้อเสนอการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย
ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) น.ส. ภูริชญา สมภาร
(ภาษาอังกฤษ) Miss. Poorichaya Somparn

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน
3489900012845

3. ตำแหน่งปัจจุบัน

-

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนน พระรามสี่ กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-252-8181-9 ต่อ 3662 โทรสาร 02-252-5952

E-mail pook_bio@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษาที่จบ	สถานศึกษา	ปริญญา/สาขา
2544	มหาวิทยาลัยบูรพา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาชีววิทยา)
2549	มหาวิทยาลัยมหิดล	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเภสัชศาสตร์ชีวภาพ)

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

-

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัยเป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

-

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อข้อเสนอการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

- Poorichaya Somparn , Chada Phisalapong , Somjai Nakornchai, Supeenun Unchern, Noppawan Phumala Morales. **Comparative Antioxidant Activities of Curcumin, Its Demethoxy Derivatives and Hydrogenated Derivatives.** Biol. Pharm. Bull. 2006.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

7. ชื่อ-นามสกุล(ภาษาไทย) นางสาวอิงอร กิมกง

(ภาษาอังกฤษ) Miss Ingorn Kimkong

8. เลขหมายประจำตัวประชาชน

3-7008-00243-666

9. ตำแหน่งปัจจุบัน(อาจารย์, ผศ., รศ., ศ.)

-

10. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

หน่วยภูมิคุ้มกัน ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330

โทรศัพท์ 0-22564132 โทรสาร 0-22525952

e-mail : mody_i43@hotmail.com

11. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ	วุฒิการศึกษา	สถานศึกษา	ประเทศ
2539-2542	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)	มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	ไทย
2543-2546	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
	จุลชีววิทยาทางการแพทย์ (ภูมิคุ้มกันวิทยา)		
2546	กำลังศึกษาระดับปริญญาเอก	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
	จุลชีววิทยาทางการแพทย์ (ภูมิคุ้มกันวิทยา)		

12. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)ระบุนสาขาวิชาการ
Immunogenetic study

13. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่า
เป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

-

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

ผลงานตีพิมพ์

1. Pimtanonthai N, **Kimkong I**, Inwattana R, Deesomchok U, Charoenwongse P 2002. DRB1*04 subtype in Thai patients with rheumatoid arthritis. J Med Assoc Thai, 85(Suppl 1) (June): S366-S370.
2. **Kimkong I**, Pimtanonthai N, Mutirangura A 2003. Distribution of Human Leukocyte Antigen-E alleles in Thailand. J Med Assoc Thai, 86(Suppl 2) (June): S230-S236.
3. Pimtanonthai N, **Kimkong I**, Mutirangura A 2004. HLA-E polymorphism in patients with nasopharyngeal carcinoma. Tissue Antigens. 2004 Nov; 64(5):588-92.
4. **Kimkong I**, Tangkijvanich P, Poovorawan Y, Hirankarn N. 2004 Interleukin-1 β Gene Polymorphism Associated With Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis B Virus Infection. Tissue Antigens. 2004 Oct; 84:383-384. (abstract)
5. Nattiya Hirankarn, **Ingorn Kimkong**, Pittaya Kummee, Pisit Tangkijvanich, Yong Poovorawan. Interleukin-1 β Gene Polymorphism Associated with Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis B Virus Infection. World J Gastroenterol 2006 Feb 7; 12(5): 776-779.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

- โครงการศึกษาบทบาทของกลุ่มยีนอินเตอร์เฟียร์อนชนิดที่1 และทรานส์ฟอร์มโกรฟแฟกเตอร์เบต้าในโรคเอสเอสอี- ความสัมพันธ์ระหว่างเวชพันธุศาสตร์ต่อลักษณะแสดงออกทางคลินิก

พยาธิสภาพ และ ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องในโรคเอสแอลอี (ทุนสนับสนุนงานวิจัยและพัฒนา
พันธุกรรมมนุษย์BIOTEC เป็นผู้วิจัยร่วม)

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

Name Dr. Ivo Glynne Gut
Address Centre National de Génotypage
2 rue Gaston Crémieux
CP 5721, 91 057 Evry Cedex, France
By telephoning the reception: +33 1 60 87 84 00
By fax: +33 1 60 87 84 85
E-mail: ivo.gut@tcng.fr

1990 chemistry at the University of Basel (CH) and obtained a PhD from the University of Basel
1990-1996 post-docs at the Harvard Medical School in Boston (MA, USA) and the Imperial Cancer
Research Fund in London (UK)
1996 joined the department of Hans Lehrach at the Max-Planck-Institute of Molecular Genetics in Berlin (D) as
a team leader.
1999 moved to the CNG and took up the position as head of technology development.

PUBLICATIONS

Vionnet, N., Tregouet, D., Kazeem, G., Gut, I., Groop, P-H., Tarnow, L., Parving, H-H., Hadjadj, S.,
Forsblom, C., Farrall, M., Gauguier, D., Cox, R., Matsuda, F., Heath, S., Thevard, A., Rousseau, R.,
Cambien, F., Marre, M., Lathrop, M, Analysis of 14 Candidate Genes for Diabetic Nephropathy on
Chromosome 3q in European Populations. Diabetes, 2006, In press.

Wahlberg, P., Strömstedt, L., Tordoir, X., Foglio, M., Heath, S., Lechner, D., Hellström, A.R., Tixier-
Boichard, M., Lathrop, M., G. Gut I.G., and Andersson L., A high-resolution linkage map for the Z
chromosome in chicken reveals hot spots for recombination. Cytogenetic and Genome Research,
2006, In press.

Tost, J. and Gut, I.G., DNA analysis by mass spectrometry-past, present and future. *J Mass Spectrom*, 2006, 41(8): p. 981-95.

- Tost, J., El abdalaoui, H. and Gut, I.G., Serial pyrosequencing for quantitative DNA methylation analysis. 2006. *Biotechniques*, 2006, 40(6): p. 721-2, 724, 726.
- Tost, J., Jammes, H., Dupont, J.M., Buffat, C., Robert, B., Mignot, T.M., Mondon, F., Carbonne, B., Simeoni, U., Grange, G., Kerjean, A., Ferre, F., Gut, I.G. and Vaiman, D., Non-random, individual-specific methylation profiles are present at the sixth CTCF binding site in the human H19/IGF2 imprinting control region. *Nucleic Acids Res*, 2006. [[Free full text at Nucleic Acids Research](#)]
- Giancola, S., McKhann, H.I., Berard, A., Camilleri, C., Durand, S., Libeau, P., Roux, F., Reboud, X., Gut, I.G. and Brunel, D., Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploid plants. *Theor Appl Genet*, 2006: p. 1-10.
- Mauger, F., Jaunay, O., Chamblain, V., Reichert, F., Bauer, K., Gut, I.G. and Gelfand, D.H., SNP genotyping using alkali cleavage of RNA/DNA chimeras and MALDI time-of-flight mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(3): p. e18. [[Free full text at Nucleic Acids Research](#)]
- Gut, I., Mass spectrometry for high-throughput genotyping. *Guide to mutation detection* edited by G.R. Taylor and I.N. Day. John Wiley & sons, 2005, (ISBN 0-471-234444-3): p. 117-122.
- Tost, J. and Gut, I. G., Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem*, 2005. 38 (4): p. 335-50.
- Windsor, L., Puschendorf, M., Allcock, R., Scott, A., Sayer, D., Kucharzak, R., Gut, I., McCann, V., Davis, E., Witt, C., Christiansen, F. and Price, P., Does a central MHC gene in

linkage disequilibrium with HLA-DRB1*0401 affect susceptibility to type 1 diabetes? *Genes Immun*, 2005. 6(4): p. 298-304.

- Rakyán, V.K., Hildmann, T., Novik, K.L., Lewin, J., Tost, J., Cox, A.V., Andrews, T.D., Howe, K.L., Otto, T., Olek, A., Fischer, J., Gut, I.G., Berlin, K. and Beck, S., DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biol*, 2004. 2 (12): p. e405.
- Eckhardt, F., Beck, S., Gut, I.G. and Berlin, K., Future potential of the Human Epigenome Project. *Expert Rev Mol Diagn*, 2004. 4 (5): p. 609-18.
- I.G. Gut and G.M. Lathrop "Duplicating SNPs", *Nature Genetics*, 36, 789-790, 2004
- Gut, I.G., An overview of genotyping and single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Molecular Analysis and Genome Discovery*, 2004: p. 43-69.
- Tost, J. and Gut, I.G., Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms by Mass Spectrometry. *Advances in Mass Spectrometry*, 2004, 16: p. 123 -143.
- Tost, J., Kucharczyk, R., Lechner, D. and Gut, I.G., The GOOD Assay: A purification free assay for genotyping by MALDI mass spectrometry. *PCR Technology, Current Innovations*, 2004: p. 121-130.
- J.-M. Dupont, J. Tost, H. Jammes, and I.G. Gut "De novo quantitative bisulphite sequencing using the Pyrosequencing technology ". *Anal Biochem*, 2004. 333(1): p. 119-27.
- R.J.N. Allcock, L. Windsor, S. Baltic, I.G. Gut, R. Kucharczyk, L. Sobre, D. Lechner, F. Christiansen, and P. Price "High-density SNP genotyping in the central MHC defines less than 20 common haplotypes of the TNF block: Implications for haplotype-tagging the TNF block". *Hum Mutat*, 2004. 24(6): p. 517-25.

- H.I. KcKhann, C. Camilleri, A. Bérard, T. Bataillon, J.L. David, X. Reboud, V. Le Corre, C. Caloustian, I.G. Gut, and D Brunel “Nested core collections maximizing genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*”, *The Plant Journal*, 38, 193-202, 2004
- J. Tost, J. Dunker, and I.G. Gut “Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing”, *BioTechniques*, 35, 152-156, 2003
- S. Sauer and I.G. Gut “Extension of the GOOD assay for genotyping single nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry”, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 17, 1265-1272, 2003
- J. Tost, P. Schatz, M. Schuster, K. Berlin, and I.G. Gut “Analysis and accurate quantification of CpG methylation by MALDI mass spectrometry”, *Nucleic Acids Research*, 31, e50, 2003
- J. Tost, O. Brandt, F. Boussicault, D. Derbala, C. Caloustian, D. Lechner and I.G. Gut, “Molecular haplotyping at high throughput”, *Nucleic Acids Research*, 30, e96, 2002
- Tost, J., Gut, I.G., *Genotyping single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry*. *Mass Spectrom Rev*, 2002. 21 : p. 388-418.
- Tost, J., Kucharzak, R., Lechner, D., Gut, I.G., The GOOD Assay: A purification free assay for genotyping by MALDI mass spectrometry, *CRC PCR Technology - Current Innovations. Molecular Biology*, 2002.
- S. Sauer, D.H. Gelfand, F. Boussicault, K. Bauer, F. Reichert and I.G. Gut “Facile method for automated genotyping of single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry”, *Nucleic Acids Research*, 30, e22, 2002
- I.G. Gut “Pharmakogenetik und Massenspektrometrie”, *Medizinische Genetik*, 13, 281-284, 2001

- G.M. Lathrop, C. Julier, F. Matsuda, I. Gut, and M. Durand “La génomique et les maladies”, Biofutur, 206, 2000
- S. Sauer, D. Lechner, K. Berlin, C. Plançon, A. Heuermann, H. Lehrach, and I.G. Gut “ Full flexibility genotyping of single nucleotide polymorphisms by the GOOD assay”, Nucleic Acids Research, methods online, 28, e100, 2000
- S. Sauer, D. Lechner, K. Berlin, H. Lehrach, J.-L. Escary, N. Fox, and I.G. Gut “ A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms”, Nucleic Acids Research, methods online, 28, e13, 2000
- K. Berlin and I.G. Gut “Analysis of negatively ‘charge tagged’ DNA by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 13, 1739-1743, 1999
- I.G. Gut “Depurination of DNA and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry”, International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 169/170, 313-322, 1997
- I.G. Gut, W.A. Jeffery, D.J.C. Pappin and S. Beck, “Analysis of DNA by “charge tagging” and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry”, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 11, 43-50, 1997
- S. Beck, S. Abdulla, R.P. Alderton, R.J. Glynn, I.G. Gut, L.K. Hosking, A. Jackson, A. Kelly, P. Sanseau, E. Radley, K.L. Thorpe, and J. Trowsdale “ Evolutionary dynamics of non-coding sequences within the class II region of the human MHC”, Journal of Molecular Biology, 256, 1-13, 1996
- I.G. Gut, P.D. Wood and R.W. Redmond "Interaction of triplet photosensitizers with nucleotides and DNA in aqueous solution at room temperature", Journal of the American Chemical Society, 118, 2366-2373, 1996

- S. Abdulla, R.P. Alderton, R.J. Glynn, I.G. Gut, L.K. Hosking, A. Jackson, A. Kelly, W.R. Newell, E. Radley, P. Sanseau, K.L. Thorpe, J. Trowsdale and S. Beck, "DNA sequencing of the MHC class II region and the chromosome 6 sequencing effort at the Sanger centre", *DNA Sequence*, 7(1), 5-7, 1997
- I.G. Gut, "Whose genes are they and how can we identify them ? *Science*, 274, 904 (letter) , 1996
- I.G. Gut and S. Beck, "A procedure for selective alkylation of DNA and detection by mass spectrometry", *Nucleic Acids Research*, 23, 1367-1373, 1995
- I.G. Gut and J. Wirz, "3H-Indole", *Angewandte Chemie, Int. Ed. Engl.*, 33, 1153-1156, German Ed., 106, 1240-1243, 1994
- G. Lin, I. Gut, S. Lee, T.J. Flotte and A.G. Doukas, "Approaches to measuring linear and non-linear acoustic properties of biological material", *Proceedings of the SPIE meeting, Los Angeles*, vol. 2134A, 171-178, 1994
- I.G. Gut, R. Farmer, R.C. Huang and I.E. Kochevar, "Upper excited state photochemistry of DNA", *Photochemistry and Photobiology*, 58, 313-317, 1993
- I.G. Gut, Y. Hefetz, I.E. Kochevar and F. Hillenkamp, "The two-photon absorption cross-sections of guanosine 5'monophosphate, uridine 5'monophosphate and DNA at 532 nm", *Journal of Physical Chemistry*, 97, 5171-5176, 1993
- I.G. Gut and I.E. Kochevar, "Upper excited state photochemistry of DNA and nucleotides", *Proceedings of the SPIE meeting in Los Angeles, CA, January 19-24, invited paper*, vol. 1646, 207-212, 1992
- J. Bernhardt, M.R. Tschudi, Y. Dohi, I. Gut, B. Urwyler, F.R. Bühler and T.F. Lüscher, "Release of nitric oxide from human vascular smooth muscle cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 180, 907-914, 1991

- I. Gut and R. Hochstrasser, "Topics in physical chemistry at the XIIth IUPAC Symposium on Photochemistry, Bologna, July 17-22, 1988" EPA Newsletter, 34, 57-58, 1988
- M. Capponi, I. Gut and J. Wirz, "The phenol-2,4-cyclohexadienone equilibrium in aqueous solution", Angewandte Chemie, 98, 358-359, Int. Ed. Engl., 25, 344-345, 1986

REVIEWS

- J. Tost and I.G. Gut, "Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications", Clinical Biochemistry, 38, 335-350, 2005
- F. Eckhardt, S. Beck, I.G. Gut, and K. Berlin, "Future potential of the human epigenome project" Expert Review of Molecular Diagnostics 4, 609-618, 2004
- J. Tost and I.G. Gut, "Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms by Mass Spectrometry" International Journal of Mass Spectrometry, 2004, in press
- I.G. Gut, "DNA Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry", Human Mutation, 23, 437-441, 2004
- D. Lechner, G.M. Lathrop, and I.G. Gut, "Large-scale genotyping by mass spectrometry: experience, advances and obstacles", Current Opinion in Chemical Biology, 6, 31-38, 2002
- S. Sauer and I.G. Gut, "Genotyping SNPs by MALDI Mass Spectrometry", Journal of Chromatography B, 782, 73-87, 2002
- J. Tost and I.G. Gut, "Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms by Mass Spectrometry", Mass Spectrometry Reviews, 21, 388-418, 2002
- I.G. Gut, "Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms", Human Mutation 17(6), 475-492, June 2001

BOOK CHAPTERS

- R. Kucharak and I.G. Gut, Genotyping Methods and Disease Gene Identification, John Wiley & sons, 2005, in press
- I.G. Gut, "Mass spectrometry for high-throughput genotyping", in "Guide to mutation detection" edited by G.R. Taylor and I.N. Day, John Wiley & sons, ISBN 0-471-234444-3, 117-122, 2005
- I.G. Gut, "An overview of genotyping and single nucleotide polymorphisms (SNPs)" in "Molecular Analysis and Genome Discovery" edited by R. Rapley and S. Harbron, Wiley, Chichester, UK, ISBN 0-471-49919-6, 43-69, 2004
- J. Tost, R. Kucharak, D. Lechner, and I.G. Gut, "The GOOD Assay: A purification free assay for genotyping by MALDI mass spectrometry" in "PCR Technology, Current Innovations", edited by T. Weissensteiner, A.M. Griffin, and H.G. Griffin, CRC Press, London, UK, ISBN 0-8493-1184-5, 121-130, 2004
- S. Sauer, D. Lechner and I.G. Gut, "The GOOD Assay", "Mass Spectrometry and Genomic Analysis" edited by J.N. Housby, Kluwer Academic Publishers, London, UK, ISBN 0-7923-7173-9, 50-65, 2001
- I.G. Gut and S. Beck, "Mass Spectrometry in Molecular Biology", "Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends, Part 1" edited by A.M. Griffin and H.G. Griffin, Horizon Scientific Press, Wyomondham, UK, ISBN 1-898486-01-8, 147-157, 1995

PATENTS

- I.G. Gut and S. Beck, "Method for DNA analysis", PCT WO 96/27681, US Patent 6,268,129, 12. March 1995

- I.G. Gut and J. Franzen, "Verfahren zur Vorbereitung von Biomaterialproben für die massenspektrometrische Analyse von Genmerkmalen", patent application Juli 1996, withdrawn
- I.G. Gut and J. Franzen, "Zwei-Schritt-Verfahren der DNA-Amplifikation für MALDI TOF Messungen", patent application DE 19710166, "Two-step method of DNA amplification for MALDI-TOF measurement", UK patent application GB 2325002, US Patent 6,303,298, 12. March 1997
- T. Dittmann, I.G. Gut, A. Heuermann, and Alex Olek, "Verfahren zur Entnahme von biologischen Proben", patent application PCT WO 99/12475, 11. September 1997, US Patent 6,659,338
- I.G. Gut, K. Berlin and H. Lehrach, "Verfahren zur Identifikation von DNA mit MALDI", patent application PCT WO 99/29898, 5. Dezember 1997, European Patent 1036202
- I.G. Gut, K. Berlin and H. Lehrach, "Verfahren zur Identifikation von DNA mit ESI", patent application PCT WO 99/29897, 5. Dezember 1997
- I.G. Gut, K. Berlin, D. Lechner, and H. Lehrach, "Verfahren zur Mutationsdetektion mittels Massenspektrometrie", and "Mutation analysis using mass spectrometry", patent application GB 2339279, 29. Mai 1998, US Patent 6,503,710
- A. Heuermann and I.G. Gut, "Method and device for preparing biological samples for DNA analysis", patent application DE 19954840, PCT WO 01/35069, 9. November 1999
- I.G. Gut and K. Berlin, "Method for analysing DNA sequences", patent application DE 19963536, PCT WO 01/46460, 20. December 1999
- A. Heuermann, H. Winkeler and I.G. Gut, "Vorrichtung zur automatisierten Ordnung, Erfassung und Einlagerung von Reaktionsbehältern", patent application EP1136825, 13. March 2000

- I.G. Gut and K. Berlin, "Verfahren zur hochparallelen Analyse von Polymorphismen", and "Method for the highly parallel analysis of polymorphisms", patent application DE 10021204, PCT WO 01/81620, 25. April 2000
- J. Hager and I.G. Gut, "Identification of genetic markers", patent application PCT WO 01/83813, 2. May 2000
- I.G. Gut, D. Lechner and S. Sauer, "Procedure for sample preparation for genotyping by mass spectrometry", patent application EP 1170379, PCT WO 02/00931, 30. June 2000
- K. Berlin and I.G. Gut, "Verfahren zur hochparallelen Analyse von Polymorphismen" and "Method for the highly-parallel analysis of polymorphisms", patent application PCT WO 01/98527, 19. June 2000
- I.G. Gut and D. Lechner, "Method for haplotyping by mass spectrometry", patent application EP 1176212, PCT WO 02/08462, 24. July 2000
- A. Heuermann and I.G. Gut, "Vorrichtung zur Aufbereitung biologischer Proben für die DNA-Analyse", DE 19954840 and "Method and device for preparing biological samples for DNA analysis", PCT WO 01/35069, publication 17. May 2001
- I.G. Gut, N.P. Christian, and D. Malinge, "Thermal cycle device for amplification of nucleic acid sequences", patent application April 2001, withdrawn
- I.G. Gut "Method for protein analysis", patent application, 12. December 2001
- I.G. Gut and F. Mauger, "Method for detection of mutations in DNA", patent application 2. July 2003
- I.G. Gut and R. Kucharzak, "Method for HLA typing", patent application 27. November 2003

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล(ภาษาไทย) นาย เกรียงศักดิ์ ฤชศาสตร์
(ภาษาอังกฤษ) Kriangsak Ruchusatsawat Ph.Dcandidate (Biomedical Sciences)

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
3529900312015

3. ตำแหน่งปัจจุบัน(อาจารย์, ผศ., รศ., ศ.)
นักเทคนิคการแพทย์ 7

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข
88/7 ซ. รพ. บำราชนราทร ถ.ติวานนท์
จังหวัด นนทบุรี รหัสไปรษณีย์ 11000
โทรศัพท์ 0-25899850 โทรสาร 0-25899850
e-mail : ruchusatsawat@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ	วุฒิการศึกษา	สถานศึกษา	ประเทศ
2526-2530	วท.บ (เทคนิคการแพทย์)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2539-2543	วท.ม (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยมหิดล	ไทย
2547-ปัจจุบัน	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเวชศาสตร์)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)ระบุนสาขาวิชาการ
Immunology

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

4.4 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

5.5 หัวหน้าโครงการวิจัย

-

6.6 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Ruchusatsawat K., Molita K., Tanaka M., Vongcheree S., *et al.* 1994, Daily Observation of Antibody Levels Among Dengue Patients Detected by Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA), *Jpn. J. Trop. Med. Hyp*;22(1): 9-12.
- Wichakchida P., Vachatimanont P., Ruchusatsawat K. and Wattanasri N. 2000. Anti- HAV antibody of Children patient in Chainat Hospital . *Bull Dept Med Sci.*, 43(2);128-33.
- Ruchusatsawat K., Beuthong A., Ajawatanawong P. and Wattanasri N. 2002. Genotypic Analysis of hepatitis G (GBV-C/HGV) Virus among Intravenous Drug Users at Thanyarak Hospital, Thailand 1999-2000. *Bull Dept. Med Sci*; 43(4): 5-9.
- Wattanasri N., Ruchusatsawat K. and Wattanasri S. 2005. Phylogenetic analysis of hepatitis A virus in Thailand. *J Med Virol*; 75: 1-7.
- [Ruchusatsawat K](#), [Wongpiyabovorn J](#), [Shuangshoti S](#), [Hirankarn N](#), [Mutirangura A](#). 2006. SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis. *J Mol Med Feb*; 84(2):175-82.
- งานวิจัยที่กำลังทำ

ความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกับการเกิดโรคสะเก็ดเงินในประชากรไทย(ทุน
งบประมาณแผ่นดิน)

ขณะนี้ดำเนินการไปแล้วประมาณ 70% และจะเสร็จสมบูรณ์ในเดือนเมษายน 2550