การแสดงออกของยีนของ IFN-γ - INDUCING FACTOR (IL-18), RANTES และ MIP-1α ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีเปรียบเทียบกับคนปกติที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

นายสมนึก พลาบดีวัฒน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-233-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19336275

GENE EXPRESSION OF IFN-γ - INDUCING FACTOR (IL-18), RANTES AND MIP-1 α IN HIV POSITIVE PATIENTS AS COMPARED TO HIV SERONEGATIVE INDIVIDUALS

Mr. Somnuek Palabodeewat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-331-233-1

Thesis Title	Gene Expression of IFN-γ - inducing factor (IL-18), RANTES and MIP-1α in HIV positive patients as compared to HIV seronegative individuals
By	Mr. Somnuek Palabodeewat
Inter-Department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.

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

.....Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Instructor Thaweesak Tirawatnapong, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.)

.....Member

(Instructor Wacharee Limpanasitthikul, Ph.D.)

นายสมนึก พลาบดีวัฒน: การแสดงออกของยีนของ IFN-γ-inducing factor (IL-18), RANTES และ MIP-1α ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวีเปรียบเทียบกับคนปกติที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี อ.ที่ปรึกษา: ผศ.นพ. เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม, 47 หน้า. ISBN 974-331-233-1.

IL-18 เป็น cytokine ที่มีฤทธิ์สูงเมื่อออกฤทธิ์ร่วมกับ IL-12 ในการกระตุ้นการสร้าง IFN-γ และมีรายงานพบว่าในหลอดทดลอง IL-18 มีฤทธิ์กระตุ้นการแบ่งตัวของเชื้อเอชไอวีใน monocytic cell line ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาบทบาทแท้จริงของ IL-18 ในพยาธิกำเนิดและทางคลินิกในโรคเอดส์ RANTES และ MIP-1α เป็น β-chemokines ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสเอชไอวีชนิด CCR-5 tropic และพบว่าการกลายพันธุ์ของยีน CCR-5 และระดับของ β-chemokines มีบทบาทในการชลอการดำเนินโรคของโรคเอดส์ การศึกษาครั้งนี้เพื่อทราบถึงอัตราการแสดงออกของยีน IL-18, RANTES และ MIP-1α ในเม็ดเลือดขาว peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี กับคนปกติที่ไม่ติดเชื้อ

ประชากรตัวอย่างประกอบด้วยอาสาสมัครที่เป็นผู้ติดเชื้อเอชไอวี 30 ราย ที่ยังไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัสเอดส์ หรือยากดภูมิคุ้มกันใดๆมาก่อน และมารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทั้งนี้โดยมีผู้ติดเชื้อจำนวนเท่า ๆ กัน ที่มี CD4+ T cell count มากกว่าหรือเท่ากับ และน้อยกว่า 200 เซลล์ต่อลบ.มม. ส่วนกลุ่มเปรียบเทียบได้แก่ ผู้บริจาคโลหิตที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวีที่ธนาคารเลือด สภากาชาดไทย จำนวน 15 ราย เลือดตัวอย่าง (heparinized whole blood) จากอาสาสมัคร ได้รับการแยกเม็ดเลือดขาวชนิด PBMCs โดยวิธี Ficoll–Hypague gradient และทำการสกัด RNA และนำไปตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน IL-18, RANTES และ MIP-1α รวมทั้ง β-actin ซึ่งเป็น housekeeping gene โดยวิธี RT-PCR

ผลการศึกษาพบว่า สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน RANTES และ MIP-1α ใน PBMCs ของอาสาสมัครทุกรายทั้งผู้ติดเชื้อเอชไอวี และอาสาสมัครปกติที่ไม่ติดเชื้อ และเกือบทุกราย (14 ใน 15 ราย ในอาสาสมัครปกติที่ไม่ติดเชื้อ, 14 ใน 15 รายในผู้ติดเชื้อเอชไอวี ที่มี CD4+ T cell count ต่ำกว่า 200 เซลล์ต่อลบ.มม. และทุกรายในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มี CD4+ T cell count ≥ 200 เซลล์ต่อลบ.มม.)ของอาสาสมัครตรวจพบว่ามีการแสดงออกของยีน IL-18 ใน PBMCs โดยสรุปไม่มีความแตกต่างกันในอัตราการแสดงออกของยีน IL-18,RANTES และMIP-1α ใน PBMCsในผู้ติดเชื้อเอชไอวีไม่ว่าจะมีค่า CD4+ T cell count มากหรือน้อยกว่า 200 เซลล์ต่อลบ.มม. กับคนปกติที่ไม่ติดเชื้อ และการศึกษานี้ถือเป็นรายงานแรกที่พบว่ามีการแสดงออกของยีน IL-18 ใน PBMCs ของคนปกติที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี และของผู้ป่วยเอดส์ในระยะต่าง ๆ โดยไม่มีความสัมพันธ์กับค่าของ CD4 counts เนื่องจากในการศึกษานี้วิธีตรวจหา mRNA โดย RT-PCR เป็นวิธี qualitative assay ในกรณีที่มีการแสดงออกของยีนเกือบทุกรายเช่นนี้ การศึกษาต่อไปควรใช้วิธี quantitative RT-PCR อาจทำให้สามารถแยกความแตกต่างของปริมาณของการแสดงออกของยีนเหล่านี้ระหว่างผู้ติดเชื้อและผู้ไม่ติดเชื้อเอชไอวีได้

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C845649 : : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: : HIV/IL-18/RANTES/MIP-1α /RT-PCR

SOMNUEK PALABODEEWAT : GENE EXPRESSION OF IFN - γ - INDUCING FACTOR (IL-18), RANTES AND MIP-1α IN HIV POSITIVE PATIENTS AS COMPARED TO HIV SERONEGATIVE INDIVIDUALS. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. KIAT RUXRUNGTHAM, M.D. 47 pp. ISBN 974-331-233-1.

IL-18, a potent co-stimulator of IL-12 in inducing IFN-γ production, has been shown to enhance HIV replication *in vitro*. However, there is no clinical data of whether IL-18 is dysregulated in patients infected with HIV-1. The roles of β-chemokines, RANTES and MIP-1α, in blocking CCR-5 tropic virus and may also contribute in delayed disease progression have been recently reported. This study is to investigate the gene expression of IL-18, RANTES and MIP-1α in PBMCs of HIV-1 infected patients as compared to HIV seronegative healthy donors.

Heparinized peripheral blood samples were obtained from 30 HIV-1-infected patients (1:1 of CD4+ T cell count $<$ and $\geq$ 200 cells/mm^3) with no active opportunistic infection and without previous antiretroviral and immunosuppressive treatments, and 15 HIV seronegative blood donors at Chulalongkorn hospital and Thai Red Cross National Blood Bank, respectively. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from the blood samples by Ficoll-Hypaque gradient. RNA were extracted from PBMCs and then subjected for RT-PCR with specific primers of IL-18, RANTES and MIP-1α. β-actin RT-PCR was included as a housekeeping gene control.

It was revealed that RANTES and MIP-1α mRNA were detected in PBMCs from all of the subjects either HIV-seropositive or seronegative. Almost all, i.e., 14 of 15 in group A (HIV seronegative blood donors), all of group B (HIV-infected with CD4+ T cell count $\geq$ 200 cells/mm^3) and 14 of 15 in group C (HIV-infected with CD4+ T cell count $<$200 cells/mm^3) showed mRNA expression of IL-18 in their PBMCs.

This is the first report to show that IL-18, as similar to RANTES and MIP-1α, was constitutively expressed in PBMCs from both of HIV seronegative and seropositive individuals. The proportion of IL-18 mRNA expression was not statistically different in the advanced as compared to the less advanced HIV-infected patients. This finding may indicate the essential roles as well as the redundancy of these cytokine and chemokines in the immune system, and therefore were preserved even in advanced HIV infection. Nevertheless, as the RT-PCR used in this study was a qualitative method, for more precise comparative analysis, quantitative RT-PCR assay should be used for the further study. The clear-cut roles of IL-18 both in physiologic state and in HIV infection required further investigation.

ภาควิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENTS

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

Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D., the lecturer of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the advisor, for his excellent and invaluable advice, indispensable help, constructive criticism and encouragement throughout the period of this study.

Dr. Yamakasu Ohmoto, Cellular Technology Institute, Otsuka Pharmaceutical Ltd., Japan, for providing the primer sequences and the PCR protocol.

Dr.Vanicha Rumsaeng, M.D., the lecturer of the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for providing the IL-18 primers.

All the staffs of HIV-NAT, AIDS Research Center, Thai Red Cross Society, and those of Anonymous Clinic for their kind help in collecting the blood specimens and providing the clinical data.

Sincere thanks are also given to all staffs in the Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine and in the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their help.

Finally, the investigator is deeply indepted to his advisory committee for their kindness and helpful suggestion for the completeness of this thesis and to his family for their understanding and support during his study period.

CONTENTS

	Page
Thai abstract	iv
English abstract	v
Acknowledgement	vi
Contents	vii
List of tables	ix
List of figures	x
Abbreviations	xi
Chapter	
I Introduction	1
II Literature Reviews	4
Overview	4
The IL-18 discovery	5
Molecular characterization of IL-18	6
IL-18 and IL-12 in synergy and differences	6
Role of IL-18 and IL-12 in pathogenesis	8
Other IL-18 related proinflammatory cytokines	8
Monocyte/Macrophages-tissue factor/cytokines dysregulation in HIV infection	9
Th1 and Th2 cytokines in HIV infection	10
The chemokine receptors and HIV entries	11
Chemokines and HIV infection	12
Monocyte/Macrophages and HIV pathogenesis and cellular tropism	13
III Materials and Methods	16
Subjects	16
Study sites	17

Page

Sample size 17

Sample specimens 18

RNA extraction from PBMC pellet by guanidine thiocyanate/phenol/ chloroform extraction 18

cDNA synthesis 19

Polymerase chain reaction 19

Amplified products analysis 20

Statistical analysis 21

IV Results 22

1) CD4+ T cell counts in HIV seropositive patients 22

2) RT-PCR assay validation 22

3) RT-PCR results 23

3.1 HIV seronegative individuals (group A) 23

3.2 HIV-infected asymptomatic patients with CD4 counts ≥ 200 cellls/μl (group B) 24

3.3 HIV-infected asymptomatic patients with CD4 counts < 200 cellls/μl (group C) 25

4) Comparative analysis 26

V Discussion 27

VI Conclusion 29

References 30

Appendix I 40

Appendix II 41

Appendix III 42

Appendix IV 43

Appendix V 45

Biography 47

LIST OF TABLES

Table **Page**

1. CD4+ T cell counts of HIV infected patients at the enrollment 22

2. Numbers of subjects with cytokine/chemokines gene expression in PBMCs samples 26

3. Primers for specific cytokine/chemokines and β-actin amplification 41

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Linearity of amplification testing for β-actin, IL-18, MIP-1α and RANTES.....	23
2.	Results of cytokine/chemokines RT-PCR from unstimulated PBMC of 15 HIV seronegative donors.....	23,24
3.	Results of cytokine/chemokines RT-PCR from unstimulated PBMC of 15 HIV infected individuals with CD4+ T cell counts ≥ 200 cells/μl.....	24,25
4.	Results of cytokine/chemokines RT-PCR from unstimulated PBMC of 15 HIV infected patients with CD4+ T cell counts < 200 cells/μl.....	25,26

ABBREVIATIONS

AIDS	=	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ARC	=	AIDS related complex
bp	=	base pair
^{o}C	=	Degree celcius
CC chemokine	=	beta-chemokine
CCR-5	=	beta-chemokine receptor 5
CD	=	Cluster of Differentation
CDC	=	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
CTL	=	Cytotoxic T lymphocyte
CXC chemokine	=	alpha chemokine
DDW	=	Deionized distilled water
DEPC-H_2O	=	Diethyl pyrocarbonate treated water
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxyribonucleotide triphosphates
DTH	=	Delayed-typed hypersensitivity
DW	=	Distilled water
env	=	envelopes
et al.	=	et alii
FACS	=	fluorescence activated cell sorter
FHLN	=	lymph node with follicular hyperplasia
g	=	gram
gp	=	glycoprotein
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
ICE	=	IL-1β converting emzyme
IFN-γ	=	interferon gamma

IGIF	=	interferon gamma inducing factor
Ig	=	Immunoglobulin
LESTR	=	leukocyte-expressed seven-transmembrane-domain receptor
IL	=	Interleukin
IL-1	=	Interleukin-1 beta
IL-1R	=	IL-1 receptor
IL-1Rrp	=	IL-1 receptor related protein
kDa	=	kilodalton
LPS	=	Lipopolysaccharide
LTR	=	long terminal repeat
LTNP	=	long term nonprogressor
M	=	Molar
MDM	=	monocyte-derived macrophages
µg/ml	=	microgram per milliliter
$MgCl_2$	=	Magnesium chloride
mg/l	=	milligram per liter
min	=	minute
MIP-1α	=	Macrophage inflammatory protein-1 alpha
MIP-1β	=	Macrophage inflammatory protein-1 beta
µl	=	microliter
ml	=	milliliter
mm^3	=	cubic milliliter
MP	=	mononuclear phagocyte
M-tropic	=	macrophage tropic
NF-κB	=	nuclear factor kappa B
NK	=	natural killer
NRT	=	non-reverse transcribed
nm	=	nanometer

NSI	=	non-syncytium-inducing
p24	=	HIV core protein fragment
PBMC	=	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	=	Polymerase chain reaction
PHA	=	phytohemagglutinin
pI	=	Isoelectric point
PMA	=	phorbol 12-myristate 13-acetate
proIL-18	=	precursor polypeptide of IL-18
q	=	long arms of chromosome
RNA	=	Ribonucleic acid
rpm	=	round per minute
RT	=	Reverse transcriptase, Reverse transcription
T-cells	=	Thymus-derived lymphocytes
TF	=	Tissue factor
Th	=	T helper
TNF-α	=	Tumor necrosis factor-alpha
Tris	=	Tris - (hydroxymethyl) - aminoethane
T-tropic	=	T cell line tropic
UV	=	Ultraviolet