HIV-1 ENVELOPE GENE EVOLUTION IN ANTIRETROVIRAL DRUG RESISTANCE STRAINS

NIRACHA ATHIPANYASIL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)
FALCULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาวิวัฒนาการของยีน ENVELOPE ในเชื้อเอชไอวี-1 สายพันธุ์ดื้อยาต้านไวรัส (HIV-1 ENVELOPE GENE EVOLUTION IN ANTIRETROVIRAL DRUG RESISTANCE STRAINS)

นิรชา อธิปัญญาศิลป์ 4736621 SIMI/M
วท.ม.(จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: รวงผึ้ง สุทเธนทร์, M.D., Ph.D., วรรณี กัณฐกมาลากุล, Ph.D.,
สนทนา ศิริตันติกร, Dr.rer.nat.

บทคัดย่อ

การรักษาผู้ติดเชื้อเอชไอวี 1 ด้วยยาต้านไวรัสเพื่อลดปริมาณไวรัสในกระแสเลือด แต่การรักษาติดต่อกันเป็นระยะเวลานานส่งผลให้เกิดเชื้อเอชไอวี 1 ที่ดื้อต่อยาต้านไวรัสได้ นอกจากนี้มีรายงานว่ายีน *env* ของเชื้อเอชไอวี 1 มีความสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบต่อวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นในยีน*env* อันเนื่องมาจากการรักษาผู้ป่วยด้วยยาต้านไวรัสซึ่งทำให้ไวรัสเกิดการกลายพันธุ์ในยีน *pol*

ได้เก็บเลือดไม่แข็งตัวชนิดอีดีทีเอจากผู้ติดเชื้อเอชไอวี 1 ก่อนที่การรักษาด้วยยาต้านไวรัสและหลังจากการรักษาด้วยยาต้านไวรัสล้มเหลวจำนวน 5 ราย (CH, NA, TI, VI และ YU) มาตรวจหาตำแหน่งการกลายพันธุ์ของการดื้อยาบนยีน *pol* จากการศึกษาพบว่าตำแหน่งที่พบมากในผู้ติดเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม NRTI คือ D67N (40%), M184V (40%) และT215F/Y (60%) และตำแหน่งที่พบมากซึ่งเกี่ยวข้องกับการดื้อยาในกลุ่ม NNRTI คือ K103N (40%), V108I (40%) และ Y181C (40%)

ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อเอชไอวี 1 ส่วนยีน *pol* (RT) และ *env* (gp120) ในผู้ติดเชื้อทั้ง 5 รายพบว่าเป็นเชื้อเอชไอวี 1 สัปทัยป์ CRF01_AE (100%) และทำนาย N-linked glycosylation บนยีน *env* เพื่อเปรียบเทียบระหว่างไวรัสสายพันธุ์ที่ไม่ดื้อและสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาต้านไวรัสพบว่ามีจำนวน N-linked glycosylation เพิ่มขึ้นในสายพันธุ์ที่ดื้อยาต้านไวรัสจำนวน 3 ราย (CH,TIและYU) มี N-linked glycosylation ลดลงในสายพันธุ์ที่ดื้อยาต้านไวรัสจำนวน 1 ราย (VI) และพบผู้ติดเชื้อ 1 ราย (NA) ที่จำนวน N-linked glycosylation เท่ากันทั้งในสายพันธุ์ที่ดื้อยาและไม่ดื้อต่อยาต้านไวรัสแต่ตำแหน่งต่างกัน จากการวิเคราะห์การใช้ coreceptor โดยการทำนายกรดอะมิโนบริเวณ V3 พบว่ามีผู้ติดเชื้อจำนวน 4 ราย (CH,NA,TI และ VI) ที่ไวรัสใช้ coreceptor ชนิด CCR5 และมี 1 ราย(YU) ที่ไวรัสใช้ coreceptor ชนิด CXCR4

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงเส้นถูกนำมาใช้เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของ intrapatient genetic diversity ระหว่างยีน *pol* (RT) และยีน *env* (gp120) ในผู้ติดเชื้อทั้ง 5 รายพบว่า intrapatient genetic diversity ระหว่างยีน *pol* (RT) และยีน *env* (gp120) มีความสัมพันธ์แบบผกผัน (R=-0.766)

การศึกษาการทำงานของยีน *env* (gp120) ทำโดยนำ infectious molecular clones ของผู้ติดเชื้อ 2 ราย (NAและVI) มาเปรียบเทียบการสร้างแอนติเจน p24 ผลพบว่าค่าแอนติเจน p24 ที่สร้างจากไวรัสสายพันธุ์ที่ไม่ดื้อยาให้ค่าสูงกว่าสายพันธุ์ที่ดื้อยา ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงถึงผลของยาต้านไวรัสที่มีต่อวิวัฒนาการและการทำงานของยีน *env* ของเชื้อเอชไอวี ซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการติดตามการรักษาในผู้ป่วยและใช้ในการวางแผนการรักษาได้

124 หน้า

HIV-1 ENVELOPE GENE EVOLUTION IN ANTIRETROVIRAL DRUG RESISTANCE STRAINS

NIRACHA ATHIPANYASIL 4736621 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: RUENGPUNG SUTTHENT, M.D., Ph.D.,
WANNEE KANTAKAMALAKUL, Ph.D., SONTANA SIRITANTIKORN, Dr.rer.nat.

ABSTRACT

The aim of antiretroviral therapy is to treat HIV-1 infected individuals to reduce plasma viral load. However, prolonged treatment with antiretroviral drugs results in the selection of HIV-1 variants with resistance to antiretroviral drugs. Also, HIV-1 *env* gene was reported to be important for HIV-1 biological properties which are related to its pathogenesis. Therefore, this study aimed to study the effect of pressure from antiretroviral treatment which causes mutation in *pol* gene on *env* gene evolution.

The EDTA blood samples from 5 HIV-1 infected patients (CH, NA, TI, VI and YU), which were collected before and after antiretroviral drug failure, were used for detection of mutation in *pol* gene by genotyping assay. The most frequent of NRTI drug resistant codon mutations among these subjects were D67N (40%), M184V (40%) T215F/Y (60%) and NNRTI drug resistant codon mutations were K103N (40%), V108I (40%) and Y181C (40%).

Phylogenetic analysis of *pol* (RT) and *env* (gp120) genes of HIV-1 from 5 subjects showed that they all were HIV-1 CRF01_AE. The numbers of N-linked glycosylation sites from 5 subjects were predicted and compared between naïve and resistant strains. Additional sites of N-linked glycosylation were found in 3 subjects (CH, TI, and YU) and reductions in N-linked glycosylation were found in only 1 subject (VI). However, one subject (NA) which had the number of N-linked glycosylation sites before and after antiretroviral failure was equal but position of N-linked glycosylation sites were different. For analysis of coreceptor usage by V3 loop amino acid prediction, 4 of 5 subjects (CH, NA, TI and VI) had CCR5 coreceptor and the CXCR4 coreceptor usage was found only in YU.

Linear regression analysis was used to compare the relationship of intrapatient genetic diversity between *pol* (RT) and *env* (gp120) in 5 subjects (before and after antiretroviral drug failure). The linear regression analysis indicated that *pol* (RT) and *env* (gp120) had an inverse relationship (R=-0.766).

For the study of HIV-1 gp120 function, infectious HIV-1 molecular clones of viruses isolated from 2 subjects (NA and VI) were compared. The average p24 antigen production of the infectious virus from drug naïve clones gave higher in p24 antigen production than in drug resistant clones. These findings suggest the effect of antiretroviral drug treatment HIV-1 *env* gene evolution and its fitness might benefit from the monitoring of patients and designing treatment protocol.

KEYWORDS: HIV-1/ DRUG RESISTANT/CODON MUTATION/EVOLUTION

124 pp.