

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทูบงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2549

เรื่อง

- (ไทย) การศึกษายีนใหม่สองยีน PTGS2 และ PSEN2 ที่เกี่ยวข้องกับ การตายของทีลิมโฟไซต์ในผู้ป่วยลูปัส : บทบาทของการเปลี่ยนแปลง ลำดับเบสและการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมที่ไม่ได้เกิดจากการ เปลี่ยนแปลงลำดับเบส
- (อังกฤษ) The characterization of the two new genes, PTGS2 and PSN2 involving in the T lymphocyte apoptosis of lupus patients: Role of genetic polymorphism and epigenetic alteration

โดย

รศ.พญ.ดร.ณัฐฐิยา หิรัญกาญจน์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.ดร.ธนาภัทร ปาลกะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ.นพ.ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์

ภาควิชา อายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
นางสาวพิมเพอร์วีย์ สดใส

สหสาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PART 1

CORRELATION OF NOTCH1 RECEPTOR EXPRESSION IN T
LYMPHOCYTES FROM SLE PATIENTS WITH DISEASE
PROGRESSION

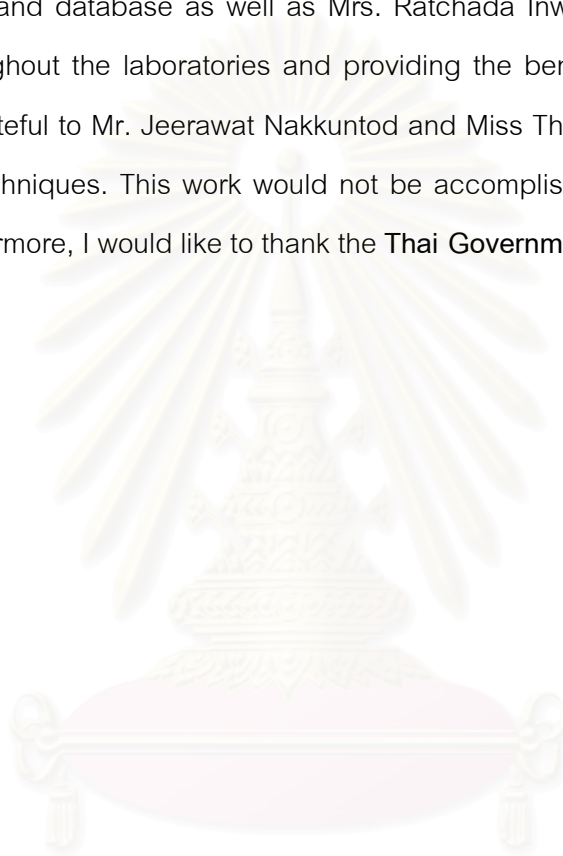


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเหตุ สำหรับยีน PSEN2 ที่สร้างเอ็นไซม์ชื่อ Presenilin นั้นมีข้อมูลเพิ่มเติมว่ากลุ่มยีน Notch ที่เป็น product ของเอ็นไซม์นี้น่าจะมีความสำคัญกับโรค SLE มากกว่าจึงได้เปลี่ยนการศึกษาจากยีน PSEN2 เป็นกลุ่มยีน Notch แทนโดยจะเน้นการศึกษาระดับการแสดงออกของ Notch ในเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วย SLE เป็นหลัก

Acknowledgements

We wished to express my thankfulness to all those who participated in the success of this thesis. We wished to thank Miss Chayanit Singkhaselit for collecting blood samples and database as well as Mrs. Ratchada Inwattana for her kindness in guidance throughout the laboratories and providing the beneficial instruments for this study. I am grateful to Mr. Jeerawat Nakkuntod and Miss Thitima Benjachat for helping in molecular techniques. This work would not be accomplished without their help and support. Furthermore, I would like to thank the **Thai Government Research Fund**.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

โรคเอส แอล อี เป็นต้นแบบของโรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตนเองโดยจะพบการสะสมของ immune complex ได้ตามเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกาย ในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดของโรคนี้ ความผิดปกติของ T lymphocyte เป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลให้การควบคุมเพื่อไม่ให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนของตนเองสูญเสียไป (loss of self-tolerance) อันจะนำไปสู่การสร้าง autoantibody ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเอส แอล อี สัญญาณ Notch เป็นวิถีสัญญาณที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมพัฒนาการของ T lymphocyte, ขบวนการกระตุ้นเซลล์ (activation), การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation), การแปรรูปของเซลล์ (differentiation) รวมถึงการทำงานของ T lymphocyte ด้วย โดยมีการศึกษามากมายที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของความผิดปกติของวิถีสัญญาณ Notch กับโรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตนเองหลายชนิด งานวิจัยนี้ทำการศึกษถึงความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน Notch1 ใน T lymphocyte กับ การดำเนินโรคเอส แอล อี โดยทำการศึกษาในผู้ป่วยเอส แอล อีจำนวน 22 คนและคนปกติ 11 คน จากผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *Notch1* ด้วยวิธี real-time RT-PCR ใน T lymphocyte ที่ผ่านการกระตุ้นด้วย PHA พบว่า ในผู้ป่วยเอส แอล อีที่มีอาการรุนแรง (active SLE) มีการแสดงออกของ *Notch1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.025$) ในขณะที่การแสดงออกของ *Notch1* ในผู้ป่วยเอส แอล อีที่มีอาการสงบ (inactive SLE) ไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ซึ่งก็ให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี conventional RT-PCR โดยพบว่าในผู้ป่วยเอส แอล อี มีการแสดงออกของ *Notch1* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.015$) เมื่อศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน Notch1 พบว่ามีการลดลงในผู้ป่วยเอส แอล อี ที่มีอาการรุนแรงโดยเปรียบเทียบกับคนปกติ ($p=0.001$) และผู้ป่วยเอส แอล อีที่มีอาการสงบ ($p=0.037$) สำหรับการแสดงออกของยีน *Hes-1* ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายของวิถีสัญญาณ Notch ไม่พบมีความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยเอส แอล อีกับคนปกติ นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนของเซลล์ของผู้ป่วยเอส แอล อี หลังการกระตุ้นแบบ in vitro ก็ไม่พบมีความปกติผิดเช่นกัน จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของยีน *Notch1* กับความรุนแรงของโรคเอส แอล อี มีทิศทางที่สวนกัน ดังนั้นความผิดปกติในการแสดงออกของโปรตีน Notch1 ใน T lymphocyte หลังถูกกระตุ้น อาจจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคเอส แอล อี

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a prototype of autoimmune disease characterized by tissue deposition of autoantibody immune complex formation. However, etiology of disease remains unclarified. Defects of T lymphocytes lead to loss of immunological tolerance and support autoantibody production suggested that they may consistently have a central role in pathogenesis of SLE. Notch signaling is an evolutionarily conserved pathway responsible for thymocyte development, activation, proliferation, differentiation and T cell functions. Several evidences suggest Notch signaling involvement in autoimmune disorders. The aim of this study was to investigate the correlation of Notch1 receptor expression in T lymphocytes with disease progression. Twenty-two Thai SLE patients and eleven healthy controls were recruited for the study. *Notch1* expression in PHA-stimulated T lymphocytes of SLE patients that indicated significantly defective regulation of *Notch1* in activated T lymphocytes of SLE patients with active stage ($p=0.025$) while stimulated T lymphocytes of SLE patients with inactive stage were indifferent expression of *Notch1* compared with healthy controls that quantified by real-time RT-PCR. It was confirmed by conventional RT-PCR that showed deceleration of Notch1 expression in SLE ($p=0.015$). As well as Notch1 protein expression, it was downregulated in active SLE compared to controls and inactive SLE ($p=0.001$ and 0.037 , respectively). However, *Hes1* that was target of Notch signaling did not reduce expression in SLE T lymphocytes. Moreover, proliferation capacity in SLE patients did not defect. These results showed converse correlation of Notch1 expression with severity of SLE. The data reveal the defective Notch1 in T cells that is possibly uncovered new factor of pathogenesis in SLE.

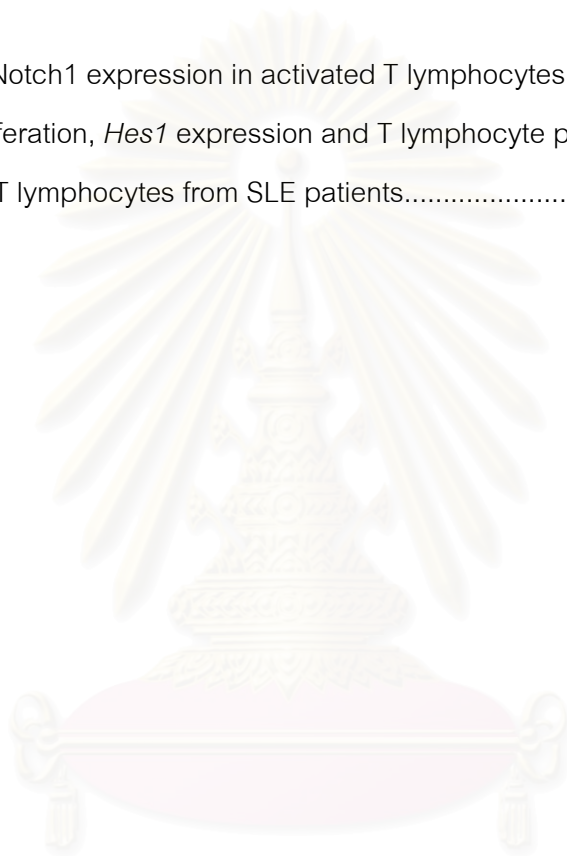
Contents

	Page
ACKNOWLEDGEMENTS.....	3
THAI ABSTRACT.....	4
ENGLISH ABSTRACT.....	5
CONTENTS.....	6
LIST OF FIGURES.....	7
ABBREVIATIONS.....	8
INTRODUCTION.....	11
MATERIALS AND METHODS.....	13
RESULTS.....	15
DISCUSSION.....	19
CONCLUSION.....	21
REFERENCES.....	22
APPENDIX.....	25
BIOGRAPHY.....	26

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of figures

Figure	Page
1 Decreased Notch1 expression in activated T lymphocytes from SLE patients	17
2 Normal proliferation, <i>Hes1</i> expression and T lymphocyte population profile in activated T lymphocytes from SLE patients.....	18



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abbreviations

ACR	American College of Rheumatology
ANA	anti-nuclear antibody
APC	antigen presenting cell
APS	ammonium persulfate
ARA	American Rheumatism Association
BAFF	B-cell activating factor
BILAG	British Isles Lupus Assessment Group
BSA	bovine serum albumin
°C	degree Celsius
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CMV	cytomegalovirus
Cox-2	cyclooxygenase-2
CpG	cytosine-guanine dinucleotide
cpm	count per minute
CSL	CSF-1/RBP-J κ for mammals, Suppressor of Hairless for <i>Drosophila</i> , and Lag-1 for <i>C.elegans</i>
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DC	dendritic cell
DILE	drug-induced lupus erythematosus
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphates
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr virus
ECLAM	European Consensus Lupus Activity Measurement
EDTA	ethylenedinitrilotetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FCGR	Fc gamma receptor

g	gram
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase
GN	glomerulonephritis
³ H-TdR	³ H-methyl-thymidine
Hes	Hairy enhancer of split
HRT	hormone-replacement therapy
HSC	hematopoietic stem cell
ICN	intracellular domain of Notch
ICs	immune complexes
IFN- γ	interferon- γ
Ig	immunoglobulin
IL	Interleukin
kDa	kilodalton
L	liter
LAI	Lupus Activity Index
μ g	microgram
μ l	microliter
M	molar
MHC	major histocompatibility complex
mg	milligram
ml	milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
ng	nanogram
PARP	poly-ADP-ribosyl transferase
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline tween
PDCD1	programmed cell death 1

PTH	parathyroid hormone
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
rpm	round per minute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
sFas	soluble Fas
SI	stimulation index
SLAM	Systemic Lupus Activity Measure
SLE	Systemic Lupus Erythematosus
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
TAE	Tris-acetate buffer
TCR	T cell receptor
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1
T _H	T helper
TLR	Toll-like receptor
Treg	regulatory T cell
U	unit

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder characterized by a wide spectrum of clinical manifestations. It is prominently characterized by abundant production of autoantibodies to autoantigens and deposition of immune complex in various tissues such as kidney, central nervous system and skin (1). Because of the nature of autoantibody production in this disease, hyperactivation of B lymphocytes are considered to play a central role in disease onset (2). In addition to B lymphocytes, evidences suggested the involvement of T lymphocytes in pathogenic events leading to flare up of the clinical conditions have been reported (3). Cytokines derived from T helper T lymphocytes have been implied in driving affinity maturation of immunoglobulin present in high levels of serum in SLE patients (4). Furthermore, defects in signaling molecules of TCR complex and co-stimulatory molecules have been reported in SLE (5). Although still controversial, the abnormalities in regulatory T cells with essential immune regulatory functions have also been reported in SLE (6-8). Therefore, T lymphocytes are considered to play an important role in etiology of SLE and knowledge on the defects of T lymphocytes may lead to a novel therapeutic intervention of autoimmune disorders, including SLE (5).

Notch signaling is an evolutionarily well conserved signaling pathway. It was first discovered and studied in *Drosophila melanogaster* as a neurogenic gene involved in cell fate decision during neuronal development (9). Extensive studies have uncovered and broadened its role in regulating differentiation, proliferation and apoptosis in wide spectrum of tissues, including cells in hematopoiesis. Notch signaling is initiated by interaction between Notch receptor and ligand on cell surface, leading to cleavage of Notch receptor by proteolytic enzymes and releasing an intracellular Notch from the cell surface (10). As the two nuclear localizing motifs it contains suggest, once activated, intracellular Notch translocates to nucleus and forms a transcriptional activator complex with a DNA-binding protein CSL. After recruitment of multiple transcriptional activators such as p300 and MAML, the complex drives expression of various target genes such as helix-loop-helix motif containing transcriptional repressor *Hes1*. Mammals have four

Notch receptors, *i.e.* Notch1-4, and five Notch ligands, *i.e.* jagged1-2, delta-like 1,3 and 4.

During development and differentiation of T lymphocytes, Notch signaling plays an essential role in governing T/B lineage decision, cell proliferation during γ -selection, influencing positive and negative selection and CD4/CD8 lineage choices (10). Notch signaling also regulates development and functions of T lymphocytes in the periphery during Th1/Th2 differentiation, and suppressive phase of regulatory T cells (11). These latter roles of Notch signaling remain controversial as conflicting evidences were reported. Notch signaling is shown to directly regulate expression of *IL-4* during differentiation of Th2, while it is shown to regulate *T-bet* expression and IFN- γ production during Th1 development (12-14). As for its role relevant to regulatory T cells, Notch has been implied in development of natural occurring regulatory T cells as overexpression of activated form of Notch3 enhanced generation of regulatory T cell development (15). In addition, overexpression of Notch ligands in APC led to development of antigen-specific regulatory T cell and Notch/Hes axis is reported be essential for suppressive functions of TGF- β ⁺ regulatory T cells (16, 17).

Defects in Notch signaling have been linked to several models of autoimmune disorders. Decreased Notch signaling using pharmacological approach protected animals from experimental autoimmune encephalomyelitis through downregulation of *T-bet* expression (14). Partial loss of presenilins, components of enzyme γ -secretase which responsible for Notch receptor processing upon ligand engagement, resulted in severe autoimmune disease phenotypes (18). In addition, presenilin2 is differentially expressed in human SLE T lymphocytes (19). In this study, we investigated the expression of Notch1 and one of its target genes, Hes1, in *in vitro* activated T lymphocytes from SLE patients. Upregulation of Notch1 was significantly decreased in active SLE patients, suggesting a role it plays during progression of SLE.

Methods

1. Patients and controls

Twenty-two patients with SLE, according to American College of Rheumatology classification criteria, were included in this study. According to the MEX-SLEDAI index, twelve of these patients were classified as active SLE (SLEDAI \leq 3) and ten patients were in an inactive stage (SLEDAI $<$ 3). Inactive SLE patients received low doses of prednisolone at \leq 10 milligrams per day within at least one month and patients with active SLE received low to intermediate doses of corticosteroids (2.5-25 milligrams of prednisolone with or without cellcept or imuran). Twenty-one of SLE patients were females and ages of all patients were in the range of 16 to 41 years old. Sex and age-matched 11 healthy volunteers were included as controls. This study has been approved by the Ethics Committee for Human Research of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and written informed consents were obtained from all subjects.(20)

2. Cells and cell cultures

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using Ficoll-Hypaque reagent (Sigma, St. Louis, MO). T lymphocytes were purified using positive selection strategy by magnetic beads (Miltenyi Biotech). Cells were cultured in RPMI1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT) and penicillin and streptomycin. For stimulation experiments, cells were stimulated with either PHA (10 μ g/ μ l) or plate bound anti-humanCD3 (clone UCHT1, 2.5 μ g/ μ l) for 72 hrs at 37 $^{\circ}$ C in 5% CO₂ condition.

3. Quantitative real time RT-PCR and conventional RT-PCR

A quantitative real time RT-PCR assay was developed for detection and quantification of *Notch1* and *Hes-1* transcripts using *β -actin* as endogenous control using total RNA isolated from cells treated as indicated using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies). Primers used in this study are as followed: Notch1 forward 5' CAGCCT GCACAACCAGACAGA3', Notch1 reverse 5'TGAGTTGATGAGGTCTCTCC AG3', Hes1 forward 5' ACCAACTGGGACGACATGGA GAA3', Hes1 reverse 5' GTG

GTGGTGAAGCTGTA GCC 3', β -actin forward 5' ACCAACTGGGACGACATGGAGAA 3', β -actin reverse 5' GTGGTGGTGAAGCTGTA GCC 3'. PCR amplification was performed with 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix with 0.5 μ M primers, 16 ng cDNA and nuclease-free water according to the manufacturer's protocol (Qiagen). The PCR conditions are as follows: 95°C for 15 min, 95°C for 15 sec, 55°C (*Notch1*) or 57°C (*Hes-1*) for 30 sec and 60°C for 30 sec, followed by repeating of 40 cycles. Levels of mRNA were measured by a Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). Levels of mRNA were expressed as threshold cycle (C_T) and used comparative C_T method for analysis. For relative quantification, expressions of *Notch1* and *Hes-1* as target genes were normalized by expression of β -actin relative to a calibrator. The amount of target was given by $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Expressions of *Notch1* and *Hes1* were confirmed by conventional RT-PCR. The PCR conditions are as follows: hot start 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C (for *Notch1* gene) or 60°C (for *GAPDH*) for 30 seconds, 72°C for 30 sec and final extension at 72°C for 10 min. Amplification was performed in Perkin Elmer/GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer). The PCR products were analyzed in 1.5 % Tris-acetate agarose gel.

4. Cell proliferation assay

Isolated T lymphocytes were stimulated with PHA for 72 hrs at 37°C in 5% CO₂ condition. Cells were pulsed with 1 μ Ci/ml of ³H-methyl-thymidine (3H-TdR) during the last 6 hrs of incubation. After incubation, cells were harvested and 3H-TdR incorporation were measured with a scintillation counter (Packard Instruments, Downers Grove, IL).

5. Western blot

Cells treated as indicated were harvested and cell lysates were prepared as described previously (13). Amounts of proteins were measured using BCA protein assay kit (Pierce; Rockford, IL). Cell lysates (30 μ g) were separated on 8% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis using Protein III system (Bio-Rad). After gel separation, proteins were transferred onto PVDF membrane (Amersham Biosciences) and blocked in PBS containing 3% nonfat dry milk and 0.05% Tween 20. Blots were

probed with rabbit anti-Notch1 Ab at 1:1000 dilution, rabbit anti-cleaved Notch1 Ab at 1:1000 dilution or anti- β actin mAb at 1:5000 dilution, followed by washing and probing with HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG Ab or sheep anti-mouse IgG Ab at 1:4000 dilution. After washing, signals were detected using ECL Western blotting analysis system (Amersham Biosciences).

6. Flow Cytometric Analysis

Purified T lymphocytes stimulated with PHA as describe above were harvested. Cells were stained with cocktail of FITC conjugated anti-CD3 Ab (clone S4.1), PE conjugated anti-CD4 Ab (clone S3.5), PE-Cy5.5 conjugated anti-CD8 Ab (clone 3B5) and APC conjugated anti-CD25 Ab (clone CD25-3G10) (Caltag, Burlingame, CA) for 20 minutes at room temperature. After washing, cells were fixed with 1% paraformaldehyde in PBS followed by analyzing on a FACSCalibur flow cytometer using Cellquest software (Becton Dickinson).

7. Statistical Analysis

Mean \pm SD of independent experiments were analyzed. Intergroup comparisons in all experiments were analyzed using independent *t* test of SPSS software (version 11.5). A *p* value of <0.05 was considered statistical significance.

Results

Notch1 has been shown to be upregulated in T lymphocytes upon stimulation *in vitro* (13). To investigate the expression of Notch1 in T lymphocytes of SLE patients upon activation *in vitro*, we stimulated purified T lymphocytes using mitogenic stimulus PHA for 72 hr, and the level of expression was measured by quantitative real time RT-PCR. As shown in Figure 1A, activated T lymphocytes from patients with active SLE showed significant decrease in *Notch1* expression, compared to those from controls ($p \leq 0.025$). In contrast, T lymphocytes from inactive SLE did not showed significant decreased *Notch1* expression as compared to controls. When total cases of SLE were combined regardless of disease stage, the level of *Notch1* is significantly lower in SLE patients compared to those of controls ($p \leq 0.05$). T lymphocytes from organ transplanted patients

receiving similar drug regimen did not show significant decrease in *Notch1* expression, excluding the possibility that the observed defect is due to drugs received at the time of experiments (data not shown). To verify the results obtained from real time RT-PCR, we carried out conventional RT-PCR and found similar downregulation of *Notch1* in T lymphocytes of active SLE patients (Figure 1B). Because post-transcriptional regulation exists, we examined the expression pattern of protein Notch1 in activated lymphocytes. Notch receptor exists on the cell surface as heterodimers of extracellular domain and intracellular plus transmembrane domain (ICT). ICT is detectable by using antibodies specific for intracellular domain of Notch with the molecular weight of approximately 110 kDa. Consistent with previous report, Notch1 protein was similarly upregulated upon stimulation in controls and inactive SLE. Lymphocytes of active SLE patients, however, failed to upregulate Notch1 (Figure 1C). When the level of expression was quantified, lymphocytes from active SLE showed significant decrease Notch1 expression upon stimulation, compared to those from controls ($p=0.001$) and inactive SLE patients (data not shown). Interestingly, the level of Notch1 in cells cultured without stimuli showed inverse relationship with the disease severity, where active SLE showed the lowest expression, and healthy controls showed the highest expression.

Upregulation of Notch1 in T lymphocytes is shown to couple with proliferation and upregulation of target gene of Notch signaling, *Hes1* (13, 21). Therefore, we examined the proliferation of T lymphocytes and *Hes1* expression from SLE patients and healthy controls. As shown in Figure 2A-B, T lymphocytes from controls and SLE patients showed similar proliferative responses and *Hes1* expression upon stimulation. Finally, we determined cell populations based on cell surface markers, CD4, CD8 and CD25 after stimulation. T lymphocytes from SLE patients showed decreased CD4+ population and increased CD8+ population profiles, as compared to healthy controls (Figure 2C). This result is consistent with the previous report showing the abnormalities of CD4+ and CD8+ population in active SLE patients (22). Therefore, defects in Notch1 upregulation in T lymphocytes from SLE patients did not affect proliferation and *Hes1* expression.

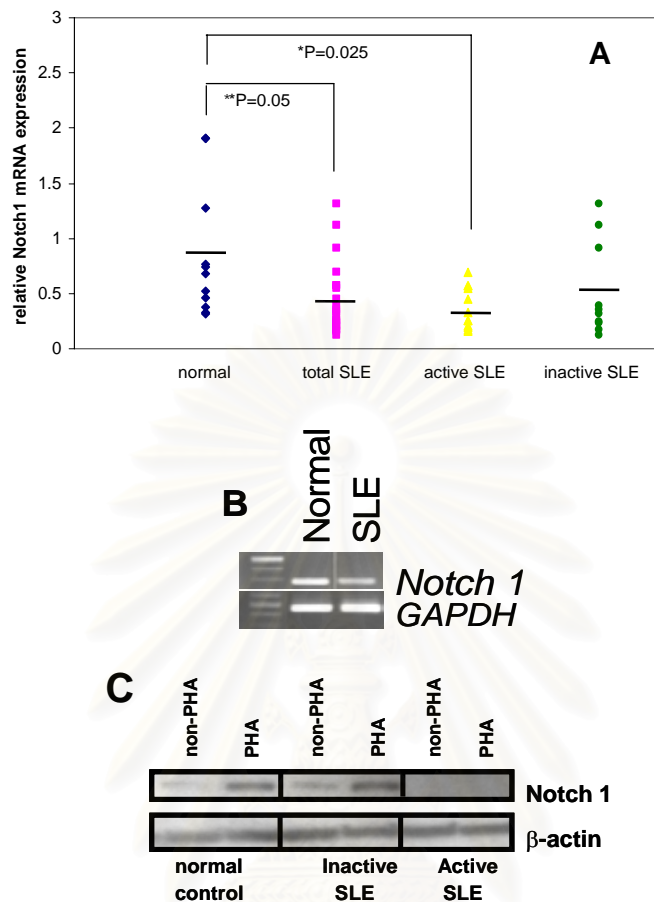


Figure 1. Decreased Notch1 expression in activated T lymphocytes from SLE patients.

- A. Purified PHA-stimulated T lymphocytes from healthy controls, inactive SLE and active SLE patients were subjected to real time RT-PCR analysis for expression of Notch1 and β -actin as described in Methods. The results shown are relative expression of Notch1 normalized to β -actin. (* $p < 0.025$, ** $p < 0.05$).
- B. Representative conventional RT-PCR of Notch1 and β -actin from PHA-stimulated T lymphocytes.
- C. PBMC from SLE patients or healthy controls were stimulated with PHA for 72 h and cell lysates were analyzed for Notch1 expression by Western blot. β -actin was used as loading control. Representative Western blot is shown.

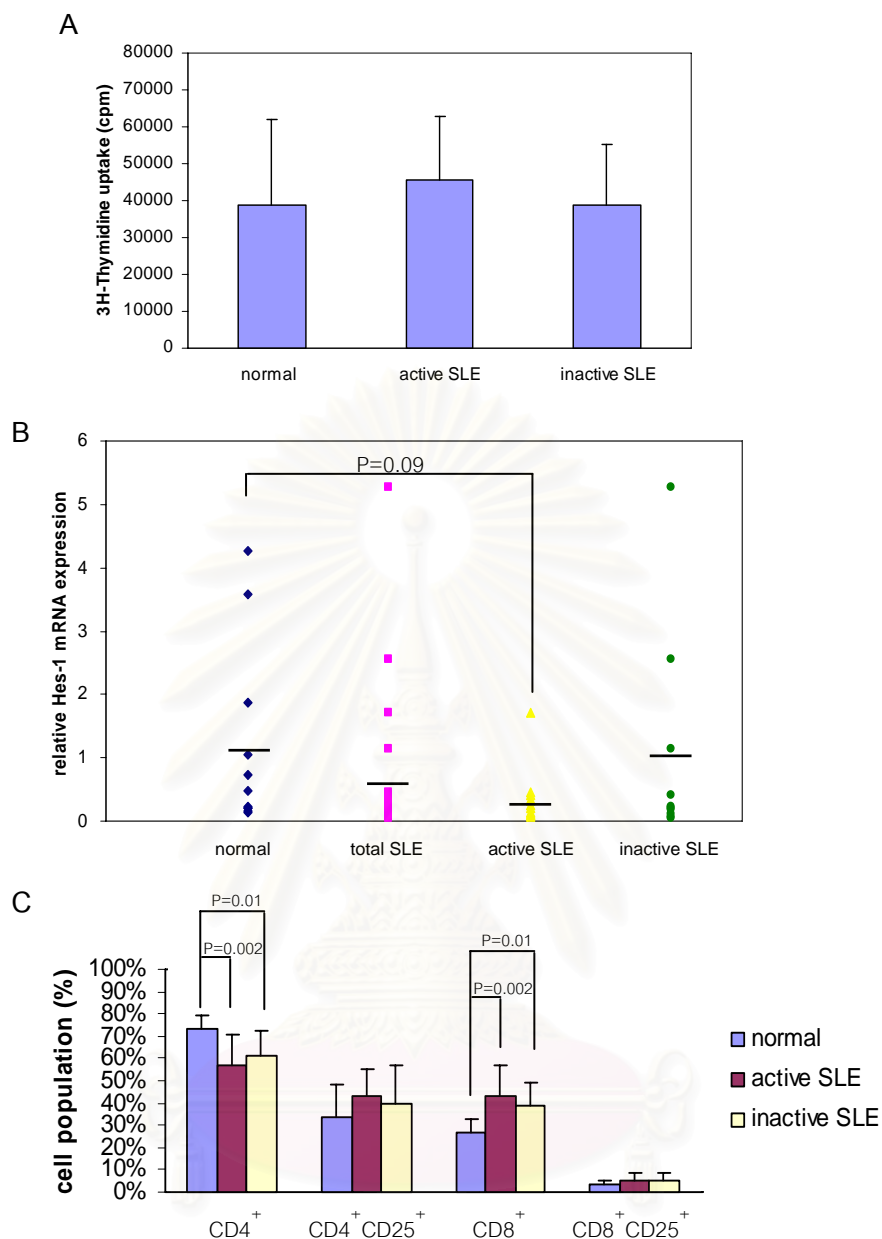


Figure 2. Normal proliferation, *Hes1* expression and T lymphocyte population profile in activated T lymphocytes from SLE patients.

- A. Purified T lymphocytes from healthy controls or SLE patients were stimulated for 72 hr before subjecting to TdR incorporation assay as described in Methods. The results shown are mean \pm SD of triplicate of all tested subjects.
- B. *Hes1* expression in activated T lymphocytes was analyzed using real time RT-PCR as described in Methods.
- C. Purified T lymphocytes were stimulated by PHA and subjected to cell surface staining for FACS analysis. The results shown are summary of all individual lymphocytes used in this study.

Discussion

The rationale behind this study is that there are mounting evidences suggesting crucial roles Notch signaling plays during T cell activation, its involvement in autoimmune disorders and the central role of T cell driven hyperactivation of immune responses in SLE. First, Notch signaling governs multiple choices during thymic development (10). Therefore, anomalies in Notch signaling, by way of abnormal expression of Notch receptors and ligands, are expected to influence ontogeny of T lymphocytes. The link between anomalies in Notch signaling during T cell development and autoimmune disorders, however, is still missing. Second, Notch signaling is involved in helper T cell development, particularly Th1/Th2 lineage choice (11). Conflicting evidences have been reported on this issue. While some studies suggested that Notch signaling is favored Th2 development by directly regulating *IL-4* expression and conditional targeted deletion of a Notch-specific scaffold protein encoding gene, MAML, resulted in compromised Th2-type immune response against helminthic infection (23, 24). On the other hand, several studies suggested that Notch signaling regulates Th1-type cytokine IFN γ via direct regulation of Th1 master regulator, T-bet (13, 14, 25). The reasons for these conflicting reports remained unresolved. SLE is generally considered Th2-driven disorder from hyperactivation of B cells, but studies of cytokine patterns in SLE patients could not be concluded decisively whether it is a Th1 or Th2 type immune response (26, 27). Third, Notch signaling is reported to be involved in generation and suppressive functions of regulatory T cells (15, 17, 28). Recently, there is a resurging interest in these regulatory T cells in pathogenesis of autoimmune disorders, including SLE. Multiple studies suggested defects in frequency of regulatory T cells and their suppressive functions in SLE patients (6-8). Forth, differential expression of presenilin2, one of the components of Notch receptor processing enzyme γ -secretase, is reported, and partial loss of presenilin1 in the *presenilin2* null background resulted in systemic autoimmune phenotypes similar to human SLE (18, 19).

In this study, we investigated the expression of *Notch1* in T lymphocytes of SLE patients upon activation. Decrease in *Notch1* upregulation correlated well with active

stage of SLE. We also examined the consequence of this defect in proliferative capacity and *Hes1* expression and found no effect on both phenotypes. Therefore, it remains to be determined whether defects in Notch1 upregulation in T lymphocytes upon *in vitro* stimulation is relevant to onset of SLE. The normal expression of *Hes1* in stimulated T cells from SLE, despite the marked decrease in Notch1 expression, may be the result of functional redundancy among Notch receptors. Notch1, 2 and 3 have been shown to be upregulated in activated T lymphocytes (13, 21, 25). The expression of Notch2 and 3 in activated T lymphocytes in SLE patients remains to be determined.

From our observations and the reported roles Notch signaling plays in regulating effector function of T lymphocyte, there are potential links that needs to be further investigated. Notch signaling may regulate Th1/Th2 differentiation and skew cytokine profiles to be pathogenic in SLE patients. Generation of regulatory T cells and its suppressive function also involve Notch signaling that need to be further explored. Interestingly, Notch1 is upregulated in antigen tolerized T lymphocytes upon activation, while T cells from airway inflammation animal models failed to do so (17). This is intriguing in light of the observation that regulatory function of regulatory T cells is mediated through Notch1 and membrane form of TGF- β . Therefore, it may be that T lymphocytes from active SLE escape regulatory mechanisms of regulatory T cells by downregulating Notch1.

In conclusion, we provided evidence in this report that Notch1 upregulation in stimulated T lymphocytes is significantly defective in SLE patients. The results of this defect in T cell functions remain to be determined. The uncovered link between Notch signaling and SLE may lead to a new therapeutic intervention for correcting T cell functions in the future.

Conclusion

The aim of this study was to determine *Notch1* expression in stimulated T lymphocytes of SLE patients that indicated significantly defective regulation of *Notch1* in activated T lymphocytes of SLE patients with active stage while stimulated T lymphocytes of SLE patients with inactive stage were indifferent expression of *Notch1* compared with healthy controls. Interestingly, stable inactive SLE was showed mRNA *Notch1* expression similar to healthy controls while unstable inactive SLE was significantly decelerated compare to healthy controls and stable inactive SLE. That not only showed conversely correlation of *Notch1* expression with severity of SLE but also *Notch1* expression might be a new marker to predict stage of SLE and the disease progression. This finding might be a clue of role in *Notch1* signaling for T_H1/T_H2 development and suppressive function of Treg cells in SLE that need to further discovery.

Although at the present several reports indicated that Notch signaling plays an important role in periphery, most of these functions are still inconclusive and controversial. Further investigating the potential roles of Notch pathway in lymphocytes are necessary. These insights may yield novel diagnostic and therapeutic application for SLE.

Reference

1. Mills JA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 1994 Jun 30;330(26):1871-9.
2. Grammer AC, Lipsky PE. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2003;5 Suppl 4:S22-7.
3. Hoffman RW. T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2004 Oct;113(1):4-13.
4. Maddison PJ, Reichlin M. Quantitation of precipitating antibodies to certain soluble nuclear antigens in SLE. *Arthritis Rheum.* 1977 Apr;20(3):819-24.
5. Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T, Yoshimoto K, Shiraishi K, Kameda H, et al. T cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2005 Aug;38(5):339-46.
6. Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2003 Nov;21(3):273-6.
7. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol.* 2004 Feb;59(2):198-202.
8. Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, Baranda L, Layseca-Espinosa E, Abud-Mendoza C, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2006 Sep;27(2):110-8.
9. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999 Apr 30;284(5415):770-6.
10. Radtke F, Wilson A, Mancini S, MacDonald H. Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004;5:247-53.
11. Osborne BA, Minter LM. Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jan;7(1):64-75.
12. Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell.* 2004 May 14;117(4):515-26.

13. Palaga T, Miele L, Golde TE, Osborne BA. TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN-gamma production in peripheral T cells. *J Immunol*. 2003 Sep 15;171(6):3019-24.
14. Minter LM, Turley DM, Das P, Shin HM, Joshi I, Lawlor RG, et al. Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat Immunol*. 2005 Jul;6(7):680-8.
15. Anastasi E, Campese AF, Bellavia D, Bulotta A, Balestri A, Pascucci M, et al. Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J Immunol*. 2003 Nov 1;171(9):4504-11.
16. Hoyne GF, Le Roux I, Corsin-Jimenez M, Tan K, Dunne J, Forsyth LM, et al. Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells. *Int Immunol*. 2000 Feb;12(2):177-85.
17. Ostroukhova M, Qi Z, Oriss TB, Dixon-McCarthy B, Ray P, Ray A. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta. *J Clin Invest*. 2006 Apr;116(4):996-1004.
18. Tournoy J, Bossuyt X, Snellinx A, Regent M, Garmyn M, Serneels L, et al. Partial loss of presenilins causes seborrhic keratosis and autoimmune disease in mice. *Hum Mol Genet*. 2004 Jul 1;13(13):1321-31.
19. Xu L, Zhang L, Yi Y, Kang HK, Datta SK. Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat Med*. 2004 Apr;10(4):411-5.
20. Choi Y, Simon-Stoos K, Puck JM. Hypo-active variant of IL-2 and associated decreased T cell activation contribute to impaired apoptosis in autoimmune prone MRL mice. *Eur J Immunol*. 2002 Mar;32(3):677-85.
21. Adler SH, Chiffolleau E, Xu L, Dalton NM, Burg JM, Wells AD, et al. Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *J Immunol*. 2003 Sep 15;171(6):2896-903.
22. Wouters CH, Diegenant C, Ceuppens JL, Degreef H, Stevens EA. The circulating lymphocyte profiles in patients with discoid lupus erythematosus and systemic lupus

erythematosus suggest a pathogenetic relationship. *Br J Dermatol.* 2004 Apr;150(4):693-700.

23. Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A. Regulation of Th2 differentiation and IL4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:607-56.

24. Tu L, Fang TC, Artis D, Shestova O, Pross SE, Maillard I, et al. Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med.* 2005 Oct 17;202(8):1037-42.

25. Maekawa Y, Tsukumo S, Chiba S, Hirai H, Hayashi Y, Okada H, et al. Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. *Immunity.* 2003 Oct;19(4):549-59.

26. Wolfer A, Bakker T, Wilson A, Nicolas M, Ioannidis V, Littman DR, et al. Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nat Immunol.* 2001 Mar;2(3):235-41.

27. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol.* 2003 Jul;56(7):481-90.

28. Kared H, Adle-Biassette H, Fois E, Masson A, Bach JF, Chatenoud L, et al. Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling. *Immunity.* 2006 Nov;25(5):823-34.

Appendix

AWARDS

1. 2004 : Excellent oral presentation at 12th Senior Project of Science Conference, Faculty of Science Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, March,18-19,2004.
2. 2006 : Poster presentation at 6th National Grad Research Conference, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, October, 13-14, 2006.

CONFERENCES

1. Sodsai P. Screening of *Streptomyces* secondary metabolites capable of inhibiting thymocyte apoptosis induced by steroid hormone. 12th Senior Project of Science Conference, Faculty of Science Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, March,18-19, 2004 (Oral presentation).
2. Sodsai P, Hirankarn N, Avihingsanon Y, Palaka T. Correlation of Notch1 expression in T lymphocytes from SLE patients with disease progression. 6th National Grad Research Conference, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, October, 13-14, 2006 (Poster presentation).
3. Sodsai P, Hirankarn N, Avihingsanon Y, Palaka T. Correlation of Notch1 receptor expression in T lymphocytes from SLE patients with disease progression. 23th Congress on Allergy and Immunology, Radisson Hotel, Bangkok, Thailand, March, 29-30, 2007 (Oral presentation)
4. Sodsai P, Hirankarn N, Avihingsanon Y, Palaka T. Correlation of Notch1 receptor expression in T lymphocytes from SLE patients with disease progression. Chula Medical Expo 2007, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, May, 15, 2007 (Oral presentation)
5. Sodsai P, Hirankarn N, Avihingsanon Y, Palaka T. Correlation of Notch1 receptor expression in T lymphocytes from SLE patients with disease progression. The 8th International Congress on SLE, Shanghai, China, May, 23-27, 2007 (Poster Discussion Presentation)

Biography

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ
 (ภาษาไทย) นาง ณัฐฐิยา หิรัญกาญจน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
 (ภาษาอังกฤษ) Mrs Nattiya Hirankarn Assistant Professor
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน
3100904730364
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์
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 โครงการศึกษาการตอบสนองทาง cytotoxic T lymphocyte ที่จำเพาะต่อ LMP1 pitopes ของ Epstein-Barr virus ในผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูกและคนปกติที่ติดเชื้อไวรัส
- 7.2.2 การพัฒนาการตรวจ HLA โดยวิธีทางอณูชีวโมเลกุล ได้แก่ PCR-SSP และ PCR-direct sequencing

7.2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างยีนของที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกับการเกิดโรคเกาต์ในประชากรไทย

7.2.4 ปัจจัยทางพันธุกรรมทางภูมิคุ้มกันที่มีผลต่อการเกิดโรคและการดำเนินโรคของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง

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 ทุนมูลนิธิกระจกอาชาสี 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 โครงการความสัมพันธ์ระหว่างยีนของที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันกับการเกิดโรคเกรฟในประชากรไทย (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. (in press).

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.4.1 โครงการปัจจัยทางพันธุกรรมทางภูมิคุ้มกันที่มีผลต่อการเกิดโรคและการดำเนินโรคของการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีเรื้อรัง (ทุนพัฒนานักวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2546-2548 เป็นผู้วิจัยหลัก)

ขณะนี้งานดำเนินไปแล้วประมาณ 50% และจะเสร็จสมบูรณ์ในเดือน มิถุนายน 2548

7.4.2 โครงการบทบาทของกลูเมออินเดอพีรอนชนิดที่1 และทรานส์ฟอร์มโกรฟแฟกเตอร์เบต้า ในโรคเอสแอลอี- ความสัมพันธ์ระหว่างเวชพันธุศาสตร์ต่อลักษณะแสดงออกทางคลินิก พยาธิสภาพ และภาวะภูมิคุ้มกันในโรคเอสแอลอี (ทุนสนับสนุนงานวิจัยและพัฒนาด้านพันธุกรรมมนุษย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปี 2548-2550 เป็นผู้วิจัยหลัก)

ขณะนี้งานดำเนินไปแล้วประมาณ 30% และจะเสร็จสมบูรณ์ในเดือน มกราคม 2550

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

- 1) ชื่อ ธนาภัทร ปาลกะ (Tanapat Palaga)
- 2) ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
- 3) สถานที่ทำงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10300
โทรศัพท์ 02-218-5070 โทรสาร 02-252-7576
e-mail tanapat.p@chula.ac.th
- 4) ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
Tokyo Institute of Technology, Japan	ปริญญาตรี	Bioengineering	2537
Tokyo Institute of Technology, Japan	ปริญญาโท	Biotechnology	2539
University of Massachusetts-Amherst, USA	Ph.D.	Microbiology (Immunology)	2545

- 5) ประวัติการฝึกอบรม
พ.ศ. 2545 Postdoctoral fellow
Department of Veterinary and Animal Sciences
University of Massachusetts at Amherst
- 6) สาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง ภูมิคุ้มกันวิทยา จุลชีววิทยา
- 7) ผลงานวิจัย
Palaga T, Kataoka T, Nagai K. Extracellular ATP inhibits apoptosis and maintains cell viability by inducing autocrine production of interleukin 4. *Int. Immunopharmacol.* 2004; **4**: 953-961.
Palaga T, Miele L, Golde TE, Osborne BA. TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN- γ production in peripheral T cells. *J. Immunol.* 2003; **171**:3019-3024.
Palaga T, Kataoka T, Woo J-T, Nagai K. Suppression of apoptotic cell death of IL-3-dependent cell lines by ER/SR Ca²⁺-ATPase inhibitors upon IL-3 deprivation. *Exp. Cell Res.* 1996; **228**: 92-97.
- 8) ผลงานวิชาการอื่นๆ
Palaga T. Nuclear hormone receptors, apoptosis and Notch: a lesson from an immune system. *J. Sci. Res. Chula.* (in press).

Palaga T, Osborne BA. The 3D's of apoptosis: death, degradation and DIAPs. *Nat. Cell Bio.* 2002; 4: E149-151.

9) โครงการวิจัยที่กำลังดำเนินการอยู่

ชื่อโครงการ The role of Notch signaling in effector functions of macrophages during mycobacterial infection

ระยะเวลาโครงการ 1.5 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2547 ถึง เมษายน 2549

แหล่งทุนที่ให้การสนับสนุน Third World Academy of Sciences (Italy)

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นาย ยิงยศ อวิหิงสานนท์
(ภาษาอังกฤษ) YINGYOS AVIHINGSANON
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน
-
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
สาขาวิชาโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนพระรามสี่ กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 02-256-4251 ต่อ 204 โทรสาร 02-252-6920
E-mail : yingyos@hotmail.com
5. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษา	มหาวิทยาลัย	ปริญญา/วุฒิปับตร
2533	จุฬาลงกรณ์	แพทยศาสตรบัณฑิต
2537	จุฬาลงกรณ์	ประกาศนียบัตรวิทยาศาสตร์การแพทย์คลินิก
2539	จุฬาลงกรณ์	วุฒิปับตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพ สาขาอายุรศาสตร์
2541	จุฬาลงกรณ์	วุฒิปับตรแสดงความรู้ความชำนาญในการประกอบวิชาชีพ 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 หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอกาวิจัย เป็นต้น
- 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย
-
- 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
- 7.2.1 โครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนของ growth factor ในปัสสาวะกับการเกิดไตอักเสบจากโรค Lupus
- 7.2.2 โครงการศึกษาอุบัติการณ์ของและการแสดงออกของยีนในภาวะ 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
- 7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อข้อเสนอกาวิจัย 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)

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.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย และสถานภาพในการทำวิจัย

โครงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีนของ growth factor ในปัสสาวะกับการเกิดไตอักเสบจากโรค Lupus (ทุนวิจัยอณูชีวโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการเงิน พ.ศ. 2546 และทุนมูลนิธิกระจกอาชาสี 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. Manuscript in preparation

โครงการบทบาทของกลูเมอรินอินเตอเพอรอนชนิดที่1 และทรานส์ฟอร์มโกรฟแฟกเตอร์ เบต้าในโรคเอสแอลอี- ความสัมพันธ์ระหว่างเวชพันธุศาสตร์ต่อ ลักษณะแสดงออกทางคลินิก พยาธิสภาพ และ ภาวะภูมิคุ้มกัน ในโรคเอสแอลอี (ทุนสนับสนุนงานวิจัยและพัฒนาด้านพันธุกรรมมนุษย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปี 2548-2550 เป็น ผู้วิจัยหลัก)

ขณะนี้งานดำเนินไปแล้วประมาณ 30% และจะเสร็จสมบูรณ์ในเดือน มกราคม 2550

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1) ชื่อ

ภาษาไทย : นางสาวพิมพ์เยาว์ สดใส

ภาษาอังกฤษ : Pimpayao Sodsai

2) ตำแหน่งปัจจุบัน - (นักศึกษาปริญญาเอก)

3) สถานที่ศึกษา สาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรุงเทพมหานคร 10300

โทรศัพท์ 02-2528181 ต่อ 509 โทรสาร 02-252-5952

e-mail yokpim1981@yahoo.com , yokpim1981@hotmail.com

4) ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปีที่ได้รับ พ.ศ.
Chulalongkorn University	ปริญญาตรี	Microbiology	2547
Chulalongkorn University	ปริญญาโท	Medical Microbiology	2550
Chulalongkorn University	Ph.D.	Medical Microbiology	

5) ผลงานวิจัย

1. Nakkuntod J, Sodsai P, Hirankarn N. Interferon gamma gene (+874). Chula Med J. 2006;50(10): 685-94.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PART 2

PTGS2 INVOLVING IN THE T LYMPHOCYTE APOPTOSIS OF
LUPUS PATIENTS: ROLE OF EPIGENETIC ALTERATION



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Introduction

DNA methylation is a postsynthesis DNA modification, which in eukaryotes occurs at the 5' position of the cytosine ring in the context of CpG dinucleotides. There are regions of the genome termed CpG islands which are rich of CpG pairs. Most of CpG islands overlap the 5' end of gene regions, including promoter and first exon sequences. In general, the promoters of active genes and tissue-specific genes are typically hypomethylated, while inactive genes are silenced by methylation. The process of DNA methylation is carried out by DNA methyltransferase (Dnmt1, Dnmt2 and Dnmt3) (1).

Several studies on the relationship between DNA methylation and SLE have been reported by Richardson and coworkers. They reported that T cells of active SLE patients were globally hypomethylated DNA and associated with decrease of Dnmt1 mRNA levels when compared with normal T cells (2, 3). Additional evidence of the role of aberrant methylation in the development of SLE comes from studies with DNA demethylating drugs. Treatment CD4⁺ T cells with the DNA methylation inhibitors (5-azacytidine, procainamide or hydralazine) became autoreactive. The CD4⁺ T cell autoreactivity was found to be due in part to an overexpression of the adhesion molecule lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) (4). It has been also reported that the increase expression of perforin and CD70 of methylation inhibitors treated- CD4⁺ T cells contributed the macrophage killing and B cell IgG production, respectively (5, 6). The overexpression of LFA-1, perforin and CD70 of CD4⁺ T cells related with demethylation of the specific sequence in promoter, as observed in SLE patients (5-8). Furthermore, *in vivo* study showed that adoptive transfers of 5-azacytidine or procainamide-treated CD4⁺ T cells to syngeneic recipient mice caused a lupus-like disease (9, 10). Therefore, CD4⁺ T cell hypomethylation may contribute the development of SLE. However, genes that are affected is unknown.

The fundamental lesion in autoimmune disease, including SLE, is selective loss of tolerance and self/non-self recognition and the development of autoantibodies (11, 12). In normal immune system, apoptosis or programmed cell death is critical for lymphocyte development and homeostasis. Potentially autoreactive T and B cells during development and after completion of an immune response are removed by

apoptosis (13). Impairment of death pathways lead to the prolonged survival of pathogenic lymphocytes. This may be one disease mechanism that contributes to the susceptibility to SLE. This hypothesis was supported by observation in murine lupus models. MRL/lpr and Gld/gld mice are lupus animal model that have defective Fas receptor and Fas ligand (FasL), respectively. Defective Fas-mediated apoptosis in these mice result in massive lymphoproliferation and the development of severe lupus-like disease with immune glomerulonephritis (14, 15). However, mutation in the genes encoding Fas and FasL are rare in SLE patients, suggests that these mutations are an uncommon cause of the disease (16, 17). Defects other than mutations in Fas/FasL may play a role in maintaining autoreactive cells in SLE. In the study gene expression of SLE CD4+ T cell under anergy and activation induced cell death (AICD) inducing condition by microarray, activated CD4+ T cells of SLE patients resisted anergy and apoptosis by upregulation of cyclooxygenase (cox) 2 mRNA (18). Furthermore, the importance of COX-2 mediated resistance to activation induced cell death in lupus T cells was confirmed by studies with COX-2 inhibitors and COX-2 deficient mice (18). Interestingly, PTGS2 gene, which encodes COX-2, is located in chromosome 1 region for lupus susceptibility in mice and humans (19, 20). The factors which control expression of PTGS2 gene in CD4+ T cells of SLE patients are interesting. The association of DNA methylation in PTGS2 gene with gene expression in cancer cells have been reported (21, 22). Therefore, aberrant methylation of PTGS2 gene in SLE CD4+ T cell may contribute the increasing expression of COX-2 that involve in resistance to AICD.

In this study, we hypothesize that variation of DNA methylation status in PTGS2 gene may lead to different gene expression and contribute in development of SLE.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Objective

To study DNA methylation status of PTGS2 gene in CD4+ T cells, CD8+ T cells and B cells compare between normal controls and SLE patients and/or disease activity.

Literature review

Prostaglandin-endoperoxide synthase (PTGS) or COX is a key regulatory enzyme involved in prostaglandin biosynthesis, the conversion of arachidonic acid to prostaglandin. Two major isoforms of COX are COX1 and COX2 (23). COX1 is expressed constitutively in most cell types for cellular housekeeping functions, whereas COX-2 is associated with biologic events such as injury, inflammation, and proliferation and is mainly expressed in macrophages, monocytes, fibroblasts and endothelial cells (24). In the study gene expression of SLE CD4+ T cell under anergy and AICD inducing condition by microarray, activated CD4+ T cells of SLE patients resisted anergy and apoptosis by upregulation of COX2 mRNA (18). Furthermore, the importance of COX-2 mediated resistance to activation induced cell death in lupus T cells was confirmed by studies with COX-2 inhibitors and COX-2 deficient mice (18). Interestingly, PTGS2 gene, which encodes COX-2, is located in chromosome 1 region for lupus susceptibility in mice and humans (19, 20). The factors which control expression of PTGS2 gene in CD4+ T cells of SLE patients are interesting. Because, T cells hypomethylation was found in SLE patients and adoptive transfers of methylation inhibitors treated- CD4+ T cells in to syngeneic recipient mice caused a lupus-like disease (2, 9, 10). Therefore, aberrant methylation in SLE CD4+ T cell may contribute the increasing expression of COX-2 that involve in resistance to AICD. Furthermore, the associations of DNA methylation of PTGS2 gene and gene expression in cancer cells have been reported (21, 22). In this study, we hypothesize that variation of DNA methylation status in PTGS2 gene may lead to different gene expression and contribute in development of SLE.

Research methodology

Normal and SLE patients

Twelve Thai patients with SLE attending at 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. Sex matched healthy volunteers were recruited as control group. The ethics committee of the faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand approved the study and the subjects gave their informed consent. Characteristics of SLE patients was shown in table 1.

Sample collection and Cell isolation

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of SLE patients and healthy donors were isolated from heparinized blood by using Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and B cells are isolated by specific immunomagnetic beads (DynaL Biotech ASA, Oslo, Norway) (Fig. 1).

DNA methylation study

DNA methylation in the CpG island at 5' region of COX2 was detected by Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) method as described previously (22). Genomic DNA was extracted from isolated-cells and cell lines (Hela, Daudi and Jurkat cell). Bisulfite treatment of DNA was performed with the EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Bisulfite treated DNA was amplified by specific primers described by Toyota and colleagues (22) : COX2F, 5'-GATTTGTAGTGAGYGTTAGGAGT-3' ; Cox2R, 5'-RCCAAATACTCACCTATATAACTAAA-3'. The 187 bp amplicons were digested by restriction enzymes *Tail* (MBI Fermentas, Flamborough, Ontario, Canada) at 65°C for 16 h and were then electrophoresed in 8% nondenaturing polyacrylamide gel. The gel was analyzed by staining with syber green and calculating the percent methylation upon visualization on a phosphor imager using the Image Quant software (Molecular Dynamics, Pharmacia Amersham). The cox2 methylation level was calculated as a

percentage of intensity of the methylated sequence divided by the sum of methylated and nonmethylated amplicons.

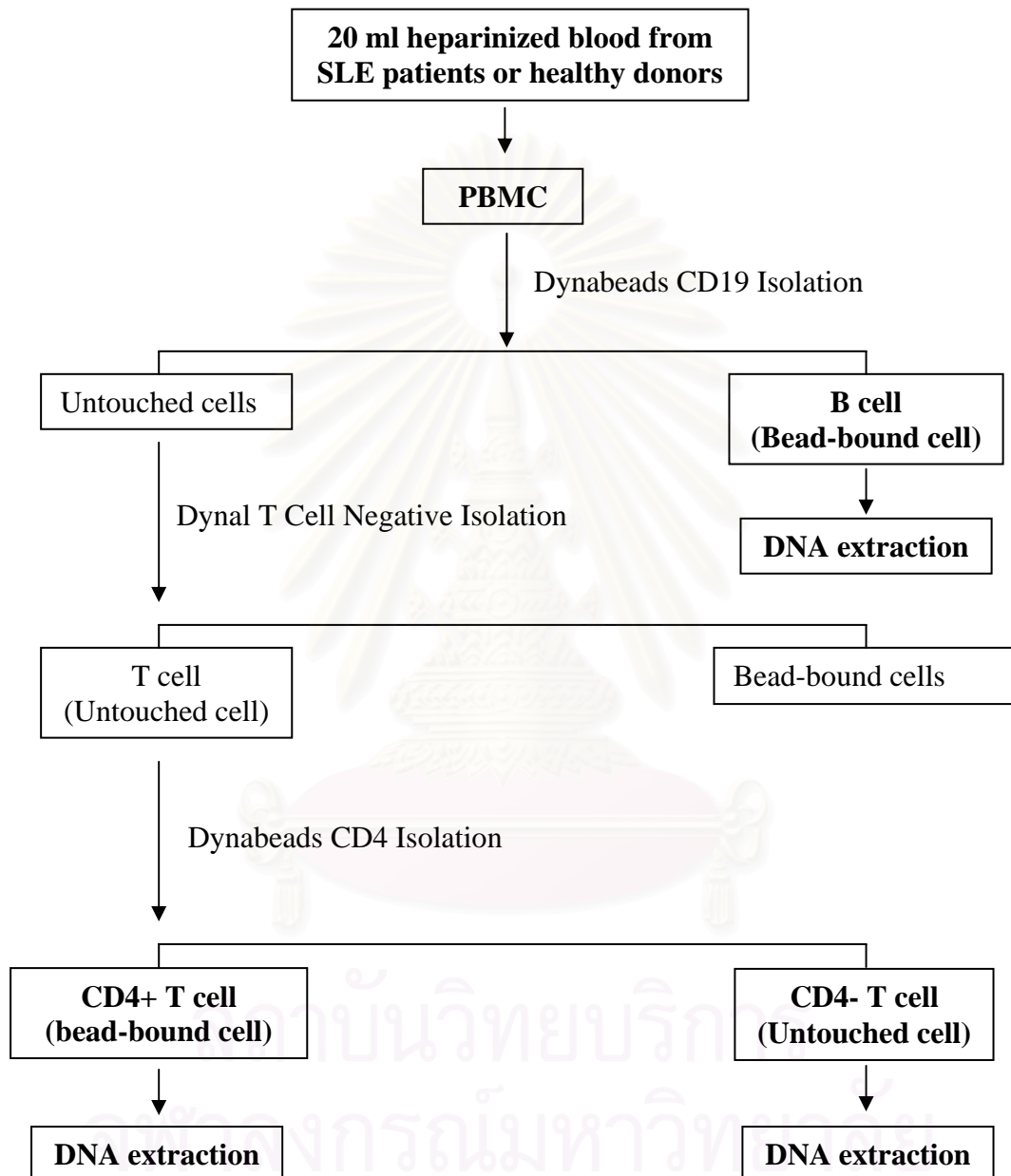


Figure 1 Procedure for cell isolation

Table 1 Characteristics of SLE patients who were analyzed in the methylation study

Patient	Age/Gender	Clinical activity	Medications
1	16/female	inactive	Prednisolone/Imuran
2	35/female	inactive	Prednisolone/ Cellcept
3	23/female	inactive	Prednisolone
4	36/female	inactive	Prednisolone
5	42/female	inactive	Prednisolone
6	37/female	inactive	Prednisolone
7	26/female	active	Prednisolone/ Cellcept
8	33/female	active	Prednisolone/ Endoxan
9	33/female	active	Imuran
10	30/female	active	Prednisolone/ Cellcept
11	24/female	active	Prednisolone
12	45/female	active	Prednisolone

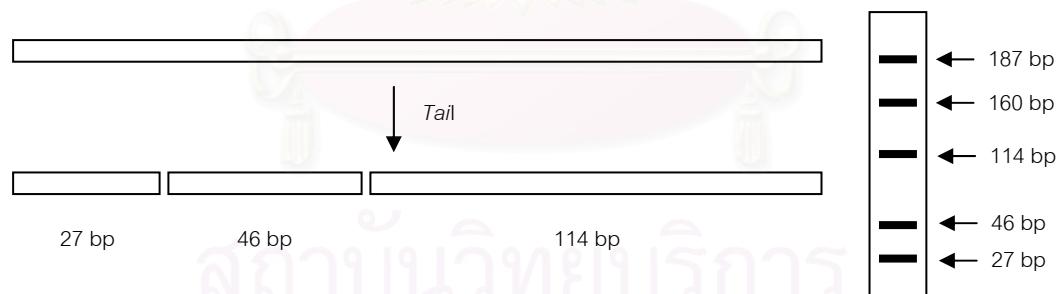


Figure 2 The expected PCR products for COBRA analysis. Methylated amplicons are 160 and 114 bp. COX2 methylation level was calculated as a percentage of intensity of 114 bp fragment divided by the sum of 187, 160 and 114 bp fragments.

Result

In this study, we examined the methylation status of CpG site within CpG island at 5' region of COX2 gene in T and B cell from 6 healthy and 12 SLE patients. This CpG, which is associated with loss of expression, was detected by COBRA assay (22). First, to investigate whether methylation status of COX2 gene differs in Jurkat (human T cell lymphoblast-like cell line), Hela (human epithelial carcinoma cell line) and Daudi (human Burkitt's lymphoma cell line). Methylation was detected in only Daudi, so this cell line was used as positive control (Figure 3). Second, to investigate whether methylation status of COX2 gene differs in T and B cell which were isolated from healthy and SLE patients. We found that CD3+CD4+ T cell, CD3+CD4- T cell and B cell of healthy and SLE patients are demethylated in the CpG site at 5' CpG island of COX2 gene (Figure 4).

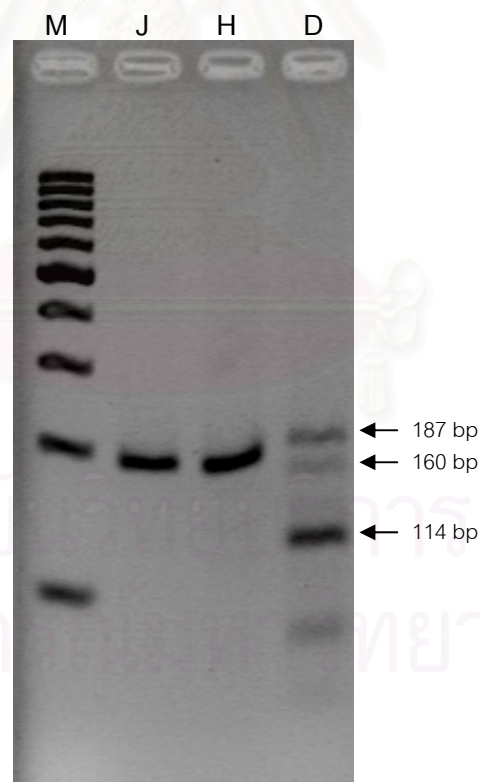


Figure 3 Methylation status of the COX2 5' CpG island in cell lines. M is 100-bp DNA size marker. J, H and D are Jurkat, Hela and Daudi, respectively.

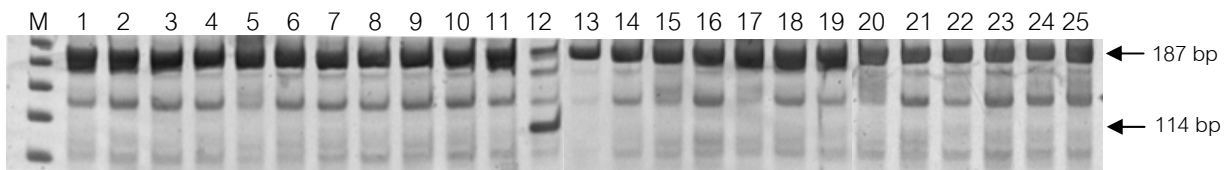


Figure 4 The representative of Methylation status of the COX2 in Healthy and SLE patients. M is 100-bp DNA size marker.

Line 1, 2, and 3 are B, CD3+CD4+ T, CD3+CD4- T cell of healthy control 1.

Line 4, 5, and 6 are B, CD3+CD4+ T, CD3+CD4- T cell of healthy control 2.

Line 7, 8, and 9 are B, CD3+CD4+ T, CD3+CD4- T cell of inactive SLE 1.

Line 10, 11, and 13 are B, CD3+CD4+ T, CD3+CD4- T cell of inactive SLE 2.

Line 14, 15, and 16 are B, CD3+CD4+ T, CD3+CD4- T cell of inactive SLE 3.

Line 17, 18, and 19 are B, CD3+CD4+ T, CD3+CD4- T cell of active SLE 1.

Line 20, 21, and 22 are B, CD3+CD4+ T, CD3+CD4- T cell of active SLE 2.

Line 23, 24, and 25 are B, CD3+CD4+ T, CD3+CD4- T cell of active SLE 3.

Line 12 is Daudi.

Reference

1. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Cmaj*. 2006 Jan 31;174(3):341-8.
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 Nov;33(11):1665-73.
3. Deng C, Kaplan MJ, Yang J, Ray D, Zhang Z, McCune WJ, et al. Decreased Ras-mitogen-activated protein kinase signaling may cause DNA hypomethylation in T lymphocytes from lupus patients. *Arthritis Rheum*. 2001 Feb;44(2):397-407.
4. 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 Jun 15;97(12):2866-71.
5. 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 Mar 15;172(6):3652-61.
6. 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 May 15;174(10):6212-9.
7. Lu Q, Kaplan M, Ray D, Zacharek S, Gutsch D, Richardson B. Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2002 May;46(5):1282-91.
8. Lu Q, Ray D, Gutsch D, Richardson B. Effect of DNA methylation and chromatin structure on ITGAL expression. *Blood*. 2002 Jun 15;99(12):4503-8.
9. Qudus 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 Jul;92(1):38-53.

10. 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 Aug;40(8):1436-43.
11. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003 Oct 16;349(16):1526-33.
12. Waldman M, Madaio MP. Pathogenic autoantibodies in lupus nephritis. *Lupus.* 2005;14(1):19-24.
13. Rathmell JC, Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell.* 2002 Apr;109 Suppl:S97-107.
14. Cohen PL, Eisenberg RA. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:243-69.
15. Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet.* 1999;33:29-55.
16. Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest.* 1996 Sep 1;98(5):1107-13.
17. Vaishnav AK, Toubi E, Ohsako S, Drappa J, Buys S, Estrada J, et al. The spectrum of apoptotic defects and clinical manifestations, including systemic lupus erythematosus, in humans with CD95 (Fas/APO-1) mutations. *Arthritis Rheum.* 1999 Sep;42(9):1833-42.
18. Xu L, Zhang L, Yi Y, Kang HK, Datta SK. Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat Med.* 2004 Apr;10(4):411-5.
19. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity.* 2001 Sep;15(3):397-408.
20. 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 Sep;15(3):435-43.
21. Ma X, Yang Q, Wilson KT, Kundu N, Meltzer SJ, Fulton AM. Promoter methylation regulates cyclooxygenase expression in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004;6(4):R316-21.

22. Toyota M, Shen L, Ohe-Toyota M, Hamilton SR, Sinicrope FA, Issa JP. Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. *Cancer Res.* 2000 Aug 1;60(15):4044-8.
23. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97-120.
24. Fritsche E, Baek SJ, King LM, Zeldin DC, Eling TE, Bell DA. Functional characterization of cyclooxygenase-2 polymorphisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Nov;299(2):468-76.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย