การตอบสนองของ HLA-A*1101 restricted HIV-specific CD8+ T lymphocyte ในผู้ติดเชื้อ HIV ที่ไม่มีอาการ

นางสาวศศิพร เรืองเดชสุวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1247-9

HLA-A*1101-RESTRICTED HIV-SPECIFIC CD8+ T LYMPHOCYTE RESPONSES IN ASYMPTOMATIC HIV-INFECTED PATIENTS

Miss Sasiporn Ruangdachsuwan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology (Inter-Department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-53-1247-9

This Thesis	HLA-A*1101-restricted HIV-specific CD8+ T Lymphocyte Responses in Asymptomatic HIV-Infected Patients
By	Miss Sasiporn Ruangdachsuwan
Field of Study	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Pokrath Hansasuta, M.D., D. Phil. (Oxon)
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Kiat Ruxrungtham, M.D., M.Sc

---

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

.....Dean of The Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

Thesis Committee:

.....Chairman
(Associate Professor Ariya Chindamporn, Ph.D.)

.....Thesis Advisor
(Pokrath Hansasuta, M.D., D. Phil. (Oxon))

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Kiat Ruxrungtham, M.D., M.Sc)

.....Member
(Associate Professor Suda Louisirirotchanakul, Ph.D.)

ศศิพร เรืองเดชสุวรรณ: การตอบสนองของ HLA-A*1101 restricted HIV-specific CD8+ T lymphocyte ในผู้ติดเชื้อ HIV ที่ไม่มีอาการ (HLA-A*1101-RESTRICTED HIV-SPECIFIC CD8+ T LYMPHOCYTE RESPONSES IN ASYMPTOMATIC HIV-INFECTED PATIENTS) อาจารย์ที่ปรึกษา: อ. นพ. ดร. ปกรัฐ หังสสูต, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ. นพ. เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม; 135 หน้า. ISBN 974-53-1247-9

Human immunodeficiency virus type1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) พบว่ามีบทบาทสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อไวรัส HIV การวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการตอบสนองของ CTL ที่จำเพาะกับ HLA-A11 ซึ่งเป็น HLA class I allele ที่พบมากที่สุดจากประชากรของประเทศ และหาความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของ CTL ดังกล่าวและปริมาณไวรัส นอกจากนี้ยังทำการศึกษาลำดับ amino acid ในผู้ที่ติดเชื้อที่ไม่มีการตอบสนอง หรือมีการผันแปรของการตอบสนองต่อ immunodominant epitope เพื่อศึกษากลไก escape mutation ของเชื้อ HIV การวิจัยนี้ทำการทดสอบ HLA-A11-restricted epitope เป็นจำนวนทั้งสิ้น 17 ชิ้น ในผู้ติดเชื้อ HIV-1 ที่มี HLA-A11 จำนวน 18 คน โดยวิธี ELISpot assay จากการวิจัยพบว่า โปรตีน Nef (QVPLRPMTYK และ GAFDLSFFLK peptide) เป็นโปรตีนที่กระตุ้น T cell ได้ดีที่สุด (18/18) รองลงมาได้แก่ โปรตีน Pol (16/18) Env (6/18) และ Gag (4/18) ตามลำดับ และไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของ CTL กับปริมาณไวรัสในผู้ป่วยส่วนใหญ่ ส่วนการศึกษาลำดับของ amino acid ในผู้ติดเชื้อที่มีความผิดปกติของการตอบสนองต่อ immunodominant Nef epitope พบว่ามีกลไกการเกิด mutation ในบริเวณ epitope หรือในส่วน flanking region แสดงว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุสำคัญของการไม่ตอบสนองต่อ epitopes เหล่านี้ ผลจากการศึกษานี้ยืนยันว่า Nef เป็น immunodominant protein และเหมาะสมที่จะเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการพัฒนาวัคซีนสำหรับทดสอบในประเทศไทยต่อไป

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....ศศิพร เรืองเดชสุวรรณ.....
ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ปกรัฐ หังสสูต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....เกียรติ.....

4489105520: MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEYWORD: HUMAN IMMUNODIFICENCY VIRUS/ CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE/ HLA-A11/ ELISPOT ASSAY/ SEQUENCE VARIATION.

SASIPORN RUANGDACHSUWAN: THESIS TITLE: HLA-A*1101-RESTRICTED HIV-SPECIFIC CD8+ T LYMPHOCYTE RESPONSES IN ASYMPTOMATIC HIV-INFECTED PATIENTS. THESIS ADVISOR: POKRATH HANSASUTA, M.D., D. Phil. (Oxon); THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. KIAT RUXRUNGTHAM, M.D., M.Sc. 135 pp. ISBN 974-53-1247-9

Human immunodeficiency virus type1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) play a major role in the controlling HIV infection. In the present study, we analysed HIV-specific HLA-A11-restricted CTL responses in asymptomatic HIV-infected Thai patients which HLA-A11 is the most common HLA class I allele in Thailand. We also established the correlation between HIV viral load and CTL responses against the immunodominant epitope, and analysed the amino acid sequences in some patients who had fluctuation or absence of responses against the immunodominant epitopes to study HIV immune escape. In this experiment, seventeen of HLA-A11-restricted epitopes were analysed by the ELISpot assay in the eighteen HLA-A11 positive HIV-infected patients. The results showed that Nef protein (QVPLRPMTYK and GAFDLSFFLK peptides) was the most immunodominant (18/18) protein followed by Pol (16/18), Env (6/18) and Gag (4/18). There was no correlation between HIV viral load and the CTL responses against immunodominant epitope in most patients.Most patients who showed no responses against immunodominant epitopes had amino acid mutation either within epitope or in the flanking region. This study supported the immunodominance of Nef protein which was conserved even in the presence of strong selective pressure. This protein is therefore should be included in the HIV vaccine construct.

Field of Study Medical Microbiology
Academic year 2004

Student's signature Sasiporn Ruangdachsuwan
Advisor's signature P. Hansasuta
Co-advisor's signature Kiat Rux

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Dr. Pokrath Hansasuta, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for his advices, indispensable help, encouraging guidance, initiating ideas and construction criticisms to carry out my study successfully.

I am particularly grateful to my co-advisor, Associate Professor Kiat Rukrungtham, the division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for his advices, kindness valuable guidance, and devotion.

My sincere gratitude is also given to the member of my advisory committee, Associate Professor Dr. Ariya Chindamporn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Associate Professor Dr. Suda Louisirirotchanakul, Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, MahidolUniversity for their kindness, constructive criticisms and helpful suggestions for completeness and correction of this thesis.

I am very grateful to Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her advices, kindness valuable guidance, devotion and indispensable help.

I will forever be indebted to Miss. Supranee Buranapraditkun, Dr. Sunee Sirivichayakul, Miss. Patrawadee Pitakpolrat, Mr. Wachira Sultawonjaroenpon, and Sven-Iven Lorenzen, the division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their encouragement and kind assistance.

I would like to extend my appreciation to, Miss Sirada kowchareon, Miss Piyamas Jinnopat, Miss Patcha Incumsub, my friends and the staff of the Microbiology Department for their help and friendship.

Finally, I am extremely grateful to my parents, my sister and my brother for their love, understanding, patience, supporting and encouragement throughout my life.

CONTENTS

Page

Page

CHAPTER

Page

CHAPTER

LIST OF TABLES

Table Page

LIST OF FIGURES

Figure Page

Figure Page

Figure Page

ABBREVIATIONS

aa	Amino acid
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
APC	Antigen presenting cell
β_2m	beta 2 microglobulin
BLCL	B lymphoblastoid cell line
bp	Base pair
CA	Capsid
Ca^{2+}	calcium 2+
CD	Cluster of differentiation
CO_2	Carbon dioxide
CRF	Circulating recombinant form
Cr-51	Chromium-51
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
CTLp	Cytotoxic T lymphocyte precursor
cu.mm.	Cubic millimeter
°C	degree celsius
DDW	Double-deionized distilled water
DMSO	Dimethyl sulphoxide
DNA	Deoxy nucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
Dw	Distilled water
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISpot	Enzyme-linked immunospot
Env	Envelope
FBS	Fetal bovine serum
Gag	Group-specific antigen
gp	Glycoprotein

Group M	Major group
Group N	New group
Group O	Outlier group
h	hour
HEPS	Highly Exposed but Persistently seronegative persons
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
IFN-γ	Interferon gamma
IL	interleukin
IL-2	interleukin 2
IL-7	interleukin 7
IN	Integrase
kb	kilobase
kD	kilodalton
LTNP	Long-term nonprogressor
LTRs	Long terminal repeats
MA	Matrix
mg	milligram
MgCl2	Magnesium chloride
MHC	Major histocompatibility complex
min	minute
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribosomal nucleic acid
µg	microgram
µl	microliter
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
NC	Nucleocapsid
Nef	Negative factor

NK cell	Natural killer cell
ng	Nanogram
nm	Nanometer
OD	Optical density
p	Protein
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
PHA	Phytohemaggutinin
pmole	Picomole
Pol	Polymerase
PR	Protease
RANTES	Regulated upon activation, normal T expressed and secreted
Rev	Regulatory of expression of viral protein
RNA	Ribonucleic acid
RNaseH	Ribonuclease H
rpm	round per minute
RPMI 1640	Rosewell park memorial institute formular 1640
RRE	Rev-responsive element
RT	Reverse Transcriptase
SFU	Spot-forming unit
SIV	Simian immunodeficiency virus
SR	Spontaneous release
TAP	Transporter associated with processing
T cell	Thymus-derived lymphocyte
Tat	Transactivator of transcription
TCR	T cell receptor
Th cell	Helper T cell
TNF	Tumour necrosis factor
TR	Tota! release
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane

Vif	Viral infectivity factor
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein U