ความแตกต่างของ $CD8^+$ T lymphocytes ที่จำเพาะต่อ Nef และ Gag ในการควบคุมการติดเชื้อ HIV-1 ในผู้ป่วยคนไทย

นางสาวชุติมา กิตติธนานุกูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2656-9

THE DIFFERENCE OF NEF AND GAG-SPECIFIC CD8$^+$ T LYMPHOCYTE RESPONSES IN CONTROL OF HIV-1 INFECTION IN THAI PATIENTS

Miss Chutima Kittitananukul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Microbiology
(Inter-Department)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-53-2656-9

Thesis THE DIFFERENCE OF NEF AND GAG-SPECIFIC $CD8^+$ T LYMPHOCYTE RESPONSES IN CONTROL OF HIV-1 INFECTION IN THAI PATIENTS

By Miss Chutima Kittitananukul

Field of Study Medical Microbiology

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

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 Somatat Wongsawang, Dr. med.vet., Cert. in Path.)

.....Thesis Advisor

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

.....Member

(Associate Professor Wasun Chantratita, Ph.D.)

ชุติมา กิตติธนานุกูล: ความแตกต่างของ $CD8^+$ T lymphocytes ที่จำเพาะต่อ Nef และ Gag ในการควบคุมการติดเชื้อ HIV-1 ในผู้ป่วยคนไทย (The Difference of Nef and Gag-specific $CD8^+$T Lymphocyte Responses in Control of HIV-1 Infection in Thai Patients.) อาจารย์ที่ปรึกษา: อ. นพ. ดร. ปกรัฐ หังสสูต; 185 หน้า. ISBN 974-53-2656-9

นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่า $CD8^+$ T lymphocytes มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อเอชไอวี แต่ความจำเพาะของการตอบสนองที่ต่างกันของ $CD8^+$ T lymphocytes อาจจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมระดับเชื้อเอชไอวี ดังนั้นเราจึงทำการศึกษาความจำเพาะในการตอบสนองของ $CD8^+$ T lymphocytes ต่อเชื้อเอชไอวีในกลุ่มคนที่มีความสามารถควบคุมการติดเชื้อได้ต่างกัน การศึกษานี้ทำการทดสอบหาการตอบสนองของ $CD8^+$ T lymphocytes ต่อ Nef และ Gag ในผู้ติดเชื้อจำนวน 35 คนที่มีปริมาณไวรัสแตกต่างกัน ตลอดจนคู่สามีภรรยาที่มีการสัมผัสเชื้อหลายครั้งแต่ยังคงไม่ติดเชื้อจำนวน 11 คนและคู่ที่ติดเชื้อจำนวน 9 คนด้วยวิธี ELISpot assay และทำการศึกษากลไกของ escape mutation ในผู้ที่ไม่พบการตอบสนอง

ผลการศึกษาพบว่าเปปไทด์ที่พบการตอบสนองสูงสุดและมีความแรงสูงสุด ได้แก่ Nef ตามด้วย p24 Gag p17 Gag และ p2p7p1p6 Gag ตามลำดับ โดยมีผู้ติดเชื้อที่ตอบสนองต่อ Nef protein จำนวน 30 คน (85.7%) และผู้ตอบสนองต่อ Gag protein จำนวน 16 คน (45.7%) อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความแรงและความกว้างในการตอบสนองกับปริมาณไวรัส นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างของการตอบสนองระหว่างกลุ่มผู้ติดเชื้อแต่ละกลุ่มซึ่งมีปริมาณไวรัสที่แตกต่างกัน ในผู้ติดเชื้อที่ไม่พบการตอบสนองพบว่ามี mutation ในบริเวณ epitope หรือในส่วน flanking region ส่วนการศึกษาในกลุ่มคู่สามีภรรยาที่ฝ่ายหนึ่งติดเชื้อแต่อีกฝ่ายหนึ่งไม่ติดเชื้อพบว่ามีความจำเพาะของการตอบสนองที่แตกต่างกัน โดยผู้ไม่ติดเชื้อตอบสนองต่อ Nef 7 Nef 8 และ Nef 9 ผู้ติดเชื้อตอบสนองต่อ Nef 9 Nef 14 และ Nef 15 ดังนั้น Nef 7 และ Nef 8 อาจมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....ชุติมา กิตติธนานุกูล.....

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ปกรัฐ หังสสูต.....

4589080520: MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEYWORD: HUMAN IMMUNODIFICENCY VIRUS / DISCORDANT COUPLES / $CD8^+$ T LYMPHOCYTE / GAG / NEF / ELISPOT ASSAY / SEQUENCE VARIATION.
CHUTIMA KITTITANANUKUL: THESIS TITLE: THE DIFFERENCE OF NEF AND GAG-SPECIFIC $CD8^+$ T LYMPHOCYTE RESPONSES IN CONTROL OF HIV-1 INFECTION IN THAI PATIENTS. THESIS ADVISOR: POKRATH HANSASUTA, M.D., D. Phil. (Oxon). 185 pp. ISBN 974-53-2656-9

$CD8^+$ T lymphocytes are believed to play an important role in the control of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. Recent studies showed that specificities of $CD8^+$ T lymphocytes might have an effect on efficiency of protective immune response. We therefore screened HIV-1-specific $CD8^+$ T lymphocytes in 35 HIV-1-seropositive Thais with different level of HIV RNA and in 11 high risk HIV-1-seronegative Thais and their HIV-1-seropositive partners using of Nef and Gag peptides based gamma interferon-enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay. In addition, we analysed the amino acid sequences of relevant HIV proteins in non-responsive subjects to study HIV escape mutation.

The results demonstrated that the most frequently recognised peptides and the strongest responses were located in Nef, followed by p24 Gag, p17 Gag, and p2p7p1p6 Gag, respectively. There are 30 subjects (85.7%) responded against Nef protein and there are 16 subjects (45.7%) responded against Gag protein. However, neither the breadth nor the magnitude of HIV-1-specific $CD8^+$ T lymphocyte responses correlated with plasma viral load. In subgroup analysis, there was no significant difference of responses among individuals with different HIV RNA load. In subjects whose the responses could not be detected had amino acid mutations either within epitope or in the flanking region. However, in case of the discordant couples, we found the different antigenicity recognition against Nef protein. One high risk HIV-1-seronegative subject had vigorous responses against Nef 7, Nef 8, and Nef 9 whilst their partner responded against Nef 9, Nef 14, and Nef 15. These results may indicate that the $CD8^+$ T cells specific for Nef 7 and Nef 8 peptides play a critical role in control of HIV-1 infection.

Field of Study Medical Microbiology
Academic year 2005

Student's signature.....Chutima Kittitananukul.....
Advisor's signature.....Hansasuta.....

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 supervision, indispensable help, encouraging guidance, initiating ideas and constructive criticisms.

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

I am also very grateful to Professor Praphan Phanuphak, director of the AIDS Research Center of the Thai Red Cross Society for his kind help in providing the subjects.

I am particularly grateful to Associate Professor Kiat Ruxrungtham, Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for his kind help in providing the peptides.

My sincere gratitude is also given to the member of my advisory committee, Associate Professor Dr. Somatat Wongsawang, Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University and Associate Professor Dr. Wasan Chantratita, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Mahidol University, for their kindness, constructive criticisms and helpful suggestions for completeness and correction of this thesis.

I will forever be indebted to Miss Supranee Buranapraditkun, Drs. Sunee Sirivichayakul and Sven-Iven Lorenzen, the division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and the staff of the Anonymous Clinic of Thai Red Cross AIDS Research Centre for their encouragement and kind assistance.

I would like to extend my appreciation to, Mr. Goraguch Gesprasert, Miss Supaporn Likitvivattanavong, Mr. Ittaphol Lohutvanich, Miss Sasiporn Ruangdachsuwan, Miss Patcha Incumsub, my friends and the staff of the Microbiology Department for their advice and friendship.

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

CONTENTS

Page

CHAPTER Page

CHAPTER Page

CHAPTER Page

CHAPTER Page

LIST OF TABLES

Table Page

Table Page

LIST OF FIGURES

Figure Page

Figure Page

Figure Page

ABBREVIATIONS

aa	amino acid
Ab	Antibody
ACD	Acid citric dextrose
Ag	Antigen
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
APC	Antigen presenting cell
bDNA	branched DNA
β_2m	beta 2 microglobulin
BLCL	B lymphoblastoid cell line
bp	Base pair
CA	Capsid
Ca^{2+}	calcium 2^+
$CaCl_2$	Calcium Chloride
CD	Cluster of differentiation
CMI	Cell mediated immunity
CO_2	Carbon dioxide
CRF	Circulating recombinant form
^{51}Cr	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
ER	Endoplasmic reticulum
FBS	Fetal bovine serum
Gag	Group-specific antigen
gp	glycoprotein
Group M	Major group
Group N	New group
Group O	Outlier group
HEPS	Highly Exposed but Persistently seronegative persons
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
HMI	Humoral immunity
HRP	Horseradish peroxidase
ICS	Intracellular cytokine staining
IFN-α	Interferon alpha
IFN-β	Interferon beta
IFN-γ	Interferon gamma
IL	interleukin
IL-2	interleukin 2
IL-7	interleukin 7
IN	Integrase
INr	Initiator
IVDU	Intravenous drug user
kb	kilobase
kD	kilodalton
KS	Kaposi's sarcoma
LDA	Limiting dilution assay
LTNP	Long-term nonprogressor
LTR	Long terminal repeat
MA	Matrix
mg	milligram

$MgCl_2$	Magnesium chloride
MHC	Major histocompatibility complex
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein-1 alpha
MIP-1β	Macrophage inflammatory protein-1 beta
ml	milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribosomal nucleic acid
μg	microgram
μl	microliter
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
NC	Nucleocapsid
Nef	Negative factor
NES	Nuclear export signal
NK cell	Natural killer cell
ng	nanogram
nm	nanometer
OD	Optical density
p	protein
PA28	Proteasome activator
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffer saline
PCP	*Pneumocystis carinii* pneumonia
PCR	polymerase chain reaction
PHA	Phytohemagglutinin
PIC	Preintegration complex
pmole	picomole
Pol	Polymerase
PR	Protease
PRR	Pattern recognition receptors

qs	quantitation standard
RANTES	Regulated upon activation, normal T expressed and secreted
Rev	Regulatory of expression of viral protein
RNA	Ribonucleic acid
RNase H	Ribonuclease H
RNAP II	RNA polymerase II
rpm	round per minute
RPMI 1640	Rosewell park memorial institute formular 1640
RRE	Rev-responsive element
RT	Reverse Transcriptase
SAIDS	Simian AIDS
SCID	Severe combinded immunodeficiency
SEB	Staphylococcal enterotoxin B
SFU	Spot-forming unit
SIV	Simian immunodeficiency virus
SR	Spontaneous release
TAP	Transporter associated with processing
TAP 1	Transporter associated with antigen 1
TAP 2	Transporter associated with antigen 2
T cell	Thymus-derived lymphocyte
Tat	Transactivator of transcription
TAR	Transactivation response element
TCR	T cell receptor
Th cell	Helper T cell
TM	Transmembrane
TNF-α	Tumour necrosis factor alpha
TR	Total release
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
Vif	Viral infectivity factor
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein U