

บทบาทของ Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific Cytotoxic T Lymphocytes ต่อการควบคุมการ
ติดเชื้อ EBV ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง



นางสาวพัชชา อินคำสีบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1248-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE PROTECTIVE ROLE OF EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV)-SPECIFIC
CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES IN IMMUNOCOMPROMISED HOSTS
WITH EBV INFECTION



Miss Patcha Incomserb

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 974-53-1248-7

This Thesis The Protective Role of Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific
 Cytotoxic T Lymphocytes in Immunocompromised Hosts with
 EBV Infection

By Miss Pathcha Incomserb

Field of Study Medical Microbiology

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

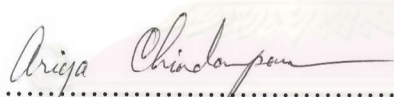
Thesis Co-Advisor Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.

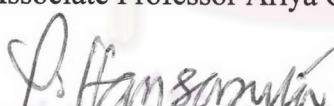
Thesis Co-Advisor Assistant Professor Wanla Kulwichit, M.D.


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 Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Wanla Kulwichit, M.D.)

.....Member
(Associate Professor Wasun Chantratita, Ph.D.)

พืซซา อินคำสึบ: บทบาททของ Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific Cytotoxic T Lymphocytes ตอการควบคุม การติดเชือ EBV ในผู่วยภูมิคุ้มกันบกพรอง (The Protective Role of Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Immunocompromised Hosts with EBV Infection) อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์ นพ. ดร. ปกรัฐ หังสสุต, อาจารย์ที่ปรึกษารวม: รศ. ดร. ภาวพันธ์ ภัทร โภศล และ ผศ. นพ. วันลา กุลวิจิต; 139 หน้า. ISBN 974-53-1248-7

Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการ ติดเชือ EBV ในการวิจัยนี้จึงทำการศึกษารอบสนองของ CTL ที่จำเพาะต่อเชือ EBV ในคนปกติและในผู่วยเอดส์ ที่ติดเชือ EBV และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไวรัสและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ EBV-specific CD8⁺ T cell ต่อ โปรตีนของไวรัส ด้วยวิธี vaccinia-based ELISpot assay นอกจากนี้เราศึกษาความเป็นไปได้อในการสร้าง CTL ที่มีความจำเพาะต่อเชือ EBV (EBV-CTL) จากผู้ติดเชือ HIV และคนปกติ

ในการวัดปริมาณไวรัส EBV เราได้การพัฒนาการตรวจด้วยวิธี real-time PCR ขึ้นมาและพบว่าวิธีที่ พัฒนาขึ้นมานี้มีทั้งความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) และความถูกต้องแม่นยำ โดยสามารถตรวจวัด ปริมาณ EBV-DNA ได้อย่างน้อย 10 copies และไม่พบการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมข้ามสายพันธุ์ (cross amplification) ของเชือไวรัสที่อยู่ในกลุ่ม Herpesviruses ด้วยกัน นอกจากนี้เมื่อทำการหาปริมาณ EBV-DNA จากกลุ่ม ผู้ติดเชือ HIV และคนปกติ พบว่าในผู้ติดเชือ HIV มีปริมาณไวรัสมากกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และ จากการศึกษารอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ EBV-specific CD8⁺ T cell ต่อ โปรตีนของไวรัส แสดงให้เห็นว่าโปรตีน กลุ่ม EBNA-3 เป็นโปรตีนที่มีการตอบสนองของ T เซลล์มากที่สุด โดย EBNA-3b มีการตอบสนองสูงสุดตามมาด้วย EBNA-3a และ EBNA-3c อย่างไรก็ดีตามเมื่อแยกพิจารณาการตอบสนองของ T cell จากกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู่วย พบว่าในกลุ่มคนปกติมีการตอบสนองต่อ EBV proteins หลากหลายชนิดกว่ากลุ่มผู่วย นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในกลุ่ม ผู่วยนั้นมีการลดลงของการตอบสนองของ T cell ต่อ EBV อย่างเห็นได้ชัด

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ EBV-CTL ตอการควบคุมการติดเชือ EBV ในผู้ติดเชือ HIV แต่อย่างไรก็ตามการสรุปว่ากลไกทางภูมิคุ้มกันส่วนใดจะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกัน และควบคุมการติดเชือ EBV อาจจะทำไม่ได้จนกว่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในประชากรกลุ่มใหญ่กว่านี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สหสาขาวิชา..สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์.. ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษารวม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษารวม.....

4489091320: MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORD: EPSTEIN-BARR VIRUS/ CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE/ IMMUNOCOMPROMISED
HOST/ REAL-TIME PCR/ HIV.

PATHCHA INCOMSERB: THESIS TITLE: THE PROTECTIVE ROLE OF EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV)-SPECIFIC CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES IN IMMUNOCOMPROMISED HOSTS WITH EBV INFECTION. THESIS ADVISOR: POKRATH HANSASUTA, M.D., D. Phil. (Oxon); THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PARVAPAN BHATTARAKOSOL, Ph.D. and ASST. PROF. WANLA KULWICHIT, MD. 139 pp. ISBN 974-53-1248-7

Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) play protective role in the pathogenesis of EBV infection. In the present study, the EBV-specific CTL responses in healthy donors and HIV-infected patients were investigated by vaccinia-based ELISpot assay. Furthermore, the correlations between EBV viral load and CD8⁺ T cell responses against various EBV proteins were analysed. Moreover, the feasibility to established EBV-CTL from either patients or healthy controls was studied.

To evaluated cell-associated EBV DNA, EBNA-1 based real-time PCR was developed. The assay showed high sensitivity (as few as 10 copies could be detected), specificity (no cross-amplification of other Herpesviruses was demonstrated) and reproducibility (inter- and intra-assay variations within a 0.5-log₁₀-difference range). Quantitative of EBV-DNA revealed that EBV viral load in HIV-infected patients was significantly higher than that in healthy donors (P<0.05). On the other hand, the study of EBV-specific CTL responses showed that EBNA-3 family was the immunodominant protein which could be recognised by both healthy donors and HIV-infected patients. Indeed, EBNA-3b was the most immunodominant followed by EBNA-3a and EBNA-3c. The number of EBV proteins recognised was lower in HIV-infected patients than in control.

This study clearly confirmed the importance of EBV-specific T cell responses in controlling EBV infection. However, the detailed study involving larger sample size may be needed to elucidate the correlate of protective immunity to EBV infection.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Inter-Department...Medical..Microbiology.....Student's signature.....*Patcha Incomserb*
Field of study.....Medical..Microbiology.....Advisor's signature.....*P. Hansasuta*
Academic year.....2004.....Co-advisor's signature.....*Parvapan Bhattarakosol*
Co-advisor's signature.....*Wanla Kulwichit*

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 Dr. Parvapan Bhattarakosol, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and Assistant Professor Dr. Wanla Kulwichit, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their advices, kindness valuable guidance, devotion and indispensable help.

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. Wasun 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 am very grateful to Associate Professor Kiat Rukrungham, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for his kindness valuable guidance, and devotion.

I am greatly indebted to the National Institute of Health, Department of Medical Science, Ministry of Public Health, my boss (Miss Sirima Pattamadilok), Mrs. Sanit Kumperasart as well as my colleagues, for giving the opportunity of my study.

I will forever be indebted to Miss. Supranee Buranapraditkun, the division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for her encouragement and kind assistance.

I would like to extend my appreciation to, Miss Soammarisa Paungpornsri, Miss Sasiporn Ruangdachsuwan, Mr. Jeerawat Nakkuntod, Miss suwimom Jantraarpornkul, Miss Chutima Kittitanakul, Miss Piyamas Jinopas, Miss Thidatip Wongsuwat, Miss Sirada khawjarean, my friends, the staff of the Microbiology Department and kindness donors for their help and friendship.

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

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II OBJECTIVE.....	3
III LITERATURE REVIEW	4
EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV).....	4
LATENT PROTEINS.....	5
EBV-ASSOCIATED DISEASES.....	7
THE IMMUNE RESPONSE.....	24
EBV IMMUNE RESPONSE.....	30
IV MATERIALS AND METHODS.....	33
Part I Subjects and sample collection.....	33
Part II Study of EBV serological response.....	34
Part III Development of EBV-DNA estimation technique by real-time PCR	35
Part IV Quantitation of EBV-DNA in clinical specimens.....	41
Part V Study of EBV-CTL responses	42
V RESULTS.....	47
Part I Characteristic of individual healthy donors and HIV infected patients...47	
Part II Study of EBV serological response.....	47

CHAPTER	
Part III	Development of EBV-DNA estimation technique by real-time PCR.....47
Part IV	Quantitation of EBV-DNA in clinical specimens.....68
Part V	Study of EBV-CTL responses.....68
VI	DISCUSSION.....103
REFERENCES107
APPENDICES 135
Appendix I136
Appendix II138
BIOGRAPHY141



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	EBV latency pattern and associated malignancies	9
2.	Laboratory testing of EBV.....	14
3.	Characteristic and EBV serological responses of individual healthy donors and HIV infected patient.....	49
4.	Intra- and Inter-assay variability	64
5.	Epstein-Barr virus copy number of peripheral blood mononuclear cell DNA in healthy donors and immunocompromised patients	69
6.	The concentration of wild type and eight recombinant vaccinia viruses expressing EBV genes used in the study.....	72
7.	ELISpot assay optimisation	75
8.	ELISpot assay of infectious dose of vaccinia optimisation.....	77
9.	EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses in EBV-seronegative donors	81
10.	EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses in EBV-seropositive donors	83
11.	EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses in HIV-infected patients	87
12.	The EBV-specific T cell responses after depletion of CD8 ⁺ T cells by immunomagnetic beads of EBV-seropositive donors (C5 and C9) and HIV-infected donors (P6, P8 and P10).....	94
13.	Summary results in establishment of BLCL, EBV-CTL and Cr-release assay of each donor.....	99
14.	Percentage of specific killing at E:T ratio of 50:1, 25:1, 12.5:1 and 6.25:1.....	100

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Model of EBV infection in human	8
2. Pattern of humoral responses to EBV antigen after primary infection.....	16
3. SYBR assay.....	20
4. Hybridization assay	21
5. TaqMan probe assay.....	22
6. The molecular beacons assay	23
7. Scorpion probe assay.....	24
8. The MHC class I antigen presentation pathway.....	27
9. Anti-VCA IgG antibody responses of individual EBV-seropositive (C1-C10), EBV-seronegative (C11-C12) and HIV infected donors (P1-P10).....	50
10. B95-8 EBV-DNA amplification curve, plotting against cycle number and fluorescence acquisition	51
11. Melting curve analysis of B95-8 EBV-DNA at 68°C	52
12. The amplified B95-8 EBV-DNA (EBNA-1) was confirmed by gel electrophoresis for 297 bp amplicon size after real-time PCR reaction	53
13. Gel electrophoresis of amplified EBNA-1 from B95-8 EBV-DNA used in preparation of plasmid containing EBNA-1 DNA before (A) and after purification (B).....	54
14. Nucleotide sequences of EBNA-1 PCR product that inserted to plasmid	55
15. Sequence alignment of 297 bp fragment of EBNA-1 gene amplified from recombinant plasmid (line 4) and the standard sequences of EBNA-1 from B95-8 strain (line 1 to 3), Genbank accession no. NC001345, AJ507799 and VO1555 respectively by ClustalW (http://www.ebi.ac.uk).....	56
16. Amplification curve of DNA of EBV (B95-8), CMV, HSV-1, HSV-2 and EBV seronegative healthy donor	59
17. Melting curve of DNA of EBV (B95-8), CMV, HSV-1, HSV-2 and EBV from seronegative healthy donor	60
18. Amplification curve of Namalwa EBV-DNA at concentration of 1.4×10^4 , 1.4×10^3 , 1.4×10^2 and 14 copies	61

19. Melting curve analysis of Namalwa EBV-DNA at concentration of 1.4×10^4 , 1.4×10^3 , 1.4×10^2 and 14 copies, respectively	62
20. The standardisation curve was obtained by serial 10-fold dilutions of Namalwa EBV-DNA	63
21. Amplification curve of <i>EBNA-1</i> recombinant plasmid obtained from a serial 10-fold dilution of recombinant plasmid ranging from 10^8 to 10 copies per reaction	64
22. Standard curve obtained by serial 10-fold dilutions of EBNA-1 recombinant plasmid	65
23. Reproducibility of the assay	66
24. TK-143 cell line (A) and cytopathic effect caused by vaccinia virus (B) Magnification x100.....	70
25. Plaque titration assay, the assay obtained by serial 10 fold dilution of recombinant vaccinia ranging from 10^4 to 10^9	71
26. EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses were enumerated when IL-2, IL-7 or both cytokines supplemented in the ELISpot assay	76
27. EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses were enumerated in ELISpot containing difference recombinant vaccinia doses (MOI of 2, 4 and 6 respectively).....	78
28. EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses in HIV infected (P1-P10), EBV seropositive (C1-C10) and EBV seronegative donors (C11 and C12) individual	82
29. The cumulative EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses to each EBV protein by healthy donors	84
30. The cumulative EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses in HIV infected donors.	88
31. Magnitude of cumulative EBV-specific T cell responses by ELISpot and EBV load of each donor	90
32. The positive trend of correlation between EBV-DNA load in PBMC and cumulative EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses (A), E3a EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses (B) and E3b EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses (C).....	91
33. The negative trend of correlation EBV-DNA load in PBMC of HIV-infected patients and total EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses (A), E3b EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses (B) and E3c EBV-specific CD8 ⁺ T cell responses (C).....	92
34. EBV-transformed B- Lymphoblastoid cell line, Magnification x100.....	97
35. EBV specific cytotoxic T lymphocyte lines ready for performing Cr release assay ...	98
36. % specific killing at E:T ratio of 50:1, 25:1, 12.5:1 and 6.25:1 of both EBV-seropositive donors and immunocompromised patients	101

37. The CTL assay shown were performed by co-culturing the CTL with chromium-absorbed-BLCL at an effector: target (E:T) ratio of 50:1, 25:1, 12.5:1, and 6.25:1... 102



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

aa	Amino acid
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
APC	Antigen presenting cell
β	Beta
β_2m	β_2 microglobulin
BLCL	B lymphoblastoid cell line
bp	Base pair
Ca^{2+}	Calcium 2+
CD	Cluster of differentiation
CO_2	Carbon dioxide
Cr-51	Chromium-51
CsA	Cyclosporine A
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
CTLp	Cytotoxic T lymphocyte precursor
cu.mm.	Cubic millimeter
$^{\circ}C$	Degree celsius
DDW	Double-deionized distilled water
DMSO	Dimethyl sulphoxide
DNA	Deoxy nucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DW	Distilled water
EBV	Epstein-Barr virus
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	Enzyme-linked immunospot
FBS	Fetal bovine serum
Gag	Group antigen gene
h	Hour
HIV	Human immunodeficiency virus
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin

IL-2	Interleukin 2
IL-7	Interleukin 7
kb	kilobase
kD	kilodalton
M	Molar
mg	milligram
MgCl ₂	Magnesium chloride
MHC	Major histocompatibility complex
min	minute
ml	milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
μg	microgram
μg/ml	microgram per milliliter
μl	microliter
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
Nef	Negative factor gene
NK cell	Natural killer cell
ng	nanogram
nm	nanometer
OD	Optical density
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	polymerase chain reaction
pfu	plaque-forming units
PHA	Phytohemagglutinin
pmole	Picomole
Pol	Polymerase
RNA	Ribonucleic acid
rpm	round per minute
RPMI 1640	Rosewell park memorial institute formular 1640
rVV	recombinant vaccinia virus

SFU	Spot-forming unit
SR	Spontaneous release
TAP	Transporter associated with processing
T cell	Thymus-derived lymphocyte
TCR	T cell receptor
Th cell	Helper T cell
TNFR	Tumour necrosis factor receptor
TR	Total release
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
TX-100	Triton X-100
UV	Ultraviolet



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย