การตอบสนองทางด้าน T cell ในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี จีโนทัยป์ต่างๆต่อโปรตีนของไวรัสตับอักเสบซี จีโนทัยป์ 1a

นาง ธีรพร ชินชัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-3270-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20968826

T CELL RESPONSES FROM BLOOD DONORS INFECTED WITH DIFFERENT HCV GENOTYPES AGAINST HCV 1a PROTEINS

Mrs. Teeraporn Chinchai

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy in Medical Microbiology
Inter-Departmental Program in Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2002

ISBN 974-17-3270-8

Thesis Title	T CELL RESPONSES FROM BLOOD DONORS INFECTED WITH DIFFERENT HCV GENOTYPES AGAINST HCV 1a PROTEINS
By	Mrs Teeraporn Chinchai
Program in	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Professor Yong Poovorawan
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Chintana Chirathaworn, Ph.D.

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

Suchada Kiranandana .... Dean of Graduate School

(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Praphan Phanuphak, M.D. .... Chairman

(Professor Praphan Phanuphak, M.D., Ph.D.)

Yong Poovorawan .... Thesis Advisor

(Professor Yong Poovorawan, M.D.)

.... Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Chintana Chirathaworn, Ph.D.)

Chantapong Wasi .... Member

(Associate Professor Chantapong Wasi, M.D.)

Parvapan Bhattarakosol .... Member

(Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)

Sanipa Suradhat .... Member

(Assistant Professor Sanipa Suradhat, D.V.M., Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธีรพร ชินชัย : การตอบสนองทางด้าน T cell ในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีจีโนทัยป์ต่างๆต่อโปรตีนของไวรัสตับอักเสบซีจีโนทัยป์1a (T CELL RESPONSES FROM BLOOD DONORS INFECTED WITH DIFFERENT HCV GENOTYPES AGAINST HCV 1a PROTEINS) อ.ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ นายแพทย์ยง ภู่วรวรรณ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. จินตนา จิรถาวร, 207 หน้า. ISBN 974-17-3270-8

การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีสามารถนำไปสู่การป่วยเป็นโรคตับเรื้อรัง ตับแข็ง และมะเร็งตับ การติดเชื้อนี้ยังคงเป็นปัญหาใหญ่ที่พบได้ทั่วโลก จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสตับอักเสบซีที่พบในบริเวณภูมิภาคต่าง ๆ สามารถแบ่งออกได้เป็นอย่างน้อย 6 จีโนทัยป์ การศึกษาหาจีโนทัยป์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น competitive PCR, PCR-RFLP, INNO-LiPA และการอ่านรหัสลำดับเบส การศึกษานี้เป็นการศึกษาสายพันธุ์ของไวรัสตับอักเสบซีจีโนทัยป์ที่ตรวจพบในผู้บริจาคโลหิตที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี เพื่อใช้ในการศึกษาระบบภูมิต้านทานและใช้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการพัฒนาวัคซีน จึงได้ทำการศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการจัดแบ่งกลุ่มไวรัสตับอักเสบซี ที่พบบ่อยในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้ศึกษาการตรวจหาจีโนทัยป์ 4 วิธี ได้แก่ RFLP 2 แบบที่ใช้เอนไซม์ต่างชนิดกัน, INNO-LiPA เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงในจำนวน 35 ตัวอย่าง พบว่าวิธีการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงยังคงเป็นวิธีที่ถูกต้องและเหมาะสมที่สุด ดังนั้นจึงได้เลือกวิธีนี้เป็นวิธีหลักในการจัดกลุ่มจีโนทัยป์ไวรัสตับอักเสบซีในการศึกษาขั้นต่อไป

ศึกษาการกระจายของไวรัสตับอักเสบซี จีโนทัยป์ต่างๆที่พบในกลุ่มผู้บริจาคโลหิตชาวไทย ทำการศึกษาในกลุ่มผู้บริจาคโลหิต 100 รายที่พบมีแอนติบอดีต่อไวรัสตับอักเสบซี 90 รายตรวจพบ HCV RNA ภายหลังจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนแกนกลาง (core) ของไวรัสจาก 77 ตัวอย่าง แยกได้เป็นจีโนทัยป์ 1 ; 39 %, จีโนทัยป์ 3 ; 44.2 % และจีโนทัยป์ 6a ; 16.8 %

ได้ทำการศึกษาถึงการตอบสนองด้านเซลล์ที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบซีของเม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิต (PBMCs) จาก 41 ตัวอย่างต่อโปรตีนที่มาจากไวรัสตับอักเสบซี จีโนทัยป์ 1a ด้วยวิธีตรวจโดยใช้แอนติเจนกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์และการสร้างอินเตอร์ฟีรอนแกมม่า (IFN-γ) ไม่พบ ความแตกต่างของการตอบสนองที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบซีใน PBMCs ที่มาจากผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีแต่ละจีโนทัยป์ต่อโปรตีนแอนติเจนของไวรัสตับอักเสบซี ที่นำมาทดสอบ (core, NS3/4, NS5) และพบว่าโปรตีนส่วน NS3/4 กระตุ้นได้มากที่สุด สามารถตรวจพบว่ากระตุ้นภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ของกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่ได้ เนื่องจากโปรตีนที่ใช้นำมาจากไวรัสตับอักเสบซี จีโนทัยป์ 1a และสามารถตรวจพบการตอบสนองต่อโปรตีนนี้ในผู้บริจาคที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี จีโนทัยป์อื่น จึงกล่าวได้ว่ามีการตอบสนองข้ามกลุ่มจีโนทัยป์ต่อโปรตีนของไวรัสตับอักเสบซี

นอกจากการใช้ core, NS3/4 และ NS5 โปรตีนเป็นตัวทดสอบแล้ว B cell lines (BLCL) ที่ผ่านการ transfection ด้วยพลาสมิดที่มีการแสดงออกของ NS3/4 โปรตีน ได้ถูกนำมาใช้ทดสอบความสามารถในการกระตุ้นการตอบสนองที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบซีในผู้ติดเชื้อ การสร้าง IFN-γ ต่อโปรตีนของไวรัสตับอักเสบ ซี ตรวจพบได้เมื่อใช้ลิมโฟซัยท์จากตับ (liver-infiltrating lymphocyte) เป็นตัวทดสอบ แต่ไม่สามารถตรวจพบเมื่อใช้ PBMCs อย่างหนึ่งที่สามารถอธิบายปรากฏการณ์นี้ก็คือการพบมี T เซลล์ที่จำเพาะต่อไวรัสตับอักเสบซีมีปริมาณน้อยในกระแสโลหิต

การศึกษาครั้งนี้ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับจีโนทัยป์ของไวรัสตับอักเสบซีที่พบได้ในกลุ่มผู้บริจาคโลหิต และพบการตอบสนองอย่างจำเพาะของผู้บริจาคโลหิตที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซี จีโนทัยป์ต่างๆว่ามีการตอบสนองข้ามกลุ่มกับโปรตีนที่ได้จากไวรัสตับอักเสบซี จีโนทัยป์ 1a ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวัคซีนที่จะมีขึ้นในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อใช้กับประชากรในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต..

ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..

428 99830 20 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : HEPATITIS C VIRUS / PROLIFERATION / IFN-γ PRODUCTION / GENOTYPE / EBV-BASED PLASMID

TEERAPORN CHINCHAI : T CELL RESPONSES FROM BLOOD DONORS INFECTED WITH DIFFERENT HCV GENOTYPES AGAINST HCV 1a PROTEINS. THESIS ADVISOR : PROF. YONG POOVORAWAN, THESIS COADVISOR : ASST. PROF. CHINTANA CHIRATHAWORN, Ph.D., 207 pp. ISBN 974-17-3270-8

Hepatitis C virus (HCV) infection, which can cause chronic liver diseases, cirrhosis and hepatocellular carcinoma, is still a major public health problem worldwide. Upon comparing the sequences of variants from different geographical areas, at least six major genotypes have been identified and classified. Several methods such as competitive PCR, PCR-RFLP, INNO-LiPA and sequencing have been used for HCV genotyping. The objective of this study were to investigate the distribution of HCV genotypes found in Thai blood donors and study the immune response against HCV 1a proteins to gain information for further vaccine development. In order to investigate a reliable method for genotyping HCV commonly found in Southeast Asia, 4 methods (2 RFLPs, INNO-LiPA, direct sequencing) were compared and performed in 35 samples. According to our data, direct sequencing still seemed to be the most reliable method for genotyping and was therefore used in HCV genotyping for further study.

In order to investigate the distribution of HCV genotypes presented in Thai blood donors, 100 anti-HCV positive blood donors were enrolled in this study. RT-PCR for HCV RNA was performed and ninety samples were HCV RNA positive. Seventy-seven samples were selected for further molecular characterization of the core region of HCV, genotype 1 (39%), genotype 3 (44.2%) and genotype 6a (16.8 %) viruses were identified.

HCV specific response of PBMCs from 41 samples against HCV 1a proteins was studied using proliferation and IFN-γ production assays. There was no significant difference in HCV specific response among PBMCs from donors infected with different HCV genotypes and among all of the HCV proteins used (core, NS3/4,NS5), HCV NS3/4 was the most immunogenic protein in a large portion of the individuals tested. Since proteins from HCV genotype 1a were used in the study and there were responses to these proteins detected in blood donors infected with other genotypes, this suggested that there might be genotype cross reactivity of immune response against HCV proteins.

In addition to soluble HCV 1a proteins, BLCL transfected with plasmid expressing NS3/4 protein was also tested for the ability to stimulate HCV specific response in HCV infected individuals. IFN-γ production against HCV protein was detected when liver-infiltrating lymphocytes were used as responder cells but not when PBMCs were used. One explanation may be that there is a very low frequency of HCV specific T cells in PBMCs.

In conclusion, this study provides the information on HCV genotypes presented in Thai blood donors and HCV specific response in blood donors infected with different HCV genotypes, which cross reactivity against HCV 1a proteins, were also demonstrated. The information obtained may be useful for further vaccine development especially for infected individuals in Southeast Asian.

Field of study Medical Microbiology Student's signature ....Teeraporn Chinchai....

Academic year 2002 Advisor's signature ....Yong Poovorawan....

Co-advisor's signature ....Chintana Ch....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and appreciation to my advisor, Professor Yong Poovorawan, for his competent supervision, guidance, encouragement and criticism which have inspired me to accomplish my study.

I am extremely grateful to my thesis co-advisor, Assistant Professor Dr. Chintana Chirathaworn, for her valuable suggestion, support and encouragement for the completeness of this thesis. I am very grateful to my supervisory committee, Professor Dr. Praparn Parnupark, Associate Professor Chantapong Wasi, Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol and Assistant Professor Dr. Sanipa Suradhat, for their valuable suggestions and criticisms.

My sincere appreciation is also expressed to Dr. Bart L. Haagmans for his valuable advice, excellent ideas and support and to Professor Albert D.M.E. Osterhaus for his kindness and support during my stay in The Netherlands. Special thanks must be extended to Associate Professor Dr. Apiwat Mutirangura, Associate Professor Dr. Ariya Chindamporn, Assistant Professor Dr. Nattiya Hirankarn, Dr. Pokrath Hansasuta for their valuable advice and suggestions.

I am indebted to Dr. Suwanna Noppornpanth, Ms. Apiradee Theamboonlers, Ms. Pojchanad Jantaradsamee and Mr. Sven Bruijns for their technical instructions and sincere helpful during my study. I would like to thank Ms. Kavita Bedi, Ms. Sunee Sirivichayakul, Ms. Suprenee Buranapraditkul and Ms. Soraya Panklom for their assistance, support of some materials and logistic work.

I am particularly indebted to the Royal Golden Jubilee Ph.D. program, Thailand Research Fund, the HECSA project from the European Commission for the scholarship supporting throughout this study and The National Blood Center, Thai Red Cross for specimen collection. Special appreciation must be extended to The Center of Excellence, Viral Hepatitis Research Unit, Department of Paediatrics/ Department of Microbiology/ Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University; Institute of Virology, Erasmus University, The Netherlands and Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for supporting equipments and other utilities.

Finally, much appreciation is special expressed to my parents, my husband and my little angel, "Farsai", for their love, kindness, encouragement and moral support throughout this study.

TABLE OF CONTENTS

		Page
Abstract (Thai)		IV
Abstract (English)		V
Acknowledgement		VI
Table of contents		VII
List of Tables		VIII
List of Figures		IX
List of Abbreviation		XI
Chapter		
I.	Introduction	1
II.	Review of Related Literatures	9
III.	Material and Methods	40
IV.	Results	58
V.	Conclusion and Discussion	88
References		98
Appendices		118
Appendix A		119
Appendix B		126
Appendix C		130
Biography		207

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Heterogeneity of hepatitis C virus...	17
2	Studies investigating circulating HCV-specific MHC class II-restricted T cells in patients with acute HCV infection..................	32
3	Studies investigating circulating HCV-specific MHC class II-restricted T cells in patients with chronic HCV infection or after recovery..	33
4	Primer sequences for HCV RNA detection................................	47
5	Electropherotypes expected from *Acc* I, *Mbo* I and *Bst*N I digestion on 405 bp fragment...	48
6	Electropherotype patterns from *Ava* I and *Sma* I digestion of the 405 bp core fragment...	49
7	HCV genotyping results of 35 samples by four different methods..	59-60
8	The HCV genotype of 41 blood donors included in HCV specific response study..	64
9	Characterization and HCV specific responses against different HCV proteins obtained from 41 selected blood donors...............	67-68
10	SI and Δcpm of all samples positive by proliferation assay..........	71
11	The number of IFN-γ spots/$2x10^5$ PBMCs of all samples positive by ELISPOT assay...	72
12	Summary of proliferation and IFN-γ production results from 41 samples grouped by genotypes of HCV..................................	75
13	Proliferative response of liver-infiltrating lymphocytes (LILs) from 7 chronic HCV patients used for immunological study against HCV infection..	76
14	The number of IFN-γ spots/$1x10^5$ PHA-stimulated PBMCs found in 3 blood donors ; 05458, 09152 and 09612...........................	87

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Structure of the RNA genome of hepatitis C virus................	10
2	The natural history of chronic hepatitis C over 50 years.........	18
3	A. Course of acute, resolving hepatitis C...........................	26
	B. Course of acute hepatitis C that evolves into chronic infection..	26
4	Schematic diagram of pNS vector used in this study............	39
5	Principle of INNO-LiPA method (left) and the strip for result Interpretation (right)..	51
6	Schematic diagram of all recombinant vaccinia-HCV (rVV-HCV) used in this study..	55
7	INNO-LiPA assay of six genotype 6 variants genotyped by INNO-LiPA assay as genotype 1b....................................	61
8	The examples of PCR-RFLP patterns (*Ava* I and *Sma* I).........	62
9	The examples of PCR-RFLP patterns (*Mbo* I).......................	62
10	HCV genotypic distribution generated by direct sequencing from 77 HCV RNA positive blood donors used in genotyping study...	63
11	HCV genotypic distribution in 41 selected blood donors used for HCV specific response study.......................................	65
12	Phylogenetic tree of 41 core sequences included in HCV specific response study..	66
13	The SI and Δcpm obtained from HCV specific proliferation assay in 41 selected blood donors....................................	69-70
14	Proliferation assay of PBMCs from 41 blood donors.............	73
15	IFN-γ ELISPOT assay of PBMCs from 41 blood donors.........	73
16	The percentages of samples positive by either proliferation or IFN-γ ELISPOT assay against HCV antigens..................	74

Figure		Page

17 IFN-γ ELISPOT assay of 816 LILs stimulated with rVV-HCV Infected autologous BLCLs.. 77

18 NS3 expression in NKNT-3 cells detected by Immunostaining.. 79

19 NS3 expression in 816 BLCLs detected by flow cytometry.. 80-81

20 Intracellular IFN-γ detection by flow cytometry................. 83-84

21 IFN-γ ELISPOT assay from 816 LILs stimulated with rVV-NNRd infected or pNS/N16 transfected autologous BLCLs.. 85

22 NS3 expression in BLCLs from three blood donors........... 86

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

HCV	=	Hepatitis C virus
NS	=	non-structural
NCR	=	non-coding region
E	=	envelope
bps	=	base pairs
aa	=	amino acid
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
ELISPOT	=	enzyme-linked immunospot assay
IFN-γ	=	interferon gamma
PHA	=	phytohemagglutinin
IL-2	=	Interleukin 2
PCR	=	polymerase chain reaction
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RT	=	reverse transcription
SI	=	stimulation index
cpm	=	count per minute
Ag	=	antigen
SOD	=	superoxide dismutase
nm	=	nanometre
μl	=	microlitre
ml	=	millitre
μg	=	microgram
mg	=	milligram
LILs	=	Liver-infiltrating lymphocytes
BLCLs	=	B Lymphoblastoid Cell Lines
PBMC	=	peripheral blood mononuclear cell
FITC	=	Fluorescein isothiocyanate
PE	=	R-phycoerythrin
FACS	=	Fluorescence activated cell sorter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS (CONT.)

EBV	=	Epstein-Barr virus
VV	=	Vaccinia virus
WT	=	wild type
AEC	=	aminoethylcarbazole
NBT	=	nitroblue tetrazolium
BCIP	=	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
PBS	=	phosphate buffer saline
FBS	=	fetal bovine serum
GTC	=	guanidinium thiocyanate
2-ME	=	2-Mercaptoethanol
LiPA	=	line probe assay

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย