การตอบสนองของไซโตทอกสิก ที ลิมป์โฟซัยท์ ต่อโปรตีนแททของเชื้อเอชไอวี-1 ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี-1 ที่ไม่เคยได้รับยาต้านไวรัสเอดส์ และมีจำนวนซีดี 4 มากกว่าหรือเท่ากับ 300 เซลล์ต่อไมโครลิตร

นางสาวสุนันทา โกศลศิริลักษณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
หลักสูตรวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1737-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20432896

HIV-1 TAT-SPECIFIC CTL RESPONSES IN UNTREATED HIV-1 INFECTED PATIENTS WITH CD4+ T CELL ≥ 300 CELLS/MICROLITRE

Miss Sunantha Kosonsiriluk

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Medical Science

Program of Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-1737-5

Thesis Title	HIV-1 Tat-specific CTL Responses in Untreated HIV-1 Infected Patients with CD4+ T cell ≥ 300 Cells/μl.
By	Miss Sunantha Kosonsiriluk
Field of study	Medical Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.

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

..... Dean of Faculty of Medicine
(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Vilai Chintanez, M.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.)

..... Member
(Associate Professor Apiwat Mutirangura, M.D., Ph.D.)

..... Member
(Nattiya Pimtanothai, M.D., Ph.D.)

สุนันทา โกศลศิริลักษณ์: การตอบสนองของไซโตทอกสิก ที ลิมป์โฟซัยท์ ต่อโปรตีนแททของเชื้อเอชไอวี-1 ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี-1 ที่ไม่เคยได้รับยาต้านไวรัสเอดส์ และมีจำนวนซีดี 4 มากกว่าหรือเท่ากับ 300 เซลล์ต่อไมโครลิตร. (HIV-1 Tat-specific CTL Responses in Untreated HIV-1 Infected Patients with CD4+ T cell ≥ 300 Cells/ μl) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม ; 57 หน้า. ISBN 974-03-1737-5.

เชื้อเอชไอวีที่พบระบาดอยู่ในประเทศไทยคือสายพันธุ์ CRF01_AE มีความแตกต่างจากสายพันธุ์ B ที่พบระบาดอยู่ในประเทศที่พัฒนาแล้ว ไซโตทอกสิก ที ลิมป์โฟซัยท์ (Cytotoxic T lymphocytes หรือ CTLs) เป็นปัจจัยสำคัญของภูมิคุ้มกันในการควบคุมการติดเชื้อเอชไอวี ยังไม่มีรายงานข้อมูลการตอบสนองของไซโตทอกสิก ที ลิมป์โฟซัยท์ต่อโปรตีนแททของเชื้อเอชไอวี-1 สายพันธุ์ CRF01_AE ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นเป้าหมายใหม่สำหรับการออกแบบวัคซีน การตรวจหาการตอบสนองของไซโตทอกสิก ที ลิมป์โฟซัยท์ต่อโปรตีนแททที่พบได้บ่อย และ/หรือ ที่พบใหม่ และการทำ epitope mapping อาจนำมาซึ่งข้อมูลที่มีประโยชน์ต่องานวิจัยและพัฒนาวัคซีนของเชื้อเอชไอวี-1 สายพันธุ์ CRF01_AE ที่ใช้แททเป็นพื้นฐาน

การศึกษานี้ได้ทำการตรวจหาการตอบสนองของไซโตทอกสิก ที ลิมป์โฟซัยท์ต่อโปรตีนแทท และการทำ epitope mapping ในอาสาสมัครไทยที่ติดเชื้อเอชไอวี–1 โดยใช้เทคนิคอิไลสปอต (Elispot) และโปรตีนแททท่อนสั้น ๆ ของเชื้อเอชไอวี-1 สายพันธุ์ CRF01_AE (ความยาว 17-21 amino acids แต่ละเส้นมีความเหลื่อมกัน 10 amino acids) ใช้สำหรับการตรวจคัดกรองการตอบสนองไซโตทอกสิก ที สิมป์โฟซัยท์ ทั้งนี้โดยใช้สายโปรตีนหรือเปปไทด์ 2 ชุด, ชุดละ 5 เปปไทด์ โดยใช้หลักเกณฑ์ที่ว่าผลการตรวจที่มีจำนวน spot หลังจากลบ background แล้ว ≥ 100 SFU/10^6 PBMCs และมากกว่า 2 เท่าของ negative control ถือเป็นผลบวก อาสาสมัครที่ให้ผลบวกต่อชุดเปปไทด์จะได้รับการตรวจหา Tat specific epitope ต่อไป

ผลการศึกษาพบว่าอาสาสมัคร 10 รายจาก 20 ราย (50%) แสดงผลบวกต่อชุดของเปปไทด์รวมค่าผลการตอบสนองอยู่ระหว่าง 260–912 SFU/ 10^6 PBMCs (ค่ากลาง 498 SFU / 10^6 PBMCs) อาสาสมัครที่ให้ผลบวกต่อชุดของเปปไทด์แสดงผลบวกต่อแต่ละเปปไทด์ที่จำเพาะจำนวน 7 ราย ผลของการตอบสนองอยู่ระหว่าง 128–1,264 SFU/ 10^6PBMCs (ค่ากลาง 460 SFU/ 10^6PBMCs) พบว่า 6 epitopes ที่สามารถตรวจพบในการศึกษานี้อาจจะมี epitope ใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อนอย่างน้อย 1 epitope

แททเป็นเป้าหมายใหม่ในการผลิตวัคซีนที่ใช้เพื่อควบคุม replication และ transmission รวมถึงการป้องกันหรือชะลอ การดำเนินโรคของเอดส์ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่า ผู้ติดเชื้อคนไทยมีการตอบสนองของไซโตทอกสิก ที ลิมป์โฟซัยท์ต่อแททเพียง 35% ส่วนการศึกษาอื่นพบว่า การตอบสนองของไซโตทอกสิก ที ลิมป์โฟซัยท์ ต่อส่วนของ gag และ pol พบได้สูงกว่า ดังนั้น การนำแททรวมกับส่วนอื่นของเชื้อเอชไอวี ในการออกแบบวัคซีน มีความเหมาะสมกว่า การใช้แททเพียงส่วนเดียวในการทำวัคซีน

หลักสูตร วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2544

4275266330: MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEY WORD: CTLS/ EPITOPE/ HIV-1 / TAT
SUNANTHA KOSONSIRILUK: HIV-1 TAT-SPECIFIC CTL RESPONSES IN UNTREATED HIV-1 INFECTED PATIENTS WITH CD4+ T CELL ≥ 300 CELLS/MICROLITRE. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. KIAT RUXRUNGTHAM, pp. 57 ISBN 974-03-1737-5.

Circulating recombinant form AE is the most common HIV-1 subtype causes AIDS epidemic in Thailand. It is different from molecular sequence subtype B commonly found in developed countries. Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are considered as an important protective immunity against HIV infection. There are no data on CTL responses against HIV-1 CRF01_AE transactivator of transcription or Tat protein that is one of the good candidates for vaccine design. The identication of common and/ or novel Tat-specific CTL responses and epitope mapping may provide some specific and additional useful data for the research and development of CRF01_AE Tat-based vaccine.

This study is to find Tat-specific CTL responses and epitope mapping in 20 untreated HIV-1 infected Thais by using gamma-interferon (IFN-γ) enzyme-linked immunospot (Elispot) assay. HIV-1 CRF01_AE based truncated Tat peptides 17-21 amino acids in length, and overlapped by 10 amino acids were used for the study. Tat-specific CTL responses were screened using 2 pools of peptides, each contains 5 truncated Tat peptides. The positive cut-off of Elispot was defined after background subtracted as ≥100 spot forming units (SFU) / 10^6 PBMCs and 2 folds higher than negative control. Patients who showed positive results were then further identified for Tat specific epitope (s).

Ten out of 20 patients (50%) showed IFN-γ-Elispot positive to pooled Tat peptides. The magnitude of responses ranged from 260-912 SFU/10^6 PBMCs (Median 498 SFU/10^6 PBMCs). Seven patients who showed positive results to the pooled peptides showed IFN-γ-Elispot positive to individual peptides. The magnitude of responses ranged from 128-1,264 SFU/10^6 PBMCs (Median = 460). Six epitopes were identified and at least one may be a novel epitope.

Tat has been targeted recently in a vaccine strategy to confine virus replication and transmission and to block or retard progression to AIDS. However, this study found similar to previously reported in the subtype C study that only one-third (35%) of HIV-1 infected individuals showed Tat-specific IFN-γ responses. Whereas other studies including our group had shown that gag- and pol-specific CTL responses much more common (80% or more). Thus, Tat may consider as a good candidate to be included in HIV vaccine design rather to Tat vaccine.

Program - Student's signature.....

Field of study Medical Science Advisor's signature.....

Academic year 2001

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude to my advisor, Assistant Professor Kiat Ruxrungtham for his valuable advice, helpful guidance, suggestions, and intellectual inspiration throughout my study and during the preparation of this study.

I would like to give my special thanks to Associate Professor Vilai Chintanez, Associate Professor Apiwat Mutirangura, and Dr. Nattiya Pimtanothai for their criticism and valuable suggestions and also for their service on the thesis committee.

I would like to thank to the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. Miss Supranee Buranapraditkun and Miss Sunee Sirivichayakul for assistance at various times in the course of this research.

Finally, I will not forget to give special thanks to my family and my friends, whose names cannot be fully listed, for their cheerfulness given to me through my graduate study and their understanding of me all the time, thank you very much.

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI) iv
ABSTRACT (ENGLISH) v
ACKNOWLEDGEMENT vi
TABLE OF CONTENTS vii
LIST OF TABLES ix
LIST OF FIGURES x
LIST OF ABBREVIATIONS xi
CHAPTER

I INTRODUCTION

- Background and Rationale 1
- Research Questions 4
- Research Objectives 4
- Limitation of the Study 4
- Key Words 4
- Conceptual Framework 5
- Expected Benefits and Application 5
- Research Methodology 6
- Administration and Time Schedule 7

II LITERATURE REVIEW

- HIV-1 Biology 8
- Classification of HIV 12
- Geographical Distribution of HIV 12
- Cellular Immunity in HIV 13
- HIV-1-specific CTL responses 15
- Control of HIV-1 infection by CTL 16
- Trans-activator of transcription 17
- Tat-specific CTL responses 17
- HIV-1 Tat protein as a potential AIDS vaccine 18
- Technique for measurement of CTL 19

TABLE OF CONTENTS (CONTINUED)

Page

III MATERIALS AND METHODS 22
IV RESULTS 26
V CONCLUSION AND DISCUSSION 39
REFERENCES 44
APPENDIX 53
BIOGRAPHY 57

LIST OF TABLES

Page

1 Clinical information of HIV-1 infected patients.....27
2 IFN-γ-Elispot responses to pooled Tat peptides in 20 patients 29
3 IFN-γ-Elispot responses to individual Tat peptides.....33
4 The magnitude of responses in patients who showed IFN-γ-Elispot positive to pooled Tat peptides.....41
5 Tat-specific IFN-γ-Elispot responses in different HIV-1 subtype infection 42

LIST OF FIGURES

Page

1 CRF01_AE CM240 genome 13
2 The MHC class I antigen presentation pathway 14
3 CTL recognition 15
4 IFN-γ-Elispot responses to pooled Tat peptides in 20 patients. 30
5 IFN-γ-Elispot responses to pooled Tat peptides 30
6 IFN-γ-Elispot responses to Tat peptides pool 1 31
7 IFN-γ-Elispot responses to Tat peptides pools 2 31
8 The number of patients who have IFN-γ-Elispot responses to individual Tat peptides 34
9 IFN-γ-Elispot responses to individual Tat peptides in each subject 34
9A Subject: PA 34
9B Subject: KK 35
9C Subject: TS 35
9D Subject: JL 36
9E Subject: CY 36
9F Subject: ST 37
9G Subject: RM 37
10 The number of patients who have IFN-γ Elispot responses to individual Tat 1, 2, and 3 peptides 38
11 Summary results of CTL epitope mapping based on IFN-γ-Elispot assay in HIV-1 CRF01_AE Tat 38
12 Tat CTL epitope map 43

LIST OF ABBREVIATIONS

AIDS	=	Acquired Immunodeficiency Syndrome
CA	=	Capsid
CD	=	Cluster of Differentiation
CO_2	=	Carbon dioxide
CRF	=	Circulating Recombinant Form
CTL	=	Cytotoxic T lymphocyte
CTLp	=	Cytotoxic T lymphocyte precursor
cu.mm.=	Cubic millimeter	
°C	=	degree Celsius
DMSO	=	Dimethyl sulphoxide
DNA	=	Deoxy Nucleic Acid
Elispot	=	Enzyme-linked immunospot
Env	=	Envelope
et al.	=	et alli
FBS	=	Fetal Bovine Serum
mg	=	milligram
Gag	=	Group-specific antigen
gp	=	Glycoprotein
Group M	=	Major group
Group N	=	Non-M and non-O group
Group O	=	Outlier group
HEPS	=	Highly Exposed but Persistently Seronegative
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
HLA	=	Human Leukocyte Antigen
IFN-γ	=	gamma interferon
IN	=	Integrase
kb	=	kilobase
kD	=	kilodalton
LTNP	=	Long-term Nonprogressor
LTRs	=	Long Terminal Repeats

MA	=	Matrix
MHC	=	Major Histocompatibility Complex
mL	=	milliliter
mRNA	=	messanger Ribosomal Nucleic Acid
µg	=	microgram
µl	=	microliter
NC	=	Nucleocapsid
Nef	=	Negative Factor
p	=	Protein
PBMC	=	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	=	Phosphate Buffer Saline
Pol	=	Polymerase
PR	=	Protease
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
SIV	=	Simian Immunodeficiency Virus
TAP	=	Transporter Associated with Processing
T cell	=	Thymus-derived lymphocyte
Tat	=	Transactivator of transcription
TCR	=	T Cell Receptor
Th cell	=	Helper T cell
TM	=	Transmembrane glycoprotein
TNF	=	Tumor Necrosis Factor
Vif	=	Viral Infectivity Factor
Vpr	=	Viral Protein R
Vpu	=	Viral Protein U