การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ E7 ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกและระยะก่อนเป็นมะเร็งที่ติดเชื้อ HPV

นางสาวรุ่งกานต์ สืบสิงห์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6775-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

HPV-E7-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES IN HPV-INFECTED PATIENTS WITH PRECANCEROUS AND CANCEROUS CERVIX

Miss Rungkarn Suebsing

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 974-17-6775-7

Thesis Title	HPV-E7-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES IN HPV-INFECTED PATIENTS WITH PRECANCEROUS AND CANCEROUS CERVIX
By	Miss Rungkarn Suebsing
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	Associate Professor Prasert Trivijitsilp, 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
(M.R. Kalaya Thingsabadh, Ph.D.)

Thesis Committee:

..... Chairman
(Associate Professor Pornthep Tiensiwakul, Ph.D.)

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

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Prasert Trivijitsilp, M.D.)

..... Member
(Associate Professor Wannee Kantakamarakul, Ph. D.)

รุ่งกานต์ สิบสิงห์: การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ E7 ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกและระยะก่อนเป็นมะเร็งที่ติดเชื้อ HPV (HPV-E7-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES IN HPV-INFECTED PATIENTS WITH PRECANCEROUS AND CANCEROUS CERVIX) อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์ นพ.ดร. ปกรัฐ หังสสูต, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. ภาวพันธ์ ภัทรโกศล, รศ. นพ. ประเสริฐ ตรีวิจิตรศิลป์; 132 หน้า ISBN 974-17-6775-7

ในปัจจุบันทั่วโลกพบว่า Cervical cancer เป็นมะเร็งอันดับ 2 ที่พบได้ในผู้หญิงทั่วโลก ประมาณ 450,000 คนต่อปี และข้อมูลทางสถิติของสถาบันมะเร็งแห่งชาติพบว่าเป็นมะเร็งที่พบมากอันดับ 1 ในผู้หญิงไทย ซึ่งพบว่าเกิดจาก HPV เป็นส่วนใหญ่ โดยตรวจพบ HPV DNA ใน 99.7 % ของ cervical cancer นอกจากนี้ยังพบ 15 high-risk HPV type ที่แยกได้จาก cervical carcinomas และตรวจพบ HPV-16 มากกว่า 50 % ของ cervical cancer สาเหตุของการเกิดและการพัฒนาเป็น cervical cancer ยังเกี่ยวข้องกับการมี persistence ของ high-risk HPV infection และ intratypic variation ของ HPV โดยการเกิด variation ใน HPV genome อาจเป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางชีววิทยาของไวรัส โดยการตอบสนองของระบบทางภูมิคุ้มกันผ่านเซลล์ที่จำเพาะพบว่า cytotoxic T lymphocyte (CTL) มีบทบาทสำคัญในการป้องกันและกำจัดการติดเชื้อจาก HPV-16 อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลในการศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่จำเพาะต่อ HPV ในประเทศไทย การวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการตอบสนองของ HPV-E7-specific T cell responses ในผู้ป่วยคนไทยที่ติดเชื้อ HPV ที่เป็น cervical intraepithelial neoplasia (CIN) และ cervical cancer (CaCx) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวัคซีนป้องกันการติดเชื้อ HPV

การศึกษาครั้งนี้จึงทำการหาลำดับเบสและกรดอะมิโน ของ HPV-16 E7 gene จาก DNA samples ที่ได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อ HPV-16 จำนวน 20 ตัวอย่าง โดยจะถูกนำมาใช้ในการออกแบบสายเปปไทด์เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อ HPV-E7 specific CD8+ T cell responses ในกลุ่มผู้ป่วย จำนวน 22 คน ซึ่งได้รับการตรวจรักษาที่ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประกอบด้วย ผู้ป่วยคนไทยที่เป็น CIN จำนวน 11 คน และ CaCx จำนวน 11 คน ด้วยวิธี Enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay และมี cord blood จำนวน 5 ราย เป็นกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ได้ศึกษาความชุกของ HPV ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2546 ถึง เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2547 โดยตรวจหาไทป์ของ HPV จากผู้ป่วย 75 คน ด้วยวิธี L1-PCR-RFLP

ผลการศึกษาความชุกของ HPV จากจำนวนสิ่งตัวอย่างทั้งหมด 75 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบการติดเชื้อของ HPV ได้ทั้งหมด 47 ตัวอย่าง คิดเป็น 62.67% เป็นตัวอย่างจากกลุ่ม CIN 41.03% และ CaCx 86.11% และเมื่อนำมาตรวจหาไทป์ด้วยวิธี RFLP พบว่าในกลุ่มผู้ป่วย CIN ติดเชื้อ HPV-16 มากที่สุด (43.75%) ในขณะที่กลุ่มผู้ป่วย CaCx ติดเชื้อ HPV-18 มากที่สุด (35.48%) ในการศึกษาการตอบสนองต่อ HPV-E7 specific CD8+ T cell responses โดยทำการหาลำดับเบสและกรดอะมิโนของ HPV-16 E7 gene เพื่อใช้ในการออกแบบสายเปปไทด์ จาก 20 ตัวอย่าง ตรวจพบการกลายพันธุ์ของ E7 gene เพียงแค่ 4 ตัวอย่าง ซึ่งมีการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งเบส 647 (A → G) ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนตำแหน่งที่ 29 จาก asparagine เป็น serine (N29S) เมื่อนำกลุ่มผู้ป่วยทั้ง CIN และ CaCx จำนวน 22 คน มาศึกษาการตอบสนองของ HPV-specific T cell โดยวิธี ELISpot assay ซึ่งกระตุ้นด้วยสายเปปไทด์ความยาว 20-mer ที่ออกแบบให้มีการ overlapping 10-mer พบว่าไม่สามารถตรวจพบ *ex vivo* HPV-specific T cell responses ได้ทั้งผู้ป่วย CIN และ CaCx จึงทำการเพิ่มจำนวน T cell โดยวิธี "cultured ELISpot assay" สามารถตรวจพบ HPV-specific T cell responses ในผู้ป่วย CIN (27.27%) มากกว่าในผู้ป่วย CaCx (10%) และพบว่าเปปไทด์ส่วนใหญ่จะมีการตอบสนองในกลุ่มผู้ป่วย CIN ในขณะที่ STHV เปปไทด์เพียงสายเดียวที่พบการตอบสนองในกลุ่มผู้ป่วย CaCx นอกจากนี้ความแรงในการตอบสนองต่อเปปไทด์ในกลุ่มผู้ป่วย CIN (1,040 - 1,640 SFU/10^6 cells) มากกว่าในกลุ่ม CaCx (188 SFU/10^6 cells) และไม่สามารถตรวจพบ HPV-specific T cell responses ในกลุ่มควบคุม

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากลุ่มผู้ป่วย CIN และ CaCx มีการตอบสนองที่แตกต่างกันทั้งความถี่และความแรงของ HPV-specific T cell โดยจะพบการตอบสนองของ HPV-specific T cell ในกลุ่มผู้ป่วย CIN มากกว่า CaCx ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวัคซีนในการป้องกันหรือรักษามะเร็งปากมดลูก

สหสาขาวิชา.....สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์. ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา .....จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4589136020: MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEYWORD: HUMAN PAPILLOMAVIRUS/ E7 GENE VARIATION/ SPECIFIC T CELL/ ELISPOT ASSAY

RUNGKARN SUEBSING: THESIS TITLE: HPV-E7-SPECIFIC IMMUNE RESPONSES IN HPV-INFECTED PATIENTS WITH PRECANCEROUS AND CANCEROUS CERVIX. THESIS ADVISOR: POKRATH HANSASUTA, M.D., D. Phil. (Oxon); THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. PARVAPAN BHATTARAKOSOL, Ph.D., ASSOC. PROF. PRASERT TRIVIJITSILP, M.D. 132 pp. ISBN 974-17-6775-7

Cervical cancer is the second leading cause of cancer deaths in women worldwide. More than 450,000 cases are diagnosed each year. The National Cancer Institute of Thailand reported that the incidence of cervical cancer was the most common among cancers in women. Human papillomavirus (HPV) infection was detected in 99.7% of cancerous cervix. Of the 15 high-risk HPV types isolated from cervical carcinomas, HPV-16 is the most frequently detected, occurring in over 50% of cervical cancers. An etiological and development of cervical cancer were associated with the persistent of high-risk HPV infection and intratypic variation. The variations of HPV genome may effect to virus virulence or divert the biological and biochemical properties. Immune responses to HPV play an important role in protection and controlling HPV infection. However, little is known about HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in HPV-infected Thai women. We are interested in exploring the role of HPV-E7-specific immune responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cervical cancer (CaCx).

In this study, twenty known HPV-16 DNA samples were identified for E7 variation. Twenty two patients were enrolled from women attending the Gynaecology Clinic at King Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok, Thailand from August 2003 to June 2004. Eleven patients with CIN and 11 patients with CaCx diagnosed and confirmed by coloposcopically and histopathology were studied HPV-E7-specific CD8+ T cell responses. Five cord blood samples were used as control group in this study. We have designed overlapping peptides that based on HPV-16 E7 Thai variant. The HPV-specific T cell responses were detected by IFN-γ ELISopt assay upon stimulation with E7 overlapping peptides. HPV typing in CIN and CaCx patients were performed on fresh and paraffin-embedded tissues section by L1-PCR-RFLP.

Forty seven out of 75 (62.67%) patients were HPV-L1 positive. The prevalence of HPV infection in CIN group was 41.03% and CaCx group was 86.11%. HPV typing was performed by RFLP. HPV-16 was predominant in CIN group (43.75%), whereas HPV-18 was predominant in CaCx group (35.48%). We sequenced HPV-16 E7 gene from 20 cases of HPV-16 infected patients and compared them with nucleotide (nt) sequence of HPV-16 reference strain. Most samples had conserved E7 gene. Only 4 out of 20 (20%) samples contained variations. Among these variations, only one non-synonymous was identified at nt 647 (A to G) resulting in a change of HPV-16-E7 amino acid at position 29 from asparagine to serine (N29S). In HPV immune responses study, we have used overlapping peptides spanning HPV-E7 protein to perform the HPV-E7-specific CD8+ T cell responses by ELISpot assays. Unexpectedly, no *ex vivo* HPV-E7-specific CD8+ T cell responses were detected in PBMC of CIN and CaCx patients. We augmented the frequency of the T cell response by "cultured ELISpot assay". HPV-E7-specific CD8+ T cell responses were detected in 27.27% of patients with CIN while only 10% of CaCx patients had the T cell responses. Almost peptides mediated detectable HPV-specific responses in CIN patients, whereas there was one peptide, STHV peptide, was recognised by CaCx patients. The magnitude of response to E7 peptide in CIN group (1,040 - 1,640 SFU/10^6 cells) were greater than that of CaCx groups (188 SFU/10^6 cells).

Our study demonstrated the differences of the HPV-specific T cell responses in CIN and CaCx patients. They did not only target different peptide epitopes, they also had different magnitude of responses. The information obtained from this study will lay the foundation for HPV vaccine development.

Inter-Department...Medical Microbiology.....
Field of study.....Medical Microbiology.....
Academic year.....2004.....

Student's signature....Rungkarn Sub.....
Advisor's signature....P. Hansasuta.....
Co-advisor's signature....Parvapan Bhattarakosol.....
Co-advisor's signature....Prasert Trivijitsilp.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest to the following individuals who have helped making this thesis possible:

My sincere gratitude and appreciation to my advisor, Dr. Pokrath Hansasuta, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for him excellent supervision, guidance, kindness, devotion which has enabled me to carry out my study successfully.

I am particularly grateful to Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Associate Professor Dr. Prasert Trivijitsilp, Department of Obstretics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for their valuable suggestions and comments for completeness of the thesis.

I am indebted to the Graduate School, Chulalongkorn University, for funding of my study.

I am greatly indebted to the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for giving the opportunity of my study.

I would like to extend my appreciation to the staff at the Department of Obstretics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Associate Professor Dr. Kiat Rukrungtham, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, and Miss Supranee Buranapraditkun, for theis helps in providing facilities during the period of this study.

I would like my friends for their wonderful friendship, help and understanding.

I also would like to many thanks my daddy and mama for consultant, encouragement, cheers up, understanding and all supports.

I also would like to many thanks my bad boy, Top, for a smile and joy in my life.

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

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... iv
ENGLISH ABSTRACT.....v
ACKNOWLEDGEMENTS.....vi
CONTENTS.....vii
LIST OF TABLES..... x
LIST OF FIGURES..... xii
ABBREVIATONS..... xiv
CHAPTER
I. INTRODUCTION..... ..1
II. OBJECTIVES..... ..4
III. REVIEW OF LITERATURE.....5
Structure.....5
Classification and antigenic diversity (variation).....8
Epidemiology.....12
Biologic characteristics.....12
HPV Life-cycle.....15
Pathogenesis.....15
Clinical manifestations.....18
Immune response 23
Diagnosis of HPV infections..... 27
Analysis of CD8+ T cell response.....31
IV. MATERIALS AND METHODS.....33
Part I. Samples.....33
Part II. HPV detection in tissue section.....33
1. Extraction of DNA from tissue samples..... 33
2. Preparation of standard HPV-DNA.....34
3. Quantitative analysis of DNA extraction..... 35
4. HPV-DNA detection and typing..... 35
4.1 Amplification of HPV L1 gene..... 35

CONTENTS (continued)

Chapter Page

4.2 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)..... 36
Part III. HPV-E7 specific CD8+ T cell responses..... 40
1. Design of E7-overlapping peptides..... 40
1.1 HPV-16 E7 gene Sequencing..... 40
1.1.1 Amplification of HPV-16 E7 gene..... 40
1.1.2 Purification of HPV-16 E7 gene PCR product..... 40
1.1.3 Preparation of purified DNA for sequencing. 41
1.1.4 Sequencing analysis..... 41
1.2 Synthesis of overlapping peptide..... 41
2. Detection of HPV-E7-specific CD8+ T cell responses.. 42
2.1 Preparation of peripheral blood mononuclear cell (PBMC)..... 42
2.2 ELISpot assays..... 42
2.2.1 *ex vivo* ELISpot assay..... 42
2.2.2 Cultured ELISpot assay..... 43
2.3 CD8+ T cell depletion..... 43
V. RESULTS..... 44
1. HPV detection by L1-PCR..... 44
2. HPV detection and typing in patients..... 51
2.1 Demographic and clinical information..... 51
2.2 Prevalence of HPV infection in patients with CIN and CaCx..... 51
2.3 Prevalence of HPV types in patients with CIN and CaCx... 51
3. Analysis of HPV-E7-specific CD8+ T cell responses..... 62
3.1 Design of HPV-E7 overlapping peptide..... 62
3.1.1 Nucleotide and amino acid sequence of HPV-E7..... 62
3.1.2 Overlapping peptide..... 68

CONTENTS (continued)

Page

3.2 Enumeration of HPV-E7-specific CD8+ T cells by IFN-γ ELISpot assays..... 70
3.2.1 HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in CIN patients..... 70
3.2.2 HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in CaCx patients..... 81
3.2.3 Comparison of HPV-E7-specific CD8+ T cell responses between CIN and CaCx patients..... 88
3.3 HPV-E7-specific CD8+ T cell depletion..... 90
3.4 Detection of HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in control group..... 92
VI. DISCUSSION..... 97
REFERENCES..... 104
APPENDICES..... 124
APPENDIX I..... 125
APPENDIX II..... 128
BIOGRAPHY..... 131

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1. A description of the functions of HPV open-reading frames 7
2. HPV types and disease association..... 19
3. The Bethesda classification system for cervical squamous cell dysplasis..... 21
4. CTL epitopes of HPV-16 E6 and E7 proteins for five Common HLA types..... 25
5. Comparison of method for the detection of HPV nucleic acids 30
6. Sequence of oligonucleotides used as primers for HPV L1 gene amplification 37
7. RFLP patterns of HPV L1 genes amplified by MY09/11 primer set..... 38
8. RFLP patterns of HPV L1 genes amplified by L1C1/C2 primer set..... 39
9. The efficiency of HPV-L1 PCR detection by MY09/11 primer set and L1C1/C2 primer set on paraffin-embedded tissues..... 50
10. The demographic and clinical information of CIN and CaCx group..... 53
11. The results of patients were detected by L1 PCR..... 54
12. Schematic of L1C1/C2 L1-PCR product restriction pattern 56
13. The 20 amino acid overlapping peptides spanning HPV-16-E7 protein..... 69
14. Demographic information of CIN patients who enrolled in the study of HPV-E7-specific CD8+ T cell response 72
15. *ex vivo* HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in 11 patients with CIN..... 73
16. HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in 11 patients with CIN by cultured ELISpot assay..... 75
17. Demographic information of CaCx patients who enrolled in the study of HPV-E7-specific CD8+ T cell response..... 82
18. *ex vivo* HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in PBMC of 11 patients with CaCx..... 83
19. HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in 10 patients with CaCx by cultured ELISpot assay..... 85

LIST OF TABLES (continued)

Table Page

20. HPV-E7-specific CD8+ T cell depletion in 3 patients 91
21. *ex vivo* HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in control group..... 93
22. HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in control group by cultured ELISpot assay.....95

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figures Page

1. Map of HPV-16 genome 6
2. Phylogenetic tree of papillomaviruses 10
3. The classification of HPV-16 variants is based on E6 gene 11
4. Prevalence of HPV DNA in CaCx cases and controls 14
5. The HPV life-cycle..... 17
6. Aetiological model of HPV infection 22
7. The sensitivity of HPV L1-PCR using MY09/11 primer 45
8. The sensitivity of HPV L1-PCR using L1C1/C2 primer..... 46
9. Amplification of L1 gene in 7 standard HPV DNA using MY09/11 primer set 47
10. Amplification of L1 gene in 7 standard HPV DNA using L1C1/C2 primer set..... 48
11. Amplification of human β-globin gene from clinical specimens 49
12. Amplification of HPV-L1 gene from clinical specimens 55
13. Restriction patterns of HPV-6 and HPV-11 L1-PCR products..... 57
14. Restriction patterns of HPV-16 and HPV-18 L1-PCR products..... 58
15. Restriction patterns of HPV-31 and HPV-33 L1-PCR products..... 59
16. RFLP patterns of the L1-PCR product from there clinical specimens..... 60
17. RFLP patterns of the L1-PCR product from there clinical specimens 61
18. The sensitivity of E7-PCR 63
19. The specificity of E7-PCR..... 64
20. Amplification of the E7-PCR product from clinical specimens..... 65
21. Nucleotide and amino acid sequence of standard HPV-16 E7 gene..... 66
22. Nucleotide and amino acid sequence of HPV-16 E7 gene from clinical samples..... 67
23. *ex vivo* HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in 11 patients with CIN... 74
24. Mean of HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in 3 patients with CIN by cultured ELISpot assay..... 76

LIST OF FIGURES (continued)

Figures Page

25. Frequency of overlapping peptides responses in CIN patients.....77
26. Only one CIN patient with HPV-16 infection
recognised HPV-16 E7 peptide.....78
27. One patient without detectable HPV infection
recognised DLYCv peptide.....79
28. The patient YP broadly recognised E7 overlapping peptides.....80
29. *ex vivo* HPV-E7-specific CD8+ T cell responses
in 11 patients with CaCx.....84
30. HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in 10 patients
with CaCx by cultured ELISpot assay.....86
31. Only one patient with cervical cancer had detectable
HPV-E7 specific CD8+ T cell responses 87
32. Comparison of HPV-E7-specific CD8+ T cell responses between
CIN and CaCx patients.....89
33. *ex vivo* HPV-E7-specific CD8+ T cell responses 5 cord blood samples
by IFN-γ release ELISpot assay.....94
34. HPV-E7-specific CD8+ T cell responses in 5 cord blood samples
by cultured ELISpot assay.....96

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

ASC-US	Atypical squamous cells of undetermined significance
ASC-H	Atypical squamous cells, cannot exclude HSIL
bp	Base pair
°C	Degree Celsius
CaCx	Cervical cancer
CIN	Cervical intraepithelial neoplasia
CIS	Carcinoma *in situ*
CK II	Casein Kinase II
cm	Centimetre
CMIR	Cell-mediated immune responses
CO_2	Carbon dioxide
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
DB	Dot-blot hybridization
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DW	Distilled water
E6AP	E6 associated protein
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EIA	Enzyme-linked immunoassay
ELISpot	Enzyme-linked immunospot
EV	Epidemodysplasia verruciformis
et al	et alii
FBS	Fetal bovine serum
fg	Framtogram
FISH	Filter *in situ* hybridization
GE	Gel electrophoresis
HC	Hybrid capture
HIR	Humoral immune response
HLA	Human leukocyte antigen

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS (continued)

HPV	Human papillomavirus
HSIL	High-grad squamous intraepithelial lesion
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICS	Intracellular-cytokine staining
IFN-α	Interferon alpha
IFN-γ	Interferon gamma
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IL-2	Interleukin-2
IL-7	Interleukin-7
IL-18	Interleukin-18
IRF	Interferon regulatory factor
ISGF	Interferon-stimulated gene factor
ISH	*in situ* hybridization
KCL	Potassium chloride
k-Da	Kilodalton
kp	Kilobase pairs
LCR	Long control region
LDA	Limiting dilution analysis
LSIL	Low-grad squamous intraepithelial lesion
M	Molar
MAP	Mitogen-activated protein
mAb	Monoclonal antibody
$MgCl_2$	Magnesium chloride
MHC	Major histocompatibility complex
mg	Milligram
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millilitre
mM	Millimolar
m RNA	messenger Ribonucleic acid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS (continued)

nM	Nanomole
nm	Nanometre
NK cell	Natural killer cell
OD	Optical density
ORF	Open reading frames
Pap	Papanicolaou-stain
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Phytohemagglutinin
pmole	Picomole
pRB	Retinoblastoma tumour suppressor protein
R10	10% fetal bovine serum in RPMI 1640
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RIA	Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Round per minute
SB	Southern blot hybridization
sec	Second
SFU	Spot forming unit
TAP	Transporters associated with antigen processing
TBE	Tris-borate ethylenediamine tetraacetic acid
TCR	T cell receptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
µg	Microgram
µl	Microliter
µm	Micrometre
UV	Ultraviolet
WBC	White blood cell

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย