รายงานการวิจัย

ประสิทธิภาพในฐานะเป็นกลไกหลบหลีกภูมิคุ้มกันผ่านทีเซลล์ต่อเอชไอวี

Translation efficiency as a mechanism for subversion of T-cell immunity against HIV

ผศ.นพ.ดร.ปกรัฐ หังสสูต

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ ประเภทเงินอุดหนุนการวิจัยจากรัฐบาล

ประจำปีงบประมาณ 2560

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2560 ขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกทางด้านสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย ท้ายที่สุด ผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครในโครงการที่ได้เล็งเห็นความสำคัญและให้ความร่วมมือเพื่อความสำเร็จแก่โครงการวิจัยนี้

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของทีเซลล์และหากลไกที่เชื้อไวรัสเอชไอวีใช้ในการหลบหลีกจากภูมิคุ้มกัน

วิธีดำเนินการทดลอง: รวบรวมอาสาสมัครที่ติดเชื้อเอชไอวี ที่มีระดับซีดีสี่มากกว่า 450 cells/μL จากคลินิกนิรนาม สภากาชาดไทย โดยแบ่งอาสาสมัครเป็น 2 กลุ่ม ตามปริมาณไวรัสในกระแสเลือด (VL) เป็น viraemic controllers (VC) (VL<2,000 cp/mL) และ non-controllers (NC) (VL>2,000 cp/mL) จากนั้นเก็บเลือดเพื่อนำมาทดสอบการตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวีส่วน Gag p24 ด้วยวิธี IFNγ ELISpot assay และทำการหาลำดับสารพันธุกรรมเพื่อใช้ในการวิเคราะห์กลไกที่ใช้ในการหลบหลีกจากภูมิคุ้มกัน

ผลการทดลอง: VC มีจำนวน 23 คน และ NC มีจำนวน 41 คน โดยที่ปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อายุ เพศ รสนิยมทางเพศ การมี protective alleles (HLA-B27, -B57, -B58) นั้นไม่แตกต่างกัน จากการทดสอบการตอบสนองต่อโปรตีน Gag p24 ด้วยวิธี IFNγ ELISpot assay โดยกระตุ้นด้วยเอพิโทปที่จำเพาะต่อชนิดของเอชแอลเอของอาสาสมัคร พบว่ามีอาสาสมัครจำนวนหนึ่งที่ไม่สามารถตอบสนองต่อเอพิโทปดังกล่าวได้ (Non-responder) กล่าวคือ อาสาสมัครที่มี HLA-B27 ที่ไม่ตอบสนองต่อ KK10 นั้น มีสาเหตุจากการมี HLA polymorphism เป็น HLA-B2706 แทนที่จะเป็น HLA-B2704 หรือ HLA-B2705 อาสาสมัครที่มี HLA-B57 เมื่อทดสอบด้วย TW10 นั้น พบว่าผู้ที่ไม่ตอบสนองมี mutation ที่ตำแหน่ง T242N และเมื่อทดสอบด้วย QW9 พบว่าผู้ที่ไม่ตอบสนอง มี mutation ที่ตำแหน่ง T3S ในขณะที่อาสาสมัครที่มี HLA-A11 เมื่อทดสอบด้วย AK11 นั้นไม่พบการกลายพันธุ์ในระดับโปรตีน แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระดับนิวคลีโอไทด์ (codon usage) ที่ตำแหน่ง anchor residue ซึ่งตรงกับกรดอะมิโนไลซีน กล่าวคือ ผู้ที่มีการตอบสนองต่อ AK11 มักใช้ codon AAG ในขณะที่ผู้ที่ไม่ตอบสนองมักใช้ AAA ในการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนไลซีน โดยสรุปจากศึกษาในครั้งนี้สามารถนำความรู้ที่ได้เกี่ยวกับกระบวนที่ไวรัสใช้ในการหลบหลีกจากภูมิคุ้มกันไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวัคซีนต่อไปในอนาคต

Abstract

Objective: To compare T cell response and to identify the mechanism of escape in HIV-infected volunteers.

Methods: HIV-infected volunteers (CD4>450 cells/μL) were enrolled from the anonymous clinic. Volunteers were classified into two groups based on HIV plasma viral load; viraemic controllers (VC) (VL<2,000 cp/mL) and non-controllers (NC) (VL>2,000 cp/mL). EDTA-whole blood was collected and determined the response against Gag p24 by IFNγ ELISpot assay. Population sequencing within the Gag p24 region was performed to identify escape mutations.

Results: Demographic data [age, gender, sexual preference and the presence of protective alleles (HLA-B27, -B57 and –B58)] between VC (n=23) and NC (n=41) were no statistical significance. IFNγ-secreting cells response against Gag p24 as determining by ELISpot assay revealed that some volunteers could not respond to epitopes which are restricted by their HLA alleles (termed as non-responder). The HLA-B27-KK10 non-responders contain HLA polymorphism, HLA-B2706 which accommodates different amino acid with HLA-B2704 and HLA-B2705. The HLA-B57-TW10 and QW9, non-responders did not respond because escape mutation (T242N and T3S, respectively) was found within non-responders' sequences. Interestingly, HLA-A11-AK11 epitope at the amino acid level was not different among responders and non-responders. Codon usages were subsequently compared and it was found that at the C-terminal position (K; Lysine) preferred different codons for translating to lysine. AAG codon is more preferable in AK11-responders while AAA codon is preferred in AK11 non-responders. In conclusion, these findings may contribute to better knowledge on HIV pathogenesis and the way to improve vaccine efficacy in the future.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
1. บทนำ	8
2. การทบทวนวรรณกรรม	13
3. ระเบียบวิธีวิจัย	22
4. ผลการวิจัย	24
5. อภิปรายและวิจารณ์ผล	35
6. สรุปผลและข้อเสนอแนะ	36
7. เอกสารอ้างอิง	37

สารบัญตาราง

หน้า

1. ข้อมูลทางประชากรศาสตร์ 27

2. ตารางแสดงความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด 28

3. ตารางสรุปผล ELISpot 31

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ART	Antiretroviral treatment
ELISpot	Enzyme-linked immunospot assay
HEPS	Highly-exposed but persistently seronegative persons
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human leukocyte antigen
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
NC	Non-controller
VC	Viraemic controller

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคเอดส์ (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) และการติดเชื้อ HIV (Human Immunodeficiency Virus, HIV) เป็นปัญหาระดับโลก และยังคงเป็นปัญหาสำหรับประเทศไทยแม้ว่าการรับรู้ปัญหานี้ผ่านสื่อจะลดลงมากจนบางครั้งเข้าใจว่าประเทศไทยไม่มีปัญหาเรื่องโรคเอดส์แล้ว การใช้ยาต้านไวรัส (Antiretroviral treatment, ART) ช่วยลดอัตราการตาย และอัตราการเจ็บป่วยจากโรคติดเชื้อฉวยโอกาสได้อย่างมาก แต่ยังคงมีปัญหาที่ไม่ได้รับการแก้ไขจากการติดเชื้อ HIV หลายประการด้วยกัน อาทิ การรับประทานยาตลอดชีวิตซึ่งต้องตรงเวลาทุกวัน การดื้อยา ผลข้างเคียงจากยา และโรคที่เป็นผลจาก immune activation เป็นต้น ดังนั้นการป้องกันการติดเชื้อ HIV น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีกว่าสำหรับการแก้ปัญหาการติดเชื้อ HIV และโรคเอดส์

นักวิทยาศาสตร์ได้เริ่มพัฒนา HIV vaccine ตั้งแต่ค้นพบว่าไวรัส HIV เป็นสาเหตุของโรคเอดส์ แต่การทดสอบวัคซีนป้องกัน HIV ประสบความล้มเหลวมาตลอด วัคซีนบางชนิดทำให้ผู้รับวัคซีนเสี่ยงต่อการติดเชื้อ HIV มากขึ้นเสียด้วยซ้ำ วัคซีนที่นักวิทยาศาสตร์คิดว่าใกล้เคียงระดับมีประสิทธิภาพมากที่สุดได้แก่ วัคซีนที่ทดสอบประสิทธิภาพ (Phase 3) ในประเทศไทย (RV144) เมื่อคำนวนแล้วพบว่าวัคซีนดังกล่าวป้องกันการติดเชื้อได้ 31% และเมื่อพิจารณาในรายละเอียดของค่าทางสถิติจะเห็นได้ว่า ความแตกต่างของผู้ได้รับวัคซีนจริงและวัคซีนหลอก (placebo) มีค่า p เกือบไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าจะมีข้อมูลว่าถ้าวิเคราะห์การป้องกันการติดเชื้อในช่วงเวลาได้รับวัคซีนไม่นาน ประสิทธิภาพของการป้องกันอาจมากถึงกว่า 60% ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ผลดี แต่มีการลดลงของภูมิคุ้มกันในเวลาต่อมา แต่การศึกษาดังกล่าวก็ไม่ได้ถูกออกแบบมาตอบคำถามดังกล่าว ปัญหาหลักของการพัฒนา HIV/AIDS vaccine ในอดีตได้แก่ การขาดความรู้เรื่องกลไกทางภูมิคุ้มกันที่ใช้สำหรับป้องกัน หรือควบคุมการติดเชื้อ HIV (Immune correlates to protection) หรืออาจกล่าวได้ว่านักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาวัคซีนชนิดนี้ขึ้นโดยการตั้งสมมติฐานว่า การได้รับโปรตีน หรือยีนของไวรัสที่ถอดรหัสให้โปรตีนจะสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันซึ่งป้องกันการติดเชื้อ HIV ได้ดังเช่นวัคซีนป้องกันไวรัสชนิดอื่นที่ได้รับความสำเร็จมาในอดีต (Empirical vaccine design) เงินหลายพันล้านเหรียญสหรัฐ นักวิทยาศาสตร์จำนวนหลายพันคน และเงินวิจัยหลายพันล้านเหรียญสหรัฐได้แสดงให้เห็นว่าวัคซีนชนิดนี้ไม่สามารถใช้กระบวนทัศน์ (paradigm) ในการพัฒนาวัคซีนแบบดั้งเดิมได้อีกต่อไป

ปัญหาที่สำคัญยิ่งของการศึกษาเพื่อวิเคราะห์กลไกทางภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการป้องกันการติดเชื้อ HIV ได้แก่ การขาดกลุ่มตัวอย่างที่ติดเชื้อ HIV แล้วหายขาดได้ (spontaneous clearance of HIV) ทำให้นักวิทยาศาสตร์ไม่สามารถนำกลุ่มตัวอย่างมาศึกษาได้ว่า ฅนเหล่านี้ใช้กลไกอะไรในการกำจัดเชื้อ HIV ในอีกกรณีหนึ่งที่สามารถศึกษากลไกที่ใช้ป้องกันการติดเชื้อ HIV ได้ ได้แก่กลุ่มฅนที่สัมผัสเชื้อแต่ไม่ติด (Highly-exposed but persistently seronegative persons, HEPS) เช่น กลุ่มทารกที่เกิดจากมารดาที่ติดเชื้อ HIV และกลุ่ม HIV serodiscordant couples สำหรับการศึกษาในกลุ่มแรกทำได้ยากแล้วในปัจจุบัน เนื่องจากมีการให้ยาต้านไวรัสในหญิงตั้งครรภ์และทารก ส่วนในกลุ่มที่มีเพศสัมพันธ์กัน โดยฝ่ายหนึ่งติดเชื้อแต่อีกฝ่ายไม่ติดเชื้อ (HIV serodiscordant) นั้น มีความยากลำบากในการ enrol อาสาสมัคร เนื่องจากมีปัจจัยที่เป็นรายละเอียด จำเป็นต้องใช้การสัมภาษณ์ในเรื่องส่วนตัวค่อนข้างมาก และมีปัจจัยอื่น (non-immunological factors) ที่มีผลต่อการไม่ติดเชื้อ ทำให้เกิดความไม่สม่ำเสมอ (heterogeneity) ของกลุ่มตัวอย่าง และมีปัญหาในการแปลผล

นอกจาก การศึกษาในกลุ่ม HEPS ที่จะนำไปสู่วัคซีนป้องกันการติดเชื้อ (prophylactic vaccine) แล้ว การศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะพิเศษบางประการอาจนำไปสู่การพัฒนาวัคซีนที่ใช้ในการควบคุม HIV ให้อยู่ในระดับที่ไม่ทำอันตรายต่อผู้ติดเชื้อ แนวคิดในลักษณะนี้ได้มากจากการเทียบเคียงกับไวรัสในตระกูล Herpesviridae เช่น Cytomegalovirus (CMV) และ Epstein-Barr virus (EBV) เป็นต้น ไวรัสในตระกูลนี้ทำให้เกิด persistent infection ตลอดชีวิตของผู้ติดเชื้อ แต่ส่วนใหญ่แล้วไม่เกิดอันตรายต่อผู้ติดเชื้อ ยกเว้นในกรณีของการเกิดภูมิคุ้มกันบกพร่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อภูมิคุ้มกันของ T cells สูญเสียการทำงานแบบปกติไป อย่างไรก็ตาม ในขณะที่ผู้ติดเชื้อ CMV และ EBV ส่วนใหญ่ไม่มีอาการ และไม่มีไวรัสที่ตรวจพบได้ในเลือดในช่วงการติดเชื้อแบบ latent infection แต่ผู้ที่ติดเชื้อ HIV เกือบทั้งหมดมีไวรัสที่ตรวจพบในในกระแสเลือด และส่วนมากมีระดับไวรัสในปริมาณค่อนข้างสูง (15,000 -20,000 copies/ml) กลุ่มผู้ติดเชื้อกลุ่มนี้เรียกว่า Typical progressors หรือ non-viraemic controllers หรือ non-controllers ในกลุ่มผู้ติดเชื้อ HIV ส่วนน้อย (3%) สามารถควบคุมให้ระดับไวรัสอยู่ต่ำกว่า 2,000 copies/ml โดยไม่ต้องใช้ยาต้านไวรัส กลุ่มผู้ติดเชื้อกลุ่มนี้เรียกว่า viraemic controllers นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจกลุ่ม viraemic controllers เป็นอย่างมากเพื่อใช้ในการศึกษาภูมิคุ้มกันที่สามารถควบคุมการติดเชื้อ HIV ซึ่งความรู้ที่ได้จากการศึกษากลไกควบคุมการติดเชื้อ HIV นี้จะนำไปสู่การพัฒนา HIV/AIDS vaccine ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีคุณภาพทำให้สามารถควบคุม HIV ได้ในลักษณะคล้ายคลึงกับการติดเชื้อ CMV และ EBV (disease-modifying vaccine)

มีหลักฐานที่เชื่อถือได้ว่าโปรตีนโครงสร้างส่วนที่เรียกว่า gag โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนย่อยที่มีขนาด 24 kD (p24) สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี ผู้ที่มีภูมิคุ้มกันผ่าน T cells จำเพาะต่อ gag จะมีปริมาณไวรัสต่ำกว่าผู้ที่ไม่มีการตอบสนองต่อโปรตีนของไวรัสส่วนนี้ ในงานกลุ่มเราก็ได้แสดงให้เห็นเช่นกันว่า T cells ของอาสาสมัครในกลุ่ม viraemic controller ที่จำเพาะต่อ p24 มีคุณภาพกว่ากลุ่ม non-controller อย่างไรก็ตาม Human Leucocyte Antigen (HLA) ที่เป็นโมเลกุลซึ่งนำเสนอแอนติเจนใน viraemic controllers ฅนไทยมีความแตกต่างจากผู้ติดเชื้อ

ผิวขาว หรือผู้ติดเชื้อผิวดำ ในขณะที่ผู้ติดเชื้อคอเคเซียนและอัฟริกันซึ่งมี good clinical outcome (เช่น มีปริมาณไวรัสต่ำ หรือมีการดำเนินของโรคช้า) มักมี HLA เป็น HLA-B*27 หรือ HLA-B*57/58 (protective alleles) แต่น่าสนใจว่า viraemic controllers ในประชากรไทยไม่ได้มี protective alleles เหล่านี้ มีความเป็นไปได้ว่า target epitopes ที่ถูกนำเสนอโดย HLA-B*27 และ HLA-B*57/58 มีการกลายพันธุ์ไป และมี HLA อื่นที่สามารถเสนอ target ที่ดีใน viraemic controllers เหล่านี้ หรืออาจเป็นไปได้ว่าผลการเปรียบเทียบระหว่าง viraemic controllers และ non-controllers ในอดีตเกิดจาก CD4 T-cell help ที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มอาสาสมัคร 2 กลุ่มนี้

เพื่อตอบคำถามวิจัยที่สำคัญซึ่งจะนำไปสู่ rationale vaccine design นี้ ผู้วิจัยจะ recruit อาสาสมัครเพิ่มเติมทั้งกลุ่ม viraemic controllers และ non-controllers โดยให้มี CD4 counts ปริมาณใกล้เคียงกัน ศึกษา T cell response ต่อ p24 antigen วิเคราะห์การกลายพันธุ์ และศึกษาว่าการกลายพันธุ์ดังกล่าวมีผลต่อ clinical outcome และ T-cell response หรือไม่ ผู้วิจัยเชื่อว่าการศึกษาวิจัยนี้จะนำไปสู่การสถาปนาความรู้เกี่ยวกับ correlates to protective immunity to HIV infection และมีผลประยุกต์โดยตรงในการพัฒนา disease-modifying vaccine สำหรับ HIV/AIDS disease

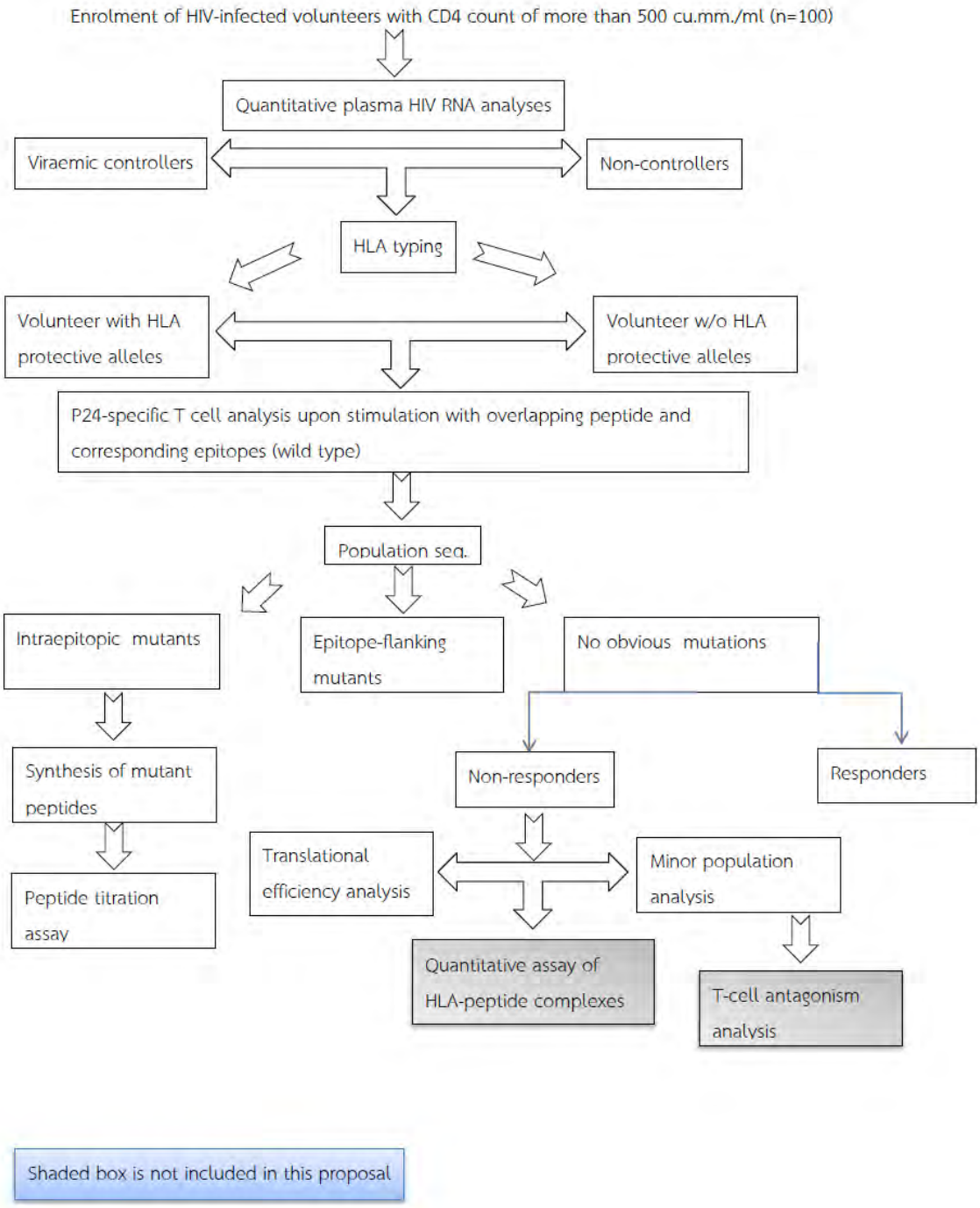
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันผ่านทีเซลล์ในผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่มีผลการดำเนินโรคดีเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการดำเนินโรคแบบปกติ
2. เพื่อเปรียบเทียบการกลายพันธุ์ของโปรตีนของเอชไอวีที่ถูกคัดเลือกโดยทีเซลล์ในกลุ่มที่มีและไม่มีเอชแอลเอที่ดี
3. เพื่อพัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบประสิทธิภาพในการแปลรหัสระดับเปปไทด์

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างจากอาสาสมัครที่ได้รับการอนุญาตอย่างถูกต้อง และใช้วิธีการมาตรฐานในการดำเนินการทดลองและมีการอ้างอิงแล้ว

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



การทบทวนวรรณกรรม

Human Immunodeficiency virus เป็นไวรัสที่อยู่ใน Family Retroviridae และอยู่ใน Genus Lentivirus สารพันธุกรรมของไวรัสชนิดนี้เป็น RNA สายเดี่ยวแบบ positive sense 2 เส้น สารพันธุกรรมล้อมรอบด้วยโครงสร้างที่เป็น capsid รูปกรวย capsid นี้ประกอบด้วยโปรตีน p24 ชั้นนอกสุดของ HIV เป็น envelope ที่มีลักษณะเป็น lipid bilayer ที่ได้จาก host cell membrane ตอน budding ออกมา บน envelope มี glycoprotein spikes ที่ประกอบด้วย gp120 ที่เป็น knob อยู่ด้านนอกสุด และ gp41 ที่เป็น transmembrane glycoprotein Genome ของ HIV ประกอบด้วย 3 reading frames ที่เหลื่อมกันและถอดรหัสได้โปรตีน 9 ชนิด ได้แก่ Gag, Env, Pol, Tat, Rev, Vpu, Vpr, Vif และ nef

Gag เป็น structural protein ประกอบด้วย p17 (matrix), p24 (capsid) และ p7 (nucleocapsid) นอกจาก p24 ที่เป็น capsid แล้ว p7 ที่เป็น nucleocapsid ยังช่วยปกป้อง HIV RNA อีกด้วย ส่วน p17 เป็น functional protein มากกว่า structure protein โดยทำหน้าที่ target gag-pol polyproteins ไปยัง cell membrane และทำหน้าที่เป็น nuclear co-localisation ของ HIV genome โปรตีนโครงสร้างอีกชนิดหนึ่งได้แก่ Env ที่ประกอบด้วย gp120 และ gp41 ไกลโคโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ช่วยเรื่อง binding และ entry ของ HIV ดังจะได้กล่าวต่อไป Pol เป็นโปรตีนประกอบด้วย enzyme ในบางตำราจัด Pol เป็น structural proteins แต่บางตำราจัดเป็นกลุ่มใหม่ได้แก่ catalytic proteins ประกอบด้วย Reverse transcriptase (RT), Protease และ Integrase RT เป็นโปรตีนที่มีหลายหน้าที่ โดยสามารถเปลี่ยน HIV RNA เป็น dsDNA (reverse transcription), ทำหน้าที่เป็น DNA polymerase จาก template ที่เป็น DNA หรือ RNA และทำหน้าที่เป็น ribonuclease H โดยตัดสาย RNA จาก DNA-RNA heteroduplexes ส่วน Tat และ Rev เป็น regulatory protein โปรตีนกลุ่มสุดท้ายของ HIV ได้แก่ Accessory proteins ประกอบด้วย Vpu, Vpr, Vif และ Nef โปรตีน Nef เป็นหนึ่งในโปรตีนของ HIV ที่ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ เนื่องจากมันสามารถ downregulate CD4 และ HLA class I molecules ได้

Target cells หลักของ HIV ได้แก่ $CD4^+$ T cells และ macrophage โดยไวรัสจับกับ CD4 ที่เป็น primary receptor และ CCR5 หรือ CXCR4 ที่เป็น co-receptors (1, 2) แล้วมีการเป็นโครงสร้างเป็น coiling-supercoiling structure ทำให้เกิดการ fusion ของ gp41 กับ plasma membrane และปล่อยไวรัสเข้าสู่เซลล์ HIV เราสามารถแบ่ง HIV ตาม coreceptor usage ได้ 3 ชนิดได้แก่ R5 virus (ไวรัสที่ติดเชื้อเซลล์ที่มี CCR5 บนผิวเซลล์ ได้แก่ macrophage และ T cells), X4 (ไวรัสที่ใช้ CXCR4 เป็น coreceptor ซึ่งแสดงออกบน T cells เท่านั้น) และ X4R5 virus (ไวรัสที่ใช้ coreceptors ได้ทั้ง 2 แบบ) หลังจาก HIV RNA ถูกปลดปล่อยเข้าสู่ cytoplasm ของ infected cell แล้ว จะเกิด reverse transcription โดยอาศัย Reverse transcriptase ได้ dsDNA ในที่สุด หลังจากนั้นจะเข้าสู่นิวเคลียสแทรกตัวเข้ากับ DNA ของ host genome เป็น provirus จนกว่าจะโดน activated เมื่อเกิด activation จะมีการ replication ของ genome พร้อมทั้งเกิดกระบวนการ transcription และ translation ได้เป็น viral proteins ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่โปรตีนบางชนิด เช่น gag-pol polyproteins ยังอยู่ภาวะ immature proteins ที่ยังทำงานไม่ได้ แต่จะถูก viral protease ย่อยให้เป็นโปรตีนที่ทำงานได้ หลังจากกระบวน assembly และ budding เสร็จสิ้นแล้ว เรียกขั้นตอนสุดท้ายนี้ว่า maturation process

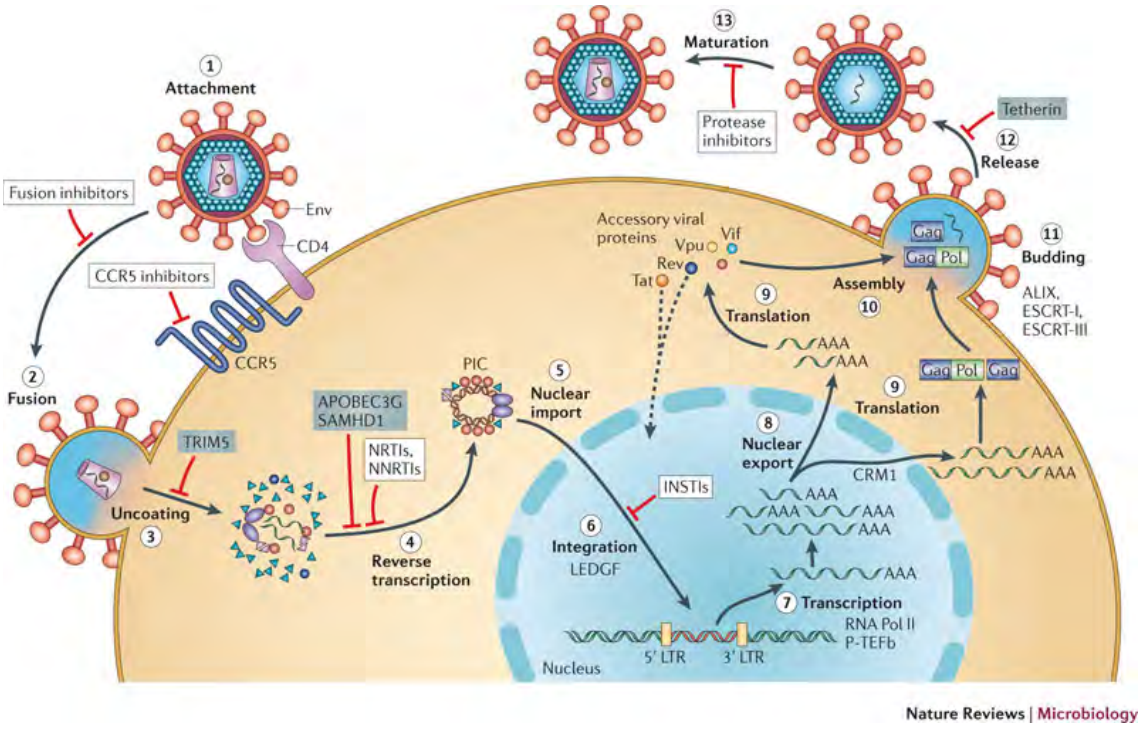


Figure 1 HIV replicative cycle (3)

HIV สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดหลักได้แก่ HIV-1 และ HIV-2 โดยมีลักษณะของ genome ที่แตกต่างกัน การดำเนินของโรคที่ไม่เหมือนกัน และที่มาของไวรัสแตกต่างกันออกไป โดย HIV-1 มียีโนมที่คล้าย Simian immunodeficiency virus ของชิมแปนซีมากกว่า (SIVcpz) (4) ส่วน HIV-2 มีสารพันธุกรรมคล้าย SIV ของ Sooty mangabey (SIVsm) (5) และผู้ติดเชื้อ HIV-2 มี clinical course ที่รุนแรงน้อยกว่า HIV-1 มาก(6) ไวรัสที่ระบาดทั่วโลกขณะนี้ส่วนใหญ่เป็น HIV-1 ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 3 กลุ่ม ได้แก่ M (major), O (outlier) และ N (non-M, non-O) กลุ่ม M นับว่าเป็นกลุ่มที่มีการระบาดมากที่สุด และมีความหลากหลายของสายพันธุ์มากที่สุด โดยสามารถแบ่งเป็น subtype (หรือ clade) A, B, C, D, F1, F2, G, H, J และ K และยังมีสายพันธุ์ลูกผสม (circulating recombinant form, CRF) อีกหลายสายพันธุ์ สายพันธุ์ HIV ที่ระบาดในประเทศไทยได้แก่ สายพันธุ์ลูกผสม AE (CRF01_AE) (7) ส่วนสายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศยุโรปตะวันและสหรัฐอเมริกาได้แก่ subtype B (Figure 2)

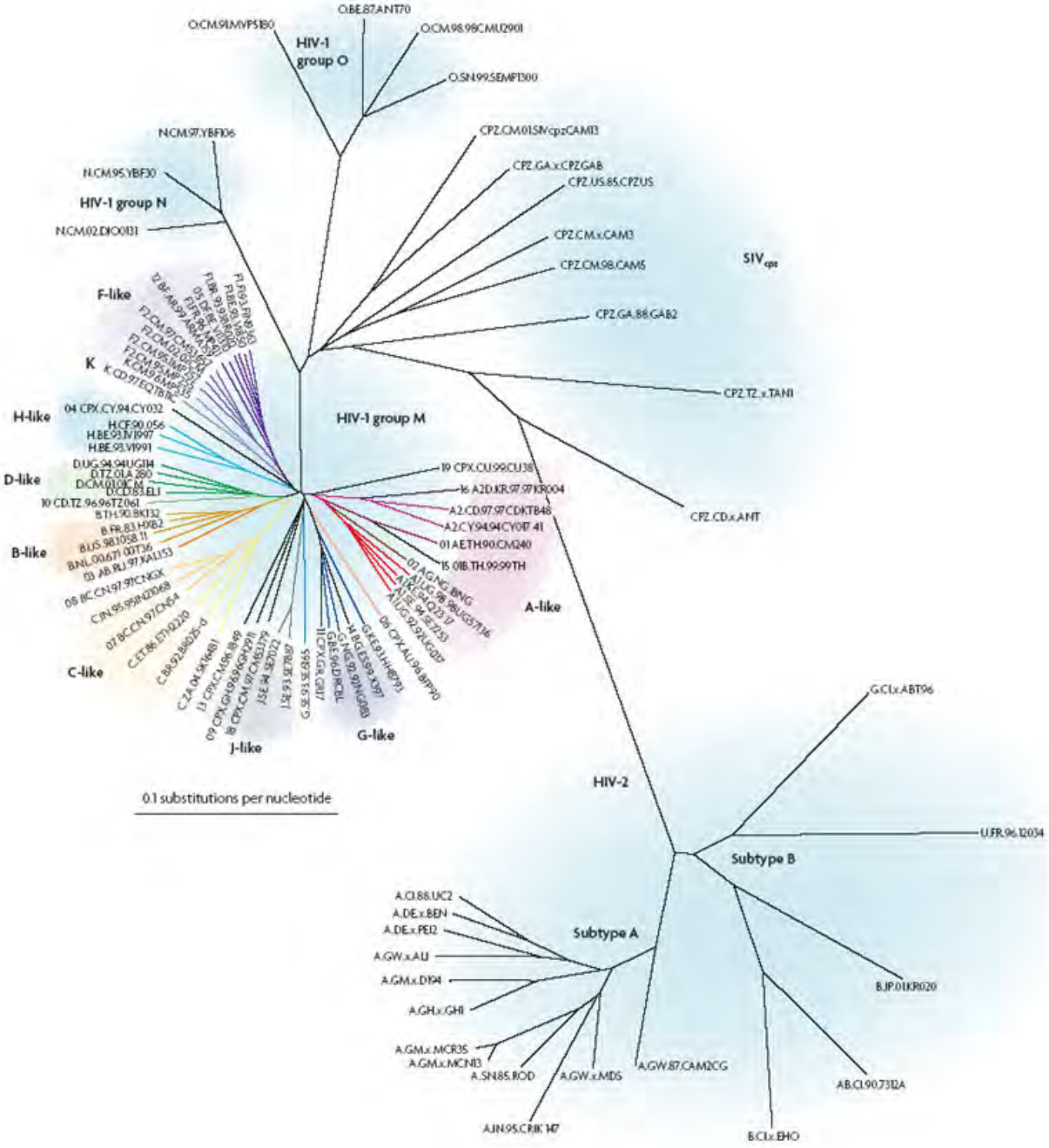


Figure 2 รูปแสดง Phylogenetic tree ของ HIV-1

การติดเชื้อ HIV สามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะได้แก่ acute, chronic asymptomatic และ symptomatic/AIDS โดยในระยะ primary infection หรือ acute infection ผู้จะมีอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ (flu-like symptoms) หรือคล้าย Infectious mononucleosis โดยมีไข้ ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย มีต่อมน้ำเหลืองโต คอ อักเสบ มีแผลในปากหรืออวัยวะเพศหรือผื่นขึ้นตามตัว ในระยะนี้จะตรวจพบ HIV RNA ในปริมาณสูงในระดับล้าน copies/ml และมี CD4 count ต่ำ บางครั้ง CD4 count ต่ำถึงขั้นเป็น opportunistic infections ได้ หลังจากนั้น จะเข้าสู่ chronic asymptomatic stage ในระยะนี้ HIV RNA จะลดลงเหลือระดับหลักหมื่น และ CD4 มี rebound กลับขึ้นมาจากค่าต่ำสุดในช่วง acute infection แต่ไม่กลับไปสู่ baseline ก่อนการติดเชื้อ ระยะไม่มีอาการนี้จะกินเวลาเฉลี่ย 7-10 ปีใน typical progressors โดยมี CD4 counts ลดลงประมาณ 50-100 cells/year เมื่อผู้ติดเชื้อมี CD4 count ต่ำกว่า 200 cells/cu.mm. จะมีความเสี่ยงต่อการเป็น opportunistic infections เพิ่มขึ้น การแบ่งระยะการติดเชื้อ HIV สามารถแบ่งได้อีกระบบหนึ่งตามผลของ virological tests เรียกว่า Fiebig staging (Figure 1) (8) ระบบนี้ทำให้มีการแบ่งในระยะ acute ได้ละเอียดมากขึ้น ตลอดจนมีประโยชน์ในการเริ่มการรักษาในช่วงติดเชื้อเฉียบพลันเพื่อหวัง ‘cure’ จากรูปจะเห็นว่าถ้าต้องการรักษาเร็วเพื่อหวังผล cure อาจต้องรักษาหลังจากการติดเชื้อไม่เกิน 7-10 วัน หรือในระยะ eclipse phase ก่อนที่ HIV จะกระจายไปซ่อนตัวใน reservoirs ซึ่งสามารถกำจัดเชื้อได้ยาก แต่โอกาสที่จะรักษาผู้ป่วยได้เร็วขนาดนี้อาจไม่สามารถทำได้ในสถานการณ์จริง

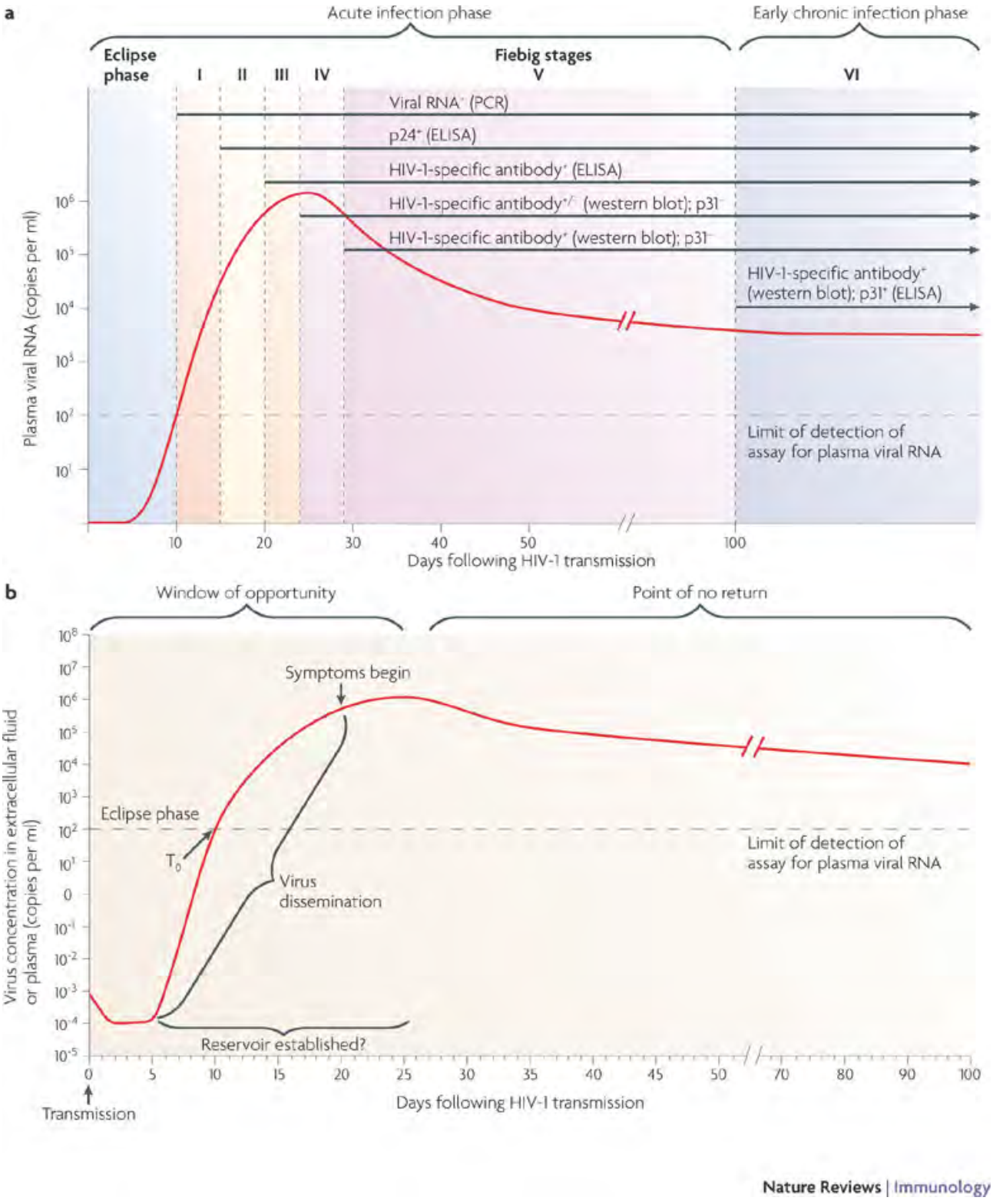


Figure 3 Fiebig stages and window of opportunity for cure

ภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อ HIV เริ่มจากช่วงใกล้หมด eclipse phase โดยมีการกระตุ้น innate immune cells ให้หลั่ง proinflammatory cytokines หลายชนิด เช่น Interleukin (IL)-1, IL-6 และ Tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) ซึ่งไม่ได้ช่วยควบคุมการติดเชื้อ HIV แต่ในทางตรงกันข้าม ทำให้ HIV เพิ่มจำนวนได้มากขึ้น เมื่อหมด eclipse phase ไวรัสก็ระจายไปยังเซลล์และเนื้อเยื่อระบบน้ำเหลืองในทางเดินอาหาร (Gut-associated lymphoid tissue) ที่มีประชากรส่วนใหญ่เป็น CCR5+ CD4+ memory T cells ทำให้เซลล์ดังกล่าวติดเชื้อ และตายเป็นจำนวนมาก หลังจาก HIV viraemia ขึ้นระดับสูงสุด (peak) ในประมาณสัปดาห์ที่ 2-3 หลังจากการรับเชื้อ จากนั้น CD8+ T cells มีการตอบสนองและสอดคล้องกับปริมาณ HIV ที่ลดลง หลังจากปริมาณไวรัสลดลงแล้วจึงตรวจพบ antibodies ซึ่งแอนติบอดีในช่วงแรกนี้โดยมากจำเพาะต่อ gp41 และไม่มีคุณสมบัติเป็น neutralizing antibody และมีคุณสมบัติในการเกิด opsonisation ต่ำ ส่วน anti-gp120 antibodies พบได้ช้ากว่า โดยมากมักพบได้ในช่วง chronic infection ส่วนแอนติบอดีต่อโปรตีนชนิดอื่นก็พบได้ช้าเช่นกัน จากหลักฐานเหล่านี้ทำให้สรุปได้ว่า anti-HIV antibodies ไม่มีบทบาทในการควบคุมการติดเชื้อ HIV ในระยะ primary infection สำหรับในช่วง chronic infection นักวิทยาศาสตร์สามารถตรวจพบ neutralising antibodies (NtAb) ได้ในคนส่วนใหญ่ แต่มักเกิด escape mutant ขึ้นมาอย่างรวดเร็วจนทำให้ narrow-spectrum NtAb เหล่านี้ไม่มีประโยชน์ในการควบคุมไวรัส ร่างกายของผู้ติดเชื้อสามารถสร้าง broad-spectrum NtAb ได้หลังจากนาน 2-4 ปี แต่ไม่มีหลักฐานว่าแอนติบอดีเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการควบคุม HIV replication เช่นกัน แอนติบอดีต่อ HIV อย่างไรก็ตามพบว่าผู้ติดเชื้อในกลุ่ม Long term non-progressor มีแอนติบอดีต่อ p24 สูงกว่า และมีแอนติบอดีที่ broad spectrum กว่ากลุ่ม typical progressors มีความเป็นไปได้ว่าแอนติบอดีเหล่านี้มีประสิทธิภาพใน LTNP เนื่องจากภูมิคุ้มกันของอาสาสมัครเหล่านี้มีความเสียหายน้อย ดังนั้นจึงสามารถสร้างแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพ

Cytotoxic T-lymphocyte (CTL) หรือ CD8+ T cells มีความสำคัญในควบคุมการติดเชื้อไวรัสที่เป็น persistent infection หลายชนิดรวมทั้ง CMV และ EBV ในโมเดลของโรคเอดส์ในลิงนั้น พบว่าลิงที่ติดเชื้อ SIV จะ

สูญเสียความสามารถในการควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัสถ้าดึง CTL ออกจากร่างกาย ในทางกลับกัน ลิงตัวที่สูญเสียความสามารถในการควบคุมไวรัสและเริ่มมีอาการนั้น ถ้าได้ CTL กลับเข้าไป ไวรัสจะลดปริมาณลงและลิงจะกลับเข้าสู่ asymptomatic stage เหมือนลิงในกลุ่มควบคุม สำหรับ HIV นั้น CTL มีบทบาทสำคัญใน acute infection ซึ่งเห็นได้จาก inverse correlation ของ HIV RNA load กับปริมาณ CTL และยังพบว่าในระยะ chronic infection นั้น CTL มีความสำคัญในผู้ติดเชื้อที่มี clinical outcome ที่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตอบสนองของ CTL ต่อ gag นั้นมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า CTL ที่จำเพาะต่อ HIV proteins ส่วนอื่น นอกจาก target ของ CTL จะสำคัญแล้ว คุณภาพของ CTL ก็มีสำคัญไม่ยิ่งหย่อนกัน มีผลงานตีพิมพ์ที่แสดงให้เห็นว่า CTL ที่เรียกว่า polyfunctional T cells (9) มีความสัมพันธ์กับการควบคุมการติดเชื้อไวรัสกลุ่ม viraemic controllers เซลล์ชนิดนี้สามารถสร้าง Gamma Interferon (IFNgamma), MIP1beta, TNFalpha, IL-2 และ CD107a อาสาสมัครในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่แล้วจะมี HLA ที่เป็น protective alleles (ได้แก่ HLA alleles ที่มีความสัมพันธ์กับ good clinical outcome เช่น HLA-B*27 (10) และ HLA-B*57/*58 (11) เป็นต้น) ส่วนในงานที่ตีพิมพ์ไปแล้วของกลุ่มเราพบว่าแม้ว่า viraemic controllers ฅนไทยจะมี polyfunctional T cells เหมือนที่เคยถูกรายงานไปแล้ว แต่อาสาสมัครชาวไทยกลุ่มนี้ไม่มีผู้ใดมี protective alleles (12)

ดังที่กล่าวมาแล้ว หรือแม้กระทั่ง HLA-B*51 ที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับ good clinical outcome ในชาวจีนเชื้อสายฮั่น (13) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า epitopes ที่ถูกนำเสนอผ่าน HLA-B*27 หรือ HLA-B*57/58 มีการกลายพันธุ์ไปทำให้ไม่สามารถถูกนำเสนอได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น มีการเปลี่ยนของกรดอมิโนบริเวณ anchor residues ทำให้ epitope ไม่สามารถจับกับ HLA molecule ได้ หรือเกิด mutation บริเวณ T cell receptor residue ทำให้ contact site ระหว่าง epitope และ T cells เปลี่ยนแปลงไป หรือมีการกลายพันธุ์บริเวณ flanking region ทำให้มีการตัด (antigen processing) ผิดกว่าที่เคยเป็น (14) หรือมี nucleotide change จนทำให้ translational efficiency เปลี่ยนแปลงไป (15) หรือการมี minor population ที่สามารถ antagonise T-cell response ได้ (16)

ในการวิเคราะห์การตอบสนองของ CTL นั้นสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น การวิเคราะห์ปริมาณ mRNA ของ cytokines, การหลั่ง cytokines โดยใช้ ELISA หรือ ELISpot assay (17), การวัด function โดยใช้เครื่องวิเคราะห์การเรืองแสงของเซลล์ (Flow cytometer) และเทคนิคสุดท้ายใหม่ล่าสุดได้แก่ การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ HIV (HIV suppression assay) ทุกเทคนิคมีจุดดีจุดด้อยแตกต่างกันอาทิ เช่น การใช้ HIV suppression assay มี correlation กับความสามารถในควบคุม plasma HIV viral load ได้ดี แต่ต้องใช้ทักษะในการเลี้ยงเซลล์และในปฏิบัติการ assay ค่อนข้างสูง ราคาค่อนข้างแพง ในขณะที่ ELISpot

assay ทำได้ง่ายกว่า ราคาถูกกว่า แต่ correlation กับ pVL ไม่ค่อยดี ดังนั้น ELISpot อาจเป็นการวิเคราะห์ที่ใช้สำหรับ screening เท่านั้นเพราะสามารถทำในตัวอย่างที่มีจำนวนมากได้ ส่วน HIV suppression assay เหมาะที่จะใช้เมื่อใช้วิเคราะห์เชิงคุณภาพขั้นสุดท้ายเป็นต้น ในการศึกษานี้เราเลือกใช้ ELISpot เป็นการจำแนกว่าอาสาสมัครมีการตอบสนองต่อ overlapping peptides หรือ epitope เส้นใด และใช้ Polyfunctional T-cell assay เพื่อยืนยันผล และให้ HIV suppression assay เพื่อศึกษาในเชิงลึกอีกครั้งใน selected subjects

วิธีดำเนินการวิจัย

1. **อาสาสมัคร**

   คัดเลือกอาสาสมัครที่ติดเชื้อ HIV-1 จำนวน 50 คน (anti-HIV antibody positive) โดยอาสาสมัครกลุ่มนี้มีการติดเชื้อ HIV-1 แบบไม่มีอาการ ยังไม่ได้รับยาต้านไวรัส และมีปริมาณ CD4 T cells มากกว่าหรือเท่ากับ 500 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร

2. **การเจาะเลือด**

   อาสาสมัครจะได้รับการเจาะเลือดใส่หลอดกันเลือดแข็งตัวชนิด EDTA จำนวน 36 มิลลิลิตร และใส่หลอดเลือดที่ไม่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว 3 มิลลิลิตร.

3. **การแยกเลือด**

   EDTA blood จะถูกเจือจางด้วย RPMI จากนั้นเทลงบนสารแยกเลือด Ficoll-Hypaque แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง หลังจากนั้น ทำการดูดเฉพาะชั้น Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ออกมา ล้าง 2 ครั้งด้วย sterile PBS นับจำนวนเซลล์โดยการย้อมด้วย trypan blue แล้วนำไปใช้ ส่วนพลาสมาเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง (-80 องศาเซลเซียส) เพื่อนำไปวิเคราะห์ยีนต่อไป

4. **ELISpot assay**

   เคลือบ plate ที่มี PVDF membrane ด้วยแอนติบอดีต่อ gamma interferon (IFNgamma) แล้ว block ด้วย RPMI ที่มี 10% fetal bovine serum จากนั้นใส่ PBMC จำนวน 2.5 x 10^5 เซลล์ (duplicate) และกระตุ้นด้วยเปปไทด์ต่อ HIV ที่ต้องการทดสอบไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นล้าง plate แล้ว develop ให้เกิดจุดสีด้วย anti-IFNgamma และ reagent ที่ประกอบด้วย alkaline phosphatase enzyme และ NBT/BCIP substrate

5. Intracellular cytokine staining

นำ PBMC มากระตุ้นด้วยเปบไทด์ที่ต้องการทดสอบ พร้อมกับใส่สารยับยั้งการส่ง cytokine/chemokine ออกนอกเซลล์เป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส ย้อมโมเลกุลบนผิวเซลล์ด้วยแอนติบอดีต่อ CD3 และ CD8 ที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสง แล้วเจาะรูพลาสมาเม็มเบรนของเซลล์ เพื่อสามารถส่งแอนติบอดีต่อ cytokine/chemokine ที่ติดฉลากสีเรืองแสงเข้าไปได้ แล้วนำไปวัดการเรืองแสงด้วยเครื่อง flow cytometer

6. CTL culture

นำ PBMC จำนวน 2.5 x 10^6 เซลล์ มา pulse ด้วย peptide ที่ให้ผลบวกต่อ ELISpot แล้วเลี้ยงใน RPMI ที่มี 10% fetal bovine serum ทิ้งไว้ 3 วัน ก่อนเติม IL-2 แล้วเลี้ยงต่อจนครบ 10 วัน แล้วจึงนำมาทำการทดสอบ

7. Translational efficiency analysis

วิธีนี้จะเป็นเทคนิคที่จะได้พัฒนาขึ้นมาใหม่ โดยหลักการจะนำยีนที่สนใจทั้งส่วนที่เป็น wild type และ mutant ไป transduce ในเซลล์เป้าหมาย แล้ววิเคราะห์ว่าถูกรับรู้โดย T cells ที่จำเพาะเท่ากันหรือไม่

ผลการวิจัย

อาสาสมัครถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มแบ่งตามระดับของปริมาณไวรัสในเลือด ดังนี้

1. Viraemic controller คือ กลุ่มอาสาสมัครที่สามารถควบคุมระดับของไวรัสได้ต่ำกว่า 2,000 copies/mL โดยที่ไม่ได้รับยาต้านไวรัส จำนวน 19 คน
2. Non-controller คือ กลุ่มอาสาสมัครที่มีระดับของ ไวรัสได้สูงกว่า 2,000 copies/mL จำนวน 47 คน

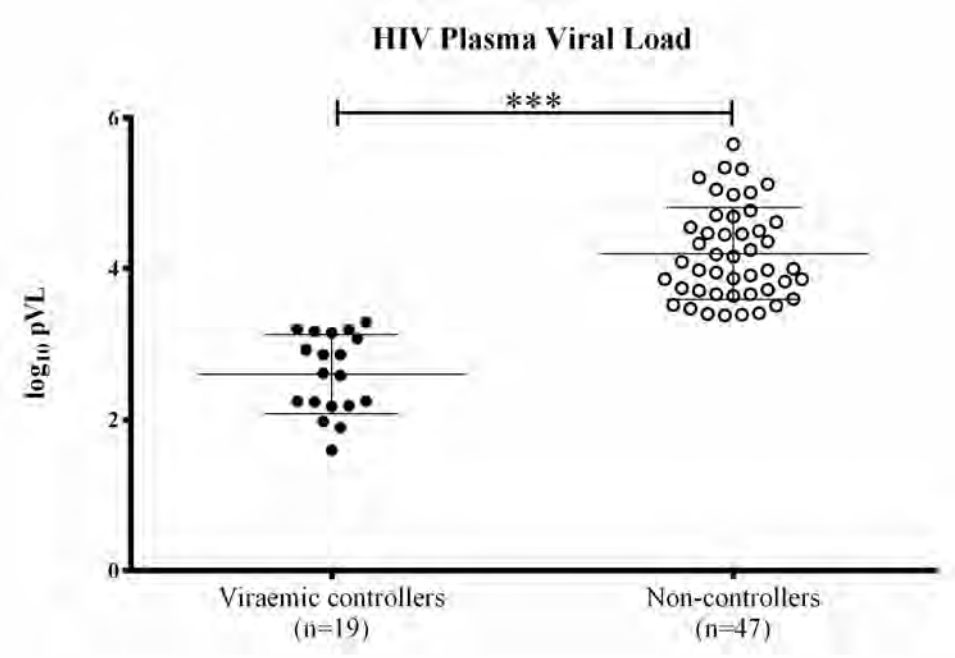


Figure 4 รูปแสดงปริมาณไวรัสในเลือดของ viraemic controller และ non-controller

ปริมาณ CD4 count ของทั้ง viraemic controller, non-controller และอาสาสมัครที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี นั้นมีปริมาณและเปอร์เซ็นต์ที่ไม่แตกต่างกัน

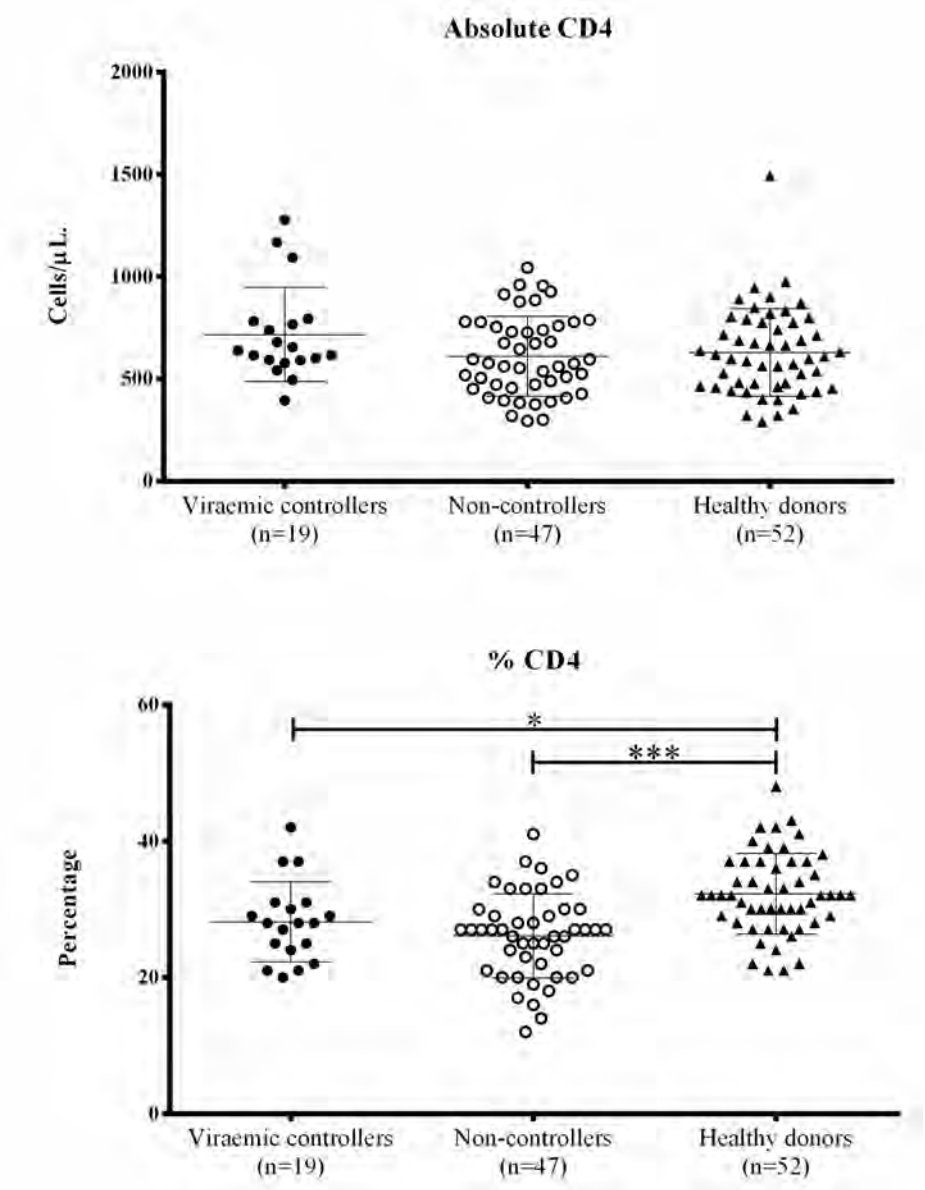


Figure 5 รูปแสดงปริมาณ CD4 count ของ viraemic controller และ non-controller เทียบกับอาสาสมัครที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี

ในการศึกษานี้มีอาสาสมัครที่เป็น controller จำนวน 19 คน และ non-controller จำนวน 47 คน อาสาสมัครส่วนมากเป็นเพศชาย ที่เป็น heterosexual เนื่องจากอาสาสมัครที่ถูกคัดเลือกเข้ามานั้น ได้มาจากคลินิกชายรักชายที่คลินิคนิรนาม สภากาชาดไทย อาสาสมัครทั้ง 2 กลุ่มนั้น ไม่มีความแตกต่างกันของ อายุเฉลี่ย ระยะเฉลี่ยของการติดเชื้อ และการมีอยู่ของ HLA class I ที่เป็น protective alleles ได้แก่ HLA-B27, HLA-B57 และ HLA-B58

ข้อมูลทางประชากรศาสตร์ (Demographic data)

	Controllers (VL < 2,000 cp/mL)	**Non-controllers (VL > 2,000 cp/mL)**
n	19 (29%)	47 (71%)
• Male	14 (74%)	36 (77%)
• Female	5 (26%)	11 (23%)
Sexual preference		
• Homosexual	13 (68%)	34 (69%)
• Heterosexual	6 (32%)	13 (31%)
Median Age (year)	30 (21-52)	28 (20-58)
Median Time since seroconversion (year)	9 (4-17)	6.5 (4-13)
Protective alleles		
• HLA-B27	2 (5.7%)	8 (8.8%)
• HLA-B57	3 (8.6%)	4 (4.4%)
• HLA-B58	2 (5.7%)	4 (4.4%)

ตารางแสดงความสมบูรณ์ของเม็ดเลือด (Complete blood count)

	VC (n=19)	NC (n=47)	Healthy Donors (n=52)
WBC count (cells/μL)	6,420	5,890	5,890
Median lymphocytes			
• Absolute number (cells/μL)	2,533	2,440	1,902
• Percentage	38.5	42.5	32.7
Median CD3			
• Absolute number (cells/μL)	1,967	1,813	1,328
• Percentage	78.5	79	71
Median CD4			
• Absolute number (cells/μL)	639	575	605
• Percentage	28	27	32
Median CD8			
• Absolute number (cells/μL)	1,078	1,070	530
• Percentage	43	46	29
CD4/CD8 ratio	0.6478	0.5887	1.036
HIV plasma viral load			
• copies/mL	419	12,231	N.D.
• log	2.62	4.045	N.D.

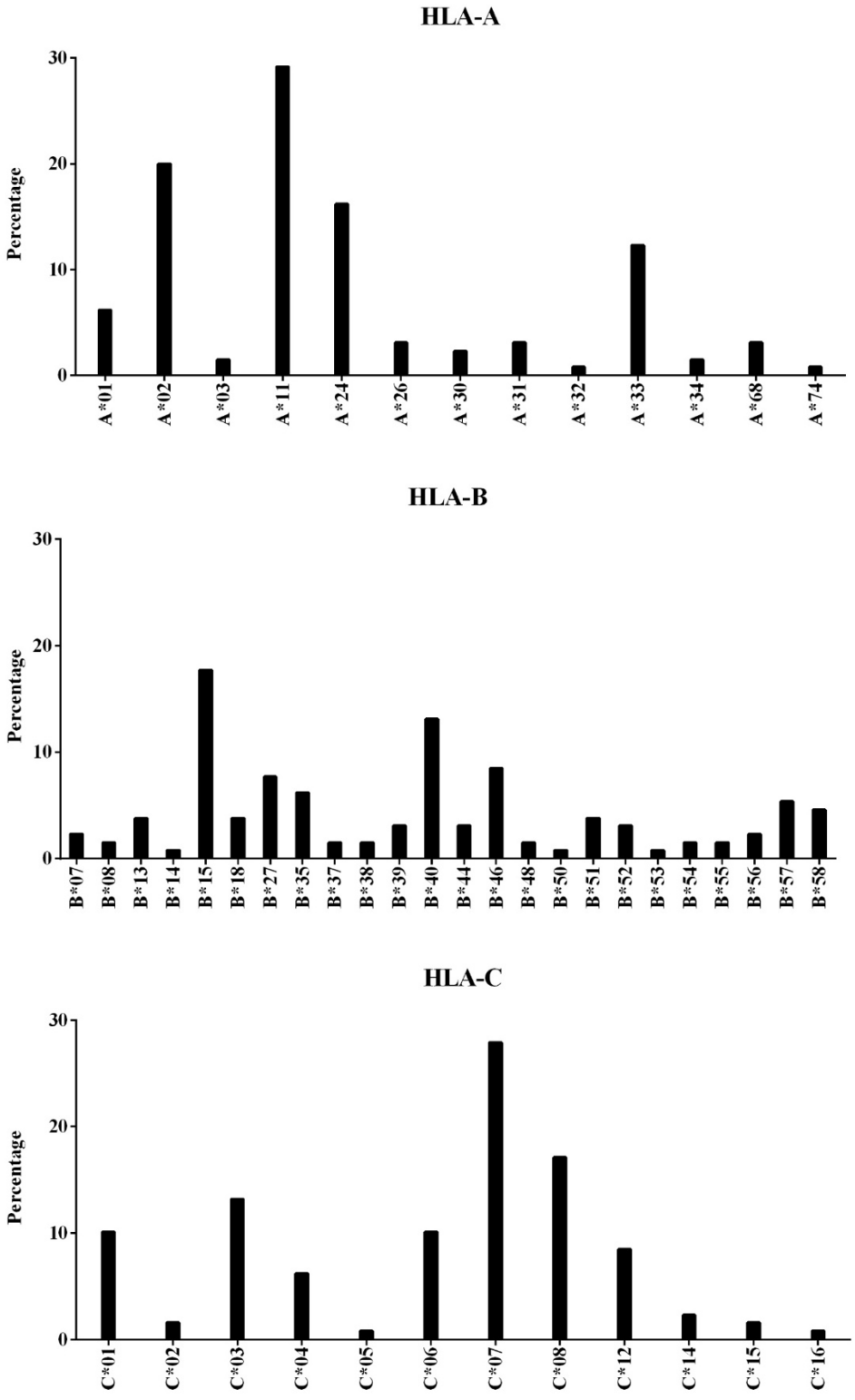


Figure 6 รูปแสดง HLA typing ของอาสาสมัคร

การทดสอบการตอบสนองของ T cell ด้วยวิธี ELISpot assay

เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (PBMC) ที่แยกได้จากเลือดของอาสาสมัคร ถูกนำมากระตุ้นด้วยเปปไทด์ gag p24 (overlapping peptides) จำนวน 23 เส้น พบว่าอาสาสมัครมีการตอบสนองต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวีทั่วทั้ง gag p24 ในปริมาณที่แตกต่างกันไปในแต่ละเส้น

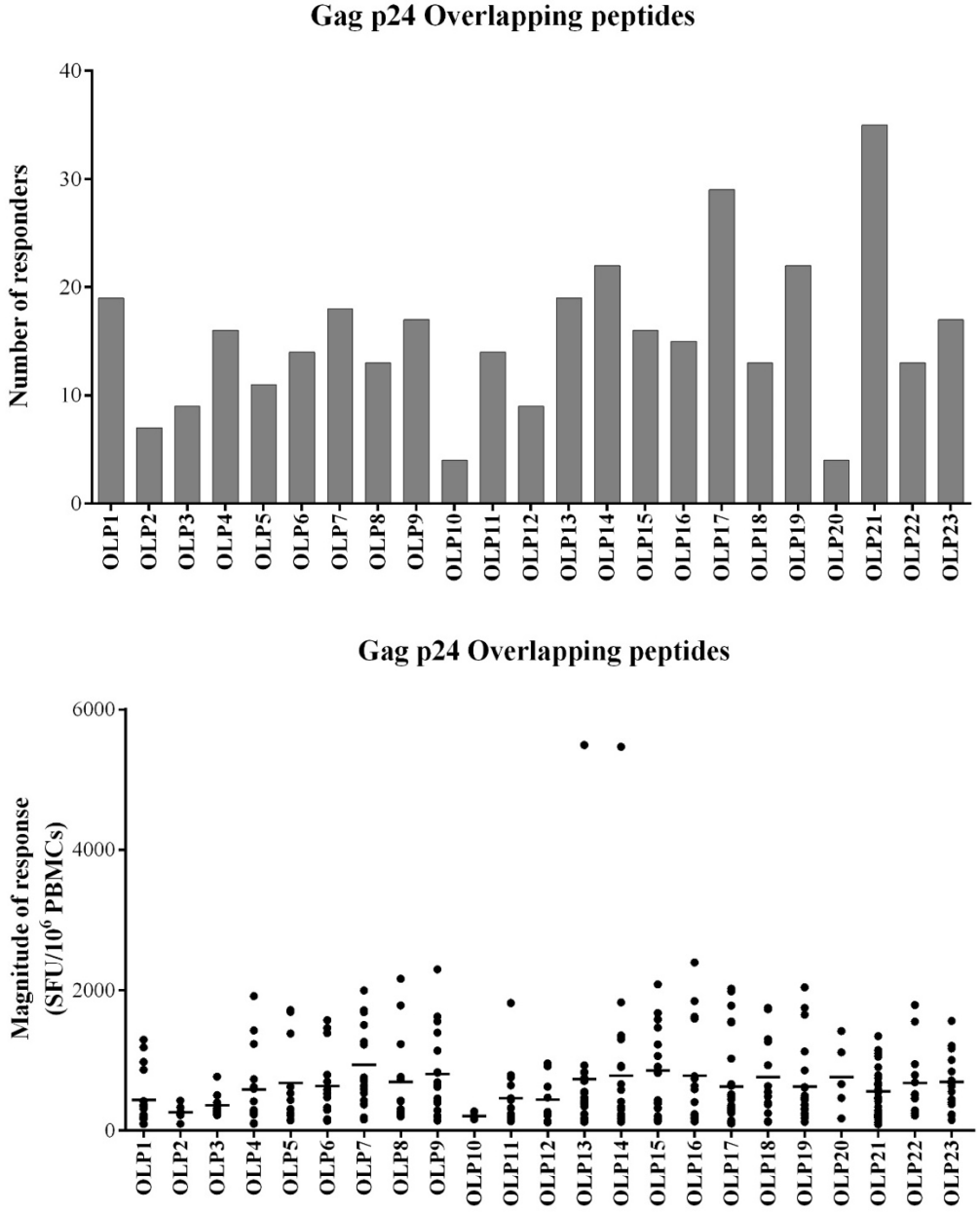


Figure 7 รูปแสดงการตอบสนองของ T cell ด้วย ELISpot assay (บน) แสดงจำนวนคนที่ตอบสนอง (ล่าง) แสดงความแรงของการตอบสนอง (Magnitude)

ตารางสรุปผลการทำ ELISpot ต่อเปปไทด์ที่ถูกนำเสนอผ่านโมเลกุลเอชแอลเอชนิดต่างๆ

HLA allele	Protein	Epitope	Number of responders	Number of non-responders
HLA-A11 (n=29)	Gag p24	AK11 (ACQGVGGPSHK)	12	17
	Nef	GK10 (GAFDLSFFLK)	21	8
	Nef	QK10 (QVPLRPMTYK)	18	11
	Pol	AK9 (AIFQSSMTK)	8	21
	Pol	QIYQ (QIYQEPFKNLK)	16	13
	Pol	QIIE (QIIEQLIKK)	7	22
	Pol	QIYA (QIYAGIKVK)	4	25
HLA-B27 (n=9)	Gag p24	KK10 (KRWIILGLNK)	6	3
	Gag p24	KK10 R264K (KKWIILGLNK)	2	7
	Gag p24	KK10 L268M (KRWIIMGLNK)	3	6
	Gag p24	KK10 R264K L268M (KKWIIMGLNK)	4	5
HLA-B57 (n=7)	Gag p24	LW9 (LSPRTLNAW)	6	1
	Gag p24	KF11 (KAFSPEVIPMF)	7	0
	Gag p24	QW9 (QATQEVKNW)	4	3
	Gag p24	TW10 (TSTLQEQIGW)	4	3
HLA-B58 (n=6)	Gag p24	LW9 (LSPRTLNAW)	2	4
	Gag p24	KF11 (KAFSPEVIPMF)	4	2
	Gag p24	QW9 (QATQEVKNW)	5	1
	Gag p24	TW10 (TSTLQEQIGW)	4	2

จากตารางข้อมูล ELISpot ข้างต้น เมื่อกระตุ้น PBMC ด้วยเปปไทด์เส้นต่างๆ โดยใช้เปปไทด์ตามชนิดของเอชแอลเอที่อาสาสมัครมี พบว่าไม่ใช่อาสาสมัครทุกคนจะสามารถตอบสนองต่อเปปไทด์ได้ ถึงแม้ว่าจะมีเอชแอลเอ

ชนิดเดียวกันก็ตาม เช่น เอชแอลเอ-เอ11 มีอาสมัครทั้งหมด 29 คน แต่มีเพียง 12 คนเท่านั้น ที่สามารถตอบสนองต่อเอพิโทป AK11 (ACQGVGGPSHK) ได้ ซึ่งเหตุการณ์นี้เกิดขึ้นคล้ายๆ กันในทุกๆ เอพิโทปที่ผู้วิจัยนำมาศึกษา ซึ่งต้องค้นหากลไกการหลบหลีกภูมิคุ้มกันต่อไป

การหาลำดับสารพันธุกรรม

เพื่อเปรียบเทียบลำดับทางพันธุกรรมของเชื้อเอชไอวี อีดีทีเอ-พลาสมา (EDTA plasma) จะถูกนำมาใช้ในการสกัดสารพันธุกรรม RNA จากนั้นนำไปเปลี่ยนให้เป็น cDNA และเพิ่มจำนวนโดยการทำ Reverse transcription PCR ต่อส่วน gag p24 ด้วย primers ที่ถูกตีพิมพ์มาก่อนหน้านี้ ได้ consensus sequence ดังนี้

Gag p24 consensus

PIVQNAQGQMVHQPLSPRTLNAWVKVVEEKGFNPEVIPMFSALSEGATPQDLNMMLNIVGGHQA
AMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIPPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNNPPIPVGDIY
KRWIILGLNKIVRMYSPVSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQNANPD
CKSILKALGTGATLEEMMTACQGVGGPSHKARVL

ผลการเปรียบเทียบลำดับพันธุกรรม gag 24 ระหว่าง consensus sequence ที่ได้จากการศึกษานี้กับ sequence CM240 เป็นสายพันธุ์ CRF01_AE ที่แยกได้จากคนไข้ในประเทศไทย พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ similarity เท่ากับ 99.134% กล่าวคือ มีกรดอะมิโนเหมือนกันจำนวน 229 ตำแหน่งจาก 231 ตำแหน่ง โดย ตำแหน่งที่ 11 จาก Alanine เป็น Valine และ ตำแหน่งที่ 77 จาก Proline เป็น Alanine

```
HIV-CM240-(U54771)      PIVQNAQGQMAHQPLSPRTLNAWVKVVEEKGFNPEVIPMFSALSEGATPQDLNMMLNIVG    60
Gag-p24-consensus       PIVQNAQGQMVHQPLSPRTLNAWVKVVEEKGFNPEVIPMFSALSEGATPQDLNMMLNIVG    60
                        **********.**************************************************

HIV-CM240-(U54771)      GHQAAMQMLKETINEEPAEWDRVHPVHAGPIPPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTN    120
Gag-p24-consensus       GHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIPPGQMREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTN    120
                        *************** ****************************************

HIV-CM240-(U54771)      NPPIPVGDIYKRWIILGLNKIVRMYSPVSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQATQE    180
Gag-p24-consensus       NPPIPVGDIYKRWIILGLNKIVRMYSPVSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYKTLRAEQATQE    180
                        ************************************************************

HIV-CM240-(U54771)      VKNWMTETLLVQNANPDCKSILKALGTGATLEEMMTACQGVGGPSHKARVL     231
Gag-p24-consensus       VKNWMTETLLVQNANPDCKSILKALGTGATLEEMMTACQGVGGPSHKARVL     231
                        ***********************************************
```

การวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน ณ เอพิโทปต่างๆ

ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอพิโทปที่ถูกนำเสนอผ่านเอชแอลเอ B27, B57/58, A11 ซึ่งมีรายงานมาก่อนหน้าว่ามีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคที่ดีในผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวี อย่างไรก็ดี จากการ วิเคราะห์ผลจากทั้ง 3 เอชแอลเอ ไม่พบความแตกต่าง ณ ระดับกรดอะมิโน ไม่ว่าจะเป็นเอพิโทปใดๆ ก็ตาม แสดงผลดังรูป

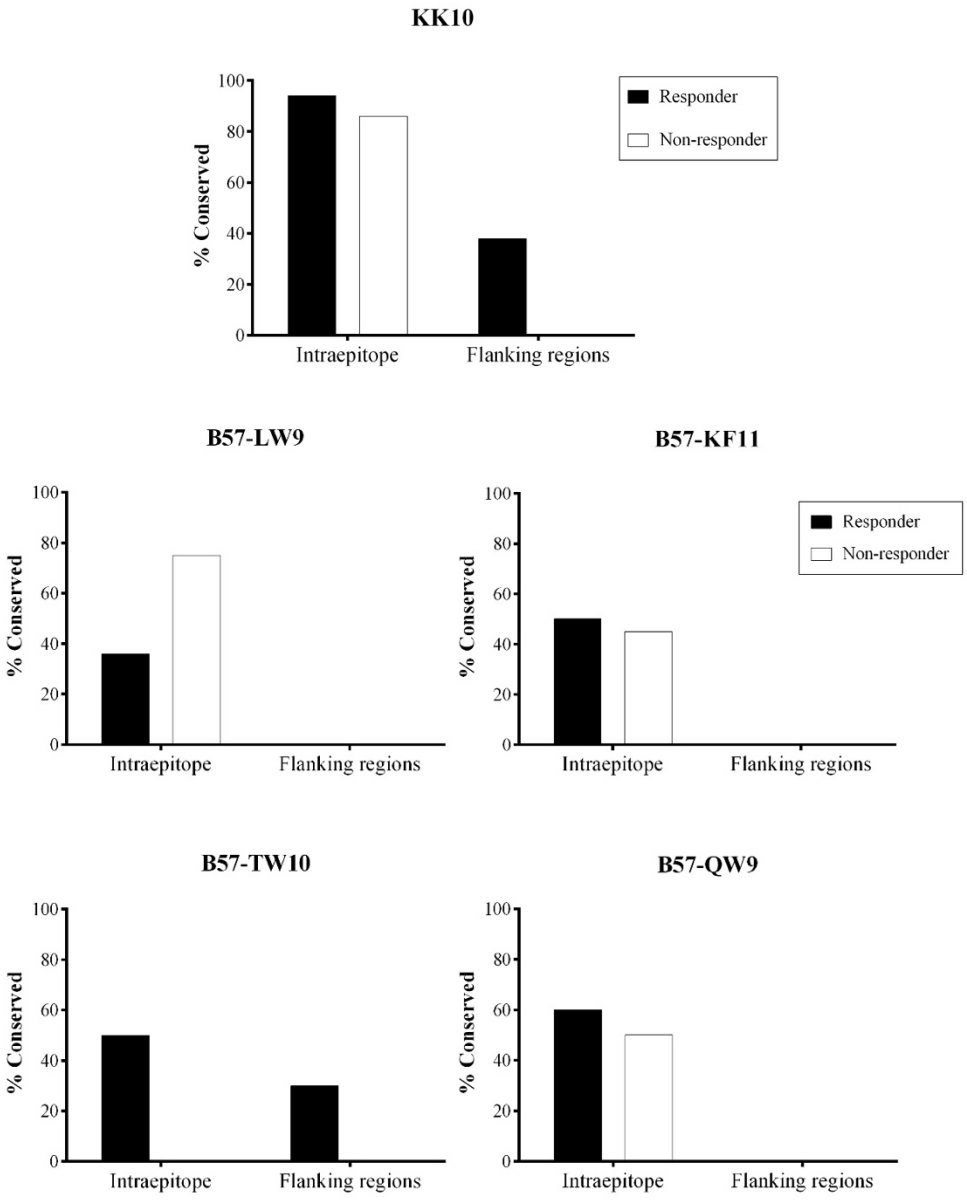


Figure 8 รูปแสดงความแตกต่างที่ระดับกรดอะมิโนของ เอชแอลเอ B27, B57/58

ถึงแม้จะไม่พบความแตกต่างในระดับกรดอะมิโน แต่เนื่องจากการแปลรหัสของกรดอะมิโน 1 ชนิด นั้น สามารถใช้โคดอนในการแปลได้มากกว่า 1 รหัส และมีรายงานมาก่อนด้วยว่า การใช้โคดอนแตกต่างกัน มีผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน ผู้วิจัยจึงทำการเปรียบเทียบโคดอนของทุกๆ เอพิโทป โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่โคดอนของตำแหน่ง C-terminal ของเอพิโทป AK11

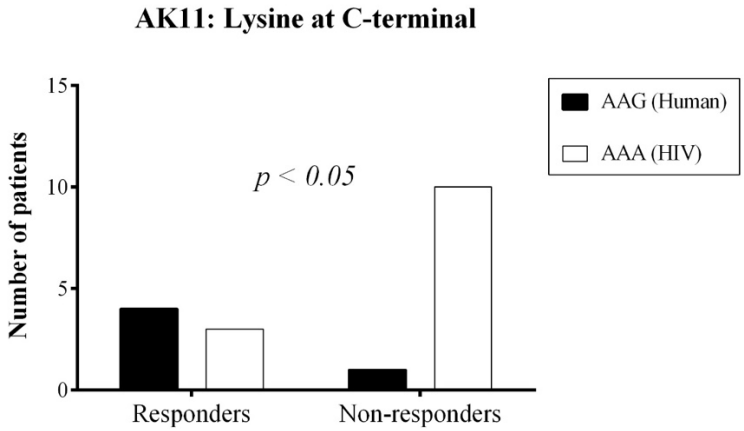


Figure 9 รูปแสดงความแตกต่างที่ระดับกรดอะมิโนของ เอชแอลเอ A11

อภิปรายและวิจารณ์ผล

อุปสรรคที่สำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนเพื่อรักษาโรคเอดส์นั้น คือ การขาดความรู้และความเข้าใจในเรื่องของกลไลของร่างกาย โดยเฉพาะในเรื่องของภูมิคุ้มกันที่มีความสำคัญต่อการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี T cell ที่จำเพาะต่อเชื้อเอชไอวี เป็นหนึ่งในเซลล์ที่ถูกรายงานว่ามีความสำคัญต่อการควบคุมการติดเชื้อ เมื่อดูจากการดำเนินโรคในมนุษย์และการศึกษาที่มีมาก่อนหน้าทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง T cell จึงเป็นเสมือน “selective pressure” ต่อเชื้อเอชไอวีทำให้เชื้อมีการกลายพันธุ์ ซึ่งการกลายพันธุ์นี้เองก็เป็นปัญหาที่สำคัญต่อการพัฒนาวัคซีนเช่นกัน คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะหากลไกที่เชื้อเอชไอวีในการกลายพันธุ์และหลบหลีกจากการตอบสนองจากภูมิคุ้มกัน โดยการคัดเลือกอาสาสมัครจากคลินิกนิรนาม สภากาชาดไทยทั้งหมด 66 คน แล้วทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบการตอบสนองของ T cell ต่อโปรตีนของเชื้อเอชไอวีด้วยวิธี ELISpot assay จากนั้นเปรียบเทียบลำดับสารพันธุกรรมเพื่อวิเคราะห์หา variation ซึ่งในระดับกรดอะมิโนนั้นไม่พบความแตกต่าง แต่เมื่อเปรียบเทียบในระดับนิวคลีโอไทด์พบว่า เอพิโทปของ HLA-A11 นั้นมีความแตกต่าง ทั้งนี้ ต้องทำการต่อไปในอนาคตเพื่อพิสูจน์ว่าความแตกต่างของโคดอนนั้นมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนของไวรัสเอชไอวี

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

คณะผู้วิจัยได้วิเคราะห์การตอบสนองของ T cell ลำดับของสารพันธุกรรม และกลไกที่ใช้ในการหลบหลีกภูมิคุ้มกัน ในอาสาสมัครคนไทย โดยคณะผู้วิจัยเชื่อว่างานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาวัคซีนโรคเอดส์ต่อไป

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. Cell. 1996;85(7):1135-48.
2. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. Nature. 1996;381(6584):661-6.
3. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. Nature reviews Microbiology. 2012;10(4):279-90.
4. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. Nature. 1999;397(6718):436-41.
5. Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. Nature. 1989;339(6223):389-92.
6. Nyamweya S, Hegedus A, Jaye A, Rowland-Jones S, Flanagan KL, Macallan DC. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. Reviews in medical virology. 2013;23(4):221-40.
7. Ou CY, Takebe Y, Luo CC, Kalish M, Auwanit W, Bandea C, et al. Wide distribution of two subtypes of HIV-1 in Thailand. AIDS research and human retroviruses. 1992;8(8):1471-2.
8. McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. Nature reviews Immunology. 2010;10(1):11-23.
9. Betts MR, Harari A. Phenotype and function of protective T cell immune responses in HIV. Current opinion in HIV and AIDS. 2008;3(3):349-55.
10. den Uyl D, van der Horst-Bruinsma IE, van Agtmael M. Progression of HIV to AIDS: a protective role for HLA-B27? AIDS reviews. 2004;6(2):89-96.
11. Brennan CA, Ibarrondo FJ, Sugar CA, Hausner MA, Shih R, Ng HL, et al. Early HLA-B*57-restricted CD8+ T lymphocyte responses predict HIV-1 disease progression. Journal of virology. 2012;86(19):10505-16.
12. Techakriengkrai N, Tansiri Y, Hansasuta P. Poor HIV control in HLA-B*27 and B*57/58 noncontrollers is associated with limited number of polyfunctional Gag p24-specific CD8+ T cells. Aids. 2013;27(1):17-27.

13. Zhang Y, Peng Y, Yan H, Xu K, Saito M, Wu H, et al. Multilayered defense in HLA-B51-associated HIV viral control. Journal of immunology. 2011;187(2):684-91.

14. McMichael AJ, Phillips RE. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. Annual review of immunology. 1997;15:271-96.

15. Kijak GH, Currier JR, Tovanabutra S, Cox JH, Michael NL, Wegner SA, et al. Lost in translation: implications of HIV-1 codon usage for immune escape and drug resistance. AIDS reviews. 2004;6(1):54-60.

16. Davenport MP. Antagonists or altruists: do viral mutants modulate T-cell responses? Immunology today. 1995;16(9):432-6.

17. Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, Hansasuta P, O'Callaghan CA, Rowland-Jones S, et al. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. Journal of immunology. 1999;162(3):1827-35.

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

๑. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายปกรัฐ หังสสูต

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr.Pokrath Hansasuta

๒. หมายเลขบัตรประชาชน 3-70500-555-75-1

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ใช้เวลาทำงานวิจัย ๒๐ ชั่วโมง/สัปดาห์

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

สังกัดสาขาวิชาไวรัสวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ที่อยู่ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระราม ๔ กทม. ๑๐๓๓๐

โทร 0817633700 โทรสาร 022525952

อีเมล pokrath@gmail.com

๕. ประวัติการศึกษา

แพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Doctor of Philosophy (University of Oxford)

อนุมัติบัตรพยาธิวิทยาคลินิก

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

T cell Immunology, Virology, HIV Medicine

๗. โครงการวิจัย (เป็นหัวหน้าโครงการวิจัยทั้งสิ้น)

๗.๑ โครงการวิจัย HLA-A11-restricted T-cell response in HIV-infected patients สนับสนุนโดยสวทช. เสร็จสิ้นแล้ว เตรียมส่งตีพิมพ์

๗.๒ โครงการวิจัย Cross-reactivity of HLA-A3 supertype T-cell epitope สนับสนุนโดยสกว. เสร็จสิ้นแล้ว เตรียมส่งตีพิมพ์

๗.๓ โครงการวิจัย GBV-C, the virus that attenuates HIV Clinical course สนับสนุนโดยสกว. เสร็จสิ้นแล้ว เตรียมส่งตีพิมพ์

๗.๔ โครงการวิจัย EBV-specific T-cell response in HIV-infected individuals with various CD4 count baseline สนับสนุนโดยทุนงบประมาณแผ่นดิน เสร็จสิ้นแล้ว เตรียมส่งตีพิมพ์

๗.๕ โครงการวิจัย Dendritic cell and CD40L-activated cell line as antigen-presenting cells สนับสนุนโดยทุนงบประมาณแผ่นดิน เสร็จสิ้นแล้ว กำลังเตรียมต้นฉบับ

๗.๖ โครงการวิจัยการตอบสนองของทีเซลล์ต่อไวรัสไข้หวัดใหญ่ 2009 สนับสนุนโดยสสส. โครงการเสร็จสิ้น แล้ว กำลังเตรียมต้นฉบับ

๗.๗ โครงการ EBV-oncoprotein-specific T cells สนับสนุนโดยทุนวิจัยวช. เสร็จสิ้นแล้ว กำลังเตรียม manuscript

๗.๘ โครงการวิจัย CMV-specific T cells สนับสนุนโดยทุนวิจัยวช. กำลังเตรียม manuscript

๗.๙ โครงการ Polyfunctional T-cell response in Thai patients who have good clinical outcome เสร็จสิ้นแล้ว ตีพิมพ์แล้ว AIDS 2013

๗.๘ โครงการ HIV-suppression assay as a method to evaluate HIV/AIDS vaccine สนับสนุนโดย สกว. และทุนงบประมาณแผ่นดิน เสร็จสิ้นแล้วกำลัง submit

๗.๙ โครงการวิจัยเพื่อ establish lab-scale EBV-specific T cells สำหรับการรักษา สนับสนุนโดย กองทุน รัชดาภิเษกสมโภช ตีพิมพ์แล้ว

๗.๑๐ โครงการวิจัยเพื่อ establish การวิเคราะห์ in-house EBV viral load โดย Real-time PCR สนับสนุนโดยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ตีพิมพ์แล้ว

ผู้ร่วมโครงการวิจัย คนที่ ๒

๑. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว ประทานพร แก้วปรีดี

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms.Prathanporn Kaewpreedee

๒. หมายเลขบัตรประชาชน 1-1014-01577-03-0

๓. ตำแหน่งปัจจุบัน นิสิตปริญญาเอก

๔. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

หน่วยงานและที่อยู่ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน กทม. 10330

เบอร์โทรศัพท์ 02-256-4132, 090-975-1675

อีเมล์ prathanporn.k@gmail.com

๕. ประวัติการศึกษา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๖. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

T cell Immunology

๗. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ-สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

-