

รายงานการวิจัย

บทบาทของทีเซลล์ต่อการวิวัฒนาการของเอชไอวี : ข้อมูลสำคัญสำหรับการพัฒนาวัคซีน

ป้องกันโรคเอดส์

The role of T cell on the HIV evolution : An essential information for

HIV vaccine development

ผศ.นพ.ดร.ปกรัฐ หังสสุต

นายสัตวแพทย์ นวพล เตชะเกรียงไกร

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2554

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	๑
บทคัดย่อ	๓
Abstract	๔
บทนำ	๕
ที่มาและความสำคัญ	๗
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบคิดการวิจัย	๑๐
บทบทวนวรรณกรรม	๑๒
วิธีดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง	๑๘
ผลการทดลอง	๒๐
สรุปและอภิปรายผล	๕๑
องค์ประกอบในการจัดทำโครงการวิจัย	๕๒
เอกสารอ้างอิง	๕๓

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ ๑ ตารางแสดงข้อมูลของอาสาสมัคร	๒๑
ตารางที่ ๒ ข้อมูล HLA ของอาสาสมัคร	๒๓
ตารางที่ ๓ การเปรียบเทียบปัจจัยที่อาจมีผลต่อการควบคุมของ เพิ่มจำนวนของ HIV	๒๗
ตารางที่ ๔ ข้อมูลทางประชากรศาสตร์อื่นๆ	๒๙
ตารางที่ ๕ ตารางสรุปตำแหน่งของ primers	๓๐
ตารางที่ ๖ ผลการวิเคราะห์การตอบสนองของ gag-p24-specific T cells ใน TP และ VC	๓๑
ตารางที่ ๗ การเปรียบเทียบการตอบสนองของ T cells ใน TP และ VC ที่มี protective HLA allele ที่ matched กัน	๓๒
ตารางที่ ๘ ผลสรุปการ Optimisation	๓๕
ตารางที่ ๙ รายชื่ออาสาสมัครและ HLA-alleles ในการวิเคราะห์ T cell functional quality	๓๗
ตารางที่ ๑๐ ลักษณะของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*27	๓๙
ตารางที่ ๑๑ ลักษณะของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*57/58	๔๓

สารบัญญภาพ

หน้า

รูปที่ ๑ สัดส่วนของ HLA-A alleles ในอาสาสมัคร	๒๔
รูปที่ ๒ สัดส่วนของ HLA-B alleles ในอาสาสมัคร	๒๕
รูปที่ ๓ สัดส่วนของ HLA-C alleles ในอาสาสมัคร	๒๖
รูปที่ ๔ ภาพแสดงการเปรียบเทียบปริมาณ CD4+ T cells และ HIV-RNA ในอาสาสมัคร	๒๘
รูปที่ ๕ การเปรียบเทียบ clinical outcome ของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA allele เดียวกัน (HLA-B*27)	๓๓
รูปที่ ๖ การเปรียบเทียบ clinical outcome ของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA allele เดียวกัน (HLA-B*57/58)	๓๔
รูปที่ ๗ การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ cytokine ภายในเซลล์ (intracellular cytokine staining, ICS) ในเซลล์ที่แยกมาใหม่ (fresh) กับเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง(frozen)	๓๖
รูปที่ ๘ และ ๙ การเปรียบเทียบ functional quality ของ VC และ TP	๓๘
รูปที่ ๑๐ ปริมาณ HIV-RNA (pVL) ของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*27	๔๐
รูปที่ ๑๑ และ ๑๒ การเปรียบเทียบ functional quality ของ VC และ TP ที่มี HLA-B*27	๔๑

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

รูปที่ ๑๓ และ ๑๔ การเปรียบเทียบ functional quality ของ VC และ TP ต่อ epitope KK10	๔๒
รูปที่ ๑๕ ปริมาณ HIV-RNA (pVL) ของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*57/58	๔๔
รูปที่ ๑๘ และ ๑๙ การเปรียบเทียบ functional quality ของ VC และ TP ต่อ epitopes ที่ presented โดย HLA-B*57/58	๔๕
รูปที่ ๒๐ Polyfunctional T cells สามารถควบคุม HIV replication และ รักษาปริมาณ CD4 T cell count	๔๗

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๒ ,ปี ๒๕๕๓ และปี ๒๕๕๔ ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกสำหรับสถานที่ และเครื่องมือ และท้ายที่สุด ผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครที่ได้สังเกตเห็นความสำคัญ และยินดีบริจาคเลือดเพื่อความสำเร็จของโครงการวิจัยนี้

รายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย)

บทบาทของทีเซลล์ต่อการวิวัฒนาการของเอชไอวี:
ข้อมูลสำคัญสำหรับการ พัฒนาวัดขึ้นป้องกันโรคเอดส์

ชื่อโครงการวิจัย
(ภาษาอังกฤษ)

The role of T cell on the HIV evolution: An essential
information for HIV vaccine development

หัวหน้าโครงการวิจัย
หน่วยงานหลัก

นายแพทย์ ดร.ปกรัฎฐ์ หังสสุต
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในการพัฒนายาคี HIV เราจำเป็นต้องมีความรู้ในกลไกการป้องกันการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ก่อนการศึกษาภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อ HIV ที่มีความสามารถในการควบคุมปริมาณ HIV ได้ตามธรรมชาติซึ่งมีปริมาณ HIV-RNA น้อยกว่า ๒๐๐๐ copies/ml สร้างโอกาสในการวิเคราะห์และค้นหาว่ากลไกอะไรที่ทำให้ผู้ติดเชื้อเหล่านี้สามารถควบคุมไวรัสได้

ผู้วิจัยรับสมัครผู้ที่ควบคุมไวรัสได้ดี (viraemic controllers, VC) จำนวน ๑๓ คน และผู้ที่ควบคุมไวรัสได้ตามปกติ (typical progressor, TP) ๓๒ คน อาสาสมัครทุกรายได้รับการวิเคราะห์ complete blood count, CD4 และ CD8 ตลอดจนปริมาณ plasma HIV-RNA ผู้วิจัยวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน p24 จากอาสาสมัครจำนวน ๑๐ รายเพื่อใช้ในการสร้าง consensus ของไวรัส "สมัยใหม่" และ overlapping peptide (OLP) ที่เป็นตัวแทนของโปรตีน p24 จาก HIV ที่มีการแพร่ระบาดในปัจจุบัน การวิเคราะห์ T-cell response ต่อ OLP หรือ epitope ทำโดยเทคนิค IFN γ ELISpot assay

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการมี protective allele ที่เคยระบุไว้ใน การศึกษาอื่น ไม่ได้การันตีว่าคนนั้นจะมีการควบคุมไวรัสที่ดีเสมอไปในคนไทย และที่ชัดเจนได้แก่ HLA-B58 ซึ่งก่อนหน้านี้เป็นที่ยอมรับว่าเป็น protective allele ใน การศึกษานี้ ทุกคนที่มี allele ดังกล่าวไม่มีความสามารถในการควบคุมไวรัสอย่างมีประสิทธิภาพ และถูกจัดอยู่ในกลุ่ม TP HLA-A11 เป็น HLA allele ที่พบมากที่สุด ในอาสาสมัครแต่ไม่มีผลในการควบคุมไวรัสแต่ประการใด ความกว้าง และความแรงของการตอบสนองของ T cell มีความใกล้เคียงกันในในกลุ่ม VC และ TP (542 vs. 685 SFU/106 PBMC) และเมื่อเปรียบเทียบในคนที่มีความคล้ายคลึงกัน พบว่าความแรงของการตอบสนองก็ไม่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน โดยค่ามัธยฐานของการตอบสนองใน VC/TP ที่มี HLA-B27 คือ 889 และ 769 SFU/106 PBMC และค่ามัธยฐานของการตอบสนองใน VC/TP ที่มี HLA-B27 คือ 542 และ 644 SFU/106 PBMC

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการวิเคราะห์กลไกในการควบคุมการติดเชื้อ HIV จำเป็นต้องทำให้กลุ่มประชากรที่มี immunogenetic และสายพันธุ์ไวรัสที่หลากหลาย ข้อมูลจากการศึกษาในคอเคเซียนที่ส่วนใหญ่แล้วติดเชื้อ HIV subtype ควรได้รับการตีความด้วยความระมัดระวัง นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังพบอีกว่าความแรง (magnitude) ของการตอบสนองแต่เพียงอย่างเดียวอาจไม่พอในการควบคุมการติดเชื้อ HIV ผู้วิจัยจะได้วิเคราะห์คุณภาพของ T cells ในการศึกษาในระยะถัดไป

Abstract

The role of T cell on the HIV evolution: An essential information for HIV vaccine development

Pokrath Hansasuta, Navapon Techakriengkrai, Yada Tansiri

Division of Virology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Objective(s) To develop a successful HIV-1 vaccine, identification of the immune correlates of protection against natural HIV-1 infection is of crucial priority. Study in a unique group of infected individuals who are able to control HIV-1 naturally (HIV controllers; plasma HIV-1 load (pVL) less than 2,000 copies/ml without antiretroviral therapy) have provided a chance to investigate the roles of host immune responses in natural HIV-1 control.

Material and Method: A total number of 13 HIV controllers (VC) and 32 typical progressors (TP) were enrolled. Their magnitude and functional quality of the T-cell responses against Gag p24 protein (defined by the number of function simultaneously performed, from single to full 5 functions of IL-2, TNF- α , IFN- γ , MIP1- β and CD107a expression) were analyzed by ELISpot assay and polychromatic ICS. Complete blood count, together with CD4 and CD8 counts, was determined for a calculation of absolute HIV-specific T cells.

Results HIV-1 Gag p24-specific-CD8⁺ T cell responses of VC were composed of high functional quality CD8⁺ T cells than that of TP ($p < 0.05$). This high functional quality observed in VC were independent of age, duration of infection or presence of protective HLA-I alleles (HLA-B*27, -B*57 and -B*58) and were observed at both a whole p24 protein specific and a single epitope specific level. The absolute number of high functional quality HIV-1 Gag p24-specific-CD8⁺ T cells was significantly in a negative correlation with pVL ($r = -0.6984$, $p = 0.0006$) and also in a positive correlation with CD4⁺ T cell counts ($r = 0.5648$, $p = 0.0095$), hence clearly illustrated their roles in determining HIV-1 clinical outcome.

Conclusion This study indicated that possession of an adequate numbers of high functional quality HIV-1 Gag p24-specific-CD8⁺ T cells is important for becoming a natural HIV controller and provided a solid evidence supporting their roles as an immune correlate of HIV-1 protection.

บทนำ

โรคเอดส์เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของทุกประเทศ องค์การ UNAIDS ได้ประมาณว่ามีผู้ติดเชื้อประมาณ ๓๙.๕ ล้านคนทั่วโลก และในจำนวนนี้เป็นผู้ติดเชื้อในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ประมาณ ๗.๘ ล้านคน สำหรับประเทศไทยคาดว่าจะมีผู้ติดเชื้อ และยังมีชีวิตอยู่ประมาณ ๘ แสน ถึง ๑ ล้านคน ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมียาต้านไวรัส และทำให้ผู้ติดเชื้อมีชีวิตยืนยาวขึ้น แต่ปัญหาของการต่อสู้ HIV โดยใช้ยาต้านไวรัสก็ยังมีอยู่มากพอสมควร ปัญหาเหล่านี้ได้แก่ ราคายา[1] ผลข้างเคียงทั้งในระยะสั้น และระยะยาว[2] ตลอดจนเชื้อไวรัสดื้อยาที่นับวันจะเป็นปัญหามากขึ้น[3] ดังนั้น ทางออกของการแก้ปัญหาเรื่องโรคเอดส์อย่างยั่งยืนน่าจะเป็นการพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคเอดส์

วัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสในอดีตประสบความสำเร็จค่อนข้างง่ายตาย เนื่องจากวัคซีนเหล่านี้เป็นวัคซีนที่ใช้ป้องกันไวรัสชนิดที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ แต่สำหรับการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคเอดส์อาจยุ่งยากกว่านั้น สาเหตุที่สำคัญได้แก่ HIV ไม่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ ในความเป็นจริงแล้วนักวิทยาศาสตร์ไม่เคยพบใครเลยที่เมื่อติดเชื้อ HIV แล้วสามารถกำจัดเชื้อออกไปจากร่างกายได้ ดังนั้น การออกแบบวัคซีนโดยอาศัยหลักการว่าเมื่อร่างกายติดเชื้อไวรัสแล้ว จะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติจึงใช้ไม่ได้สำหรับ HIV สาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งได้แก่การที่ HIV มีการเพิ่มจำนวน และกลายพันธุ์อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์เหล่านี้ถูกควบคุมในระดับหนึ่ง เนื่องจากกรดอะมิโนบางตำแหน่งมีความสำคัญต่อโครงสร้าง [4] หรือหน้าที่ของโปรตีนของ HIV การกลายพันธุ์ในตำแหน่งเหล่านี้จึงอาจทำให้ไวรัสไม่สามารถมีชีวิตต่อไปได้ (abortive mutation)

ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของ HIV มีข้อจำกัด และเมื่อกระบวนการหลบหลีกภูมิคุ้มกันโดยการกลายพันธุ์ดำเนินไปเรื่อยๆ ในที่สุดแล้ว HIV จะไม่สามารถกลายพันธุ์หนีต่อไปได้และอาจมีลักษณะของลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะซึ่งสามารถนำข้อมูลส่วนนี้เพื่อใช้ในการออกแบบวัคซีนได้ นอกจากนี้ในประชากรหนึ่งที่มี HLA polymorphism คล้ายคลึงกัน การหลบหลีกของภูมิคุ้มกันนี้อาจนำไปสู่รอยประทับของ HLA ได้เช่นกัน [5]

นอกจากควรเลือกลำดับกรดอะมิโนที่ HIV ไม่สามารถหลบหนีไปได้แล้ว นักวิทยาศาสตร์อาจต้องอาศัยปัจจัยอีกประการหนึ่งในการตัดสินใจว่าลำดับกรดอะมิโนชนิดใดที่ควรใส่ไว้ในวัคซีนต้นแบบ ปัจจัยที่สำคัญนี้ได้แก่ ความสามารถในการกระตุ้นที่เซลล์ให้หลัง cytokine ได้หลายชนิด (polyfunctional T cell) cytokine

เหล่านี้ได้แก่ MIP1 α/β , TNF α , IL-2, Gamma Interferon และความสามารถในการเพิ่มจำนวน (Proliferative capacity) เป็นต้น ซึ่งการที่ทีเซลล์หลัง cytokines ได้หลายชนิดได้ถูกแสดงให้เห็นแล้วว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ทีเซลล์มีความสามารถในการควบคุมการติดเชื้อ HIV

โครงร่างวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้ออกแบบวางแผนการทดลองเพื่อศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ HIV การหลบหลีกภูมิคุ้มกันของ HIV และการทำงานทีเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการกลายพันธุ์ ข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคเอดส์ในอนาคต

ประเภทของการวิจัย

โครงการนี้เป็นงานวิจัยประเภทพื้นฐาน (Basic research)

สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาที่ทำการวิจัย

สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

. คำสำคัญ (key words)

- Human Immunodeficiency Virus
- Cytotoxic T lymphocyte
- T cell
- Gag
- Immune escape
- Polyfunctional T cell
- AIDS
- Mutation

ที่มาและความสำคัญ

โรคเอดส์เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของทุกประเทศ องค์การ UNAIDS ได้ประมาณว่ามีผู้ติดเชื้อประมาณ ๓๙.๕ ล้านคนทั่วโลก และในจำนวนนี้เป็นผู้ติดเชื้อในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ประมาณ ๗.๘ ล้านคน สำหรับประเทศไทยคาดว่าจะมีผู้ติดเชื้อ และยังมีชีวิตอยู่ประมาณ ๘ แสน ถึง ๑ ล้านคน ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะมียาต้านไวรัส และทำให้ผู้ติดเชื้อมีชีวิตยืนยาวขึ้น แต่ปัญหาของการต่อสู้ HIV โดยใช้ยาต้านไวรัสก็ยังมีอยู่มากพอสมควร ปัญหาเหล่านี้ได้แก่ ราคายา[1] ผลข้างเคียงทั้งในระยะสั้น และระยะยาว[2] ตลอดจนเชื้อไวรัสดื้อยาที่นับวันจะเป็นปัญหามากขึ้น[3] ดังนั้น ทางออกของการแก้ปัญหาเรื่องโรคเอดส์อย่างยั่งยืนน่าจะเป็นการพัฒนาวัคซีนเพื่อใช้ในการป้องกันโรคเอดส์

วัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสในอดีตประสบความสำเร็จค่อนข้าง ง่ายตาย เนื่องจากวัคซีนเหล่านี้เป็นวัคซีนที่ใช้ป้องกันไวรัสชนิดที่สามารถกระตุ้นให้เกิด ภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ แต่สำหรับการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคเอดส์อาจยุ่งยากกว่านั้น สาเหตุที่สำคัญได้แก่ HIV ไม่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ ในความเป็นจริงแล้ว นักวิทยาศาสตร์ไม่เคยพบใครเลยที่เมื่อติดเชื้อ HIV แล้วสามารถกำจัดเชื้อออกไปจาก ร่างกายได้ ดังนั้น การออกแบบวัคซีนโดยอาศัยหลักการว่าเมื่อร่างกายติดเชื้อไวรัสแล้ว จะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติจึงใช้ไม่ได้สำหรับ HIV สาเหตุที่สำคัญประการ หนึ่งได้แก่การที่ HIV มีการเพิ่มจำนวน และกลายพันธุ์อย่างรวดเร็วแต่อย่างไรก็ตาม การ กลายพันธุ์เหล่านี้ถูกควบคุมในระดับหนึ่ง เนื่องจากกรดอะมิโนบางตำแหน่งมี ความสำคัญต่อโครงสร้าง [4] หรือหน้าที่ของโปรตีนของ HIV การกลายพันธุ์ใน ตำแหน่งเหล่านี้จึงอาจทำให้ไวรัสไม่สามารถมีชีวิตต่อไปได้ (abortive mutation) ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของ HIV มีข้อจำกัด และเมื่อ กระบวนการหลบหลีกภูมิคุ้มกันโดยการกลายพันธุ์ดำเนินไปเรื่อยๆ ในที่สุดแล้ว HIV จะ ไม่สามารถกลายพันธุ์หนีต่อไปได้ และอาจมีลักษณะของลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะซึ่ง สามารถนำข้อมูลส่วนนี้เพื่อใช้ในการออกแบบวัคซีนได้นอกจากนี้ในประชากรหนึ่งที่มี HLA polymorphism คล้ายคลึงกัน การหลบหลีกของภูมิคุ้มกันนี้อาจนำไปสู่รอยประทับ ของ HLA ได้เช่นกัน [5]

นอกจากควรเลือกลำดับกรดอะมิโนที่ HIV ไม่สามารถหลบหนีไป ได้แล้ว นักวิทยาศาสตร์อาจต้องอาศัยปัจจัยอีกประการหนึ่งในการตัดสินใจว่าลำดับกรดอะ มิโนชนิดใดที่ควรใส่ไว้ในวัคซีนต้นแบบ ปัจจัยที่สำคัญนี้ได้แก่ ความสามารถในการ กระตุ้นที่เซลล์ให้หลัง cytokine ได้หลายชนิด (polyfunctional T cell) cytokine

เหล่านี้ได้แก่ MIP1 α/β , TNF α , IL-2 และ Gamma Interferon เป็นต้น ซึ่งการที่ทีเซลล์หลัง cytokines ได้หลายชนิดได้ถูกแสดงให้เห็นแล้วว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ทีเซลล์มีความสามารถในการควบคุมการติดเชื้อ HIV

โครงร่างวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้ออกแบบวางแผนการทดลองเพื่อศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ HIV การหลบหลีกภูมิคุ้มกันของ HIV และการทำงานของทีเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการกลายพันธุ์ ข้อมูลนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคเอดส์ในอนาคต

วัตถุประสงค์

- ๑ เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของโปรตีน gag ของผู้ติดเชื้อ HIV
- ๒ เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของการตอบสนองของทีเซลล์ต่อ peptide ที่เป็น wild type และ mutant

ขอบเขตของงานวิจัย

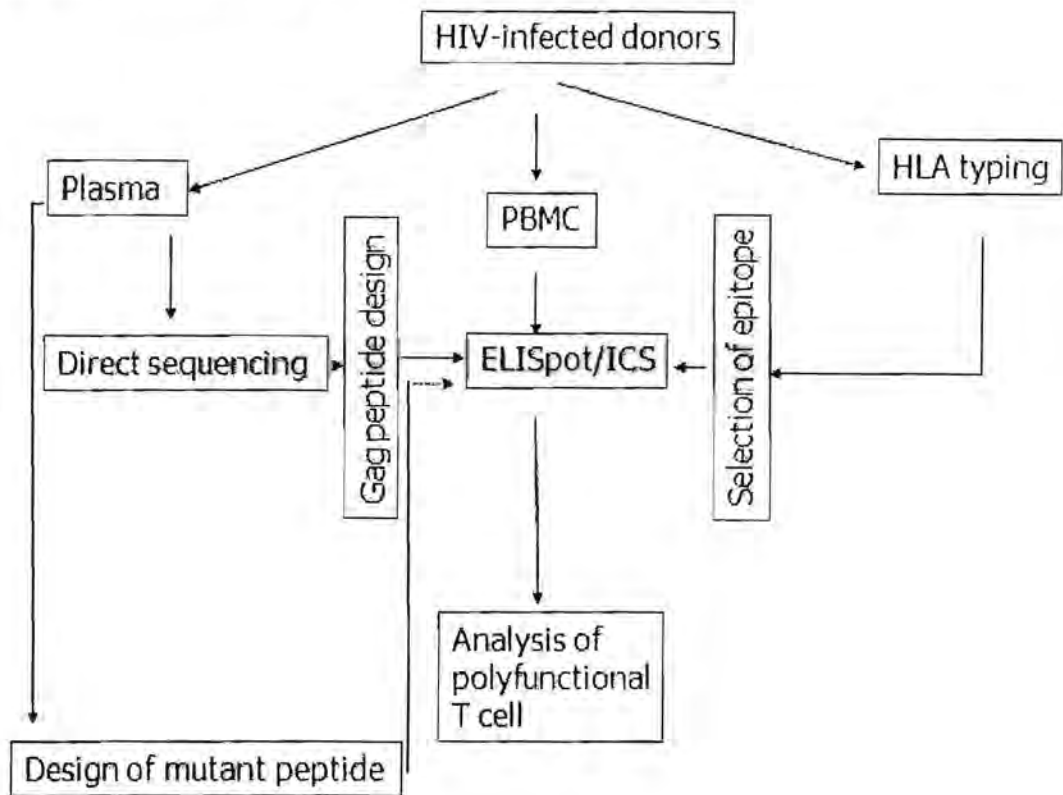
งานวิจัยนี้ทำการศึกษาในผู้ติดเชื้อ HIV ที่มีปริมาณ CD4 มากกว่า 300 cells/mm³ โดยได้ชี้แจงรายละเอียดของโครงการให้แก่อาสาสมัครได้รับทราบแล้ว และได้รับการอนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบคิดการวิจัย

HIV เป็นไวรัส ที่หลบหลีกภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการหนึ่งที่ไวรัสชนิดนี้ใช้ได้แก่ การกลายพันธุ์ของส่วนที่เป็น epitope ของโปรตีนที่สำคัญ การกลายพันธุ์ดังกล่าวถ้าเกิดขึ้นที่ anchor residue จะทำให้ epitope นั้นไม่สามารถจับกับ HLA molecule ได้ หรือถ้าเกิดบริเวณ T cell receptor residue ก็จะทำให้เกิดการหลบหลีกจากการรับรู้ของทีเซลล์โดยตรง นอกจากนี้ อาจเป็นไปได้ว่า mutant peptides ที่เกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ของ HIV อาจทำให้เกิดการตอบสนองของทีเซลล์ที่ไม่มีประสิทธิภาพ เช่น การหลั่ง cytokine เพียงชนิดเดียวแทนที่จะเป็น polyfunctional T cell เป็นต้น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีสมมติฐานว่า peptide ที่กระตุ้นการตอบสนองของ T cell สามารถมีได้หลายรูปแบบ แต่มีบางรูปแบบเท่านั้นที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ polyfunctional T cell ได้

คณะผู้วิจัยจะได้รับสมัครอาสาสมัครที่ติดเชื้อ HIV จำนวน ๒๐ คนเจาะเลือดเพื่อทำการแยก Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) และ plasma ทำการวิเคราะห์ HLA type และทำการหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน gag ด้วยการทำ direct sequencing เพื่อนำมาประกอบเป็นข้อมูลในการออกแบบ overlapping peptide ของโปรตีน gag เมื่อได้ peptide แล้ว จึงทำการวิเคราะห์ T cell response ด้วยวิธี ELISpot screening โดยใช้ overlapping peptides และ epitope peptide หลังจากนั้น ทำการออกแบบ mutant peptides/epitopes เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ T cell response ด้วยเทคนิค Intracellular cytokine staining

แผนภูมิแนวความคิดการทำวิจัย



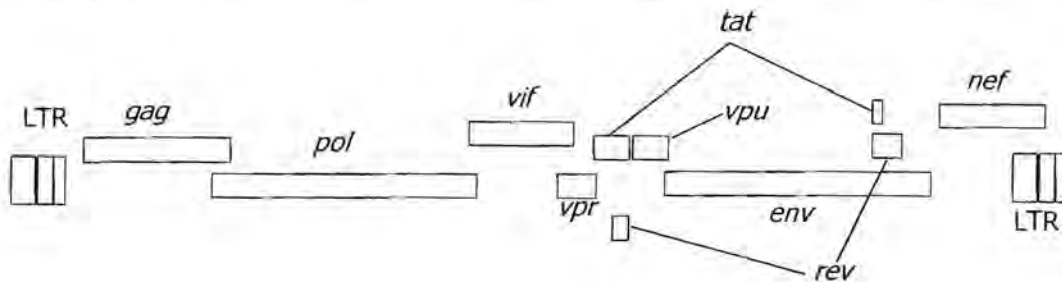
บทบทวนวรรณกรรม

HIV เป็นสมาชิกของไวรัสใน Genus Lentivirus ซึ่งอยู่ใน Family Retroviridae ไวรัสชนิดนี้มีพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยวสองเส้น HIV เป็น enveloped virus ที่มี glycoprotein spikes (gp160) ที่มีบทบาทสำคัญในการเข้าสู่เซลล์ของไวรัสสมาชิกของ Lentivirus นอกจาก HIV แล้ว ยังมี Simian Immunodeficiency Virus (SIV) ซึ่งเป็นไวรัสพบใน primate รวมทั้งสิ้น ๒๖ สายพันธุ์ อาทิ SIVagm (SIV ใน African Green Monkey) เป็นต้น SIV ใน host ตามธรรมชาติเหล่านี้ จะไม่ก่อโรคใดๆ แต่สามารถก่อโรคที่มีอาการคล้ายโรคเอดส์ได้ในลิงแสม (Rhesus macaques) ซึ่งเป็นลิงประจำถิ่นของทวีปเอเชีย [6] นอกจากนี้ นักวิทยาศาสตร์ยังเชื่ออีกว่า SIVcpz หรือ SIV ที่มาจากชิมแปนซี (*Pan troglodytes troglodytes*) เป็นต้นกำเนิดของ HIV-1 ที่ระบาดในมนุษย์ [7] ส่วน HIV-2 อาจจะมาจกเชื้อ SIVsm (SIV ที่มาจากลิง Sooty mangabey (*Cercocebusatys*)) [8]

HIV สามารถแบ่งได้เป็น ๒ ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่ HIV-1 ที่ระบาดอยู่ทั่วโลกในขณะนี้ และ HIV-2 ซึ่งมีการระบาดส่วนใหญ่อยู่ในทวีปแอฟริกา HIV-1 สามารถแบ่งออกเป็น ๓ กลุ่มได้แก่ Major group (M), Outlier group (O) และ Non-M, non-O group (N) การระบาดในขณะนี้มาจาก group M เป็นส่วนใหญ่ นักวิทยาศาสตร์ได้แบ่งกลุ่ม HIV-1 ใน group M ตามความใกล้เคียงกันของ nucleotide sequence เรียกกลุ่มย่อยนี้ว่า subtype หรือ clade แต่ถ้า HIV-1 สายพันธุ์ใดที่มีลักษณะของไวรัสมากกว่าหนึ่ง subtype เรียกไวรัสสายพันธุ์นี้ว่าเป็น Circulating Recombinant Form (CRF) ตัวอย่างของ CRF ได้แก่ HIV-1 สายพันธุ์ที่ระบาดแพร่หลายมากที่สุดในประเทศไทย ซึ่งแต่เดิมถูกจัดอยู่ใน subtype E แต่ต่อมาพบว่าไวรัสชนิดนี้เป็นไวรัสลูกผสมระหว่าง subtype A และ subtype E จึงได้ตั้งชื่อใหม่เป็น CRF01_AE [9] เป็นต้น นอกจากนี้ นักวิทยาศาสตร์ยังพบว่ายังมี HIV ลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ CRF01_AE และ subtype B ซึ่งได้ตั้งชื่อว่า CRF15_01B [10] HIV บางสายพันธุ์เป็นลูกผสมของสายพันธุ์ต่างๆ มากกว่าหรือเท่ากับ ๔ สายพันธุ์ขึ้นไป หรือที่เรียกว่าเป็น mosaic viruses จะใช้คำต่อว่า cpx ซึ่งหมายถึง complex เช่น subtype I ซึ่งปัจจุบันพบว่าเป็นสายพันธุ์ลูกผสมแบบ mosaic จึงตั้งชื่อใหม่ว่าเป็น CRF04-cpx เป็นต้น

HIV-1 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ ๑๐๐ ถึง ๑๕๐ นาโนเมตร และมีขนาดของ genome ประมาณ ๑๐ กิโลเบส ซึ่งมี long-terminal repeats (LTRs) ขนาบอยู่สองข้าง HIV-1 มียีนหลักอยู่สามชนิดได้แก่ *gag* (ซึ่งถอดรหัสให้โครงสร้างของไวรัส) *pol* (ซึ่งถอดรหัสให้ enzyme ของไวรัส) และ *env* (ซึ่งถอดรหัสให้

ไกลโคโปรตีนของ envelope) นอกจากนี้แล้ว HIV-1 ยังมียีนอีก ๖ ชนิดที่เป็น regulatory และ accessory genes ได้แก่ *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef* และ *vpu* (รูปที่ ๑)



รูปที่ ๑ Genomic organization of HIV-1

โครงสร้างของ HIV-1 ส่วนใหญ่ได้มาจากการถอดรหัสของยีน *gag* ซึ่งตอนแรกจะได้เป็นโปรตีนตั้งต้น (precursor protein) ขนาดใหญ่ (pr55) หลังจากนั้นจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ protease ของไวรัสได้เป็นโปรตีนชนิดเล็กลง เช่น Matrix (MA, p17), Capsid (CA, p24) และ Nucleocapsid (NC, p7) matrix เป็นโปรตีนที่อยู่ผิวด้านในของ envelope และทำหน้าที่ในการชักนำให้เกิดการหุ้ม virion ของ HIV-1 ด้วย envelope ในกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัสก่อนที่จะออกนอกเซลล์ นอกจากนี้ matrix ยังมีส่วนร่วมในกระบวนการนำ viral preintegration complex เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์อีกด้วย ส่วน viral capsid (p24) นั้นเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของแกนกลาง (core) ของ HIV-1 ส่วน nucleocapsid (p7) เป็น RNA binding protein และมีหน้าที่ในการบรรจุ RNA ของไวรัสเข้าสู่ virion

เอนไซม์ของไวรัสก็ถูกสร้างมาโดยการย่อยสลายโปรตีนตั้งต้นเช่นกัน โดยระหว่างการสร้างโปรตีนของ HIV-1 นั้นบางครั้งจะเกิดการสร้างโปรตีนของ *gag* และ *pol* เชื่อมกันเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ เรียกว่า *gag-pol* precursor protein ซึ่งจะถูกย่อยสลายโดย viral protease ได้เป็น โปรตีน *gag* และเอนไซม์ของไวรัสได้แก่ protease (p11), reverse transcriptase (RT)/RNase H (p66/p51) และ Integrase (p32)

โปรตีนของไวรัสที่ได้จากการถอดรหัสของยีน *env* นั้น จะถูกสังเคราะห์ขึ้นใน endoplasmic reticulum (ER) ได้เป็น polypeptide ที่มีขนาด ๘๘ กิโลดาลตัน และผ่านกระบวนการ glycosylation ที่ ER และ golgi network ได้เป็นไกลโคโปรตีน gp160 ซึ่งมีขนาด ๑๖๐ กิโลดาลตัน ซึ่งภายหลังจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ของเซลล์ได้เป็น ๒ ส่วนได้แก่ gp41 ซึ่งเป็น transmembrane subunit และ gp120

ซึ่งเป็น surface subunit แต่ทั้งสองส่วนยังคงเชื่อมต่อกัน และถูกนำเข้าไปแทรกใน envelope ของไวรัสซึ่งกระบวนการนี้อาศัยปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุล ๒ ชนิดได้แก่ matrix protein และ cytoplasmic domain ของ gp41 โกลโคโปรตีนนี้จะมีการประกอบกันเป็น trimers และมีลักษณะเป็น spike อยู่บนผิวของ virion โดยมีจำนวน spike ประมาณ ๗๒ spikes ต่อหนึ่ง virion

สำหรับยีนอีก ๖ ชนิดนั้น มียีนอยู่สองชนิดที่มีความจำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้แก่ *tat* และ *rev* แต่ยีนอีกสี่ชนิดนั้น (*vif*, *vpr*, *vpu* และ *nef*) ในบางกรณีไม่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของไวรัสในหลอดทดลอง ดังนั้นบางทีจึงเรียกว่า accessory genes แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พบว่า ยีนทั้ง ๖ ชนิดนี้มีความสำคัญมากกว่าที่เคยคิดมาในอดีต

แอนติบอดีที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกัน และควบคุมการติดเชื้อไวรัสได้แก่ neutralising antibody ซึ่งในกรณีของ HIV นั้นตำแหน่งที่ neutralising antibodies ไปจับมีอยู่สามตำแหน่งได้แก่ CD4-binding site ซึ่งอยู่บริเวณ V3-loop ของ gp120, co-receptor binding site และ gp41 แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของแอนติบอดีต่อ HIV นั้นดูเหมือนว่าจะมีปัญหาในการทำหน้าที่ตามปกติ เนื่องจากนักวิทยาศาสตร์ได้พบว่าแอนติบอดีจากผู้ติดเชื้อ HIV มีคุณสมบัติในการ neutralisation เชื้อ HIV ที่เป็น primary isolate ได้ไม่ดี [11-13] และยิ่งไปกว่านั้นแอนติบอดีส่วนใหญ่ที่สร้างขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อ HIV เป็น non-neutralizing antibodies ซึ่งจับกับ virion debris [14] และยิ่งพบอีกว่าแอนติบอดีดังกล่าวอาจจะมียับยั้งมาก ในการควบคุมการติดเชื้อในระยะ primary infection โดยจะเห็นได้จากว่า การลดลงของปริมาณไวรัสในระยะ primary infection เกิดขึ้นก่อนมี neutralising antibodies เสียอีก [14] และที่สำคัญ neutralising antibodies เหล่านี้ส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ค่อนข้างสูง มี neutralising antibodies อยู่เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่มีความสามารถในการ neutralisation ข้ามสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในขณะที่ยังมีข้อสงสัยอยู่ว่าแอนติบอดีจะมีประสิทธิภาพเพียงใดในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ HIV นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าภูมิคุ้มกันผ่านเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง cytotoxic T-lymphocyte (CTL) อาจจะมีบทบาทสำคัญกว่า โดยมีหลักฐานว่าในระยะ primary infection นั้น ปริมาณไวรัสในเลือดลดลงสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของ CTL [15] ซึ่งอาจจะเป็นหลักฐานว่า CTL สามารถควบคุมการติดเชื้อ HIV อย่างน้อยที่สุดในช่วงแรก นอกจากนี้ยังพบอีกว่ามีความสัมพันธ์เชิงผกผันระหว่างปริมาณ HIV ในเลือด และจำนวน HIV-specific T cells ในระยะ chronic infection [16] ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อวิเคราะห์การตอบสนองของภูมิคุ้มกันในผู้ติดเชื้อ HIV ที่มีการ

ดำเนินโรคที่ดี (Long-term slow progressor) จะพบว่าการตอบสนองของ CTL ต่อโปรตีนบางชนิดของ HIV มีบทบาทสำคัญที่ทำให้ผู้ติดเชื้อในกลุ่มนี้มีการดำเนินโรคที่ดีกว่าคนทั่วไป [17]ไม่เพียงแต่หลักฐานในผู้ติดเชื้อเท่านั้น CTL ยังมีบทบาทในการป้องกันการติดเชื้อผู้ที่สัมผัสเชื้อแต่ไม่ติด (Highly-exposed persistently seronegative persons, HEPS) อีกด้วย[18-21]ด้วยหลักฐานดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ผู้เชี่ยวชาญในการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ HIV ในปัจจุบันจึงมีแนวคิดว่าจะพัฒนาวัคซีนที่มุ่งเป้าครอบคลุมหลักในการกระตุ้น CTL ต่อโปรตีนของ HIV

ถึงแม้ว่า CTL จะมีบทบาทสำคัญในการควบคุม HIV แต่ไวรัสชนิดนี้มีความสามารถในการกลายพันธุ์หลบหลีกภูมิคุ้มกัน และในบางกรณีปรากฏการณ์ในลักษณะนี้นำไปสู่การดำเนินโรคที่เลวร้ายลง[22] และไวรัสกลายพันธุ์ดังกล่าวในกรณีที่มารดาติดเชื้อ HIV สามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกได้ [23] อย่างไรก็ตาม การหลบหลีกจาก CTL นี้ อาจจะไม่เกิดขึ้นในทุกกรณี โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อ epitope อยู่ในบริเวณที่มีความสำคัญต่อโครงสร้างของ HIV [4]Kellerher และคณะได้แสดงให้เห็นว่า epitope เส้นหนึ่งที่อยู่บริเวณ p24 (capsid) และ restricted ผ่าน HLA-B*2705 ถึงแม้ว่าจะเป็น immunodominant epitope แต่การกลายพันธุ์เกิดขึ้นได้น้อยมาก เนื่องจากบริเวณดังกล่าวเป็นส่วนสำคัญในการประกอบเป็น capsid ของไวรัส ลักษณะของ structural constraint เช่นนี้มักเกิดขึ้น HLA ที่มีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับการดำเนินโรคที่ช้าเท่านั้น อย่างไรก็ตามในการศึกษาของคณะผู้วิจัยเองพบว่า HLA-A*1101-restricted nef-specific epitope ซึ่งมีการตอบสนองในระดับสูงในผู้ติดเชื้อชาวไทย ไม่สามารถทำให้เกิด escape mutation ได้ (Hansasuta, P. et al, manuscript in preparation) หวังอาจเป็นเพราะบริเวณดังกล่าวมีความสำคัญต่อ HIV จนไม่สามารถเกิดการกลายพันธุ์ได้ เช่นเดียวกับกรณีของ HLA-B*2705 และทั้งที่ HLA-A*1101 มีความชุกมากในประชากรคนไทยจึงน่าจะเกิดการหลบหนีภูมิคุ้มกันแล้วทิ้งร่องรอยไว้ในสายพันธุ์ของ HIV ที่ระบาดอยู่ในประเทศไทย อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์การตอบสนองของทีเซลล์ในกรณีนี้ผู้วิจัยได้ใช้เทคนิควัดการหลั่ง IFN γ โดย ELISpot assay ดังนั้น มีความเป็นไปได้ว่าความแรงของการตอบสนองโดยการหลั่ง IFN γ อาจไม่มีความสัมพันธ์กับ antiviral pressure ของ HIV-specific T cell ดังนั้นการวิเคราะห์การตอบสนองของ T cell โดยการวัดการสร้าง cytokines หลายชนิดอาจจำเป็นเพื่อวิเคราะห์ antiviral pressure ที่แท้จริงของ HIV-specific T cell

ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยขอเสนอการศึกษาวิวัฒนาการของสายพันธุ์ HIV โดยเฉพาะอย่างยิ่งความหลากหลายของโปรตีน gag ตลอดจนวิเคราะห์การตอบสนองของทีเซลล์ต่อโปรตีน gag โดยใช้เทคนิค intracellular cytokine staining

(ICS) เพื่อวิเคราะห์การสร้าง cytokines ของ HIV-specific T cell ในกรณีที่ไวรัสมีการกลายพันธุ์บริเวณ peptide หรือ epitope ที่ศึกษา ผู้วิจัยจะได้ศึกษารายละเอียดของการตอบสนองของทีเซลล์ที่มีต่อ wild type และ variant peptides โดยใช้เทคนิค ICS

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ๑ ข้อมูลเรื่องความหลากหลายทางพันธุกรรมของโปรตีน gag
- ๒ ข้อมูลการตอบสนองของทีเซลล์ต่อ peptide ที่เป็น wild type และ Mutant
- ๓ ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ ๑ ฉบับ
- ๕ นิสิตระดับบัณฑิตศึกษา ๑ คน

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

ผลงานวิจัยนี้จะถ่ายทอดสู่นิสิตทั้งในระดับปริญญาตรี และระดับบัณฑิตศึกษา และจะได้นำเสนอผลงานในที่ประชุมในระดับนานาชาติ ตลอดจนมีผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

- ๑ กลุ่มประชากร
อาสาสมัครที่ติดเชื้อ HIV จำนวน ๑๐ คน อาสาสมัครเหล่านี้ควรมี CD4 count มากกว่า 300 cells/mm³
- ๒ การเก็บตัวอย่าง
เจาะเลือดรวม ๕๐ ซีซีเพื่อเก็บพลาสมาโดยใช้ EDTA เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว และ Peripheral mononuclear cell (PBMC) โดยใช้ heparin เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัว
- ๓ การแยก PBMC
นำ heparinised blood มาเจือจางด้วย RPMI ในอัตราส่วน ๑ ต่อ ๑ หลังจากนั้นนำไปแยก PBMC โดยใช้วิธี Ficoll-hypaque density-gradient centrifugation ที่ ๒๕ องศาเซลเซียส นำเซลล์ที่ได้มาย้อมด้วย Trypan blue และนับโดยกล้องจุลทรรศน์
- ๔ การหาลำดับเบสของยีน gag โดย direct sequencing
สกัด RNA จาก plasma และเพิ่มจำนวน gag โดยใช้ primer ที่เหมาะสม โดย RT-PCR หลังจากนั้นนำไปศึกษาลำดับเบสโดยตรง (direct sequencing) โดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer
- ๕ นำข้อมูลจากการวิเคราะห์ลำดับยีนมาส่งเคราะห์เปปไทด์เพื่อใช้ใน ขั้นตอนต่อไป
- ๖ วิเคราะห์ T cell response โดยวิธี ELISpot assay เพื่อได้ข้อมูลของการตอบสนองเบื้องต้น
- ๗ วิเคราะห์การตอบสนองด้วย Intracellular cytokine staining

ระยะเวลาการทำวิจัย และแผนดำเนินการวิจัย

- ๑ เตรียมอุปกรณ์ นํ้ายา สารเคมี และเซลล์เพาะเลี้ยงระยะเวลา ๓ เดือน (ตุลาคม ถึง ธันวาคม ๒๕๕๒)
- ๒ เก็บตัวอย่างและปั่นเลือดเพื่อเก็บ PBMC ระยะเวลา ๙ เดือน ตั้งแต่ ๑ มกราคม ๒๕๕๒ ถึง ๓๐ กันยายน ๒๕๕๓
- ๓ วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ gag ระยะเวลา ๑๘ เดือนตั้งแต่ เมษายน ๒๕๕๓ ถึง กันยายน ๒๕๕๔
- ๔ ออกแบบและสังเคราะห์ peptide ระยะเวลา ๓ เดือนตั้งแต่ ตุลาคม ถึง ธันวาคม ๒๕๕๓
- ๖ วิเคราะห์การตอบสนองของ T cell ด้วย ELISpot ระยะเวลา ๑๕ เดือนตั้งแต่ มกราคม ๒๕๕๓ ถึง มีนาคม ๒๕๕๔
- ๗ วิเคราะห์การตอบสนองของ T cell ด้วยวิธี ICS ระยะเวลา ๑๕ เดือนตั้งแต่ มีนาคม ๒๕๕๓ ถึง มิถุนายน ๒๕๕๔
- ๙ รวบรวม วิเคราะห์ข้อมูล สรุป และเขียนรายงาน ระยะเวลา ๓ เดือนตั้งแต่ กรกฎาคม ถึง กันยายน ๒๕๕๔

ผลการทดลอง

ข้อมูลทางประชากรศาสตร์

ผู้วิจัยได้รับสมัครอาสาสมัครจำนวน ๔๕ คนโดยจัดเป็น typical progressor (TP) ๓๒ คน viraemic controller (VC) ๑๐ คน และ elite controller ๓ คน อายุเฉลี่ยของอาสาสมัคร ๓๐ ปีเป็นชาย ๒๔ คนและเป็นหญิง ๒๑ คนปริมาณ HIV-RNA ในพลาสมาอยู่ระหว่าง <40 - 1,132,883 copies/ml (median = 9,165 copies/ml) และ CD4+ T cell count อยู่ระหว่าง 126 - 1,319 cells/cu.mm. (median = 493 cells/cu.mm.) อาสาสมัครทุกรายยังไม่ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส (antiretroviral treatment, ART) รายละเอียดของข้อมูลกรณาดูตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ ตารางแสดงข้อมูลของอาสาสมัคร

	ID	Sex	Age	Time since seroconversion (years)	CD4 counts (cells/mm ³)	CD8 counts (cells/mm ³)	pVL (copies/ml)
EC	HN5	F	28	7	834	942	<40
	HN10	F	38	5	670	507	<40
	HN31	M	52	10	470	745	<40
VC	HN1	M	18	1	878	nat	1,999
	HN2	M	26	3	1,169	1,814	1,175
	HN9	M	43	9	639	nat	936
	HN12	M	27	1	495	791	1,549
	HN15	M	30	3	578	1,388	742
	HN20	F	24	3	493	1,104	1,034
	PRT	M	19	1	551	633	1,123
	HN24	F	28	9	699	810	151
	HN26	M	51	nat	735	780	1,318
	HN30	M	34	3	1,319	2,232	165
TP	JSM	F	36	2	265	1,348	6,569
	NOT	M	27	4	195	624	16,925
	VKJ	F	29	3	381	1,313	154,253
	SUL	M	45	4	493	896	5,385
	RSR	F	42	4	187	974	503,411
	KRR	F	37	6	126	743	88,597
	SYT	F	49	12	368	1,104	9,540
	HN21	M	44	3	881	1,222	299,077
	PNN	F	33	10	319	2,008	5,728
	HN16	M	21	1	561	1,148	12,231
	HN22	M	26	1.5	754	785	4,612
	CHL	F	66	13	448	nat	3,993
	NKM	M	37	12	173	nat	112,042
	TBT	M	21	2	185	nat	4,973
	PPK	F	40	4	219	nat	43,061
	UKY	F	33	8	249	nat	309,949
	HN8	F	36	1	659	nat	230,942
	HN17	F	28	1	325	382	10,961
	HN18	F	30	1	385	823	51,900
	HN19	M	26	2	519	1,338	17,313
	HNN5	M	29	2	375	1,259	27,487
	HNN7	M	23	1	525	1,003	30,145
	HN3	F	24	1	452	521	3,307
HN7	M	23	3	540	582	12,501	
HN11	F	58	5	450	865	3,094	

ID	Sex	Age	Time since seroconversion (years)	CD4 counts (cells/mm ³)	CD8 counts (cells/mm ³)	pVL (copies/ml)
HN14	F	28	1	551	694	32,744
HN23	M	35	1	427	1,029	3,312
HNN4	F	34	5	187	550	1,132,883
HN25	F	27	0.5	622	1,172	5,689
HN27	M	24	0.5	855	1,489	8,790
HN28	M			490	979	58,523
HN29	M			428	663	31,329

na† Not available

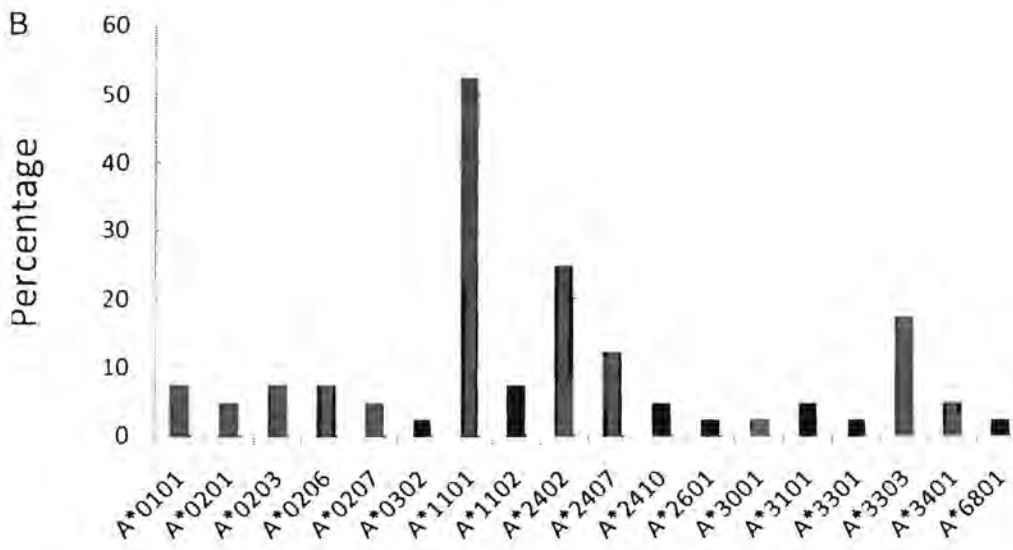
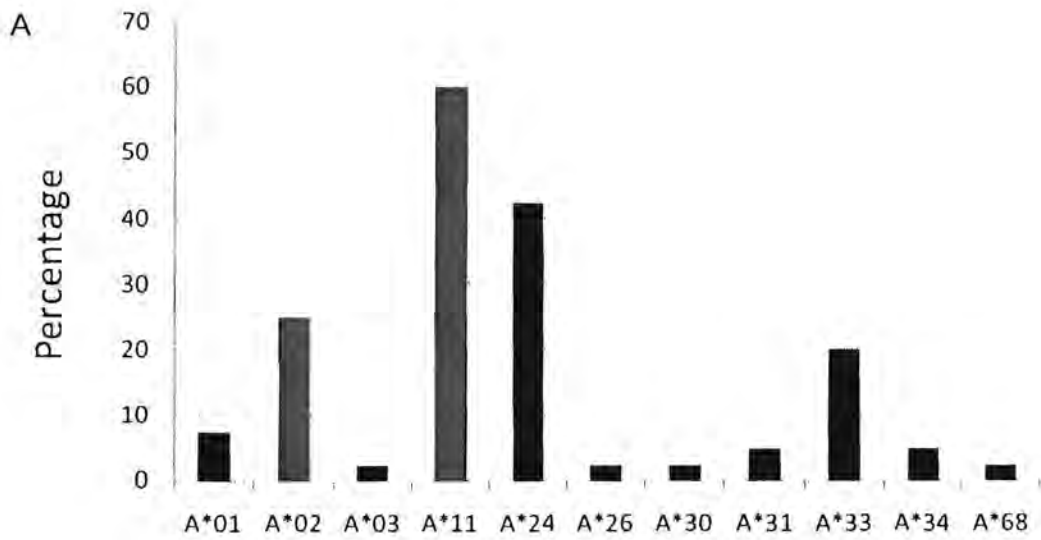
ข้อมูล Human Leucocyte Antigen class I (HLA-I) ในอาสาสมัคร

HLA-I เป็นโมเลกุลที่ถูกรายงานว่ามีความสำคัญและมีความสัมพันธ์ในการควบคุมปริมาณ HIV-RNA และผลสัมฤทธิ์ของการติดเชื้อ HIV ในกลุ่มชาติพันธุ์คอเคเซียนและกลุ่มชาติพันธุ์แอฟริกา ผู้วิจัยจึงต้องการวิเคราะห์ว่าในผู้ติดเชื้อซึ่งเป็นกลุ่มชาติพันธุ์อาเซียน (โดยใช้คนไทยเป็นตัวแทน) จะมีลักษณะและความสัมพันธ์ของ HLA-I และการควบคุม HIV-RNA เหมือนหรือแตกต่างจากที่เคยถูกไว้รายงานในชาติพันธุ์อื่นหรือไม่อย่างไร ในภาพรวมของ HLA-A locus แล้ว HLA-A*11 มีความถี่สูงสุดโดยพบถึง ๖๐ เปอร์เซ็นต์ของอาสาสมัครรองลงมาเป็น HLA-A*24 (42.5%) HLA-A*02 (25%) และ HLA-A*33 (20%) ตามลำดับสำหรับ HLA-B locus นั้น HLA-B*15 มีมากที่สุด (35%) รองลงมาเป็น HLA-B*40 (30%) HLA-B*27 (20%) และ HLA-B*58 (20%) ตามลำดับในกลุ่ม HLA-C locus นั้น HLA-C*07 มีความถี่สูงสุด (45%) รองลงมาเป็น HLA-C*03 (35%) และ HLA-C*01 (22.5%) ตามลำดับ รายละเอียดของข้อมูล HLA กรุณาดูที่ตารางที่ ๒ และรูปภาพที่ ๑ - ๓

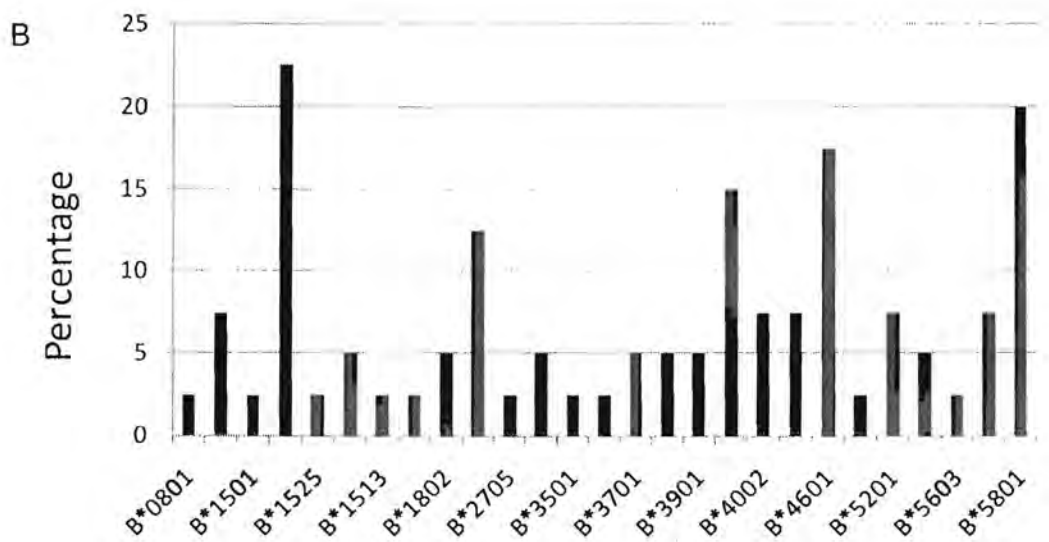
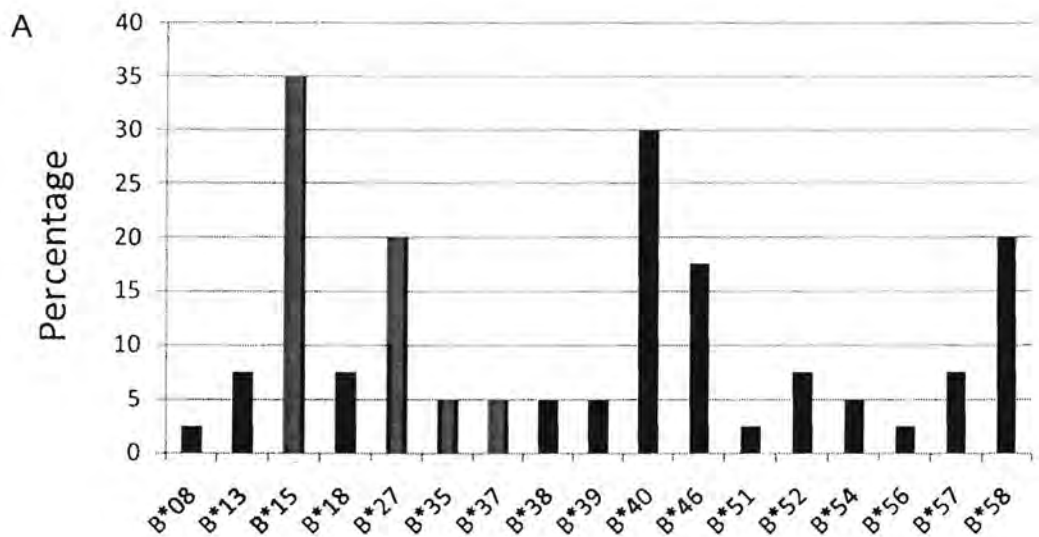
ตารางที่ ๒ ข้อมูล HLA ของอาสาสมัคร

	ID	HLA-A alleles		HLA-B alleles		HLA-C alleles	
EC	HN5	2402	1101	150201	4001	030301	080101
	HN10	2402	1101	5401	4001	0102	0304
	HN31	nat	nat	nat	nat	nat	nat
VC	HN1	2402	1101	130101	2705	20202	0403
	HN2	0302	110101	080101	2706	0304	0702
	HN9	110101	310102	3501	4001	0303	0702
	HN12	0101	1101	5701	1801	0602	0701
	HN15	0206	1102	270401	400601	0801	1202
	HN20	110101	110101	150201	460101	010201	080101
	PRT	110101	110253	5201	2704	070201	120202
	HN24	0101	0206	5701	4002	0304	0602
	HN26	0203	1101	4601	4601	0102	0102
	HN30	nat	nat	nat	nat	nat	nat
TP	JSM	1101	2410	1802	2704	nat	nat
	NOT	0206	1102	2704	3701	0602	1202
	VKJ	1101	3303	1301	5801	nat	nat
	SUL	1101	3303	1502	5801	0302	0801
	RSR	3101	3303	5102	5801	0302	1502
	KRR	2402	3303	3802	5801	0302	0702
	SY Y	3303	3303	5801	5801	0302	0302
	HN21	260101	1102	3901	2704	070201	120202
	PNN	2402	3303	2706	5801	0302	0702
	HN16	110101	330301	580101	4001	0302	0702
	HN22	0101	1101	5201	5701	060201	070201
	CHL	0201	0207	5201	5603	0102	1202
	NKM	2402	2402	1501	4002	0401	0702
	TBT	0203	1101	4001	4001	0304	0702
	PPK	2407	2407	3505	4601	nat	nat
	UKY	1101	1101	1301	4601	0102	0406
	TP	HN8	0201	1101	150201	460101	010201
HN17		0203	0207	1525	4002	0304	0702
HN18		0207	2407	1502	4601	0102	080101
HN19		0207	0207	4001	4601	0102	0702
HNN5		24020101	2407	150201	3901	0403	080101
HNN7		2402	1101	5401	400601	010201	070201
HN3		2407	1103	150201	370101	0602	0801
HN7		2407	340101	150201	1535	0702	0801
HN11		340101	300101	130201	1535	060201	070201
HN14		2402	1101	150201	150201	080101	080101
HN23		2402	6801	1505	1513	0801	1602
HNN4		2410	3301	5801	1802	0302	0704
HN25		1101	1101	3802	4006	0702	1502
HN27		nat	nat	nat	nat	nat	nat
HN28		nat	nat	nat	nat	nat	nat
HN29	nat	nat	nat	nat	nat	nat	

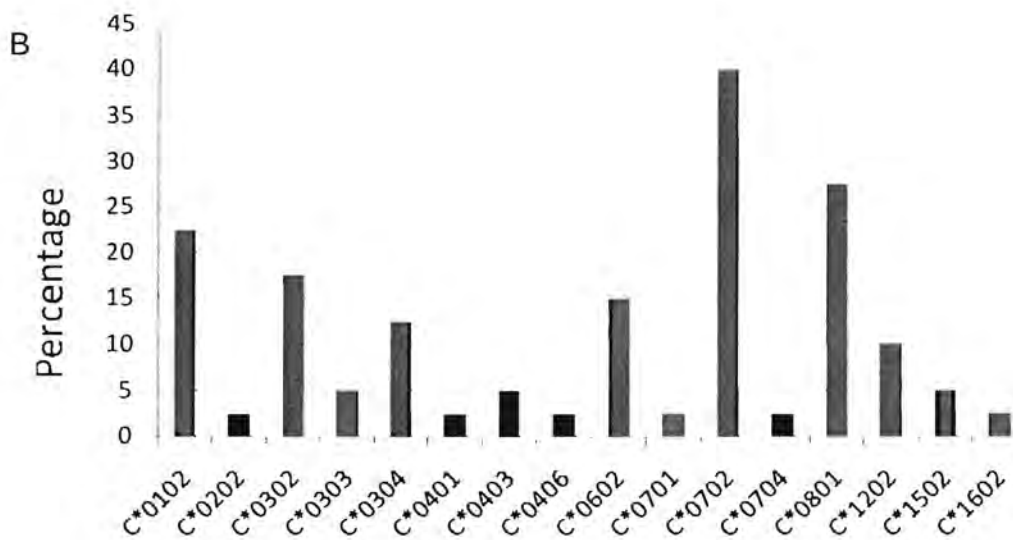
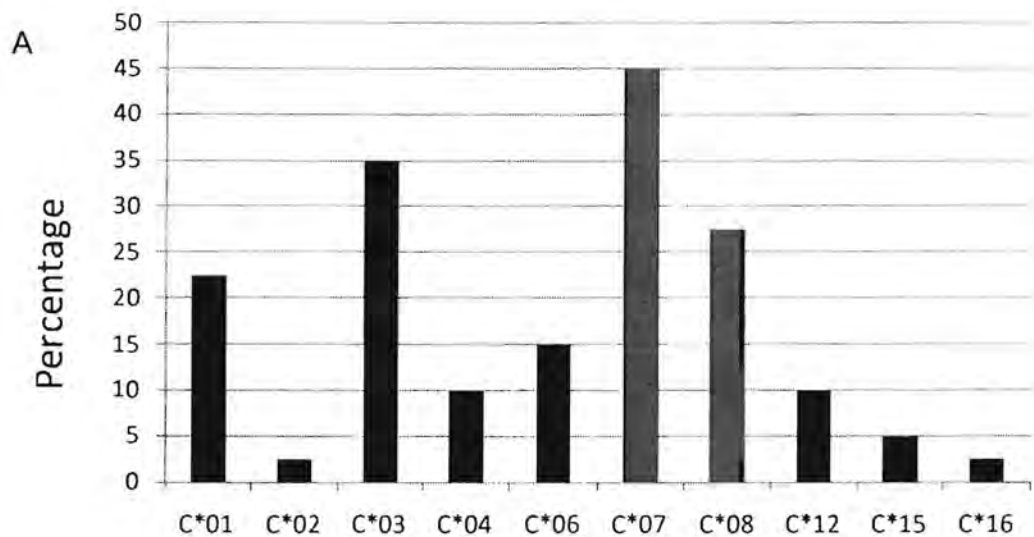
nat Not available



รูปที่ ๑ สัดส่วนของ HLA-A alleles ในอาสาสมัคร



รูปที่ ๒ สัดส่วนของ HLA-B alleles ในอาสาสมัคร



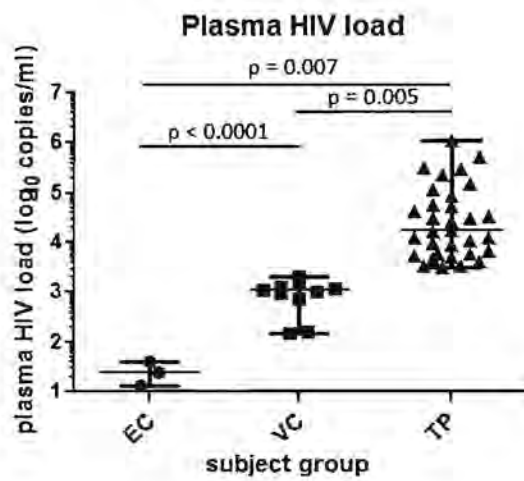
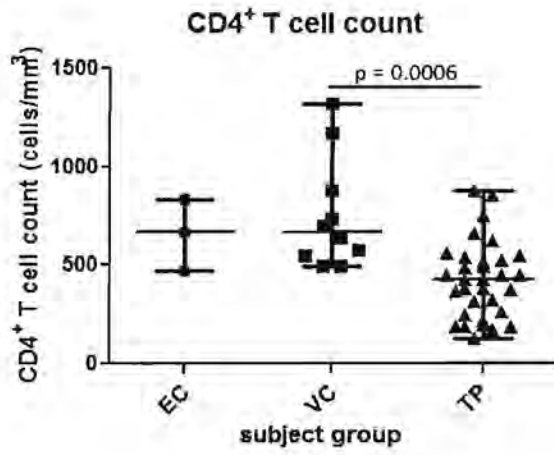
รูปที่ ๓ สัดส่วนของ HLA-C alleles ในอาสาสมัคร

การเปรียบเทียบปัจจัยที่อาจมีผลต่อปริมาณ HIV-RNA ในอาสาสมัคร

มีปัจจัยหลายประการที่อาจมีผลต่อการควบคุมการเพิ่มจำนวนของ HIV อาทิอายุเพศระยะของการติดเชื้อและปริมาณ CD4+/CD8+ T cells สำหรับอายุนั้นพบว่ากลุ่ม EC มีอายุมากที่สุดรองลงมาเป็น TP และ VC แต่ความแตกต่างนี้ไม่นัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับเพศระยะที่ติดเชื้อและปริมาณ CD8+ T cells ปัจจัยที่มีความต่างอย่างเดี่ยวได้แก่ CD4+ T cells ที่ VC มีมากกว่า TP (ตารางที่ ๓ และรูปที่ ๔)

ตารางที่ ๓ การเปรียบเทียบปัจจัยที่อาจมีผลต่อการควบคุมของเพิ่มจำนวนของ HIV

Groups	Age (years)	Sex (M:F)	Years after seroconversion	CD8 ⁺ T cell counts (cells/mm ³)	CD4 ⁺ T cell counts (cells/mm ³)	Plasma HIV-1 load (copies/ml)
Elite controllers (EC)	38 (28-52)	1:2	7 (5-10)	745 (507-942)	670 (470-834)	<40
Viraemic controllers (VC)	27.5 (18-51)	8:2	3 (1-9)	957 (633-2,232)	669 (493-1,319)	1,079 (151-1,900)
Typical progressors (TP)	33 (21-66)	15:17	2.5 (0.5-13)	976.5 (382-2,008)	427.5 (126-881)	17,119 (3,094-1,132,883)



รูปที่ ๔ ภาพแสดงการเปรียบเทียบปริมาณ CD4⁺ T cells และ HIV-RNA ในอาสาสมัคร

การเปรียบเทียบผลลัพธ์ของการติดเชื้อในอาสาสมัครที่มี HLA protective allele (PA) เปรียบเทียบกับอาสาสมัครที่ไม่มี protective allele (nPA)

ผู้วิจัยทำการเปรียบเทียบผู้ที่มี protective HLA alleles เช่น HLA-B*27, -B*57 และ -B*58 ซึ่งมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กับ good clinical outcome แต่พบว่าในกลุ่มที่มี protective alleles (PA) มีปริมาณ CD4+ T cell count และปริมาณไวรัสไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่มี protective alleles (nPA) (ตารางที่ ๔) ในกลุ่ม PA พบว่ามี HLA-B*27 จำนวน ๘ คนและ HLA-B*57/58 จำนวน ๑๑ คน (ผู้วิจัยจัด HLA-B*57 และ HLA-B*58 อยู่ในกลุ่มเดียวกันเนื่องจากคุณสมบัติการ binding ของ epitope) การเปรียบเทียบผลลัพธ์ทางคลินิกดังกล่าวไม่ขึ้นกับระยะการติดเชื้อ และข้อมูลทางประชากรศาสตร์อื่นๆ (ตารางที่ ๔) เฉพาะค่า CD8+ T cell count นั้นที่ PA มีค่าสูงกว่า nPA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ ๔ ข้อมูลทางประชากรศาสตร์อื่นๆ

Groups	Age (years)	Sex (M:F)	Years after seroconversion	CD8 ⁺ T cell counts (cells/mm ³)	CD4 ⁺ T cell counts (cells/mm ³)	Plasma HIV-1 load (copies/ml)
Subjects with protective-allele(s) (PA)	30 (18-49)	10:9	3 (1-12)	1,104 (550-2,232)	493 (126-1,319)	5,728 (151-1,132,883)
Subjects without protective-allele(s) (nPA)	29.5 (19-66)	12:10	1 (0.5-13)	865 (382-1,489)	451 (173-855)	14,137 (936-309,949)

Primers สำหรับการเพิ่มจำนวน HIV-1 gag p24

ถึงแม้ว่า HIV-1 สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทยยังคงเป็น CRF_01AE แต่วิวัฒนาการของไวรัสมีการเปลี่ยนแปลงไปเรื่อยๆ ดังนั้นแทนที่จะนำลำดับกรดอะมิโนที่ถูกรายงานไว้แล้วในฐานข้อมูล ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์ใหม่ในผู้ติดเชื้อปัจจุบันเพื่อที่จะได้ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน gag p24 ที่เป็นสายพันธุ์ที่แพร่หลายในปัจจุบันตำแหน่งของการจับของ primers ได้สรุปไว้ในตารางที่ ๕

ตารางที่ ๕ ตารางสรุปตำแหน่งของ primers

Forward primers	Binding position (CM240)	Reverse Primers	Binding Positon (CM240)
Outer1	276-297	Outer1	1951-1972
Outer2	169-195	Outer2	2401-2423
Outer3	304-321	Outer3	1652-1669
Inner	640-659	Inner	1552-1571

การวิเคราะห์การตอบสนองของ gag p24-specific T cells โดย ELISpot assay

ในอาสาสมัครจำนวน ๔๕ คนมีเพียง ๔ คนเท่านั้นที่ไม่มีการตอบสนองและ ๓ คนในจำนวนนี้เป็น elite controller และอีก ๑ คนเป็น typical progressor (HN7)

๑. การตอบสนองของ typical progressor (TP) เมื่อเปรียบเทียบกับ viraemic controller (VC)

ในภาพรวมพบว่าความกว้างของการตอบสนอง (breadth of response) ของทั้ง ๒ กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันสำหรับความแรงของการตอบสนองพบว่า VC มีแนวโน้มว่ามีการตอบสนองสูงกว่า TP ทั้งในแง่ของ cumulative และ median magnitude of response (ตารางที่ ๖)

ตารางที่ ๖ ผลการวิเคราะห์การตอบสนองของ gag-p24-specific T cells ใน TP และ VC

	Typical progressors (TP)	Viraemic controllers (VC)
Breadth (OLP)	3 (1-6)	3 (1-9)
Cumulative magnitude (SFU/10⁶ PBMC)	1755 (322-7913)	2748 (644-16098)
Median magnitude (SFU/10⁶ PBMC)	542 (98.75-2490)	684.5 (205-1855)

๒. การเปรียบเทียบการตอบสนองระหว่างอาสาสมัคร TP และ VC ที่มี protective HLA allele เหมือนกัน

ความกว้างและความแรงของการตอบสนองของ T cell ขึ้นอยู่กับ HLA alleles ที่อยู่ในประชากรดังนั้นการเปรียบเทียบทั้ง ๒ ปัจจัยให้แม่นยำจำเป็นต้องวิเคราะห์การตอบสนองของสองกลุ่มในบริบทของ HLA allele เดียวกันในกลุ่มอาสาสมัครที่มี HLA-B*27 พบว่า pVL ในกลุ่ม VC ต่ำกว่า TP ประมาณ ๑๐ เท่า ($p < 0.05$) และ CD4+ T cell count ในกลุ่ม VC มีแนวโน้มสูงกว่า TP แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติการตอบสนองของ T cells ถึงแม้ว่า VC จะมีแนวโน้มว่ามี breadth และ cumulative magnitude of response สูงกว่า TP แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ กลุ่มอาสาสมัครที่มี HLA-B*57/58 กลุ่ม VC มี CD4+ count สูงกว่าและมี pVL ต่ำกว่ากลุ่ม TP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสำหรับการตอบสนองของ T cells ทั้ง breadth และ cumulative magnitude of response ของ VC สูงกว่า TP แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ๗, รูปที่ ๕ และรูปที่ ๖)

ตารางที่ ๗ การเปรียบเทียบการตอบสนองของ T cells ใน TP และ VC ที่มี protective HLA allele ที่ matched กัน

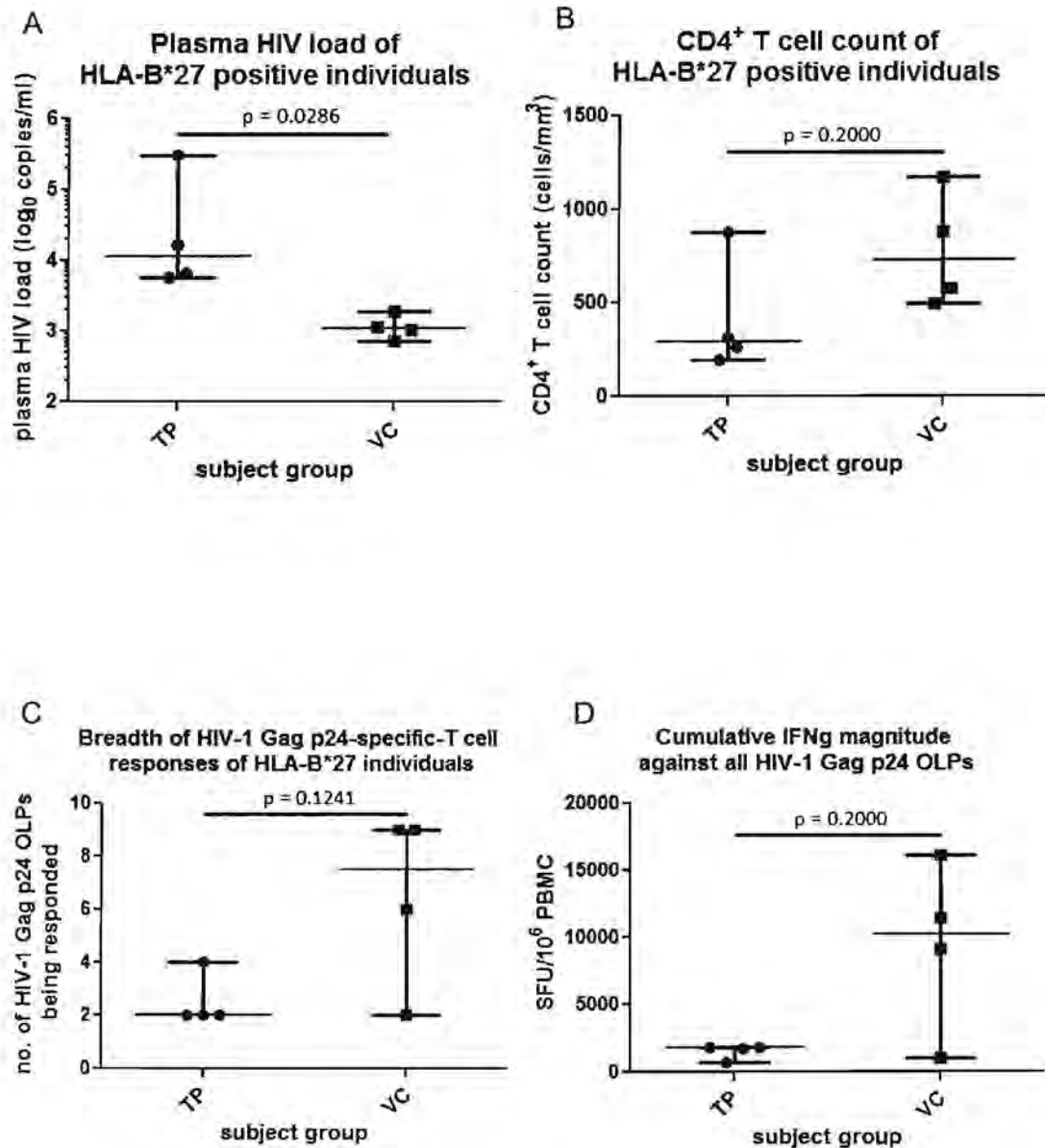
	HLA-B*27 group		HLA-B*57/58 group	
	TP (4)	VC (4)	TP (9)	VC (3)
Age (years)	34.5 (27-44)	25 (19-30)	34 (21-49)	28 (27-34)
HIV-1 duration (years)	3.5 (2-10)	3 (2-3)	4 (1.5-12)	2 (1-3)
CD4⁺ T cell counts (cells/mm³)	292 (195-881)	728 (493-1,169)	368 (126-658)	699 (495-1,319)*
CD8⁺ T cell counts (cells/mm³)	1285 (624-2,008)	1388 (1,104-1,814)	974 (550-2,008)	810 (791-2,232)
Plasma HIV-1 load (copies/ml)	11,747 (5,728-299,077)	1,104.5 (742-1,900)*	12,231 (3,026-1,132,883)	165 (151-1,549)**
p24 breadth of responses (no of OLPs)	2 (2-4)	7.5 (2-9)	2 (1-6)	4 (1-8)
p24 cumulative magnitude of responses (SFU/10⁶ PBMC)	1,779 (719.5-1,804)	10,241 (1,024-16,098)	1,496 (542-7,913)	2,440 (644-3,056)
p24 median magnitude of responses (SFU/10⁶ PBMC)	889.3 (167.3-902)	769 (512-1,149)	542 (98.75-1,445)	644 (205-725)
Breadth of specific HLA-I allele restricted epitopes responses (no of EPs) †	natt	natt	2 (0-4)	3 (2-4)
Median magnitude of specific HLA-I allele restricted epitopes responses (SFU/10⁶ PBMC)	1,109 (0-2,547.5)	2,112 (0-5,834)	987 (0-3,435)	586 (483-751)
Cumulative magnitude of specific HLA-I allele restricted epitopes responses (SFU/10⁶ PBMC)	natt	natt	1,860 (0-4058)	2,338 (966-3,678)

*p value < 0.05, ** p value < 0.01,

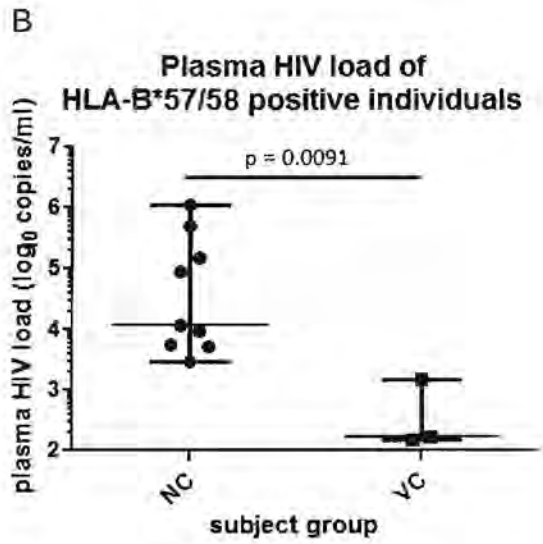
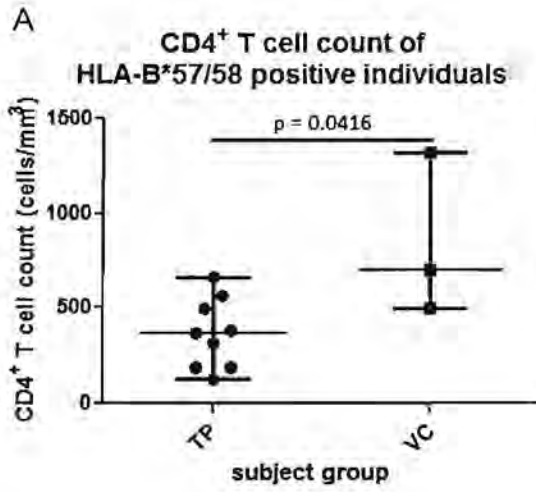
† HLA-B27-restricted epitope: KRWILGLNK, KK10;

† HLA-B57/58-restricted epitopes: LSPRTLNAW, LW9; KGFNPEVIPMF, KF11; ETINEEA EW, EW10; QATQEVKNW, QW9; GTGATLEEM, GM9 and TSTLQEIQW, TW10

†† not analyzed, only 1 HLA-B27 restricted epitope tested in this study



รูปที่ ๕ การเปรียบเทียบ clinical outcome ของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA allele เดียวกัน (HLA-B*27)



รูปที่ ๖ การเปรียบเทียบ clinical outcome ของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA allele เดียวกัน (HLA-B*57/58)

๓. การวิเคราะห์คุณภาพของการตอบสนองของ T cells ใน TP และ VC

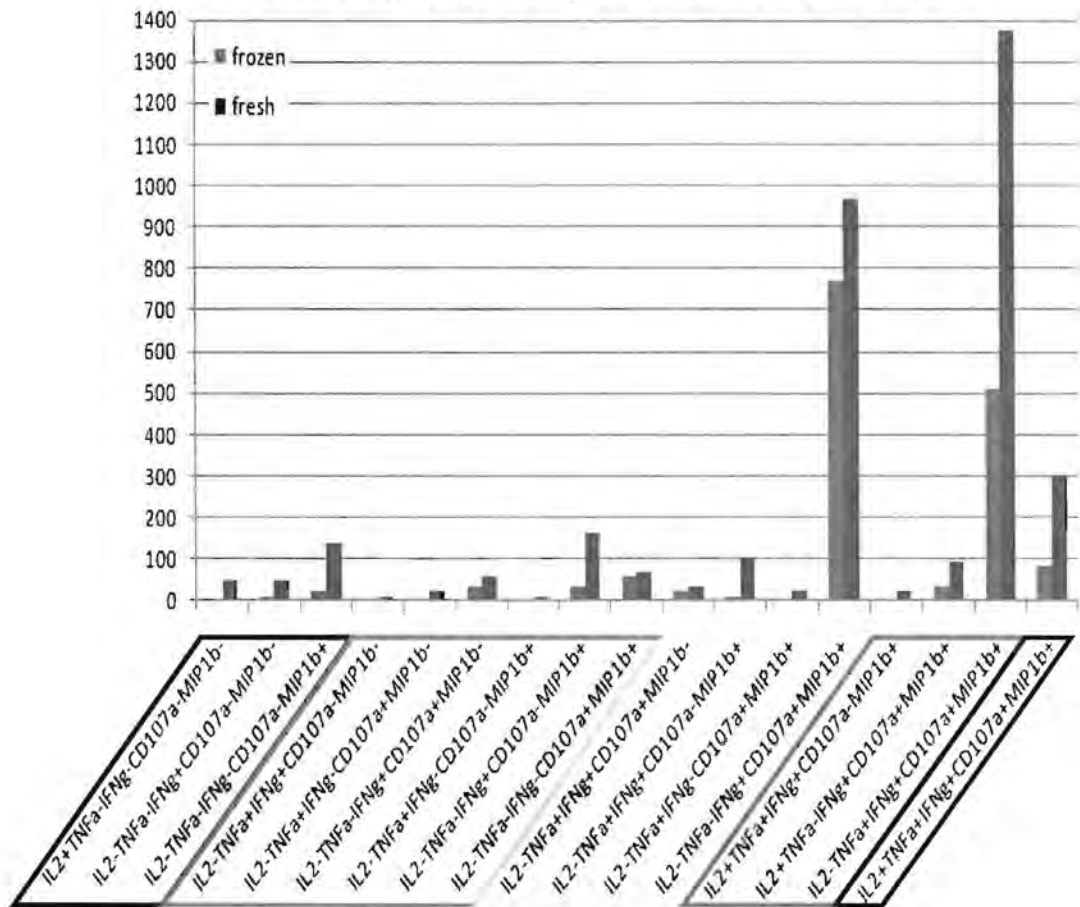
ผู้วิจัยได้ทำการ optimization การย้อม cytokine ด้วยแอนติบอดีดังผลที่แสดงในตารางที่ ๘

นอกจากนี้เรายังเปรียบเทียบการวิเคราะห์ในเซลล์ที่แยกออกมาใหม่ (fresh) และในเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง (frozen) และเพื่อผลการทดลองที่ดีที่สุด ผู้วิเคราะห์จึงตัดสินใจทำการวิเคราะห์โดยใช้เซลล์ที่แยกมาใหม่ทั้งหมด

ตารางที่ ๘ ผลสรุปการ Optimisation

Antibodies	Recommended volumes (1X)	Optimal titers	Optimal volumes
APC-H7-conjugated anti-human CD3 monoclonal antibody (Beckton Dickinson)	5 µl	1/2X	2.5 µl
Pacific blue-conjugated anti-human CD8 monoclonal antibody (Biolegend)	20 µl	1/16X	1.25 µl
PE-Cy5-conjugated anti-human CD107a monoclonal antibody (Beckton Dickinson)	5 µl	1/4X	1.25 µl
FITC-conjugated anti-human IL-2 monoclonal antibody (Biolegend)	20 µl	1X	20 µl
APC-conjugated anti-human TNF-α monoclonal antibody (Biolegend)	5 µl	1X	5 µl
PE-Cy7-conjugated anti-human IFN-γ monoclonal antibody (Biolegend)	5 µl	1X	5 µl
PE-conjugated anti-human MIP1-β monoclonal antibody (Beckton Dickinson)	5 µl	1/8X	0.5 µl

Functional quality of HIV-1 Gag p24-specific-CD8⁺ T cell responses



รูปที่ ๗ การเปรียบเทียบวิเคราะห์ cytokine ภายในเซลล์ (intracellular cytokine staining, ICS) ในเซลล์ที่แยกมาใหม่ (fresh) กับเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง (frozen)

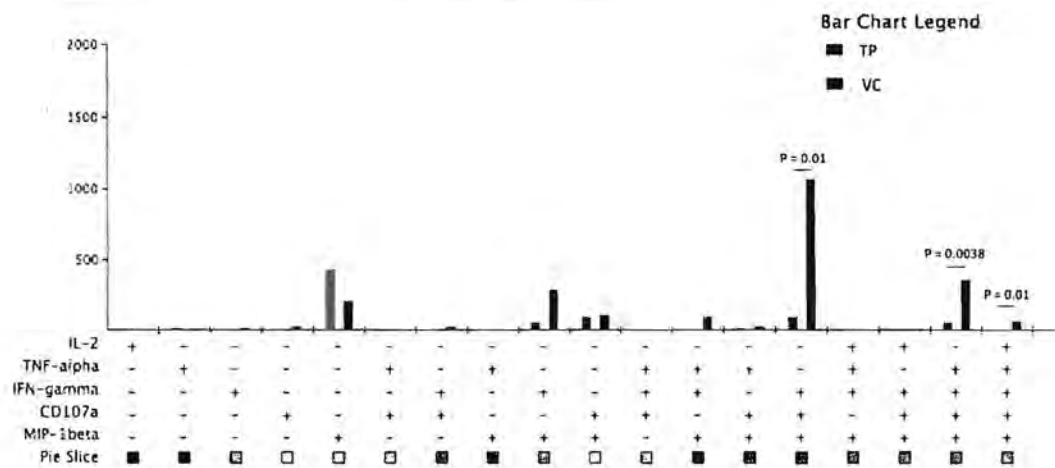
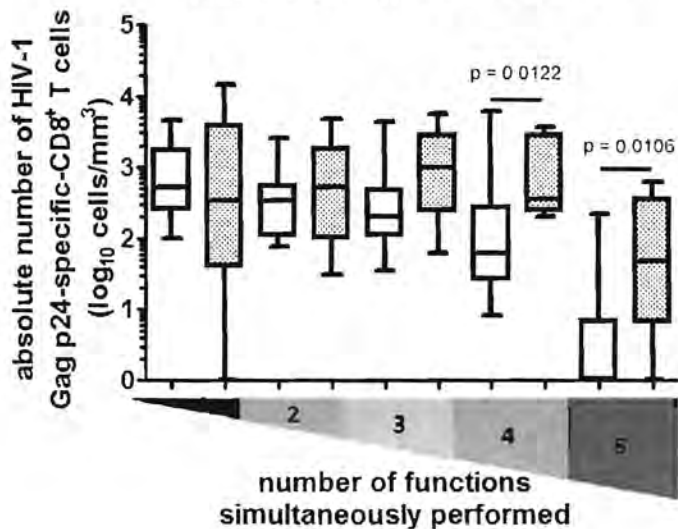
ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์คุณภาพของการตอบสนองของ T cells โดยวิธี Intracellular cytokine staining (ICS) วิเคราะห์การสังเคราะห์ MIP-1 β , IFN γ , TNF- α , IL-2 และ CD107a T cells ที่มีการแสดงออกของ markers เหล่านี้ในเซลล์เดียวกันเรียกว่ามี polyfunctional T-cell response ซึ่งมีหลักฐานว่าเป็นเซลล์ที่มีคุณภาพดีและมีความสัมพันธ์กับการควบคุมการติดเชื้อ HIV เมื่อเปรียบเทียบ polyfunctional T cells ในกลุ่ม VC และ TP (ตารางที่ ๙) พบว่ามี functional phenotype อยู่ ๓ ชนิดที่ VC และ TP มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติได้แก่ ๑) cell phenotype ที่มีครบ ๔ functions ๒) cell phenotype ที่มี ๔ functions เฉพาะเซลล์ที่มีการแสดงออกของ MIP-1 β , IFN γ , TNF- α และ CD107a และ ๓) cell phenotype ที่มี ๓ functions เฉพาะเซลล์ที่มีการแสดงออกของ MIP-1 β , TNF- α และ CD107a (รูปที่ ๘ และ ๙)

ตารางที่ ๙ รายชื่ออาสาสมัครและ HLA-alleles ในการวิเคราะห์ T cell functional quality

Typical Progressors (TP)		Viraemic Controllers (VC)	
ID	Protective HLA-I alleles [†]	ID	Protective HLA-I alleles
HN3	None ^{††}	HN2	HLA-B*2706
HN11	None	HN12	HLA-B*5701
HN18	None	HN15	HLA-B*2704
HN19	None	HN20	HLA-B*2704
HN21	HLA-B*2704	HN24	HLA-B*5701
HNN4	HLA-B*5801	HN26	HLA-B*4601
JSM	HLA-B*2704	HN30	HLA-B*5801
NOT	HLA-B*2704	PRT	None
PNN	HLA-B*2706/B*5801		
RSR	HLA-B*5801		
SUL	HLA-B*5801		
VKJ	HLA-B*5801		

[†] indicated that this individual was positive for one or more of the 3 protective HLA-I alleles, which included HLA-B*27, -B*57 and -B*58, ^{††} indicated that this individual was negative for all of the 3 protective HLA-I alleles.

Comparison of functional quality of HIV-1 Gag p24-specific-CD8⁺ T cell responses between TP and VC



รูปที่ ๘ และ ๙ การเปรียบเทียบ functional quality ของ VC และ TP

๔. การวิเคราะห์คุณภาพ T cells จากอาสาสมัครที่มี HLA-matched alleles

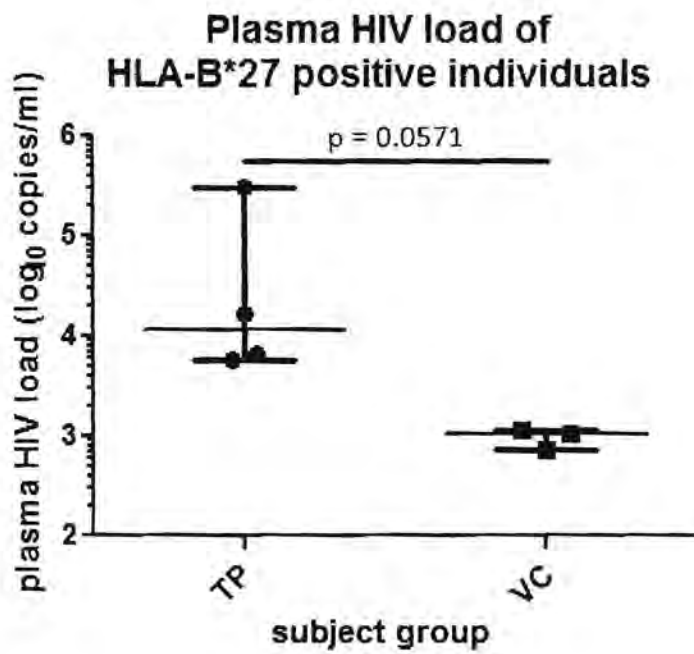
เช่นเดียวกับเหตุผลที่เคยไว้แล้วเมื่อวิเคราะห์ T-cell response โดย ELISpot assay ผู้วิจัยได้วิเคราะห์เปรียบเทียบคุณภาพของ T cells ด้วยเทคนิค ICS และเปรียบเทียบในกลุ่มอาสาสมัครที่มี HLA allele(s) เหมือนกันโดยจะแบ่งเป็นการวิเคราะห์ในกลุ่ม VC/TP ที่มี HLA-B*27 และกลุ่ม VC/TP ที่มี HLA-B*57/58

๔.๑ คุณภาพของการตอบสนองของ T cells ในอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*27 VC มีอายุค่อนข้างน้อยกว่าแต่ดีดเชื้อในระยะเวลาใกล้เคียงกันปริมาณ CD4+ T cells ของ VC มีค่ามากกว่า TP เกือบ ๒ เท่า (ตารางที่ ๑๐) และ pVL ต่างกันประมาณ ๑ log (รูปที่ ๑๐) และเมื่อวิเคราะห์ T-cell functional quality พบว่า functional T cells ของ VC ส่วนใหญ่มีมากกว่า TP และความแตกต่างนี้มีนัยสำคัญใน cell phenotype ที่มีครบ ๕ functions (รูปที่ ๑๑ และ ๑๒) อย่างไรก็ตาม T-cell functional quality ที่พบในการวิเคราะห์ก่อนหน้านี้อาจมาจากผลของการตอบสนองที่เป็น non-HLA-B*27 restriction ดังนั้นผู้วิจัยจึงวิเคราะห์คุณภาพของ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย KK10 epitope ที่นำเสนอโดย HLA-B*27 ผลการวิเคราะห์นี้พบว่า functional T cells ยกเว้นชนิดครบ 5 functions ของ TP มีปริมาณใกล้เคียงกับ VC แต่สำหรับ phenotype ที่มีครบ ๕ functions VC มีมากกว่า TP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ ๑๓ และ ๑๔)

ตารางที่ ๑๐ ลักษณะของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*27

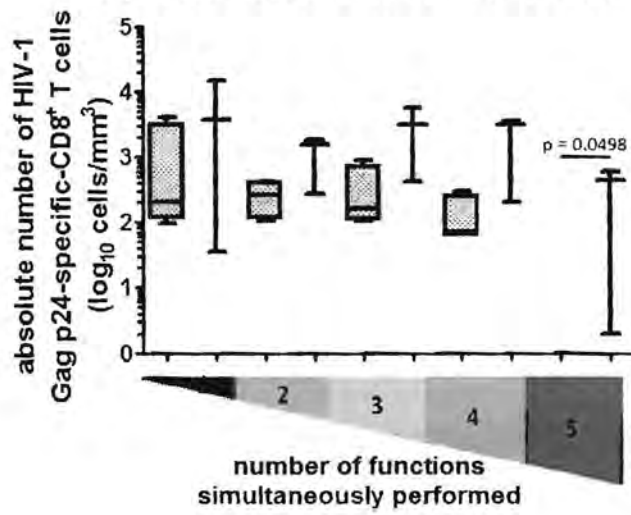
Demographic data	TP (4)	VC (3)
Age (years)	34.5 (27-44)	26 (24-30)
Years after seroconversion	3.5 (2-10)	3 (3)
CD4 ⁺ T cell count (cells/mm ³)	292 (195-881)	578 (493-1169)
CD8 ⁺ T cell count (cells/mm ³)	1285 (624-2008)	1388 (1104-1814)
Plasma HIV-1 load (copies/ml)	11747 (5728-299077)	1034 (742-1175) [†]

[†] Difference in pVL was significant when all 4 HLA-B*27 positive TP were compared with 4 HLA-B*27 positive VC (11747 vs. 1104.5, p = 0.0286,)



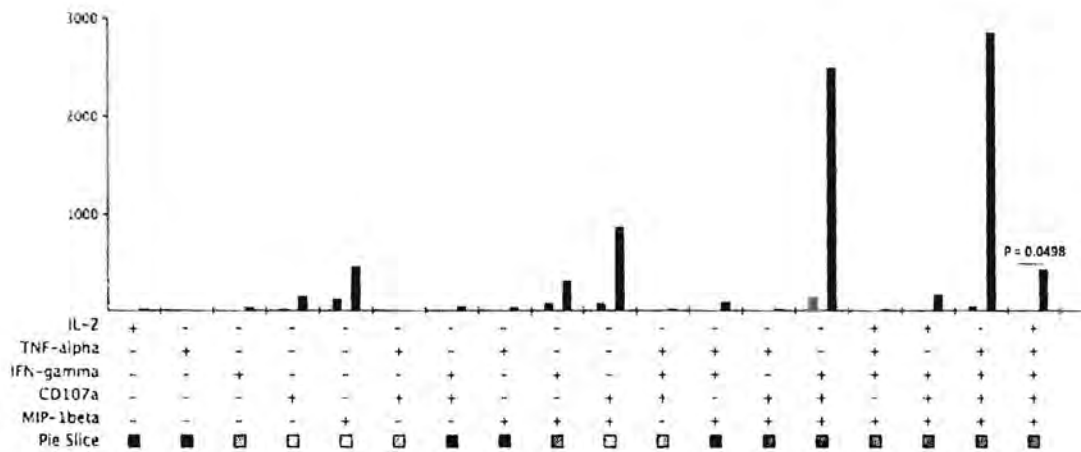
รูปที่ ๑๐ ปริมาณ HIV-RNA (pVL) ของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*27

Comparison of functional quality of HIV-1 Gag p24-specific-CD8⁺ T cell responses between HLA-B*27 TP and VC



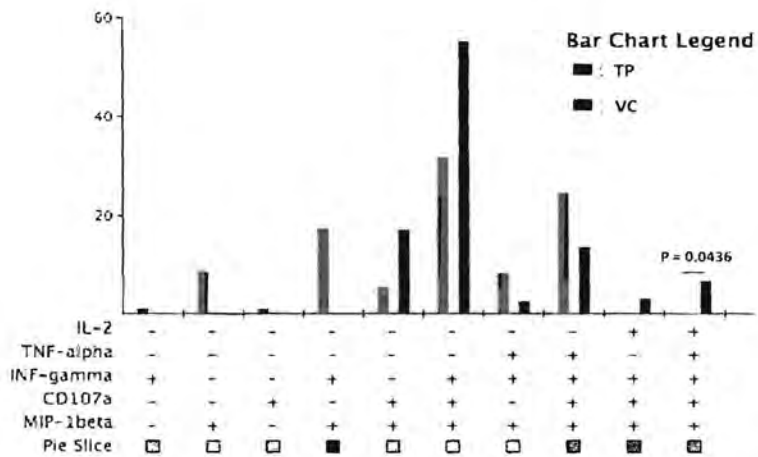
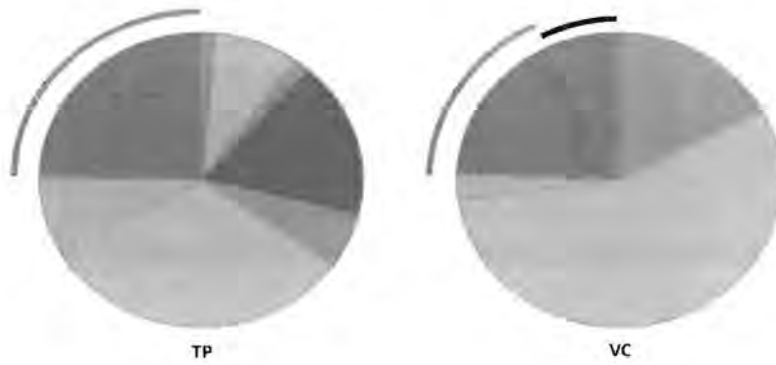
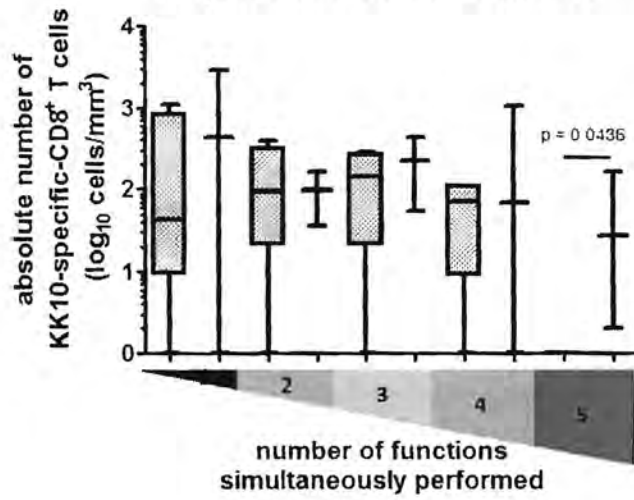
Bar Chart Legend

- TP
- VC



รูปที่ ๑๑ และ ๑๒ การเปรียบเทียบ functional quality ของ VC และ TP ที่มี HLA-B*27

Comparison of functional quality of HLA-B*27 KK10-specific-CD8⁺ T cell responses between TP and VC

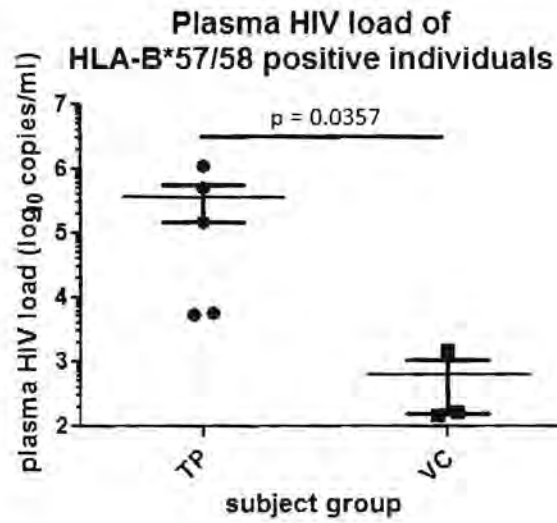
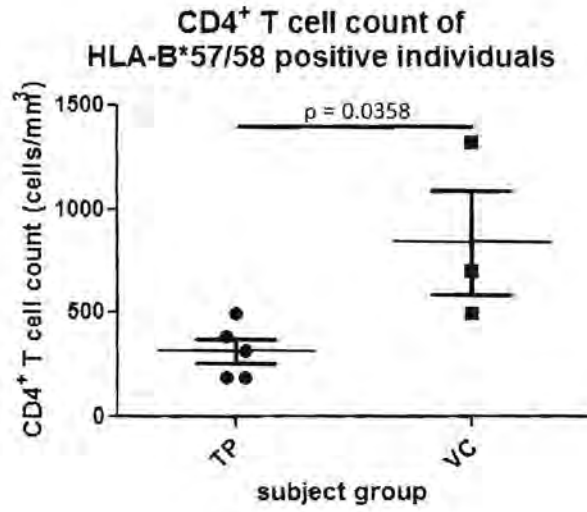


รูปที่ ๑๓ และ ๑๔ การเปรียบเทียบ functional quality ของ VC และ TP ต่อ epitope KK10

๔.๒ คุณภาพของการตอบสนองของ T cells ในอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*57/58 VC มีอายุค่อนข้างน้อยกว่า TP ติดเชื่อนานกว่า VC เล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ปริมาณ CD4+ T cells ของ VC มีค่ามากกว่า TP ๒ เท่าและมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ๑๑) และ pVL ของ TP มากกว่า VC ๒ log (รูปที่ ๑๕) และเมื่อวิเคราะห์ T-cell functional quality พบว่า T cells ที่มี function \leq ๓ functions ของ TP มีมากกว่า VC และ T cells ที่มี ๔ และ ๕ functions ของ VC มีมากกว่า TP โดยพบความแตกต่างนี้มีนัยสำคัญใน cell phenotype ที่มีครบ ๕ functions (รูปที่ ๑๖ และ ๑๗) อย่างไรก็ตามดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น T-cell functional quality ที่พบในการวิเคราะห์ก่อนหน้านี้ อาจมาจากผลของการตอบสนองที่เป็น non-HLA-B*57/58 restriction ดังนั้นผู้วิจัยจึงวิเคราะห์คุณภาพของ T cells ที่ถูกกระตุ้นด้วย epitopes ที่นำเสนอโดย HLA-B*57/58 ผลการวิเคราะห์นี้พบว่า functional T cells ยกเว้นชนิดครบ 5 functions ของ TP มีปริมาณใกล้เคียงกับ VC แต่สำหรับ phenotype ที่มีครบ ๕ functions VC มีมากกว่า TP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ ๑๘ และ ๑๙)

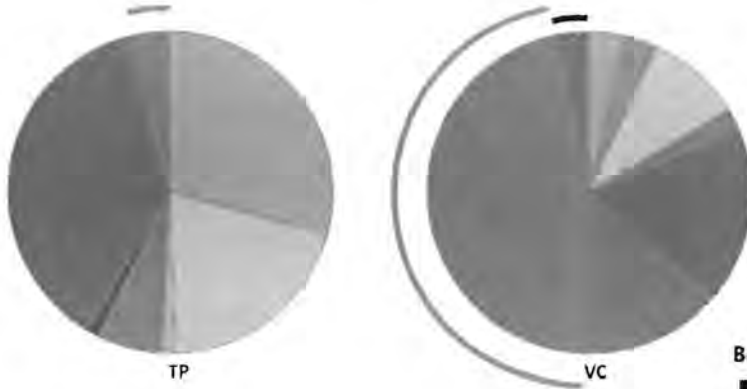
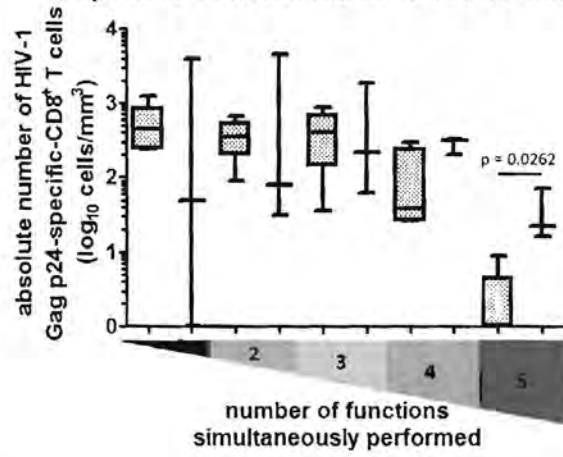
ตารางที่ ๑๑ ลักษณะของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*57/58

Demographic data	TP (5)	VC (3)
Age (years)	34 (29-47)	28 (27-34)
Years after seroconversion	4 (3-10)	3 (1-9)
CD4 ⁺ T cell counts (cells/mm ³)	319 (187-493)	699 (495-1,319)*
CD8 ⁺ T cell counts (cells/mm ³)	974 (550-2,008)	810 (791-2,232)
Plasma HIV-1 load (copies/ml)	154,253 (5385-1,132,883)	165 (151-1,549)**

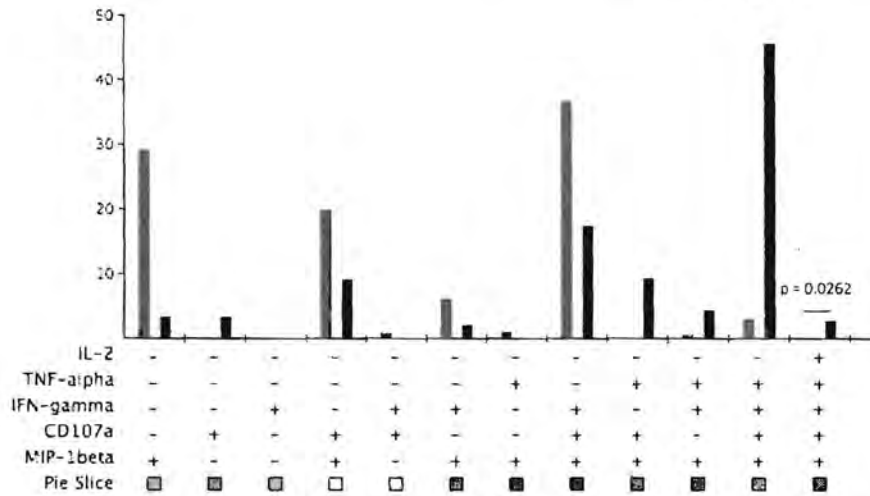


รูปที่ ๑๕ ปริมาณ HIV-RNA (pVL) ของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*57/58

Comparison of functional quality of HIV-1 Gag p24-specific-CD8⁺ T cell responses between HLA-B*57/58 TP and VC

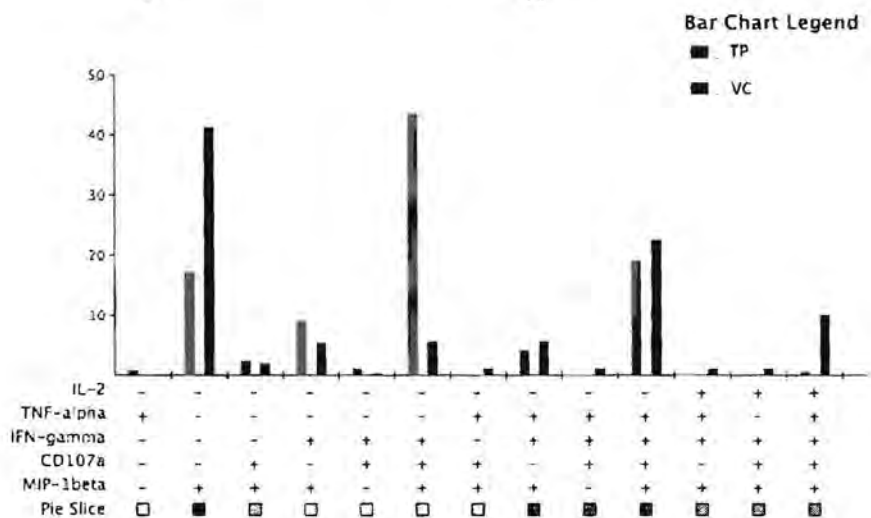
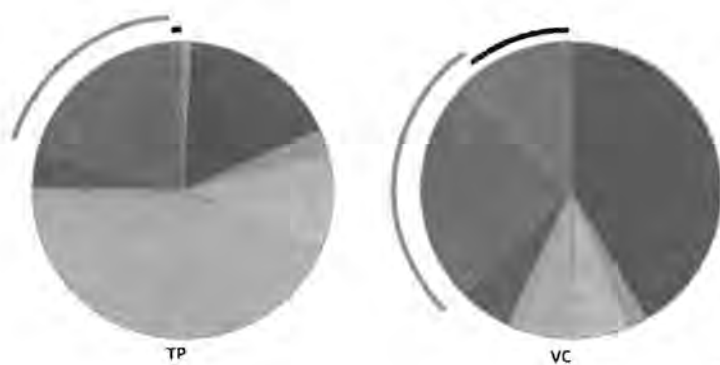
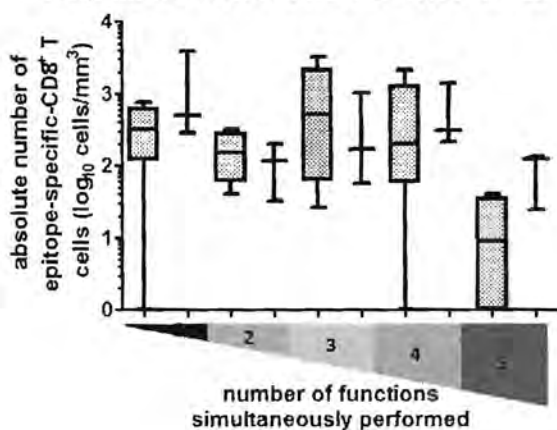


Bar Chart Legend
 ■ : TP
 ■ : VC



รูปที่ ๑๖ และ ๑๗ การเปรียบเทียบ functional quality ของ VC และ TP ที่มี HLA-B*57/58

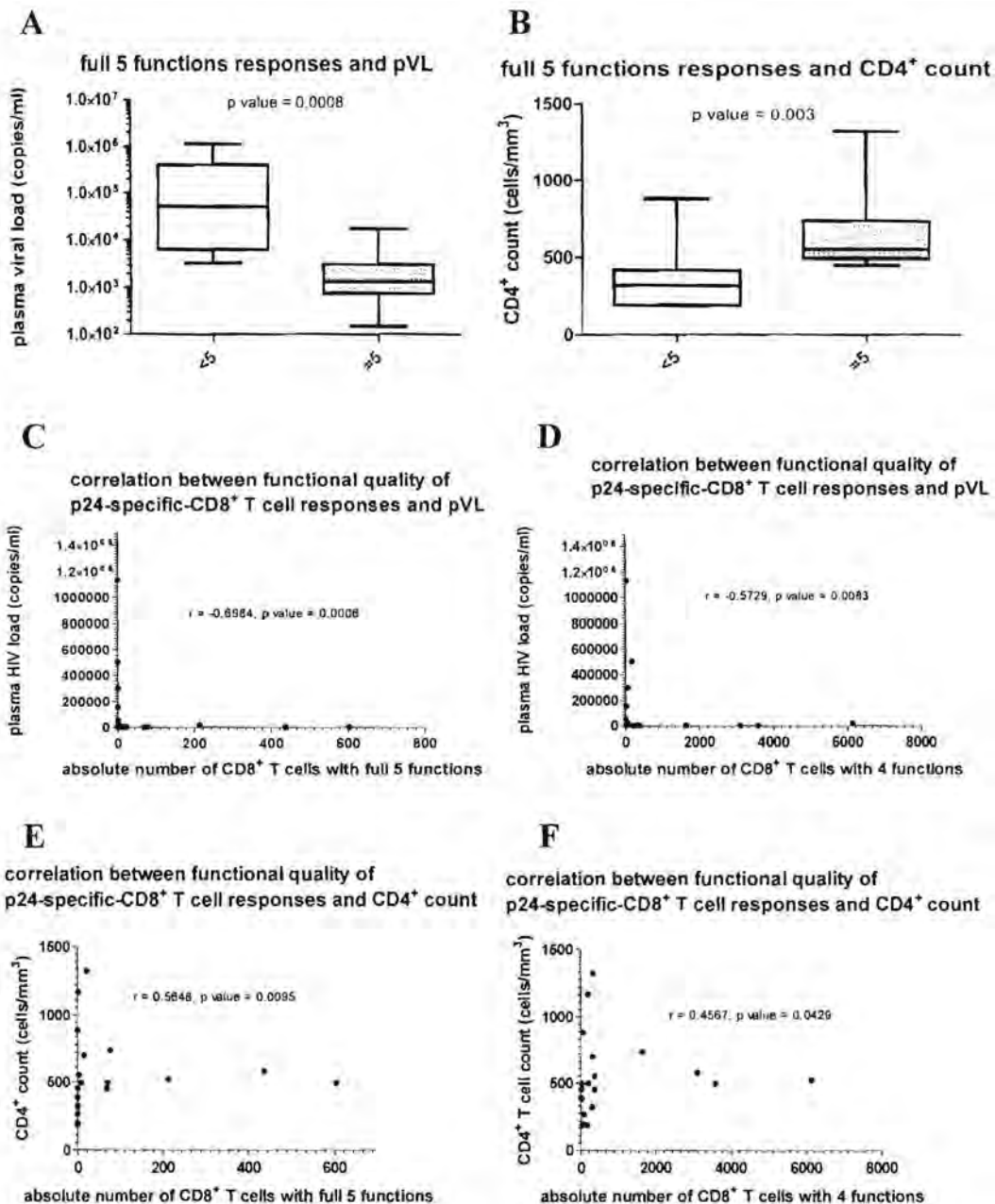
Comparison of functional quality of all 6 HLA-B*57/58 restricted epitopes-specific-CD8⁺ T cell responses between HLA-B*57/58 TP and VC



รูปที่ ๑๘ และ ๑๙ การเปรียบเทียบ functional quality ของ VC และ TP ต่อ epitopes ที่ presented โดย HLA-B*57/58

๕. ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของ T cells และผลลัพธ์ของการติดเชื้อ HIV

ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า polyfunctional T cells ที่มี functions ๕ ชนิดมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการติดเชื้อ HIV ดังนั้นเพื่อพิสูจน์สมมติฐานนี้ผู้วิจัยจึงได้นำอาสาสมัครซึ่งมี T cells ที่มี functional phenotype ดังกล่าวมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับ readout ที่สะท้อนให้เห็นผลลัพธ์ของการติดเชื้อได้แก่ pVL และปริมาณ CD4+ T cells และเปรียบเทียบกับผู้ที่ไม่มี T cells ที่ highly functional ดังกล่าวและพบว่าเฉพาะผู้มี functional phenotype ครบ ๕ functions เท่านั้นที่มีความสามารถในการควบคุม HIV replication ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและสามารถรักษาระดับ CD4+ T cell count ไว้ในระดับสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน



รูปที่ ๒๐ Polyfunctional T cells สามารถควบคุม HIV replication และรักษาระดับ CD4 T cell count

๖. ความหลากหลายของ epitopes ที่ถูกนำเสนอโดย HLA ที่มีความสัมพันธ์กับความความสามารถในการควบคุม HIV replication (HLA-B*27 และ HLA-B57/58) และ HLA ที่พบได้บ่อยในคนไทย (HLA-A*11)

ผู้วิจัยมีสมมติฐานว่าการตอบสนองของ T cells ที่มีประสิทธิภาพสำคัญที่เป้าหมาย หรือ epitope ของ T cells นั้น โดยถ้า T cells รับรู้ epitope ที่มีความสำคัญต่อโครงสร้างของไวรัส การตอบสนองนั้นจะสามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของ HIV ได้เนื่องจากไวรัสที่กลายพันธุ์บริเวณที่สำคัญเพื่อหลบการตอบสนองดังกล่าว จะมีความพิการของโครงสร้างแล้วนำไปสู่การลด replicative fitness ทำให้มีปริมาณ HIV plasma load ต่ำ และมีการดำเนินของโรคช้าลง ผู้วิจัยได้เลือก epitopes ที่นำเสนอผ่าน HLA-B*27 และ HLA-B*57/58 เป็นตัวอย่างของ epitope ที่อยู่บริเวณมีความสำคัญต่อโครงสร้างของโปรตีน gag สำหรับ epitope KK10 (KRWIILGLNK) ที่นำเสนอโดย HLA-B*27 พบว่า epitope นี้ไม่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น อธิบายได้ว่าไวรัสที่พยายามหลบภูมิคุ้มกันอาจกลายพันธุ์แต่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ หรือเพิ่มจำนวนได้น้อยมากจึงพบแต่ wild type KK10 epitope ในกรณีของ epitopes ของ HLA-B*57/58 ซึ่งมีหลาย epitopes ได้แก่ EW10 (ETINEEAAEW), KF11 (KGFNPEVIPMF), QW9 (QATQEVKNW) และ LW9 (LSPRTLNAW) ผู้วิจัยพบว่าการกลายพันธุ์ของ epitopes พบได้เช่น QW9 ที่มีตำแหน่งที่ ๓ เปลี่ยนจาก T เป็น S และตำแหน่งรองสุดท้าย (N) เปลี่ยนเป็น Q หรือ KF11 ที่ G ณ.ตำแหน่งที่ ๒ เปลี่ยนเป็น A แต่ epitope variations ทั้งหมดนี้เป็น cross-reactive epitopes ดังนั้นจึงไม่ได้เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการคัดเลือกพันธุ์โดยการตอบสนองผ่าน T cells ในกรณีวิเคราะห์ AK11 ที่เป็น epitope ซึ่งนำเสนอผ่าน HLA-A*11 นั้นแม้ว่าพบการตอบสนองค่อนข้างสูง ก็ไม่พบการกลายพันธุ์เช่นกัน ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่า epitope บริเวณนี้เป็น target ที่สำคัญเหมือน KK10 แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า ในอาสาสมัครที่มี HLA-A*11 บางคนทั้งๆที่มี conserved AK11 epitope แต่ไม่มีการตอบสนอง ในกรณีนี้อาจต้องมีการศึกษาทั่วโลกในการ 'silence' การตอบสนองของ AK11-specific T-cell response ต่อไป

ผลการทดลอง

Donor	ACQGVGGPSHK	CD4 count	HIV load	SFU/a million PBMC
HN14	ACQGVGGPSHK	551	32744	Non response
	ACQGVGGPSHK	487	18301	Non response
	ACQGVGGPSHK	528	656	Non response
HN16	Not done	519	33851	Non response
HN22	Not done	658	3026	Non response
HN5	Not done	624	105	Non response
HN10	Not done	647	1032	Non response
HN26	Not done	783	419	Non response
HN21	Not done	771	202728	Non response
HN13	SCQGVGGPSHK	1051	2434	1692
HN12	ACQGVGGPSHK	464	6514	596
HN20	ACQGVGGPSHK	653	32899	1567
HN2	Not done	1261	682	2114
HN41	Not done	712	151	1276
HN47	Not done	707	979	514
HN25	Not done	641	6053	426
HN28	ACQGVGGPSHK	490	58523	1018
HN32	ACQGVGGPSHK	779	9599	106
PRT	Not done	543	13298	1108
HN34	Not done	886	443105	196

Donor	KRWIILGLNK	CD4 count	HIV load	SFU/a million PBMC
HN20	KRWIILGLNK	653	32899	2955
HN15	Not done	578	742	860
HN21	Not done	771	202728	1240
HN1	Not done	878	2472	Non response
HN2	Not done	1261	682	Non response

Donor	LSPRTLNAW	CD4 count	HIV load	SFU/a million PBMC	HLA
HN22	LSPRTLNAW	658	3026	1196	B57
HN24	Not done	837	158	1146	B57
HN30	Not done	1310	20	1378	B57

Donor	KGFNPEVIPMF	CD4 count	HIV load	SFU/a million PBMC	HLA
HN12	KGFNPEVIPMF	464	6514	182	B57
HN16	KGFNPEVIPMF	519	33851	1144	B58
	KGFNPEVIPMF	403	51887	1856	
HN40	KAFNPEVIPMF	956	8972	134	B58
HN48	KGFNPEVIPMF	731	96369	668	Not done
HN24	Not done	837	158	332	B57
HN30	Not done	1310	20	466	B57

Donor	ETINEEAAEW	CD4 count	HIV load	SFU/a million PBMC	HLA
HN42	ETINEEAAEW	543	1400	874	Not done
HN16	ETINEEAAEW	403	51887	132	B58

Donor	QATQEVKNW	CD4 count	HIV load	SFU/a million PBMC	HLA
HN12	QATQEVKQW	464	6514	228	B57
HN16	QATQEVKQW	519	33851	1650	B58
	QATQEVKQW	403	51887	1340	
HN40	QASQEVKNW	956	8972	152	B58
HN24	Not done	837	158	332	B57
HN30	Not done	1310	20	196	B57

Donor	GTGATLEEM	CD4 count	HIV load	SFU/a million PBMC	HLA
HN59	Not done	374	33096	134	Not done

Donor	TSTLQEQIGW	CD4 count	HIV load	SFU/a million PBMC	HLA
HN12	TSNLQEQIGW	464	6514	384	B57
HN30	Not done	1310	20	264	B57
HN22	Not done	658	3026	1014	B57

สรุปและอภิปรายผล

ถึงแม้ว่าการทดสอบวัคซีนโรคเอดส์ในประเทศไทยครั้งล่าสุด พบว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพประมาณ ๓๑ เปอร์เซ็นต์ แต่ระดับการป้องกันดังกล่าวยังไม่เพียงพอที่มาใช้ได้จริง และยังไม่ทราบกลไกแน่ชัดว่าวัคซีนดังกล่าวสามารถป้องกันการติดเชื้อ HIV ได้อย่างไร แต่เนื่องจากโครงสร้างของวัคซีนดังกล่าวไม่สามารถกระตุ้น T cells แสดงว่าผลการทดสอบของวัคซีนชนิดนี้ไม่เกี่ยวข้องกับ การตอบสนองของ T cells ดังนั้น มีความเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพของวัคซีนที่ไม่ดีมากนักอาจเนื่องมาจากการที่ วัคซีนไม่ได้กระตุ้นการตอบสนองของ T cells ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์การตอบสนองของ T cells ในอาสาสมัครคนไทย โดยเปรียบเทียบระหว่างผู้ที่สามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนไวรัสได้ดี (Viraemic/elite controller) และอาสาสมัครที่ไม่สามารถควบคุมไวรัสได้ (Typical progressor)

ในการศึกษานี้พบว่า protective allele ไม่ได้มีผลต่อ clinical outcome ทั้งๆที่ปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อ outcome ใกล้เคียงกัน ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าผลของ protective allele ในการศึกษาในประชากรคอเคเซียน และอัฟริกันอาจไม่ได้มีผลอย่างเดียวกันในกลุ่มประชากรไทย ซึ่งอาจมาจากปัจจัยทาง viral variation หรือ host HLA ในระดับ high resolution ดังนั้นเพื่อตอบคำถามเรื่องการตอบสนองของ T cells ที่แตกต่างกันของอาสาสมัครที่มีความสามารถในควบคุม HIV ที่ต่างกัน ผู้วิจัย จึงแบ่งกลุ่มอาสาสมัครออกเป็น ๓ กลุ่ม ได้แก่ elite controller, viraemic controller และ typical progressor เมื่อวิเคราะห์การตอบสนองด้วย ELISpot assay พบว่า viraemic controller มี breadth และ magnitude ของการตอบสนองไม่แตกต่างจาก typical progressor

เนื่องจากการตอบสนองของ T cell ขึ้นกับ HLA class I molecule เป็นไปได้ว่าผลของการเปรียบเทียบการตอบสนองในอาสาสมัคร VC และ TP อาจขึ้นกับ HLA alleles ที่ต่างกันด้วย ไม่ได้มากจากความสามารถของการควบคุมไวรัส แต่เพียงอย่างเดียว ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเปรียบเทียบเฉพาะอาสาสมัครที่มี HLA allele เดียวกัน ผลการเปรียบเทียบในลักษณะนี้พบว่า clinical outcome (ที่ประเมินด้วย CD4/pVL) ของ VC มีผลลัพธ์ที่ดีกว่า TP ทั้งผู้ที่มี HLA-B*27 และ HLA-B*57/58 แต่การตอบสนองของ T cells ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติผู้วิจัยจึง ตั้งสมมติฐานว่าคุณภาพของ T cells (ที่สะท้อนโดย polyfunctional T cells) อาจมีความสัมพันธ์กับการควบคุม HIV มากกว่า จึงได้วิเคราะห์คุณภาพของ T cells ดังกล่าว โดย intracellular cytokine staining (ICS)

องค์ประกอบในการจัดทำโครงการวิจัย

คณะผู้วิจัย บทบาทของนักวิจัยแต่ละคนในการทำวิจัย และสัดส่วนที่ทำการวิจัย (%)

หัวหน้าโครงการวิจัย	ไทย	นายปกรัฎ หังสสูตร
	อังกฤษ	Mr.Pokrath Hansasuta
ตำแหน่ง		ผู้ช่วยศาสตราจารย์ระดับ ๘
บทบาท		ผู้วิจัยหลัก ออกแบบการศึกษาริวิจัย ดำเนินการวิจัย วิเคราะห์ผลการทดลอง และเขียนบทความเสนอผลงานวิจัย
สถานที่ทำงาน		ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สัดส่วนการทำงาน		๗๐ เปอร์เซ็นต์
ผู้ร่วมโครงการวิจัย คนที่ ๑	ไทย	นายนवल เดชะเกรียงไกร
	อังกฤษ	Mr.Navapol Techakriengkrai
ตำแหน่ง		นิสิตปริญญาโท
บทบาท		ดำเนินการวิจัย วิเคราะห์ผลการทดลอง
สถานที่ทำงาน		ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สัดส่วนการทำงาน		๓๐ เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

- [1] Orrell C. Antiretroviral adherence in a resource-poor setting. *Current HIV/AIDS reports*. 2005 Nov;2(4):171-6.
- [2] Friis-Moller N, Weber R, Reiss P, Thiebaut R, Kirk O, d'Arminio Monforte A, et al. Cardiovascular disease risk factors in HIV patients--association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study. *Aids*. 2003 May 23;17(8):1179-93.
- [3] Geretti AM. Epidemiology of antiretroviral drug resistance in drug-naive persons. *Curr Opin Infect Dis*. 2007 Feb;20(1):22-32.
- [4] Kelleher AD, Long C, Holmes EC, Allen RL, Wilson J, Conlon C, et al. Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 2001;193(3):375-86.
- [5] Moore CB, John M, James IR, Christiansen FT, Witt CS, Mallal SA. Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science*. 2002 May 24;296(5572):1439-43.
- [6] Letvin NL, Daniel MD, Sehgal PK, Desrosiers RC, Hunt RD, Waldron LM, et al. Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science*. 1985 Oct 4;230(4721):71-3.
- [7] Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes* [see comments]. *Nature*. 1999;397(6718):436-41.
- [8] Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M, Vandamme AM. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 27;100(11):6588-92.
- [9] Currier JR, deSouza M, Chanbancherd P, Bernstein W, Birx DL, Cox JH. Comprehensive screening for human immunodeficiency virus type 1 subtype-specific CD8 cytotoxic T lymphocytes and definition of degenerate epitopes restricted by HLA-A0207 and -C(W)0304 alleles. *J Virol*. 2002 May;76(10):4971-86.
- [10] Tovanabutra S, Watanaveeradej V, Viputtikul K, De Souza M, Razak MH, Suriyanon V, et al. A new circulating recombinant form, CRF15_01B, reinforces the linkage between IDU and heterosexual epidemics in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003 Jul;19(7):561-7.
- [11] Montefiori DC, Pantaleo G, Fink LM, Zhou JT, Zhou JY, Bilska M, et al. Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors. *J Infect Dis*. 1996;173(1):60-7.
- [12] Moog C, Fleury HJ, Pellegrin I, Kirn A, Aubertin AM. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol*. 1997;71(5):3734-41.
- [13] Moore JP, Cao Y, Qing L, Sattentau QJ, Pyati J, Koduri R, et al. Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120. *J Virol*. 1995 Jan;69(1):101-9.

- [14] Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Zhou JY, Zhou JT, et al. Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis.* 1997;176(4):924-32.
- [15] Wilson JD, Ogg GS, Allen RL, Davis C, Shaunak S, Downie J, et al. Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *Aids.* 2000;14(3):225-33.
- [16] Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science.* 1998;279(5359):2103-6.
- [17] Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof Garde SR, Bende RJ, Keet IP, et al. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med.* 1995;181(4):1365-72.
- [18] Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, Dong T, Gotch F, McAdam S, et al. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women [published erratum appears in *Nat Med* 1995 Jun;1(6):598]. *Nat Med.* 1995;1(1):59-64.
- [19] Rowland-Jones SL, Dong T, Dorrell L, Ogg G, Hansasuta P, Krausa P, et al. Broadly cross-reactive HIV-specific cytotoxic T-lymphocytes in highly-exposed persistently seronegative donors. *Immunol Lett.* 1999;66(1-3):9-14.
- [20] Rowland-Jones SL, Dong T, Fowke KR, Kimani J, Krausa P, Newell H, et al. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi [see comments]. *J Clin Invest.* 1998;102(9):1758-65.
- [21] Hansasuta P, Rowland-Jones SL. What makes some people resistant to HIV infection? *Current Medical Literature-Infectious Diseases.* 2000;14:85-91.
- [22] Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, et al. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med.* 1997;3(2):212-7.
- [23] Goulder PJ, Brander C, Tang Y, Tremblay C, Colbert RA, Addo MM, et al. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature.* 2001;412(6844):334-8.

ภาคผนวก

1. ต้นฉบับ (Original article) ส่งตีพิมพ์ในวารสาร AIDS

เรื่อง The role of T cell on the HIV evolution : An essential
information for HIV vaccine development

1 **Total = 3498 words**

2 **Poor HIV control in HLA-B*27 and -B*57/58 non-controllers is resulted from limited**
3 **number of polyfunctional Gag p24-specific-CD8⁺ T cells** 19 words 119 characters

4 NAVAPON TECHAKRIENGKRAI^{1,2}, YADA TANSIRI^{1,2}, POKRATH HANSASUTA^{1*}

5 ¹Division of Virology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

6 ²Interdisciplinary Program, Graduate School, Chulalongkorn University

7 *Corresponding author's address: Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 road,
8 Bangkok 10330, Thailand

9 *Corresponding author's email address: Pokrath.H@Chula.ac.th

10 **Source of Funding support:** This work is supported by Government grant (through NRCT and
11 Chulalongkorn University, Thailand). PH is Thailand Research Fund Scholar. NT is funded by
12 Chulalongkorn University Graduate Scholarship to commemorate the 72nd Anniversary of HM King
13 Bhumibol Adulyadej.

14 Some data had been previously presented at Keystone Symposium 2011.

15

16

17

18

19

20

21

22

23 **Abstracts** 249 words

24 Objectives: Analysis of immune response in HIV controllers, a unique group of infected individuals
25 who are able to control HIV naturally, have provided us a chance to investigate the roles of host
26 immune responses in HIV control.

27 Design: In this study, the functional quality of HIV Gag p24-specific-CD8⁺ T cell responses were
28 assessed and compared between the groups of clinically distinct, HLA-B*27, -B*57/58 matched
29 individuals, viraemic-controllers (VC, pVL ≤ 2,000 copies/ml) and non-controllers (NC, pVL > 2,000
30 copies/ml) to determine their impacts on natural HIV clinical outcome.

31 Methods: An *ex vivo* IFN-γ ELISpot assay was used to screen for each individual's HIV Gag p24-
32 specific-T cell responses. Intracellular Cytokine Staining assay was used to determine their functional
33 quality (as number of cytokine being produced).

34 Results: We found that, in contrast to previous studies, all Thai volunteers with HLA-B*5801 were
35 uniformly non-controllers. HIV Gag p24-specific-CD8⁺ T cell responses of VC were with larger
36 number of high functional quality CD8⁺ T cells than those of NC ($p < 0.05$). This superior quality of
37 responses was observed at both whole p24- and epitope-specific level. Moreover, the absolute
38 number of high functional quality HIV Gag p24-specific-CD8⁺ T cells was significantly in a negative
39 correlation with pVL ($r = -0.6984$, $p = 0.0006$) and also in a positive correlation with CD4⁺ T cell
40 count ($r = 0.5648$, $p = 0.0095$).

41 Conclusion: We concluded that an adequate number of high functional quality Gag p24-specific-CD8⁺
42 T cells is important in order to become a natural HIV controller.

43 **Keywords:** HIV Gag p24, HLA-B*27, HLA-B*57/58, functional quality of CD8⁺ T cell responses, HIV
44 controller

45

46

47

49 Although antiretroviral therapy (ART) has been demonstrated as an effective way to reduce
50 morbidity, mortality and, more importantly Human Immunodeficiency Virus (HIV) transmission, its
51 deleterious side-effects and cost also put a lifelong burden on its users. Prevention of HIV by vaccine
52 is believed to be the most cost-effective and yet safe intervention for HIV/AIDS epidemic. Decades of
53 disappointing HIV vaccine development has asked us an important question "what are the immune
54 correlates of protection against HIV infection?".

55 Several immunological factors have been linked with HIV control in which HIV-specific-CD8⁺ T
56 cells are convincingly the most important component [1]. Impacts of HIV-specific-CD8⁺ T cells have
57 been evidently demonstrated in a large number of studies, including: reduction of peak viraemia
58 observed during primary infection, higher SIV load and rapid disease progression in CD8⁺-depleted
59 macaque, direct killing of CD4⁺ T cells and suppression of HIV replication [2-8]. Recent evidence
60 showed us that not all T cells were protective against HIV [9]. Presence of HIV-specific T cells
61 defined by gamma interferon assay is not indicative of T-cell mediated immunity. Subsequent works
62 confirmed that only T cells with higher functional quality were protective and hence controlling HIV
63 replication in HIV-infected individuals with good clinical outcome [9-11]. These high functional
64 quality or "polyfunctional" T cells are T cells which simultaneously produce multiple
65 cytokines/chemokines, up-regulate surface cytotoxic function such as CD107a and are perhaps with
66 proliferative capacity [12]. Not only functional quality of the HIV-specific T cells, specificity of these T
67 cells is undoubtedly essential to determine level of protection against HIV infection. T cells targeted
68 at capsid p24 of HIV were seen to be associated with low HIV-RNA, while other T cells specific to
69 other proteins seemed to relate with high viral load [13].

70 Amongst associations between HIV control and CD8⁺ T cell responses, the most unequivocal
71 evidence is the protective effect observed with some certain HLA-I alleles [14, 15]. These HLA-I
72 alleles are frequently presented in a unique group of infected individuals termed "HIV controllers",
73 who are able to control HIV naturally (lower than 2,000 copies/ml HIV load). There are 3 HLA-I
74 alleles frequently regarded as "protective alleles": HLA-B*27, -B*57 and -B*58 [14-18]. These
75 associations of HIV control may be hypothetically resulted from T cells recognition of epitopes

76 presented on these 'protective' HLA alleles [18-22]. However, possessing these protective alleles
77 does not guarantee good clinical outcome in HIV-infected individuals, it is interesting to see quality of
78 the T cells in protective allele-matched individuals who have differential control of HIV replication.

79 In this study, we asked whether functional quality of the T cells directing against same p24
80 antigen in protective HLA-I allele-matched controllers and non-controllers were different.

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97 **Materials and methods** 838 words

98 **Study subjects:** Forty-five chronically HIV infected individuals, from King Chulalongkorn Memorial
99 hospital and HIV clinic, Thai Red Cross Society, were enrolled into this study. All were antiretroviral
100 drug naïve with no opportunistic infections. Signed informed consents were obtained from all
101 individuals. This study was approved by Ethic Committee of Faculty of Medicine, Chulalongkorn
102 University.

103 **Clinical data:** Plasma HIV load (pVL) (Roche, USA), complete blood count (CBC), CD4⁺ and CD8⁺T
104 cell count (Beckman Coulter, USA) were determined at Department of Microbiology, King
105 Chulalongkorn Memorial hospital, Thai Red Cross Society.

106 Subjects categorization: Donors were categorized into 2 groups according to their pVL, "viraemic-
107 controllers" (VC, pVL ≤ 2,000 copies/ml) and "non-controllers" (NC, pVL > 2,000 copies/ml) as
108 defined elsewhere [23, 24]. Only donors with consecutively, 3 months apart, pVL control were
109 considered VC.

110 **PBMC preparation:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from
111 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) blood by standard density-gradient centrifugation using Ficoll
112 Hypaque (Amersham Biosciences, Sweden). Isolated PBMC were either used freshly in an ELISpot
113 assay or rested at 10⁶ PBMC/ml overnight in R10 (RPMI1640 (Gibco, USA) supplemented with 10%
114 heat-inactivated Fetal Bovine Serum (Lonza, USA)) for an intracellular cytokines staining (ICS) assay
115 performing on the following day. The rest were cryo-preserved at -80 °C for future usage.

116 **HLA typing:** HLA class I alleles were typed using both PCR-sequence-specific-oligonucleotides (PCR-
117 SSOP) and PCR-sequence-specific-primers (PCR-SSP) by Proimmune Ltd. (Oxford, UK)

118 **HIV *p24* sequencing:** Viral RNA was extracted from 200 µl of fresh or frozen plasma. Reverse
119 transcription-nested PCR were performed using the following primers; 5'-GAGGTGCA
120 CACAGCAAGAGGCG-3', 5'-CCCCCTATCATTTTTG GTTTCC-3' (outer1), 5'-GCGRCTGGTGAGTACGCC-3',
121 5'-RGGAAGGCCAGATYTTCC-3' (outer2) and 5'-GGCGAGAGCGGCGACTGGTGAG-3', 5'-CCCCTCTGT

122 ATCATCTGCTCCTGTATC-3' (inner) for *p24*. All sequences were analyzed using Bioedit Sequence
123 Alignment Editor version 7.0.9.0 [25].

124 **Design of currently circulating HIV Gag p24 overlapping peptides (OLPs) and epitopes:**

125 Twenty-three OLPs (20 overlapped by 10 amino acids) and 7 HLA-B*27, B*57 and B*58 restricted
126 epitopes (supplementary table 1) spanning Gag p24 protein were designed based on a consensus
127 sequence derived from 10 randomly selected HIV infected individuals. The majority of these
128 sequences (9/10) were CRF_01AE subtype (supplementary figure 1). All peptides were synthesized
129 by Mimotopes (Australia).

130 **ELISpot assay:** Gamma Interferon (IFN- γ) ELISpot was performed as follow. In brief, 2.5×10^5
131 freshly isolated PBMC was plated into each well of 96 wells-polyvinylidene-plate (Millipore, USA) which
132 were manually coated for 3 hours with 15 $\mu\text{g/ml}$ of anti IFN- γ mAb (D1K, Mabtech, Sweden) and
133 incubated at 37°C, 5% CO₂ for 15 hours in the presence of 10 $\mu\text{g/ml}$ of **each peptide. Each peptide**
134 **was tested individually and performed in duplicate.** Phytohaemagglutinin (Sigma-Aldrich, Germany)
135 and R10 was used as a positive and negative control. After discarding cell suspension, biotinylated-
136 secondary anti IFN- γ mAb (7-B6-1, Mabtech, Sweden) was added at a final concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$
137 and incubated in dark for 3 hours. Streptavidin-conjugated-alkaline-phosphatase (Mabtech, Sweden)
138 was then added and incubated for another hour. Plate was developed using alkaline-phosphatase
139 substrate kit (BioRad, USA). Spot forming unit (SFU) were determined using ELISpot reader (Carl-
140 Zeiss, USA) and calculated by subtracting with negative control. Only responses with more than 50
141 SFU/ 10^6 PBMCs and 10 times over the background were considered positive.

142 **P24-specific-CD8⁺ T cells functional quality determination:** Overnight-rested PBMC were
143 washed, resuspended and adjusted with R10 to a concentration of 10^7 PBMC/ml. One hundred
144 microliter of cell suspension was cultured with anti-human CD28, anti-human CD49d, anti-human
145 CD107a PE-Cy5 (Beckton Dickinson, USA), Brefeldin-A (Sigma-Aldrich, Germany) and 10 $\mu\text{g/ml}$ of
146 each ELISpot-responding peptide and incubated at 37°C, 5% CO₂ for 6 hours. Streptococcus
147 enterotoxin B (Sigma-Aldrich, Germany), irrelevant peptide and dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-
148 Aldrich, Germany) were used as positive and negative control. PBMC were then stained with anti-
149 human CD3 APC-H7 (Beckton Dickinson, USA) and anti-human CD8 Pacific Blue (Biolegend, USA) and

150 incubated for another 20 minutes. PBMC were permeabilized using Cytofix/Cytoperm (Beckton
151 Dickinson, USA) according to user manual and stained with anti-human IL2 FITC, anti-human TNF- α
152 APC, anti-human IFN- γ PE-Cy7 (Biolegend, USA) and anti-human MIP1- β PE (Beckton Dickinson, USA)
153 for an additional 30 minutes. PBMC were fixed with 1% paraformaldehyde in phosphate buffer saline
154 (Sigma-Aldrich, Germany), kept at 4°C overnight and analyzed on FACS Aria II (Beckton Dickinson,
155 USA). All analyses were performed using FACSDiva software version 6.1.2 (Beckton Dickinson, USA).
156 Only CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes were taken into account as shown in gating strategy (supplementary
157 figure 2). Specific CD8⁺ T cell responses were calculated by subtracting with negative control. Only
158 responses above background level were considered positive. CBC and CD8⁺ T cell count data were
159 used to calculate absolute numbers of responding cells. Multi-parameter analyses were performed
160 using FCOM algorithm on WinList software (Verity Software House, USA). With the 5 cytokine being
161 investigated, total number of 32 possible functionally-distinct CD8⁺ T cell subpopulations (functional-
162 phenotypes) was generated. Individuals' absolute number of each functional-phenotype was used to
163 calculate group median which was subsequently compared to determine the differences between
164 groups.

165 **Statistical analysis:** All statistical analyses were performed using Prism version 5 (Graphpad
166 Software, USA). Two-tailed, Mann-Whitney U test was used to compare group median and Spearman
167 R test was used to determine a correlation. P value < 0.05 was considered statistic significance.

168

169

170

171

172

173

174

175 **Results** 1266 words

176 **Protective HLA-I alleles were not associated with HIV control**

177 We categorized donors in this study according to their plasma HIV load (pVL) to reflect their
178 HIV control ability. Indeed, viraemic-controllers (VC, n=13) were with better clinical outcome than
179 non-controllers (NC, n =32) as reflected by absolute CD4⁺ count (table 1). This difference was not
180 due to their stage of HIV infection since their median time after first diagnosis was similar (table 1).
181 HLA-B*27, -B*57 and -B*58 have been shown to be associated with HIV control [14-18]. To
182 determine the influence of these "protective-alleles", donors were categorized according to their HLA-
183 I into 2 groups: subjects with protective-allele(s) (PA, n = 19) and subjects without protective-
184 allele(s) (nPA, n = 26). Surprisingly, both CD4⁺ count and pVL were not different between PA and
185 nPA (table 1). This comparable clinical outcome was independent of HIV duration and other
186 demographic characteristics (table1). Indeed, there was a similar proportion of PA in both VC (70%)
187 and NC (60%). It was apparent that mere presence and absence of protective-allele(s) was not
188 associated with clinical outcome in this study. This finding suggested that possession of protective-
189 allele(s) per se might not be sufficient to arm HIV-infected individuals with protective HIV immunity,
190 and additional factors would be required to confer an ability to control HIV.

191 **Interferon- γ producing T-cells were of similar characteristic between VC and NC**

192 In order to determine the protective effect of HIV-specific-T cells, we investigated p24-
193 specific-T cell responses in fresh PBMC by an interferon- γ (IFN- γ) ELISpot assay. There were 4 non-
194 responders, 3 VC and 1 NC which were excluded from further investigations. Overall, both NC and
195 VC mediated the same breadth of responses (median = 3 OLPs). Although VC seemed to mount
196 higher magnitude of responses than NC, it was not statistically significant (table 2A). Different HLA-I
197 restriction might have an effect on both breadth and magnitude of T-cell responses. These
198 differences were likely due to the frequency of HLA-I alleles which, in turn, having an influence on
199 immunodominance of epitopes in a certain population or patient. In order to exclude impacts of HLA-
200 I restriction, p24-epitopes-specific-T cell responses of VC and NC were analyzed in a PA-matched
201 manner. There were 8 HLA-B*27 positive donors in this study consisting of 4 VC and 4 NC. In this

202 HLA-B*27 positive group, VC had significantly lower pVL than NC (1,104.5 vs. 11,747 copies/ml,
203 $p < 0.05$). Though CD4 count was higher in VC than NC, it did not reach statistic significance (table
204 2B). Similarly, in HLA-B*57/58 positive group, there were 3VC and 9 NC in which VC had significantly
205 lower pVL and higher CD4⁺ count than NC (table 2B). However, better clinical outcome observed in
206 either HLA-B*27 and HLA-B*57/58 positive VC could not simply be explained by their better T-cell
207 responses as estimated by IFN- γ ELISpot assay, since epitope-specific-T cell responses were similar.
208 In addition, the overall p24-specific-T cell responses (as defined by both breadth and median
209 magnitude of T cell responses against 23 OLPs spanning Gag p24 protein) were also not different
210 between these PA-matched VC and NC (table 2B). These findings suggested that, at an epitope-
211 specific level, analysis of IFN- γ producing cells might not be accurate enough for evaluating the
212 protective quality of the p24-specific-T cell responses [9]. ~~In order to precisely determine an effect of~~
213 ~~T cell responses, we performed an intracellular cytokine staining (ICS) assay to investigate the~~
214 ~~functional quality of p24-specific-CD8⁺ T cell responses in these groups.~~

215 **P24-specific-CD8⁺ T cell responses of VC were of higher functional quality than those of** 216 **NC**

217 Total number of 20 subjects (8 VC and 12 NC) was included in this functional quality
218 assessment by using multi-parametric flow cytometry upon stimulation with each responding peptide
219 previously defined by an IFN- γ ELISpot assay. Fresh PBMC from the same time-point with ELISpot
220 screening were used as results from our preliminary study showed an enhanced sensitivity of cytokine
221 detection when using fresh PBMC as compared to frozen samples (data not shown). Moreover, with
222 the CBC data, we were able to calculate absolute number of responding CD8⁺ T cells, hence allowed
223 us to investigate p24-specific-CD8⁺ T cell responses in their actual number, not the proportion of total
224 lymphocyte.

225 Firstly, p24-specific-CD8⁺ T cell responses were determined as a whole (summation of every
226 single OLP-specific response in each individual). Significantly larger number of high functional quality
227 p24-specific-CD8⁺ T cells (defined as having simultaneous 4 or 5 functions) was observed in VC as
228 compared to NC (figure 1A). Next, an absolute number of each possible functional-phenotype was
229 compared between NC and VC to determine its association with HIV control. Though many

230 functional-phenotypes were different between VC and NC, only 3 reached statistical significance; full
231 5 functions, IL-2⁺TNF- α ⁺IFN- γ ⁺CD107a⁺MIP1- β ⁺, 4 functions TNF- α ⁺IFN- γ ⁺CD107a⁺MIP1- β ⁺ and 3
232 functions IFN- γ ⁺CD107a⁺MIP1- β ⁺ (figure 1B). The absolute number of these subpopulations in VC
233 and NC were 47 vs. 0 cell/mm³ ($p = 0.01$), 352 vs. 62 cell/mm³ ($p = 0.0038$) and 91 vs. 9 cell/mm³
234 ($p = 0.01$), respectively. In NC, p24-specific-CD8⁺ T cell responses were dominated by single MIP1- β
235 producing cells (figure 1B).

236 **Discordant HIV control between protective-allele(s) matched donors was attributed from**
237 **the functional quality of CD8⁺ T cell responses**

238 Next, P24-specific-CD8⁺ T cell responses from VC and NC matching for the same protective
239 HLA-B*27 or HLA-B*57/58 allele were subsequently analyzed to determine whether their diverse
240 clinical outcome was resulted from their different quality of responses. In HLA-B*27 group, VC (n=3)
241 exhibited significantly more p24-specific-CD8⁺ T cells with 5 functions than did NC (n=4) (437 vs. 0
242 cell/mm³, $p < 0.05$). Although several other functional-phenotypes were also higher in VC than NC,
243 these differences were not statistically significant (figure 2A). We next determined their quality of
244 response against an HLA-B*27 restricted epitope, KRWIILGLNK (KK10). Significantly larger number
245 of full 5 functions, KK10-specific-CD8⁺ T cells was observed in VC than NC (figure 2B). Similarly, HLA-
246 B*57/58 positive VC (n=3) possessed significantly larger number of p24-specific-CD8⁺ T cells with 5
247 functions than did NC (n=5) (23 vs. 0 cell/mm³, $p < 0.05$) (figure 2C). However, there were not
248 enough number of responders to assess each of the 6 HLA-B*57/58-restricted epitope being
249 investigated individually, they were accumulated as a summation of all the responding epitopes of
250 each subjects. Though, larger number of 5 functions CD8⁺ T cells was observed in VC than NC, it did
251 not reach statistic significance (figure 2D).

252

253

254

255

256 **Better clinical outcome could be explained by an absolute number of high functional**
257 **quality p24-specific-CD8⁺ T cells**

258 Results from our previous experiments had demonstrated an association between high
259 functional quality CD8⁺ T cell responses and good clinical outcome in both whole p24 protein specific
260 and a single epitope level (figure 1-2). We next determined the relationship between functional
261 quality of p24-specific-CD8⁺ T cell responses and readouts of HIV clinical outcome (CD4⁺ count and
262 pVL). Significantly lower level of pVL was observed in HIV-1 infected donors possessing p24-specific-
263 CD8⁺ T cells with full 5 functions (n=11) compared to those who did not (n=9) (figure 3A). In
264 addition, these donors with full 5 functions CD8⁺ T cells also had significantly higher level of CD4⁺
265 count (figure 3B). Furthermore, an absolute number of CD8⁺ T cells with full 5 functions and 4
266 functions were significantly in negative correlation with pVL ($r = -0.6984$, $p = 0.0006$ and $r = -0.5729$
267 $p = 0.0083$, respectively)(figure 3C and 3E) and in positive correlation with CD4⁺ T cells count ($r =$
268 0.5648 , $p = 0.0095$ and $r = 0.4567$, $p = 0.0429$, respectively) (figure 3D and 3F). These data
269 suggested that good clinical outcome observed in VC was strongly associated with their absolute
270 number of high functional quality p24-specific-CD8⁺ T cells.

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280 **Discussion** 953 words

281 This study examined the functional quality of the immunodominant antigen-specific CD8⁺ T-
282 cell responses in Thai individuals mostly infected with CRF01_AE virus. Roles of host immune
283 response in HIV control are better illustrated in a unique group of HIV infected individuals called "HIV
284 controllers" who are able to maintain low HIV load without anti-retroviral treatment for years. In this
285 study, we demonstrated that mere presence of some previously defined "protective alleles" (HLA-
286 B*27, -B*57 and -B*58) per se did not guarantee this controller status. The previously-described
287 protective allele "HLA-B*5801" did not confer any protective effect in our study. In fact, all HLA-
288 B*5801 volunteers were non-controllers. Moreover, we also demonstrated that an ability to control
289 HIV was strongly associated with absolute number of Gag p24-specific-CD8⁺ T cells with high
290 functional quality.

291 Presence or absence of an HLA-B*27-restricted KRWILGLNK (KK10)-specific T-cell response
292 was demonstrated to determine HIV loads in HLA-B*27⁺ individuals [26-28]. In our study, however,
293 the comparable frequency and magnitude of the KK10 response was seen in VC and NC. Unlike
294 previous observation [26, 28, 29], epitope escape mutation did not explain failure to mediate T-cell
295 response in KK-10 non-responder (data not shown). However, high resolution HLA analysis revealed
296 that HLA-B*27 of the non-responders was indeed HLA-B*2706 whilst KK10 responders had HLA-
297 B*2704 and -B*2705 alleles. Lack of KK10 response in the non-responders might be related to
298 differential epitope-binding properties amongst HLA-B*27 subtypes. HLA-B*2705-KK10 crystal
299 structure has demonstrated that residues 77 and 116 are key residues in determining F-pocket
300 binding affinity [30]. Replacing wild type acidic aspartic acid residue at position 77 with nucleophilic
301 serine (as observed in HLA-B*2704) may have minor effect on KK10 epitope recognition, since HLA-
302 B*2704⁺ individuals seem to recognize KK10 equally well. On the other hand, substitution of aspartic
303 acid at residue 116 with bulky aromatic side chain tyrosine (as observed in HLA-B*2706) may
304 abrogate binding of KK10 epitope and lead to failure of the T-cell response in HLA-B*2706⁺
305 individuals.

306 Due to the limited number of only 1.3% HLA-B*5701 carriers in Thai population [31] and
307 since HLA-B*5701 or HLA-B*5801 are both members of HLA-B58 supertype which share the same

308 binding specificity [30], study of these HLA restricted T cell responses were considered as a combined
309 group of HLA-B*57/58 positive individuals in this study. Unlike HLA-B*27, HLA-B*57/58 presents
310 more than 1 HIV Gag p24 epitopes [18, 21, 22, 32-35]. The strong association observed between
311 HLA-B*57/58 and HIV control is hypothetically resulted from CD8⁺ T cell responses against these
312 high fitness cost epitopes [14]. Indeed, sequential escape mutations of these epitopes resulting in
313 narrowing the breadth of the HLA-B*57/58-restricted T cell responses have been shown to be
314 associated with loss of control [21, 22]. In our study, however, HLA-B*57/58-restricted p24-specific
315 breadth and magnitude of responses determined by IFN γ ELISpot assays in NC were not different
316 from those observed in VC. This finding may suggest that an ability to secrete IFN γ per se is not
317 sufficient for controlling HIV infection. Other T-cell functional characteristics may be needed in order
318 to mediate quality T-cell response [1, 9, 12, 36, 37].

319 Estimation of polyfunctional p24-specific CD8⁺ T cells in proportion to CD8⁺ T cell population
320 or in an absolute number (by calculation with CBC) pointed out that VC had more polyfunctional than
321 NC. Similar to previous studies, most T-cell response mediated by NC had only 2-3 functions [9, 38].
322 Of note, some NC had high proportion of high functional T cells but the absolute numbers were
323 significantly lower than those owned by VC. The fact that total CD8⁺ count of NC and VC were
324 similar emphasized that the absolute number of high functional quality T cells was essential for HIV
325 control.

326 Detailed mechanisms to explain discrepancy of the T cell quality in HLA-matched NC and VC
327 remain unclear. However, either viral or host factors are potentially important in determining quality
328 of the T cells. As escape from T-cell response, unlike previously defined, may be not all-or-none
329 event. The virus might preferentially interfere the most potent antiviral function(s) whilst leaving
330 another one(s) untouched. Variations within a given epitope, though maintaining certain affinity to
331 HLA molecule and T-cell receptor (TCR), this less-than-optimal interaction of TCR-HLA/peptide
332 complex may lead to (stepwise) abrogation of T-cell functions. We speculated that IL-2 function is
333 perhaps the most vulnerable to be suppressed upon HIV escape? Lack of IL-2, in turn, leads to less
334 of proliferative capacity of T cells and hence being of poor quality. This speculation helps explain
335 sequential T-cell function loss when T-cell functional quality of NC and VC were cross-sectionally

336 compared (data not shown). In fact, the similar trend was also observed in individuals when they are
337 in controller status compared to the same ones when they progressed to non-controller status. On
338 the other hand, host factors such as T-cell antigen sensitivity, proliferative capacity, senescence and
339 repertoire may also be important for determining quality of HIV-specific T cell response [39-43]. High
340 antigen sensitivity and proliferative capacity with broader and cross-reactive T cells are favourable
341 and are likely to be characteristics of the VC. Although proliferative capacity of the T cells in this study
342 was not directly investigated, analysis of IL-2 producing CD8⁺ HIV-specific T cells could reflect this
343 particular function of the T cells. In our study, the fact that only VC having the IL-2-producing T cells
344 suggests that the high quality T cells in these individuals are continuously maintained by renewal of
345 similar quality clones.

346 In conclusion, this study helps extend the previous observation in subtype B-infected
347 individuals that functional quality of p24-specific-CD8⁺ T cell response is also the main contributing
348 factor for natural control of HIV in CRF01_AE-infected individuals. Our finding in HLA-B*2706⁺ and
349 HLA-B*5801⁺ NC suggests that studies in diverse immunogenetic population infected with non-
350 subtype B HIV are warranted.

351 **Acknowledgements**

352 This work is supported by Government grant (through NRCT and Chulalongkorn University,
353 Thailand). NT was funded by Chulalongkorn University Graduate Scholarship to commemorate the
354 72nd Anniversary of HM King Bhumibol Adulyadej. We thank Assoc. Prof. Jintanart Ananworanich
355 and staff at Men Health clinic, Thai Red Cross society for patient enrolment. We also thank Ms.
356 Supranee Buranapraditkul and Mr. Vittawat Jitnaitam for their technical assistance.

357 **Conflicts of Interest**

358 There were no conflicts of interest in this study.

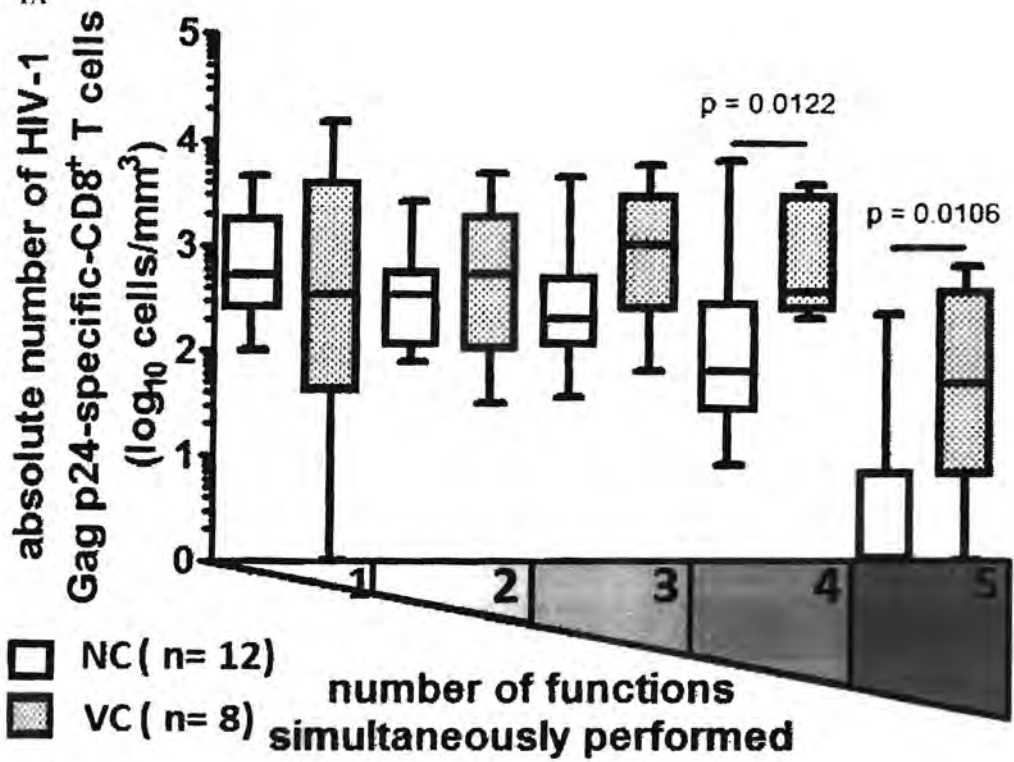
359 **Sequences**

360 All sequences were submitted to GenBank with the following accession numbers:
361 JN704002 - JN704066.

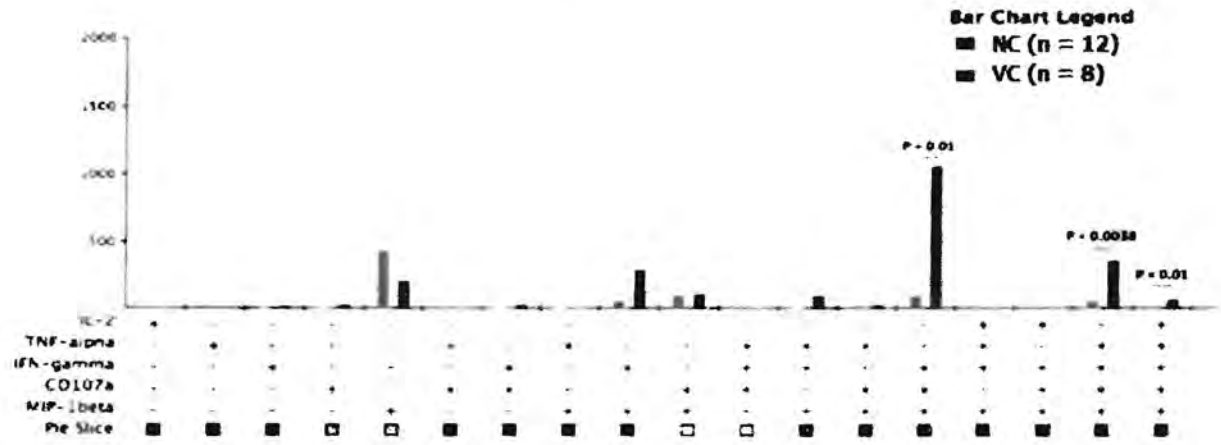
- 363 1. O'Connell KA, Bailey JR, Blankson JN. Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol Sci* 2009;**30**:631-
364 637.
- 365 2. Jin X, Roberts CG, Nixon DF, Cao Y, Ho DD, Walker BD, *et al.* Longitudinal and cross-sectional analysis of cytotoxic T lymphocyte
366 responses and their relationship to vertical human immunodeficiency virus transmission. ARIEL Project Investigators. *J Infect Dis*
367 1998;**178**:1317-1326.
- 368 3. Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane HC, Martin MA. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the
369 clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol* 1998;**72**:164-169.
- 370 4. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, *et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus
371 infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science* 1999;**283**:857-860.
- 372 5. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of
373 viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994;**68**:6103-6110.
- 374 6. Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof Garde SR, Bende RJ, Keet IP, *et al.* Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte
375 responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med*
376 1995;**181**:1365-1372.
- 377 7. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the
378 initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994;**68**:4650-4655.
- 379 8. Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, *et al.* HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals.
380 *Nature* 1987;**328**:345-348.
- 381 9. Betts MR, Nason MC, West SM, De Rosa SC, Migueles SA, Abraham J, *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional
382 HIV-specific CD8⁺ T cells. *Blood* 2006;**107**:4781-4789.
- 383 10. Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, *et al.* Analysis of total human immunodeficiency virus
384 (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol* 2001;**75**:11983-11991.
- 385 11. Gea-Banacloche JC, Migueles SA, Martino L, Shupert WL, McNeil AC, Sabbaghian MS, *et al.* Maintenance of large numbers of virus-
386 specific CD8⁺ T cells in HIV-infected progressors and long-term nonprogressors. *J Immunol* 2000;**165**:1082-1092.
- 387 12. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2008;**8**:247-
388 258.
- 389 13. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, *et al.* CD8⁺ T-cell responses to different HIV proteins have
390 discordant associations with viral load. *Nat Med* 2007;**13**:46-53.
- 391 14. Goulder PJ, Watkins DI. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nat Rev Immunol*
392 2008;**8**:619-630.
- 393 15. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, *et al.* HLA B*5701 is highly associated with restriction
394 of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:2709-2714.
- 395 16. Altfeld M, Addo MM, Rosenberg FS, Hecht FM, Lee PK, Vogel M, *et al.* Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control
396 during acute HIV-1 infection. *AIDS* 2003;**17**:2581-2591.
- 397 17. Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Munoz A, Saah AJ, *et al.* Influence of combinations of human major histocompatibility complex
398 genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 1996;**2**:405-411.
- 399 18. Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, Draenert R, Addo MM, Feeney M, *et al.* HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after
400 transmission. *Nat Med* 2004;**10**:282-289.
- 401 19. Schneidewind A, Brockman MA, Sidney J, Wang YE, Chen H, Suscovich TJ, *et al.* Structural and functional constraints limit options for
402 cytotoxic T-lymphocyte escape in the immunodominant HLA-B27-restricted epitope in human immunodeficiency virus type 1 capsid. *J Virol*
403 2008;**82**:5594-5605.
- 404 20. Schneidewind A, Brockman MA, Yang R, Adam RJ, Li B, Le Gall S, *et al.* Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-
405 lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol*
406 2007;**81**:12382-12393.

- 407 21. Martínez-Picado J, Prado JG, Fry EE, Pfafferoth K, Leslie A, Chetty S, *et al.* Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with
408 control of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2006;**80**:3617-3623.
- 409 22. Crawford H, Prado JG, Leslie A, Hue S, Honeyborne I, Reddy S, *et al.* Compensatory mutation partially restores fitness and delays reversion
410 of escape mutation within the immunodominant HLA-B*5703-restricted Gag epitope in chronic human immunodeficiency virus type 1
411 infection. *J Virol* 2007;**81**:8346-8351.
- 412 23. Walker BD. Elite control of HIV infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med* 2007;**15**:134-136.
- 413 24. Baker BM, Block BL, Rothchild AC, Walker BD. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin Biol Ther*
414 2009;**9**:55-69.
- 415 25. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
416 program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 1999;**41**:95-98.
- 417 26. Ammaranond P, Zaunders J, Satchell C, van Bockel D, Cooper DA, Kelleher AD. A new variant cytotoxic T lymphocyte escape mutation in
418 HLA-B27-positive individuals infected with HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;**21**:395-397.
- 419 27. Goulder PJ, Brander C, Tang Y, Tremblay C, Colbert RA, Addo MM, *et al.* Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in
420 HIV infection. *Nature* 2001;**412**:334-338.
- 421 28. Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, *et al.* Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte
422 response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 1997;**3**:212-217.
- 423 29. Kelleher AD, Long C, Holmes EC, Allen RL, Wilson J, Conlon C, *et al.* Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for
424 escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001;**193**:375-386.
- 425 30. Sidney J, Peters B, Frahm N, Brander C, Sette A. HLA class I supertypes: a revised and updated classification. *BMC Immunol* 2008;**9**:1.
- 426 31. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene
427 frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res* 2011;**39**:D913-919.
- 428 32. Brockman MA, Schneidewind A, Lahaie M, Schmidt A, Miura T, Desouza I, *et al.* Escape and compensation from early HLA-B57-mediated
429 cytotoxic T-lymphocyte pressure on human immunodeficiency virus type 1 Gag alter capsid interactions with cyclophilin A. *J Virol*
430 2007;**81**:12608-12618.
- 431 33. Draenert R, Le Gall S, Pfafferoth KJ, Leslie AJ, Chetty P, Brander C, *et al.* Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic
432 T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J Exp Med* 2004;**199**:905-915.
- 433 34. Miura T, Brockman MA, Schneidewind A, Lobritz M, Pereyra F, Rathod A, *et al.* HLA-B57/B*5801 human immunodeficiency virus type 1
434 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong cytotoxic T-lymphocyte [corrected]
435 recognition. *J Virol* 2009;**83**:2743-2755.
- 436 35. Navis M, Schellens I, van Baarle D, Borghans J, van Swieten P, Miedema F, *et al.* Viral replication capacity as a correlate of HLA
437 B57/B5801-associated nonprogressive HIV-1 infection. *J Immunol* 2007;**179**:3133-3143.
- 438 36. Bangham CR. CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur J Immunol* 2009;**39**:1700-1712.
- 439 37. Blankson JN. Effector mechanisms in HIV-1 infected elite controllers: highly active immune responses? *Antiviral Res* 2010;**85**:295-302.
- 440 38. Owen RE, Heitman JW, Hirschkom DF, Lanteri MC, Biswas HH, Martin JN, *et al.* HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell
441 activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. *AIDS* 2010;**24**:1095-1105.
- 442 39. Almeida JR, Price DA, Papagno L, Arkoub ZA, Sauce D, Bornstein E, *et al.* Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is
443 reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J Exp Med* 2007;**204**:2473-2485.
- 444 40. Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, Moris A, *et al.* Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell
445 polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood* 2009;**113**:6351-6360.
- 446 41. Kosmrlj A, Read EL, Qi Y, Allen TM, Altfeld M, Deeks SG, *et al.* Effects of thymic selection of the T-cell repertoire on HLA class I-
447 associated control of HIV infection. *Nature* 2010;**465**:350-354.
- 448 42. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, Sabbaghian MS, Rabin R, Hallahan CW, *et al.* HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to
449 perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* 2002;**3**:1061-1068.
- 450 43. Streeck H, Brumme ZL, Anastario M, Cohen KW, Jolin JS, Meier A, *et al.* Antigen load and viral sequence diversification determine the
451 functional profile of HIV-1-specific CD8+ T cells. *PLoS Med* 2008;**5**:e100.

1A

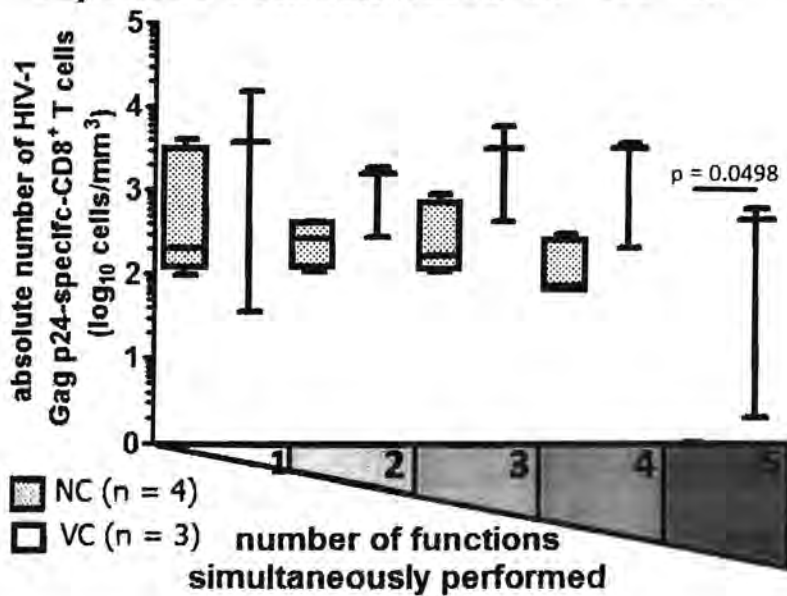


1B

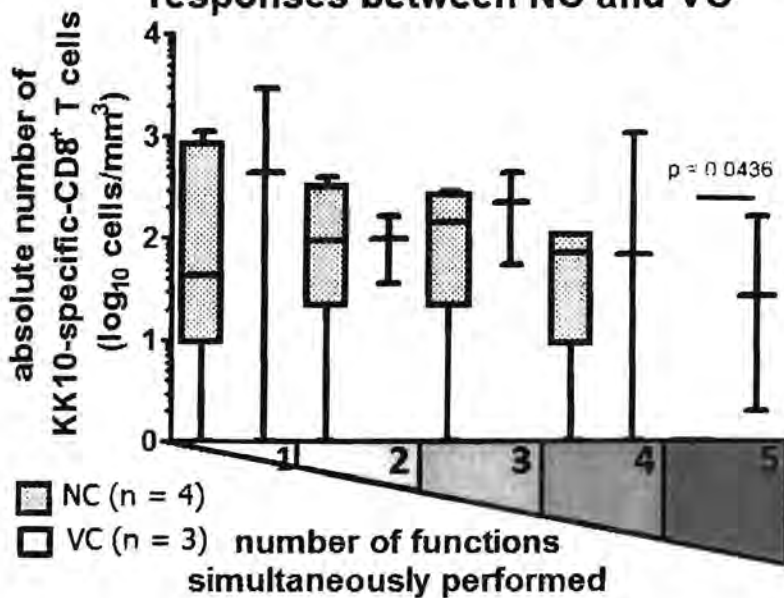


2
3
4
5
6

2A Comparison of functional quality of HIV-1 Gag p24-specific-CD8⁺ T cell responses between HLA-B*27⁺ NC and VC



2B Comparison of functional quality of HLA-B*27 KK10-specific-CD8⁺ T cell responses between NC and VC



7

8

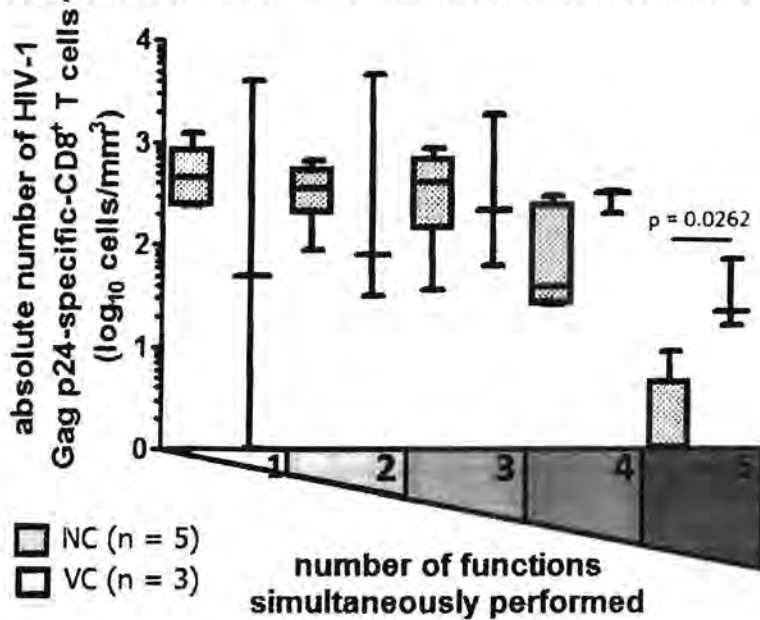
9

10

11

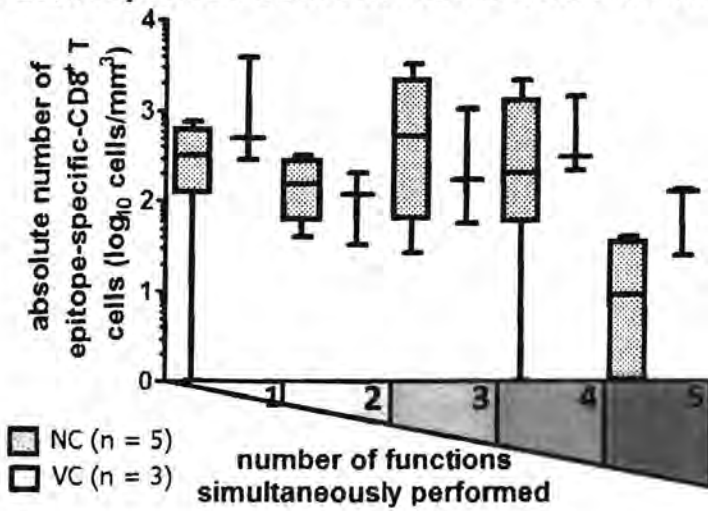
12

2C Comparison of functional quality of HIV-1 Gag p24-specific-CD8⁺ T cell responses between HLA-B*57/58 NC and VC



13

2D Comparison of functional quality of all 6 HLA-B*57/58 restricted epitopes-specific-CD8⁺ T cell responses between HLA-B*57/58 NC and VC

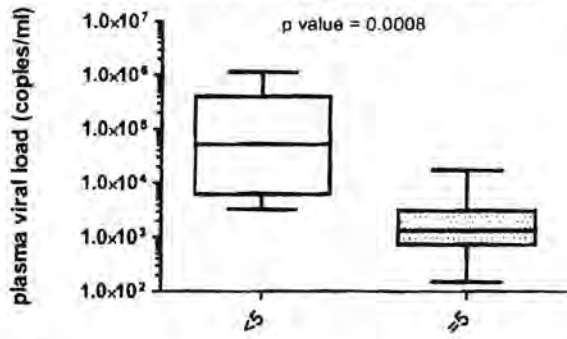


14

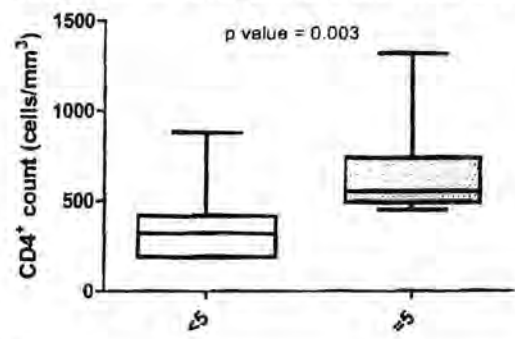
15

16

3A full 5 functions responses and pVL



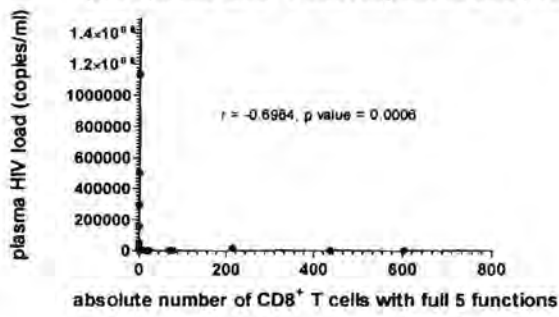
3B full 5 functions responses and CD4⁺ count



17

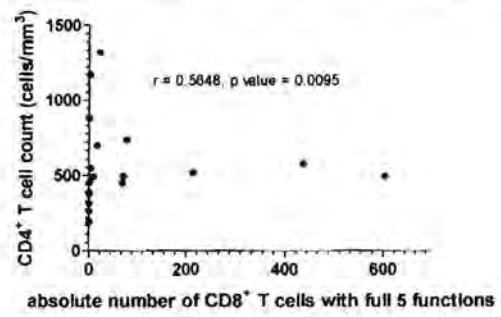
3C

correlation between functional quality of p24-specific-CD8⁺ T cell responses and pVL



3D

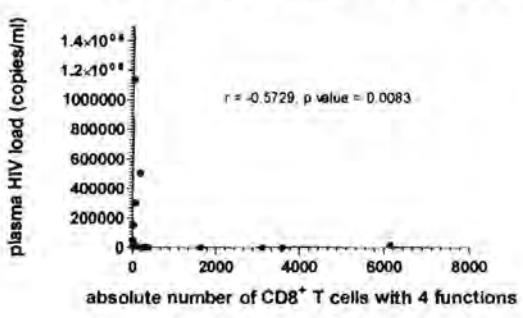
correlation between functional quality of p24-specific-CD8⁺ T cell responses and CD4⁺ count



18

3E

correlation between functional quality of p24-specific-CD8⁺ T cell responses and pVL



3F

correlation between functional quality of p24-specific-CD8⁺ T cell responses and CD4⁺ count

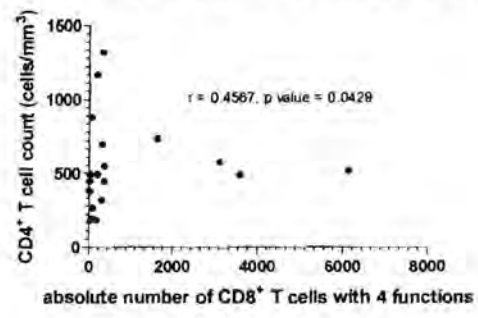


Table1. Demographic data of the study population

Group	Age (years)	Sex (M:F)	Time after 1st diagnosis (years)[†]	CD4⁺ T cell count (cells/mm³)	CD8⁺ T cell count (cells/mm³)	Plasma HIV load (copies/ml)
Categorized by plasma HIV load (threshold = 2000 copies/ml)						
Viraemic controllers (VC) (n = 13)	27.5 (18-51)	8:2	3 (1-9)	669 ^{††} (493-1,319)	957 (633-2,232)	1,079 ^{†††} (151-1,900)
Non-controllers (NC) (n = 32)	33 (21-66)	14:17	2 (0.5-13)	427.5 (126-881)	979 (382-2,008)	17,313 (3,094-1,132,883)
Categorized by presence of protective HLA class I alleles (HLA-B*27, -B*57 and -B*58)[§]						
Subject with protective-allele(s) (PA) (n = 19)	30 (18-49)	10:9	3 (1-12)	493 (126-1,319)	1,104 (550-2,232)	5,728 (151-1,132,883)
Subject without protective-allele(s) (nPA) (n = 26)	29.5 (19-66)	12:10	1 (0.5-13)	451 (173-855)	865 (382-1,489)	14,137 (936-309,949)

[†]This was calculated as years since donors were first diagnosed HIV-seroconverted to the day of sample collection.

^{††} p value = 0.0006, ^{†††} p value < 0.0001

[§] PA were subjects expressing any of these three HLA-B alleles, HLA-B*27, -B*57 and -B*58, while nPA were subjects with the other HLA-B alleles.

Table.2 HIV Gag p24 specific interferon- γ ELISpot responses

2A) Overall HIV Gag p24 specific interferon- γ ELISpot responses^{†§}

	Non-controllers (NC) (n = 31)	Viraemic controllers (VC) (n = 10)
Breadth (OLP)	3 (1-6)	3 (1-9)
Cumulative magnitude (SFU/10⁶ PBMC)	1755 (322-7913)	2748 (644-16098)
Median magnitude (SFU/10⁶ PBMC)	542 (98.75-2490)	684.5 (205-1855)

[†]All 23 OLPs were tested individually in duplicate.

[§]There were 4 non-responders in which their responses were either undetectable or below cutoff

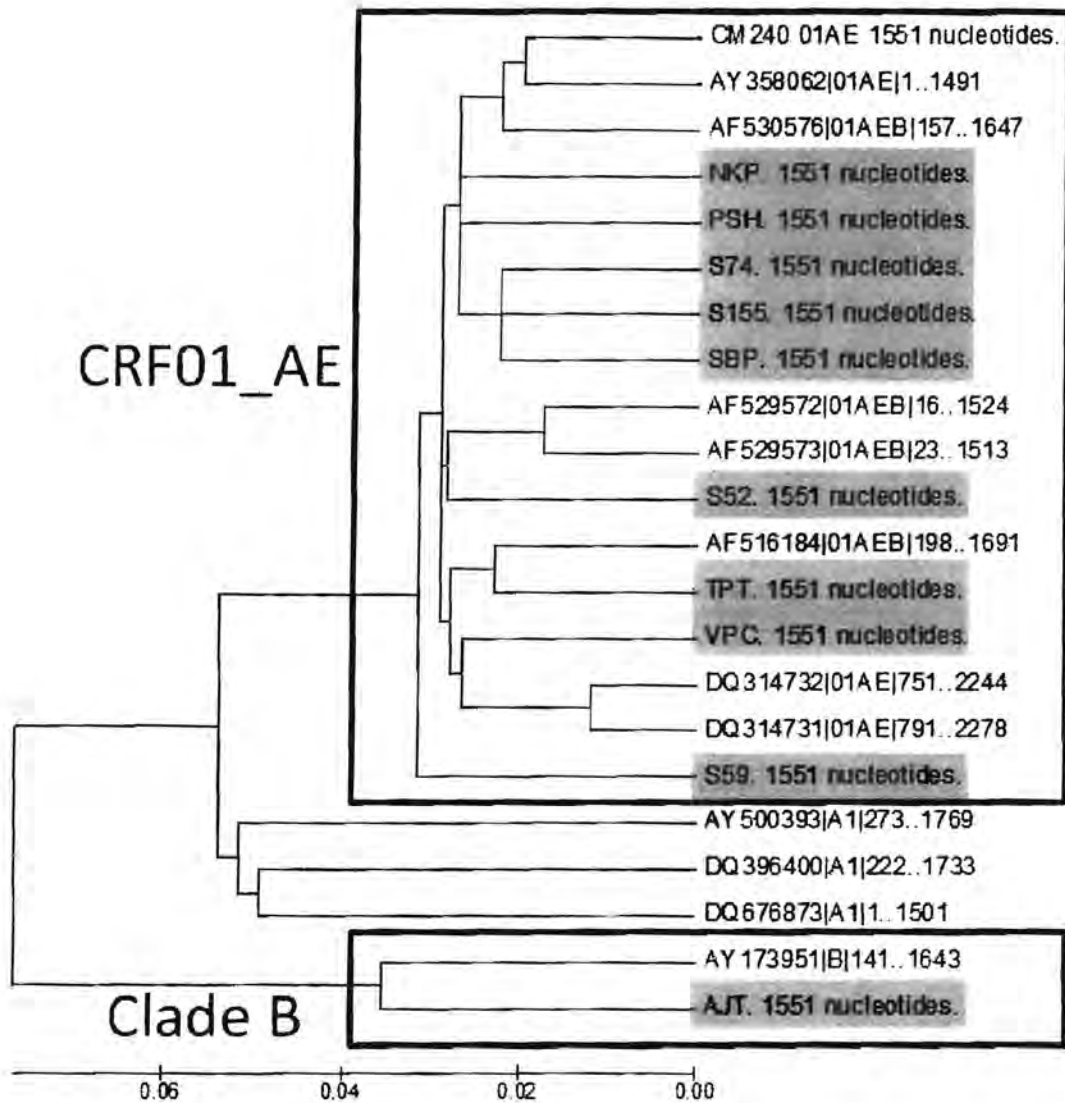
2B) HIV Gag p24 specific interferon- γ ELISpot responses of protective HLA allele(s) positive viraemic controllers and non-controllers

	HLA-B*27 group		HLA-B*57/58 group	
	NC (4)[§]	VC (4)	NC (9)	VC (3)
Age (years)	34.5 (27-44)	25 (19-30)	34 (2-49)	28 (27-34)
HIV duration (years)	3.5 (2-10)	3 (2-3)	4 (1.5-12)	2 (1-3)
CD4⁺ T cell count (cells/mm³)	292 (195-881)	728 (493-1169)	368 (126-658)	699 (495-1319)*
CD8⁺ T cell count (cells/mm³)	1285 (624-2008)	1388 (1104-1814)	974 (550-2008)	810 (791-2232)
Plasma HIV load (copies/ml)	11747 (5728-299077)	1104.5 (742-1900)*	12231 (3026-1132883)	165 (151-1549)**
p24 breadth of responses (no of OLPs)	2 (2-4)	7.5 (2-9)	2 (1-6)	3 (1-3)
p24 magnitude of responses (SFU/10⁶ PBMC)	889.3 (167.3-902)	769 (512-1149)	721.5 (98.75-1445)	644 (205-725)
Breadth of specific HLA-I allele restricted epitope responses (no of EPs)	na	na [†]	2 (0-4)	3 (2-4)
Magnitude of specific HLA-I allele restricted epitope responses (SFU/10⁶ PBMC)	1109 (0-2547.5)	2112 (0-5834)	987 (0-3435)	586 (483-751)

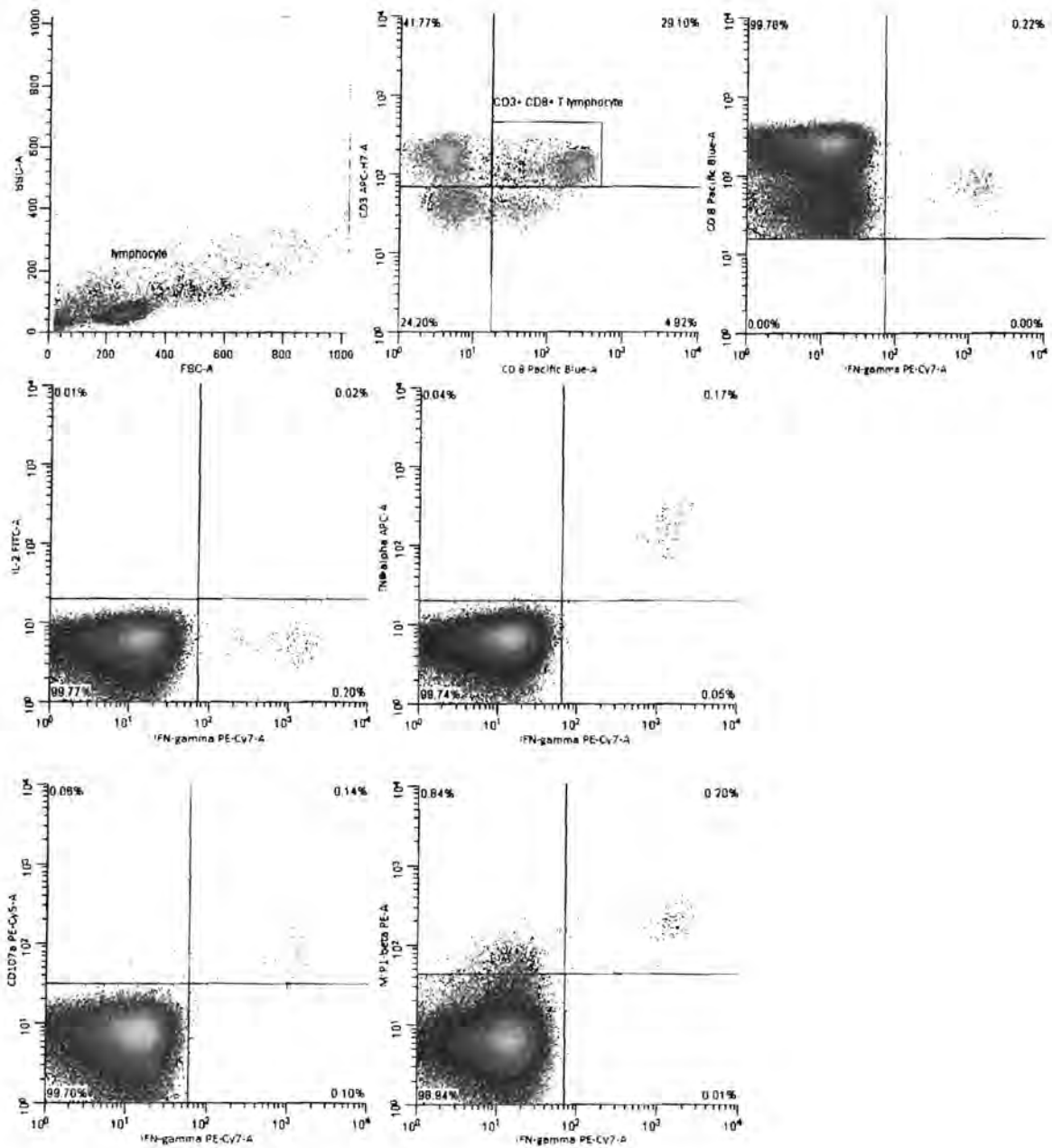
data was shown as median value, *p value < 0.05, ** p value < 0.01

[§] One non-controller expressed both HLA-B*27 and -B*58.

[†] not analyzed, only 1 HLA-B*27 restricted epitope tested in this study



Supplementary figure 1. Neighbor-joining phylogenetic tree of 10 HIV gag gene from Thai donors with reference Thailand HIV sequence (subtype B, CRF01_AE, CRF01_B, CRF01_C, CRF15_01B and CRF34_01B) Sequences derived from 10 chronically HIV infected Thai donors were indicated with grey shading. Sequences which were genotypically related were group together within black box. Nine sequences (NKP, PSH, S74, S155, SBP, S52, TPT, VPC and S59) were genetically related to CRF_01AE subtype, while one sequence (AJT) was related to Clade B.



Supplementary figure 2. Gating strategy for identification of high functional quality responding CD8⁺ T cells Plots shown were a representative data from OLP18-specific CD8⁺ T cell response from subject HN30, a viraemic controller. Upper column showed a gating scheme for CD3⁺CD8⁺ T cell population. The upper rightmost plot and 4 lower plots showed a gating scheme for CD3⁺CD8⁺ T cells responded with IFN-γ, IL-2, TNF-α, CD107a and MIP-1β, respectively.

Figure 1 **Viraemic-controllers were with higher functional quality of p24-specific-CD8⁺ T cell responses than non-controllers:** **A.** Cumulative absolute number of p24-specific CD8⁺ T cells with 1, 2, 3, 4 or 5 functions of non-controllers (NC, clear column) and viraemic-controllers (VC, dotted column) were shown on y-axis. Grey-scaled spectrum on x-axis represented numbers of function; the darker the tone, the more functions the cell expressed (from 1 to 5 functions). Medians were compared between NC (12) and VC (8) **B.** **Pie chart** showed the contribution of each functional-phenotype (pie slice area) on the total p24-specific-CD8⁺ T cell responses (summation of all individual overlapping peptide-specific response of each subjects). The proportions shown were based on group median (NC and VC). Each phenotype was represented by individual colour (also shown at the lowest part of the lower bar chart). Black and grey arc that curved over the pie chart indicated the full 5 functions responding phenotypes and the 4 functions responding phenotypes, respectively. **Bar chart** compared a median absolute number of each functional-phenotype between NC (blue bar) and VC (crimson bar). Any difference reaching statistic significance was indicated by a linked-bar and a p-value over the comparative pair. Only the positive functional-phenotypes were shown.

Figure 2 **Larger numbers of high functional quality p24-specific-CD8⁺ T cells were observed in protective HLA alleles-matched VC than NC:** These figures compared cumulative absolute number of p24-specific CD8⁺ T cells with 1, 2, 3, 4 or 5 functions of an HLA-B*27 (**A and B**) and HLA-B*57/58 (**C and D**) positive non-controllers (NC, dotted column) and viraemic-controllers (VC, clear column). Grey-scaled spectrum on x-axis represented numbers of function; the darker the tone, the more functions the cell expressed (from 1 to 5 functions). **Figure 2A and 2B** showed a comparison of total p24-specific-CD8⁺ T cell responses (summation of every single overlapping peptide-specific response of each subjects) and HLA-B*27-restricted epitope (KRWILGLNK, KK10)-specific-CD8⁺ T cell responses, respectively. Medians were compared between HLA-B*27⁺ NC (4) and VC (3). **Figure 2C and 2D** showed a comparison of total p24-specific-CD8⁺ T cell responses (summation of every single overlapping peptide-specific response of each subjects) and a summation of all 6 HLA-B*57/58-restricted epitopes (LSPRTLNAW(LW9), KGFNPEVIPMF(KF11),

ETINEEAEW(EW10), QATQEVKNW(QW9), GTGATLEEM(GM9) and TSTLQEQIGW(TW10)-specific-CD8⁺ T cell responses, respectively. Medians were compared between HLA-B*57/58⁺ NC (5) and VC (3).

Figure 3 Relationship between high functional quality p24-specific-CD8⁺ T cells and HIV control: Both plasma HIV load (**A**) and CD4⁺ T cells count (**B**) was compared between donors who possessed full 5 functions p24-specific-CD8⁺ T cells (=5) (n=11) and those who did not (<5) (n=9). Medians were compared using Mann-Whitney U test. The functionality of their T cell was analyzed either at total p24-specific or epitope-specific level. Plasma HIV load (**C**) and CD4⁺ T cells count (**D**) was plotted as a function of absolute number of full 5 functions p24-specific-CD8⁺ T cell (cell/mm³). Plasma HIV load (**E**) and CD4⁺ T cells count (**F**) was plotted as a function of absolute number of full 4 functions p24-specific-CD8⁺ T cells (cell/mm³). Each dot represented each individual. Spearman R test was used for statistical analysis.

Authors' contributions

NT designed and performed experiments, recruited volunteers, analyzed data and prepared the manuscript.

YT performed experiment and recruit volunteers.

PH designed and supervised an experiment, obtained funding and prepared manuscript.