ปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ของ Cytotoxic T Lymphocytes ต่อส่วน*Gag. Pol* ของเชื้อ HIV-1 และการหา Epitope Mapping ต่อส่วน*Gag* ในคนไทยที่ติดเชื้อ HIV-1 ที่ไม่แสดงอาการ

นางสาวสุปราณี บูรณประดิษฐ์กุล

วิทยานิพนธ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-0159-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20059504

HIV-1 *GAG, POL* CROSS-CLADE SPECIFIC CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES AND *GAG* EPITOPE MAPPING IN ASYMPTOMATIC HIV-1-INFECTED THAI PATIENTS

MISS SUPRANEE BURANAPRADITKUN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology
Inter-Departmental Program in Medical Microbiology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2000
ISBN 974-13-0159-6

Thesis Title	HIV-1 *Gag, Pol* Cross-Clade Specific Cytotoxic T Lymphocytes And *Gag* Epitope Mapping in Asymptomatic HIV-1-Infected Thai Patients
By	Miss Supranee Buranapraditkun
Inter-department	Medical Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Kiat Ruxrungtham, M.D.

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

..... Dean of Graduate School
(Professor Suchada Kiranandana, Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman
(Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph.D.)

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

..... Member
(Assistant Professor Molvibha Vongsakul, Ph.D.)

นางสาวสุปราณี บูรณประดิษฐ์กุล : ปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ของ Cytotoxic T Lymphocytes ต่อส่วน*Gag*. *Pol* ของเชื้อ HIV-1 และการหา Epitope Mapping ต่อส่วน*Gag* ในคนไทยที่ติดเชื้อ HIV-1 ที่ไม่แสดงอาการ อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม, 101 หน้า. ISBN 974-13-0159-6

ประเทศไทยพบการติดเชื้อโรคเอดส์ได้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ A/E และ B (พบ B' มากกว่า B) การศึกษาปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ของ CTL และการหา epitope mapping เป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนาวัคซีนในประเทศไทย ซึ่งประสิทธิภาพของวัคซีนที่จะนำมาใช้ จะต้องสามารถก่อให้เกิดการตอบสนองของ CTL ที่มีปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ได้อย่างกว้างขวาง เพื่อศึกษาความหลากหลายของปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ของ CTL ในผู้ที่ติดเชื้อ HIV-1 ที่มีปริมาณ CD4+ T cells มากกว่าหรือเท่ากับ 300 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร และการหา HIV-1 CTL epitope ที่พบบ่อย และ/หรือพบใหม่ ต่อส่วน gag ในผู้ติดเชื้อไทย การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาในผู้ติดเชื้อ HIV-1 จำนวน 25 คน โดยวิธี classical chromium-51 release CTL assay โดยใช้ recombinant vaccinia ที่มียีนของ HIV-1 *gag* หรือ *pol* ของสายพันธุ์ A และ B ในผู้ป่วยที่ตรวจพบว่าติดเชื้อสายพันธุ์ A/E และมี HIV-1 specific CTL ได้ทำการศึกษา epitope mapping โดยทดสอบด้วย truncated peptides ของ HIV-1 gag สายพันธุ์ A (สายพันธุ์ A 92UG037 ซึ่งแต่ละ peptide ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีความยาว 20 ตัวและซ้อนทับกันด้วยกรดอะมิโน 10 ตัว เป็นจำนวนทั้งสิ้น 49 ชิ้น) การหาสายพันธุ์ของเชื้อ HIV-1 วิธี genotyping โดยการตรวจลำดับเบสตรง V3 loop ของ env และส่วนของ gag ผลการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณ CD4+ T cell เท่ากับ 540 $\pm$ 179 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร (มีค่าระหว่าง 307-978) ค่ามัธยฐานของปริมาณไวรัส HIV-1 ในกระแสเลือดเท่ากับ 6936 คู่ต่อมิลลิลิตร (มีค่าระหว่าง 886-57022) พบว่า 23 รายติดเชื้อ HIV-1 ชนิดสายพันธุ์ A/E และ 2 รายมีการติดเชื้อ HIV-1 ชนิดสายพันธุ์ B ผลการตรวจ CTL assays พบว่าผู้ติดเชื้อทุกราย (ร้อยละ 100) มี CTL activity ต่อ gag A และ 21 ใน 25 ราย (ร้อยละ84) มีปฏิกิริยา CTL ต่อ pol A และพบว่าร้อยละ 64 และ 20 ของอาสาสมัครมีปฏิกิริยา CTL ต่อ gag B และ pol B ตามลำดับ ในอาสาสมัครที่ติดเชื้อ HIV-1 สายพันธุ์ A/E จำนวน 23 ราย พบว่า 14 ใน 23 ราย (ร้อยละ 61) มีปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ต่อส่วนของ gag แต่มีเพียง 5 ใน 23 ราย (ร้อยละ 22) ที่มีปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ต่อส่วนของ pol การศึกษา CTL epitope mapping ในอาสาสมัครที่ติดเชื้อ HIV-1 ชนิดสายพันธุ์ A/E จำนวน 19 ราย พบว่ามี CTL ตอบสนองต่อ 18 peptides โดยที่ 7 peptides อยู่ในส่วนของ p17 10 peptides อยู่ในส่วนของ p24 และ 1 peptide อยู่ในส่วนของ p6 การศึกษาเพื่อหา HLA class I-restriction ของ 3 peptides ในอาสาสมัคร 3 ราย พบว่าเป็นแอนติเจนที่ถูกนำเสนอโดย HLA A2, B7 และ Cw1 การศึกษาครั้งนี้มีการตรวจพบ CTL epitope ใหม่ที่ถูกนำเสนอโดย HLA Cw1 คือ NKIVRMYSPVSILDIKQGPK ของ gag A ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 271-290 ซึ่งอยู่ในส่วนของ p24 และยังมีการตรวจพบ CTL epitope ใหม่อีก 3 epitopes ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ปฏิกิริยา CTL ต่อ HIV-1 gag พบได้ทุกรายในอาสาสมัครผู้ติดเชื้อ HIV-1 และมีปฏิกิริยาข้ามสายพันธุ์ระหว่าง A กับ B มากกว่าต่อส่วน pol อย่างชัดเจน ดังนั้น HIV-1 gag จึงเหมาะสมที่จะเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการพัฒนาวัคซีนสำหรับทดสอบในประเทศไทย นอกจากนี้การศึกษายังก่อให้เกิดการค้นพบ CTL epitope ใหม่จำนวนหนึ่ง ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ทำให้มีความรู้ความเข้าใจด้าน CTL และ HLA restriction ในคนไทยเพิ่มมากขึ้น และนำไปสู่การศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

สหสาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4175267930 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY
KEYWORDS : Cross-Clade/ Cytotoxic T Lymphocyte/ Epitope Mapping
SUPRANEE BURANAPRADITKUN : HIV-1 *GAG, POL* CROSS CLADE SPECIFIC CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES AND *GAG* EPITOPE MAPPING IN ASYMPTOMATIC HIV-1-INFECTED THAI PATIENTS. THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR KIAT RUXRUNGTHAM, 101 pp. ISBN 974-13-0159-6

There are 2 clades of HIV-1: A/E and B (B' is more common than B) found in Thailand. It is now believed that an effective vaccine should be able to generate broad cross-clade CTL responses. Cross-clade CTL study and epitope mapping are therefore warranted for HIV vaccine development to be tested in Thailand. This study is to find the prevalence of cross-clade CTL activities against HIV-1 gag and pol in HIV-1-infected Thai patients with CD4+ $\geq$ 300 cells/cu.mm. and to identify common and/or novel HIV-1 CTL gag epitopes. Classic Cr^{51} release CTL assays were performed in 25 HIV-1 infected Thai patients. Recombinant HIV-1 *gag* and *pol* vaccinia for both clade A and B were used. HIV-1 clade A gag truncated peptides amino acid 1-499, consensus sequence of 92UG037, each is 20 amino acids in length, with 10 amino acids overlaps between sequential peptides were used for gag CTL epitope mapping. Dried pack cell samples were tested genotypically for HIV-1 subtypes. Mean CD4+ T cell counts 540 $\pm$ 179 cells/cu.mm (range 307-978), median plasma HIV-RNA 6936 copies/ml (range 886-57022). From genotyping, 23 patients found infected with HIV-1 clade A/E, 2 patients were clade B infection. All of the patients showed CTL activity against clade A gag (100%) and 21/25 (84%) against pol A, whereas 16/25 (64%) and 5/25 (20%) showed CTL against clade B gag and pol, respectively. In HIV-1 clade A/E infected 23 patients, HIV-1 gag region showed the highest cross-clade CTL activity (14/23, 61%), but only 22% (5/23) showed cross-clade CTL activity against pol region. There are 18 epitopes identified in 19 evaluated HIV-1 clade A/E patients. Seven epitopes locate in p17, 10 in p24 and 1 in p6 regions. In the HLA class I-restriction study, 3 patients were analyzed. Three epitopes were found to be restricted by HLA A2, B7 and Cw1. A new HLA Cw1 restricted p24 CTL epitope, i.e. gag A residues 271-290: NKIVRMYSPVSIL DIKQGPK was detected. Three potential CTL epitopes were also identified and need further investigation.

In conclusion, HIV-1 gag is the most common target of CTL responses among HIV-1 infected Thais. In addition, cross-clade CTL activity against gag is 3 folds higher than to pol. Thus, HIV-1 gag clade A is suitable to be included in a candidate HIV vaccine to be evaluated in Thailand.

Department Medical Microbiology
Field of study Medical Microbiology
Academic year 2000

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGMENT

I wish to express my deep gratitude to the followings, who have helped, supported and advised me in this work.

Assistant Professor Doctor Kiat Ruxrungtham, of the Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, the advisor, for his excellent and invaluable advice, indispensable help, constructive criticism and encouragement throughout this study.

Miss Sunee Sirivichayakul of Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Dr.Robert Oelrichs of Macfarlane Burnet Centre, Melbourne for their help in HIV-genotyping.

Dr.Tim Rostron in the Human Immunology Unit and Dr. Sarah Rowland-Jones and Dr. Pokrath Hansasuta of MRC Human Immunology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford, OX3 9DS, UK for their kind help in HLA-typing.

All the staffs at the Thai Red Cross AIDS Research Centre for their help in specimen collection and patient follow up.

Special thanks are also given to all my colleagues in the Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine and in the Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for their help and encouragement. I would also like to thank all of the subjects who donated their blood for my studies.

Finally, I am grateful to my parents for their kind support and warm encouragement, which enable me to fulfil this study.

CONTENT

		Page
THAI ABSTRACT		iv
ENGLISH ABSTRACT		v
ACKNOWLEDGEMENT		vi
LIST OF TABLES		x
LIST OF FIGURES		xi
ABBREVIATIONS		xii
CHAPTER		
I	INTRODUCTION	1
II	LITERATURE REVIEW	
	Acquired Immunodeficiency Syndrome	3
	HIV-1 Biology	3
	Genetic Diversity of HIV-1	6
	HIV-1 Subtypes in Thailand	9
	The HIV Life Cycle	10
	Virus Entry	10
	Cell-surface Binding of HIV	10
	HIV Fusion with Cell Membrane	11
	Reverse Transcription	11
	Integration of Viral DNA into Cellular Genomic DNA	12
	Viral Protein Expression	13
	Viral Assembly	13
	Expression of Viral Envelope Proteins	13
	M-tropic and T-tropic HIV	14
	The Immunopathogenesis of HIV Infection	14
	Clinical Course of HIV Infection	14
	HIV Disease Progression	15
	The Immune System	17
	The Organs of the Immune System	17
	Bone Marrow	17
	Thymus	17
	Spleen	18
	Antigens	18
	Antibodies	18
	Lymph Nodes	19

The Cells of the Immune System..... 19
T Cell..... 19
Natural Killer Cell..... 20
B Cell..... 20
Granulocytes or PMNs..... 20
Macrophages..... 21
Dendritic Cells..... 21
The Immune Response..... 21
Cytotoxic T Lymphocyte..... 22
Granule-mediated Cell Death..... 23
Lymphocyte Receptor-mediated Cell Death..... 24
Human Leukocyte Antigen..... 24
Class I HLA Molecules..... 25
Class II HLA Molecules..... 26
Expression of MHC Molecules..... 26
CTL and HIV-1..... 27
Soluble Inhibitory Factors..... 28
HIV-Specific Cytolytic..... 28
Technique for Measurement of CTL..... 30
Classical Chromium-51 Release Assay..... 30
ELISPOT Assay..... 30
Intracellular IFN-γ Assay..... 30
HLA-peptide Tetrameric Complex Assay..... 31
Evidence of HIV-specific CTL Responses..... 31

III MATERIALS AND METHODS

1. Study group, sample size and specimen collections.... 34
2. Dried pack cell preparation..... 34
3. HIV-1 genotyping assay..... 35
4. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) preparation..... 35
5. Culture of B95-8 cells..... 35
6. Harvesting Epstein Barr virus (EBV)..... 35
7. B lymphoblastoid cell lines (BLCL) preparation..... 36
8. Sample preparation for HLA genotyping assay..... 36
9. HLA genotyping assay..... 37
10. Recombinant vaccinia virus and HIV-1 clade A gag peptide..... 37
11. Effector cells preparation..... 38

12. Cross-clade CTL activity 38
13. CTL epitope mapping 40
14. HLA-restriction 40
15. Formula for calculation 40
16. Criteria of CTL activity 40
17. Statistic analysis 40
IV RESULTS
1. Clinical characteristic 41
2. Cross-clade CTL assay 41
3. Gag A epitope mapping CTL assay 46
4. HLA class I genotypic 52
5. HLA-restriction 53
6. Example for raw data of patient PU 68
V DISCUSSION 76
VI CONCLUSION 80
REFERENCES 81
APPENDICES 92
APPENDIX I 93
APPENDIX II 95
APPENDIX III 97
APPENDIX IV 100
BIOGRAPHY 101

TABLE LIST

Tables		Page
1	Comparison of each technique for detect of CTL activity.....	31
2	Clinical information for naïve asymptomatic HIV-1-infected Thai patients.....	42
3	Results of cross-clade CTL activity.....	43
4	HIV-1 gag A CTL epitope recognition.....	46
5	HLA-restriction of patient PU with peptide no. 3750.....	55
6	HLA-restriction of patient AP with peptide no. 3786.....	59
7	HLA-restriction of patient KM with peptide no. 3789.....	64
8	HLA-restriction of patient KM with peptide no. 3750.....	66
9	Data of HLA restriction of patient PU with peptide no. 3750.....	68

FIGURE LIST

Figures		Page
1	Genomic organization of HIV-1	4
2	Mosaic genome structures of the four currently recognized circulating recombinant forms	8
3	HLA class I and class II structure	25
4	Cross-clade HIV-1 gag CTL activity in HIV-1 clade A/E infection	44
5	Cross-clade HIV-1 pol CTL activity in HIV-1 clade A/E infection	45
6	CTL epitope mapping in HIV-1 clade A/E infection	51
7	The three most common HLA class I molecule	52
8	HIV-1 gag peptide epitope mapping of patient PU	54
9	HLA-restriction of patient PU with peptide no.3750	56
10	HIV-1 gag peptide epitope mapping of patient AP	58
11	HLA-restriction of patient AP with peptide no.3786	60
12	HIV-1 gag peptide epitope mapping of patient KM	62
13	HLA-restriction of patient KM with peptide no.3789	65
14	HLA-restriction of patient KM with peptide no.3750	67
15	CTL epitope mapping in HIV-1 clade A/E infection	78

ABBREVIATIONS

α	=	alpha
aa	=	amino acid
AIDS	=	acquired immune deficiency syndrome
APC	=	antigen presenting cell
ARC	=	AIDS related complex
ARV	=	AIDS-associated retrovirus
β	=	beta
β_2m	=	β2 microglobulin
B-Cell	=	bursa-derived lymphocyte
BFA	=	brefeldin A
BLCL	=	B lymphoblastoid cell line
Ca^{2+}	=	calcium 2+
CCR	=	CC chemokines receptor
CD	=	cluster of differentiation
cm^2	=	square centimeter
CO_2	=	carbon dioxide
cpm	=	count per minute
CRF	=	circulating recombinant form
Cr-51	=	chromium-51
CSA	=	cyclosporin A
CTL	=	cytotoxic T lymphocyte
cu.mm.	=	cubic millimeter
CXCR	=	CXC chemokines receptor
^oC	=	degree celsius
DMSO	=	dimethyl sulphoxide
DNA	=	deoxy nucleic acid
DW	=	distilled water
EBV	=	Epstein-Barr virus
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetate
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	=	enzyme-linked immunospot
env	=	envelope gene
ER	=	endoplasmic recticulum
et al.	=	et alii
FADD	=	Fas-associated death domains
FBS	=	fetal bovine serum

gm	=	gram
gag	=	group antigen gene
gp	=	glycoprotein
GPA	=	gelatin particle agglutination
group M	=	major group
group N	=	non-M and non-O group
group O	=	outlier group
h	=	hour
HEPS	=	highly exposed but persistently seronegative
HIV	=	human immunodefficiency virus
HLA	=	human leukocyte antigen
I	=	ionomycin
i.e.	=	id est
ICE	=	interleukin-1β-converting enzyme
IFN-γ	=	interferon gamma
Ig	=	immunoglobulin
IL-2	=	interleukin 2
IL-7	=	interleukin 7
IN	=	integrase
Ir	=	immune response gene
IVDU	=	intravenous drug user
IVS	=	*in vitro* stimulation
kb	=	kilobases
kD	=	kilodaltons
LAV	=	lymphadenopathy-associated virus
LT	=	lymphotoxin
LTNP	=	long-term nonprogressor
LTR	=	long terminal repeat
M-tropic	=	macrophage tropic virus
MA protein	=	matrix protein
Mg^{2+}	=	magnesium 2+
MHC	=	major histocompatibility complex
min	=	minute
MIP	=	macrophage inflammatory protein
ml	=	milliliter
mRNA	=	messenger ribosomal nucleic acid
µg/ml	=	microgram per milliliter
µl	=	microliter

NC	=	nucleocapsid protein
nef	=	negative factor gene
NIH	=	National institute of health
NK Cell	=	natural killer cell
NLS	=	nuclear localization signal
NSI	=	non syncytia inducing
p	=	protein
p24	=	protein 24
PBMC	=	peripheral blood mononuclear cell
PBS	=	phosphate buffer saline
PCR	=	polymerase chaine reaction
pfu	=	plaque-forming units
PMA	=	phorbolmyristate acetate
PMN	=	polymorphonuclear cell
pol	=	polymerase gene
PR	=	protease
RANTES	=	regulated upon activation, normal T expressed and secreted
rbc	=	red blood cell
rev	=	regulator of expression of viral proteins
RNA	=	ribonucleic acid
rpm.	=	round per minute
RPMI1640	=	Rosewell Park Memorial Institute formular 1640
RRE	=	rev-responsive element
RT	=	reverse transcriptase
rVV	=	recombinant vaccinia virus
SDF-1	=	stromal cell-derived factor 1
SI	=	syncytia inducing
SIV	=	simian immunodeficiency virus
SR	=	spontaneous release
SSP	=	sequence specific primer
STD	=	sexually transmitted disease
TAP	=	transporter associated with processing
T Cells	=	thymus-derived lymphocyte
T-tropic	=	T-cell line tropic virus
TAR	=	trans-activating response element
tat	=	transactivator of transcription gene
TCR	=	T cell receptor
TNFR	=	tumor necrosis factor receptor

TR	=	total release
TX-100	=	triton X-100
vif	=	viral infectivity factor gene
vpr	=	viral protein R
vpu	=	viral protein U
WT	=	wild type