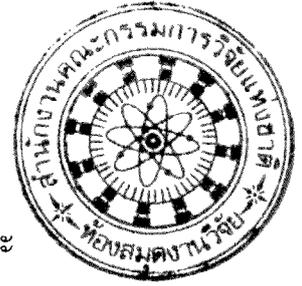


อาสาสมัครที่ติดเชื้อ HIV จำนวน ๔๕ คน อาสาสมัครเหล่านี้ควรมี CD4 count มากกว่า 300 cells/mm<sup>3</sup> โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่ควบคุมไวรัสได้ดี และกลุ่มติดเชื้อทั่วไป



๒ การเก็บตัวอย่าง

เจาะเลือดรวม ๕๐ ซีซีเพื่อเก็บพลาสมาโดยใช้ EDTA เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวและ 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 นำเซลล์ที่ได้มาช้อมด้วย Trypan blue และนับโดยกล้องจุลทรรศน์

๔ การหาลำดับเบสของยีน gag โดย direct sequencing

สกัด DNA จาก PHA blast จำนวน ๕ ล้านเซลล์ หรือ RNA จาก plasma และเพิ่มจำนวน nef โดยใช้ primer ที่เหมาะสม โดย PCR และ RT-PCR ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปศึกษาลำดับเบสโดยตรง (direct sequencing) โดยใช้เครื่อง automated DNA sequencer

๕ นำข้อมูลจากการวิเคราะห์ลำดับยีนมาสังเคราะห์เปปไทด์เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

๖ วิเคราะห์ T cell response โดยวิธี ELISpot assay เพื่อได้ข้อมูลของการตอบสนองต่อ overlapping peptides

๗ ทดสอบการตอบสนองด้วย Intracellular cytokine staining เพื่อวิเคราะห์คุณภาพของ T cell

**ผลการทดลอง**

ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับอาสาสมัคร

ผู้วิจัยได้วิเคราะห์ผู้ติดเชื้อ HIV จำนวน ๔๕ ราย เป็นผู้ที่ควบคุมไวรัสไม่ได้ (typical progressor, TP) จำนวน

๓๒ ราย ผู้ที่ควบคุมไวรัสได้ดี (viraemic controller, VC) ๑๐ ราย และผู้ควบคุมไวรัสได้ดีมาก (elite

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่..... 19 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน..... 243373
เลขเรียกหนังสือ.....

controller, EC) จำนวน ๓ ราย เป็นชาย ๒๔ รายและหญิง ๒๑ ราย อายุของผู้ป่วยอยู่ระหว่าง ๑๘ ถึง ๖๖ ปี (ค่ามัธยฐาน ๓๐ ปี) ระยะเวลาการติดเชื้ออยู่ระหว่าง ๖ เดือนถึง ๑๓ ปี ปริมาณ CD4 มีค่า ๑๒๖ ถึง ๑๓๑๕ cells/mm<sup>3</sup> โดยมีค่ามัธยฐาน ๔๕๓ cells/mm<sup>3</sup> ปริมาณ CD4 มีค่า ๓๘๒ ถึง ๒๒๓๒ cells/mm<sup>3</sup> โดยมีค่ามัธยฐาน ๕๔๒ cells/mm<sup>3</sup> ปริมาณ HIV-RNA (pVL) มีค่าอยู่ระหว่าง <๔๐ ถึง ๑,๑๓๒,๘๘๓ copies/ml และมีค่ามัธยฐาน ๕๑๖๕ copies/ml (ตารางที่ ๑) ผู้วิจัยได้เปรียบเทียบปริมาณ CD4 และ pVL ของอาสาสมัครแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่ม TP มี CD4 ต่ำที่สุด และมี pVL สูงที่สุด (Fig 1)

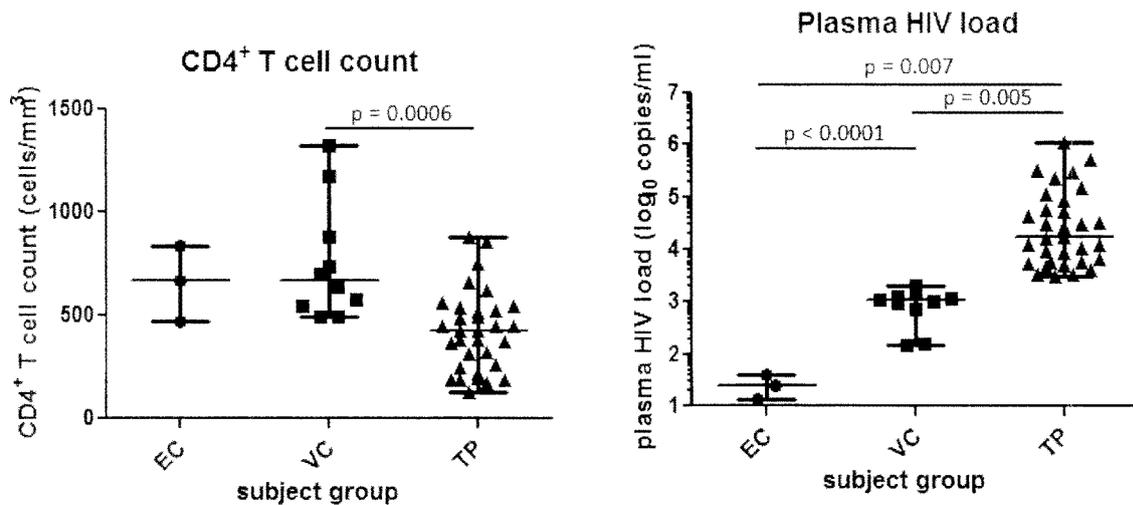


Figure 1 CD4 และ pVL ในอาสาสมัครแต่ละกลุ่ม

### HLA typing

HLA-A11 เป็น HLA-A allele ที่พบบ่อยที่สุด (๖๐ เปอร์เซ็นต์) รองลงมาเป็น HLA-A24 (๔๒.๕ เปอร์เซ็นต์) HLA-A2 (๒๕ เปอร์เซ็นต์) และ HLA-A33 (๒๐ เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ สำหรับ HLA-B allele HLA-B15 พบบ่อยที่สุด (๓๕ เปอร์เซ็นต์) รองลงมาเป็น HLA-B40 (๓๐ เปอร์เซ็นต์), HLA-B27 (๒๐ เปอร์เซ็นต์) และ HLA-B58 (๒๐ เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ สำหรับ HLA-C HLA-C07 เป็น allele ที่พบบ่อยที่สุด (๔๕ เปอร์เซ็นต์) ตามด้วย HLA-C08 (๒๗.๕ เปอร์เซ็นต์) และ HLA-C01 (๒๒.๕ เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ตารางที่ ๒ และ Fig 1)

ตารางที่ ๑ Demographic data ของอาสาสมัคร

	ID	Sex	Age	Time since	CD4 counts	CD8 counts	pVL
				seroconversion (years)	(cells/mm3)	(cells/mm3)	(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	na†	1,999
	HN2	M	26	3	1,169	1,814	1,175
	HN9	M	43	9	639	na†	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	na†	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
	SY Y	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	na†	3,993
	NKM	M	37	12	173	na†	112,042
	ID	Sex	Age	Time since	CD4 counts	CD8 counts	pVL

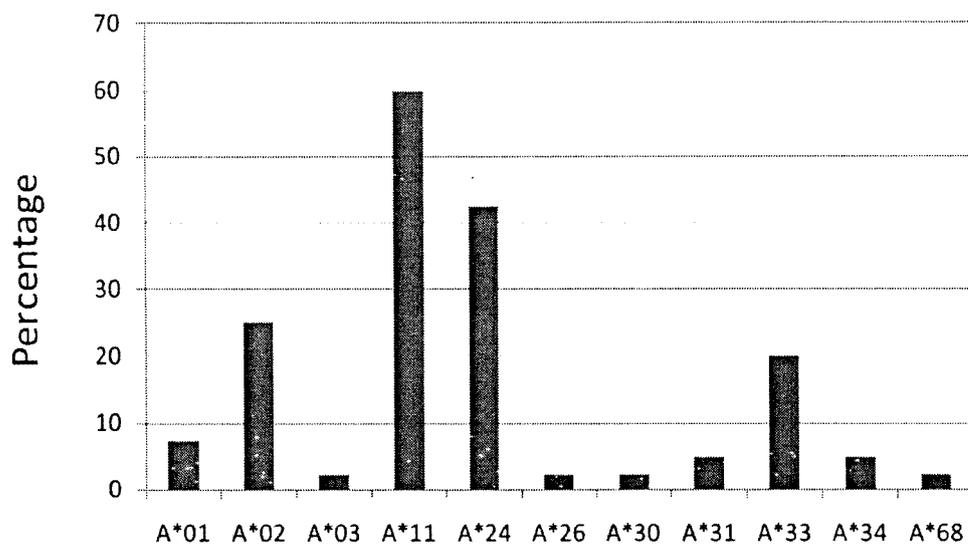
			seroconversion (years)	(cells/mm3)	(cells/mm3)	(copies/ml)	
TP	TBT	M	21	2	185	na†	4,973
	PPK	F	40	4	219	na†	43,061
	UKY	F	33	8	249	na†	309,949
	HN8	F	36	1	659	na†	230,942
	HN17	F	28	1	325	382	10,961
	HN18	F	30	1	385	823	51,900
	HN19	M	26	2	519	1,338	17,313
	HNN5	M	29	2	375	1,259	27,487
	HNN7	M	23	1	525	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
	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

ตารางที่ ๒ HLA type 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	na†	na†	na†	na†	na†	na†

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	na†	na†	na†	na†	na†	na†
	TP	JSM	1101	2410	1802	2704	na†
NOT		0206	1102	2704	3701	0602	1202
VKJ		1101	3303	1301	5801	na†	na†
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	na†	na†
UKY		1101	1101	1301	4601	0102	0406
ID		HLA-A alleles		HLA-B alleles		HLA-C alleles	
HN8		0201	1101	150201	460101	010201	080101
HN17	0203	0207	1525	4002	0304	0702	
HN18	0207	2407	1502	4601	0102	080101	
HN19	0207	0207	4001	4601	0102	0702	

TP	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	na†	na†	na†	na†	na†	na†
	HN28	na†	na†	na†	na†	na†	na†
	HN29	na†	na†	na†	na†	na†	na†



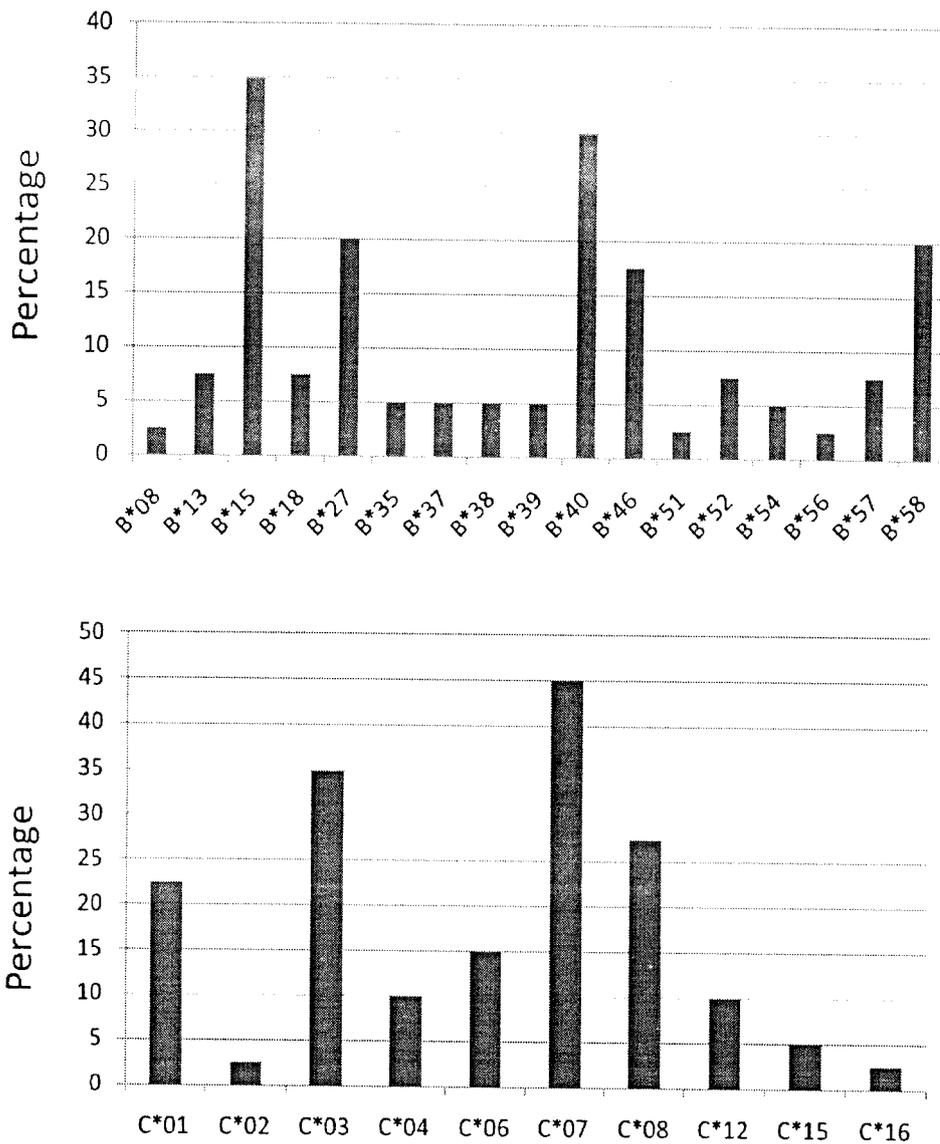


Figure 2 HLA allele frequency ในอาสาสมัคร

ผลของ protective allele ต่อ CD4 และ pVL

HLA allele บาง allele มีความสำคัญต่อการควบคุมการเพิ่มจำนวนไวรัส (protective allele, PA) พบว่าในผู้ที่  
 มี PA จะมี clinical outcome ที่ดีกว่าผู้ที่ HLA allele ทั่วไป (non-protective allele, nPA) ตัวอย่างของ PA  
 ได้แก่ HLA-B27, -57 และ -58 ในการศึกษา<sup>1</sup> ผู้วิจัยได้ศึกษาเปรียบเทียบเพื่อวิเคราะห์ว่าปรากฏการณ์  
 ดังกล่าวจะแสดงผลในผู้ติดเชื้อคนไทยหรือไม่ เรามีอาสาสมัคร ๘ คนที่มี HLA-B27 และ ๑๑ คนที่มี HLA-  
 B57 หรือ -B58 (HLA-B57/58, ทั้ง ๒ allele นี้อยู่ใน HLA supertype เดียวกัน และผู้วิจัยจะได้กล่าวรวมกัน  
 ไปเป็น HLA-B57/58) เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วพบว่า CD4 และ pVL ซึ่งเป็นตัวชี้วัด clinical outcome ไม่มี

ความแตกต่างกันในกลุ่ม PA และกลุ่ม nPA (ตารางที่ ๓) มีเฉพาะ CD8 T cell count เท่านั้นที่พบว่า PA มีมากกว่า nPA ( $p < 0.05$ ) (Fig 3)

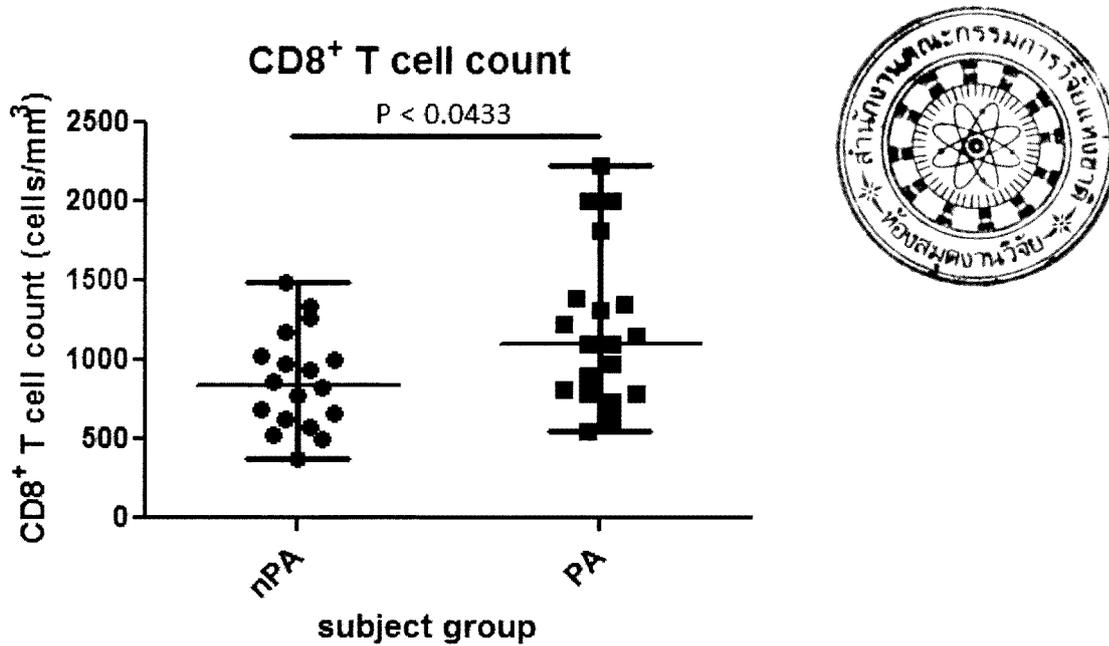


Figure 3 ปริมาณ CD8 T cells ในกลุ่ม PA และ nPA

การออกแบบ overlapping peptide

ผู้วิจัยได้ออกแบบ overlapping peptide ที่ครอบคลุมโปรตีน p24 โดยวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนดังกล่าวจากอาสาสมัครติดเชื้อ HIV จำนวน ๑๐ ราย ตำแหน่งของ primers ได้แสดงไว้ใน Figure 4 และตารางที่ ๓



เมื่อวิเคราะห์ได้ลำดับกรดอะมิโนจากโปรตีน p24 ของผู้ป่วย ๑๐ คนแล้วนำมา align เพื่อสร้างเป็น consensus sequence (Fig 5) และออกแบบเป็น overlapping peptide จำนวน ๒๓ เส้น พร้อมทั้ง epitope อีก ๗ เส้น (Fig 6 และตารางที่ ๔)

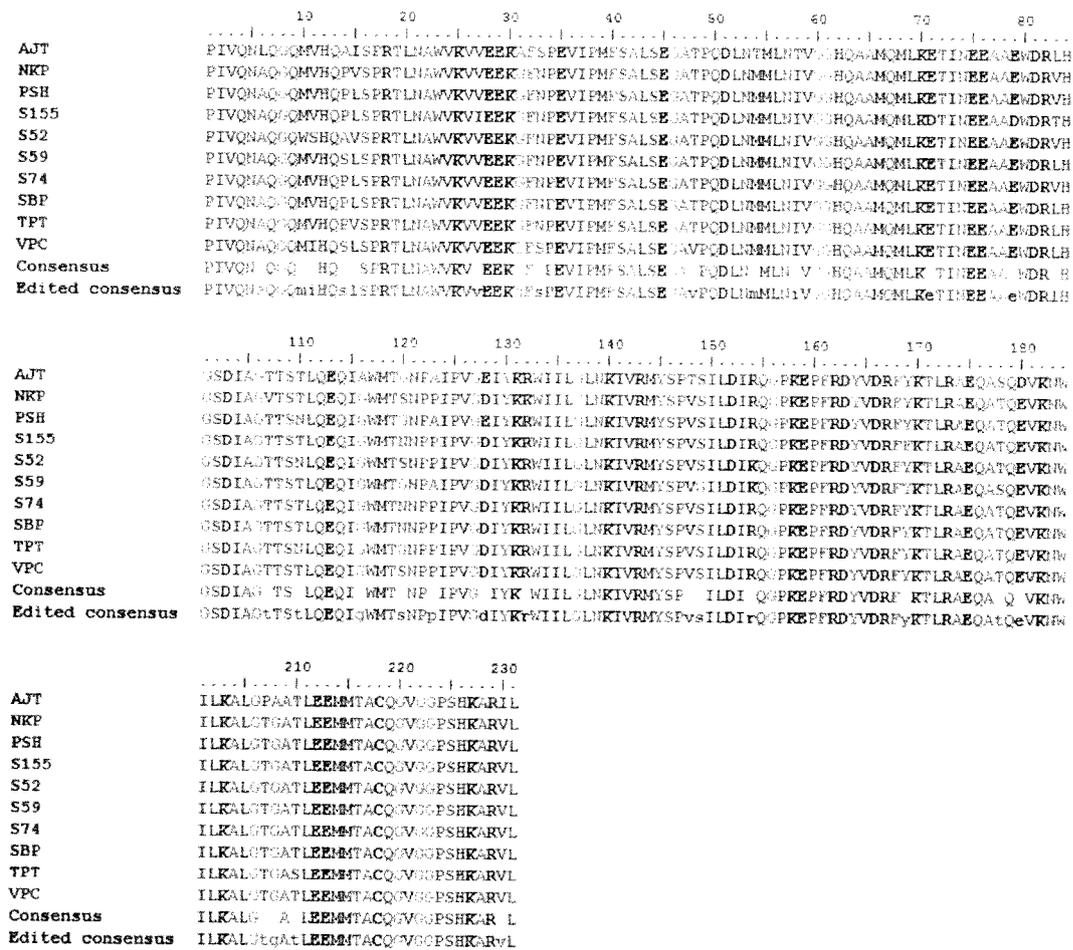


Figure 5 Alignment of p24 amino acid sequences from 10 individuals

Word length: 20  
 Overlap consecutive peptides by: 10  
 Shorten by: 0  
 Lengthen by: 0  
 Forbidden C-term amino acids:  
 Forbidden N-term amino acids:  
 Number of peptides generated: 23  
 Sequence names: seq1

PIVQNAQQQMIHQSLSPRTLNAWVKVVEEKGFSPPEVIMPFSALESEGAVPQDLNMLNIVGGHQAMQMLKETINEEAAEWDRLEHPVHAGP  
 PIVQNAQQQMIHQSLSPRTL (20) [-0.33]  
     IHQSLSPRTLNAWVKVVEEK (20) [-0.39]  
         NAWVKVVEEKGFSPPEVIMPF (20) [0.18]  
             GFSPPEVIMPFSALESEGAVPQ (20) [0.47]  
                 SALESEGAVPQDLNMLNIVG (20) [0.51]  
                     DLNMLNIVGGHQAMQMLK (20) [0.29]  
                         GHQAMQMLKETINEEAAEW (20) [-0.71]  
                             EAAEWDRLEHPVHAGP (20) [-0.96]

DRLHPVHAGPIPPGQMRPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTSNPPIVPGDIYKRWIILGLNKIVRMYSFVSILDIRQGPKEPFRDYVDRFYK  
 DRLHPVHAGPIPPGQMRPR (20) [-1.15]  
     IPPGQMRPRGSDIAGTTST (20) [-0.82]  
         GSDIAGTTSTLQEQIGWMTS (20) [-0.24]  
             LQEQIGWMTSNPPIVPGDIY (20) [-0.17]  
                 NPPIVPGDIYKRWIILGLNK (20) [-0.04]  
                     KRWIILGLNKIVRMYSFVSI (20) [0.49]  
                         IVRMYSFVSILDIRQGPKEP (20) [-0.19]  
                             LDIRQGPKEPFRDYVDRFYK (20) [-1.34]

FRDYVDRFYKTLRAEQATQEVKNWMTETLLIQNANPDCKSILKALGTGATLEEMMTACQVGGPSSHARVL  
 FRDYVDRFYKTLRAEQATQ (20) [-1.26]  
     TLRAEQATQEVKNWMTETLL (20) [-0.60]  
         VKNWMTETLLIQNANPDCKS (20) [-0.55]  
             IQNANPDCKSILKALGTGAT (20) [-0.10]  
                 ILKALGTGATLEEMMTACQ (20) [0.50]  
                     LEEMMTACQVGGPSSHARV (20) [-0.22]  
                         VGGPSSHARVL (11) [-0.07]

Total number of "forbidden" peptides generated 0

Figure 6 รูปแสดงการตัดโปรตีน p24 ออกเป็น overlapping peptides

ตารางที่ ๔ ลำดับของกรดอะมิโนของ overlapping peptides

Peptide names	Amino acid sequences
<b>OLP1</b>	PIVQNAQGGQMIHQSLSPRTL
<b>OLP2</b>	IHQSLSPRTLNAWVKVVEEK
<b>OLP3</b>	NAWVKVVEEKGFSPEVIPMF
<b>OLP4</b>	GFSPEVIPMFSALSEGAVPQ
<b>OLP5</b>	SALSEGAVPQDLNMMLNIVG
<b>OLP6</b>	DLNMMLNIVGGHQAAMQMLK
<b>OLP7</b>	GHQAAMQMLKETINEEAAEW
<b>OLP8</b>	ETINEEAAEWDRLHPVHAGP
<b>OLP9</b>	DRLHPVHAGPIPPGQMREPR
<b>OLP10</b>	IPPGQMREPRGSDIAGTTST
<b>OLP11</b>	GSDIAGTTSTLQEQIGWMTS
<b>OLP12</b>	LQEQIGWMTSNPPIPVGDIY
<b>OLP13</b>	NPPIPVGDIYKRWIILGLNK
<b>OLP14</b>	KRWIILGLNKIVRMYSVSI
<b>OLP15</b>	IVRMYSVSIILDIRQGPKEP
<b>OLP16</b>	LDIRQGPKEPFRDYVDRFYK
<b>OLP17</b>	FRDYVDRFYKTLRAEQATQE
<b>OLP18</b>	TLRAEQATQEVKNWMTETLL
<b>OLP19</b>	VKNWMTETLLIQNANPDCKS
<b>OLP20</b>	IQNANPDCKSILKALGTGAT
<b>OLP21</b>	ILKALGTGATLEEMMTACQG
<b>OLP22</b>	LEEMMTACQGVGGPSHKARV
<b>OLP23</b>	VGGPSHKARVLAEAMSHAQQ
<b>KK10</b>	KRWIILGLNK
<b>LW9</b>	LSPRTLNAW
<b>KF11</b>	KGFNPEVIPMF
<b>EW10</b>	ETINEEAAEW
<b>QW9</b>	QATQEVKNW
<b>GM9</b>	GTGATLEEM
<b>TW10</b>	TSTLQEQIGW

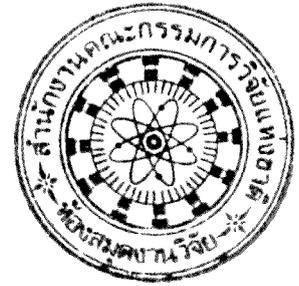
## การวิเคราะห์ p24-specific T-cell response ด้วย ELISpot assay

ผู้วิจัยใช้ IFN $\gamma$  ELISpot assay เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของการตอบสนองโดย T cells ต่อ p24 ในอาสาสมัครจำนวน ๔๕ คน มี ๔ รายที่ไม่มีการตอบสนองที่วัดได้ (non-responder) ในจำนวนนี้มี EC ๓ ราย และ TP ๑ ราย

เมื่อเปรียบเทียบการตอบสนองของ TP และ VC พบว่าความกว้างของการตอบสนอง (breadth of response) ทั้ง ๒ กลุ่มใกล้เคียงกัน ส่วนความแรงของการตอบสนอง (magnitude of response) นั้น ถึงแม้ว่าดูเหมือนว่า VC จะมีแนวโน้มที่ความแรงมากกว่า แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ๕) อย่างไรก็ตาม ผลการตอบสนองของ T cells อาจเป็นผลมาจาก HLA class I alleles ที่แตกต่างกันในอาสาสมัครแต่ละคน และแต่ละกลุ่ม ซึ่งทำให้ผลการสังเกตการณ์ไม่ตรงไปตรงมาตามที่ควรจะเป็น ผู้วิจัยจึงเสนอการเปรียบเทียบเทียบการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน T cells ในอาสาสมัครที่มี HLA allele เดียวกัน ในที่นี้เราสนใจที่จะจับคู่ HLA ๒ alleles ได้แก่ HLA-B27 และ HLA-B57/58 ที่มีผลต่อ clinical outcome ของ HIV infection

ในอาสาสมัครที่มี HLA-B27 นั้น พบว่าอาสาสมัคร VC มี pVL ต่ำกว่าอาสาสมัคร TP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fig 7) และมีแนวโน้มว่า CD4 ในกลุ่ม VC จะมีกว่ากลุ่ม TP แต่ไม่มากพอที่จะถึงระดับมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fig 8) การตอบสนองของ T cells ต่อ overlapping peptide (OLP) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างอาสาสมัคร VC และ TP (Fig 9 และ Fig 10) การตอบสนองต่อ KRWILGLNK (KK10) ก็ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน (ตารางที่ ๖)

สำหรับในอาสาสมัครที่มี HLA-B57/58 พบว่าผลลัพธ์ทางคลินิกของ VC ดีกว่า TP โดยพบว่า VC มี pVL ต่ำกว่า และมี CD4 ที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fig 11 และ Fig 12) แต่เป็นที่ประหลาดใจ เนื่องจาก T-cell response ต่อ OLP ของอาสาสมัคร VC และ TP ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ ๖) และเมื่อวิเคราะห์การตอบสนองของ T cells ต่อ epitopes ทั้ง ๖ เส้น ก็พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่าง TP และ VC ที่มี HLA-B57/58 เช่นกัน (ตารางที่ ๖)



ตารางที่ ๕ การตอบสนองของ T cells ต่อ p24 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)

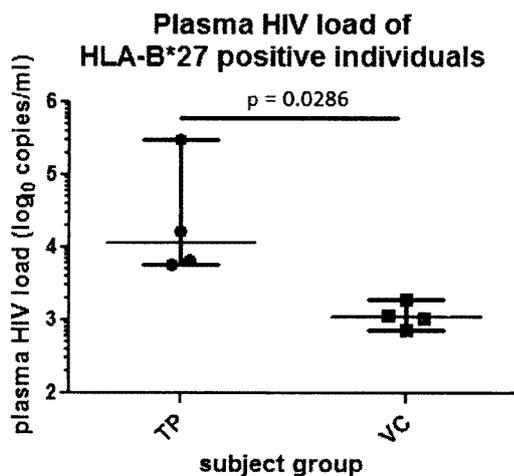


Figure 7 pVL in HLA-B27+ TP and VC

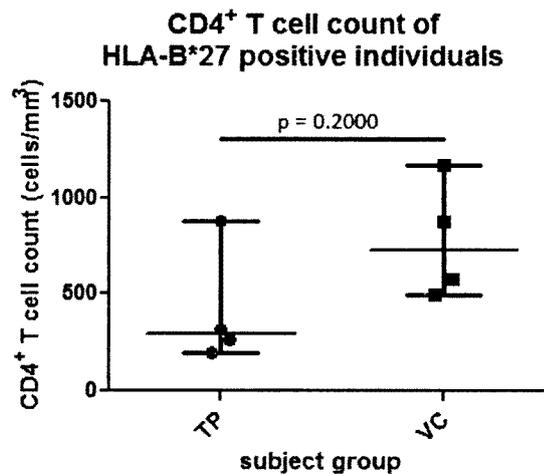


Figure 8 CD4 count in HLA-B27 TP and VC

ตารางที่ ๖ Comparison of HIV-1 Gag p24 specific interferon- $\gamma$  ELISpot responses between typical progressors and viraemic controllers carrying the same protective HLA-I alleles

	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/mm <sup>3</sup> )	292 (195-881)	728 (493-1,169)	368 (126-658)	699 (495-1,319)*
CD8+ T cell counts (cells/mm <sup>3</sup> )	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) †	na††	na††	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)	na††	na††	1,860 (0-4058)	2,338 (966-3,678)

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

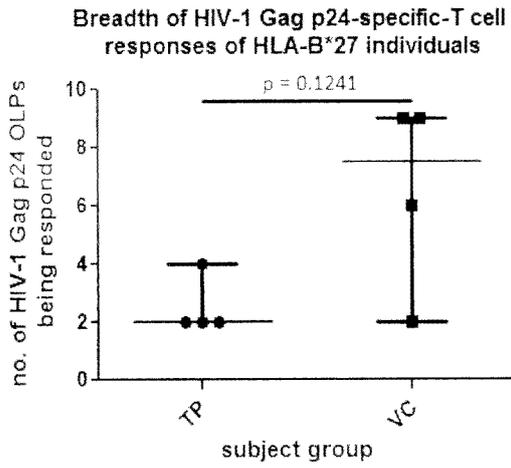


Figure 9 Breadth of T cells

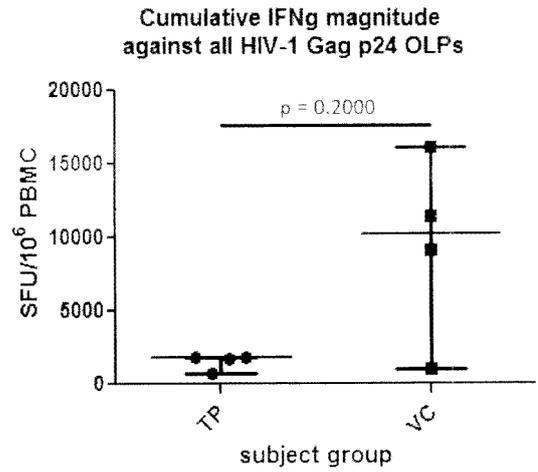


Figure 10 Magnitude of T cells

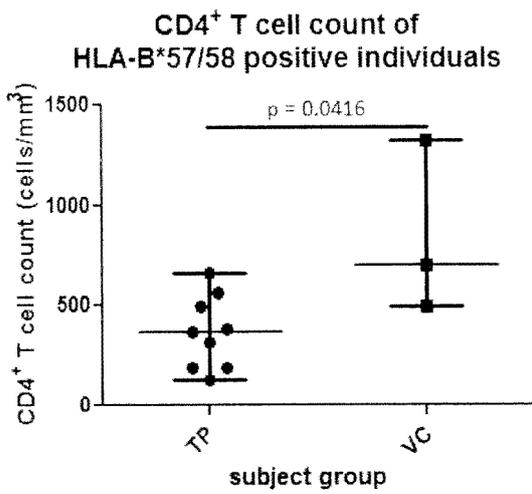


Figure 11 CD4 in HLA-B57/58 donors

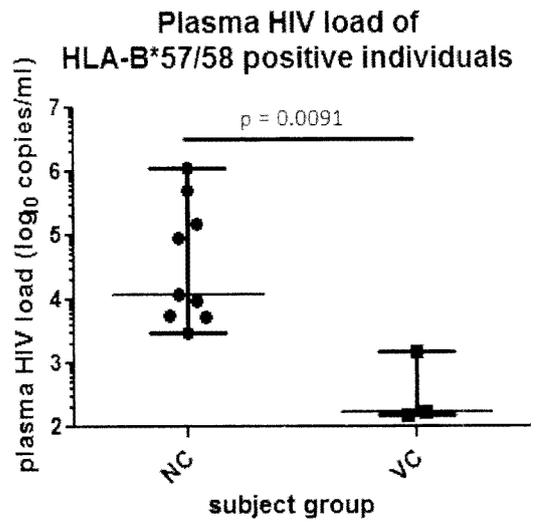


Figure 12 pVL in HLA-B57/58 donors