

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๒ ,ปี ๒๕๕๓ และปี ๒๕๕๔ ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่อำนวยความสะดวกสำหรับสถานที่ และเครื่องมือ และท้ายที่สุด ผู้วิจัยขอขอบคุณอาสาสมัครที่ได้เล็งเห็นความสำคัญ 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.ปกรัฏ หังสสุต
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ในการพัฒนาวัคซีน HIV เราจำเป็นต้องมีความรู้ในกลไกการป้องกันการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ก่อนการศึกษาภูมิคุ้มกันของผู้ติดเชื้อ HIV ที่มีความสามารถในการควบคุมปริมาณ HIV ได้ตามธรรมชาติซึ่งมีปริมาณ HIV-RNA น้อยกว่า ๒๐๐๐ copies/ml สร้างโอกาสในการวิเคราะห์และค้นหากลไกอะไรที่ทำให้ผู้ติดเชื้อเหล่านี้สามารถควบคุมไวรัสได้

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 ที่เคยระบุไว้ในการศึกษาอื่น ไม่ได้การันตีว่าคนนั้นจะมีการควบคุมไวรัสที่ดีเสมอไปในคนไทย และที่ชัดเจนได้แก่ HLA-B58 ซึ่งก่อนหน้านี้เป็นที่ยอมรับว่าเป็น protective allele ในการศึกษาอื่น ทุกคนที่มี allele ดังกล่าวไม่มีความสามารถในการควบคุมไวรัสอย่างมีประสิทธิภาพ และถูกจัดอยู่ในกลุ่ม TP HLA-A11 เป็น HLA allele ที่พบมากที่สุดใอาสาสมัครแต่ไม่มีผลในการควบคุมไวรัสแต่ประการใด ความกว้าง และความแรงของการตอบสนองของ T cell มีความใกล้เคียงกันในกลุ่ม VC และ TP (542 vs. 685 SFU/106 PBMC) และเมื่อเปรียบเทียบในคนที่มีความคล้ายกัน พบว่าความแรงของการตอบสนองก็ไม่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน 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 ในความเป็นจริงแล้ว นักวิทยาศาสตร์ไม่เคยพบใครเลยที่เมื่อติดเชื้อ HIV แล้วสามารถกำจัดเชื้อออกไปจากร่างกายได้ ดังนั้น การออกแบบวัคซีนโดยอาศัยหลักการว่าเมื่อร่างกายติดเชื้อไวรัสแล้ว จะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติจึงใช้ไม่ได้สำหรับ HIV สาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งได้แก่การที่ HIV มีการเพิ่มจำนวน และกลายพันธุ์อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์เหล่านี้ถูกควบคุมในระดับหนึ่ง 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 นักวิทยาศาสตร์อาจต้องอาศัยปัจจัยอีกประการหนึ่งในการตัดสินใจลำดับกรดอะมิโนชนิดใดที่ควรใส่ไว้ในวัคซีนต้นแบบ 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 การหลบหนีภูมิคุ้มกันของ 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

วัคซีนป้องกันการติดเชื้อไวรัสในอดีตรับความสำเร็จค่อนข้างง่ายตาย เนื่องจากวัคซีนเหล่านี้เป็นวัคซีนที่ใช้ป้องกันไวรัสชนิดที่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ แต่สำหรับการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคเอดส์อาจยุ่งยากกว่านั้น สาเหตุที่สำคัญได้แก่ HIV ไม่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติ ในความเป็นจริงแล้ว นักวิทยาศาสตร์ไม่เคยพบใครเลยที่เมื่อติดเชื้อ HIV แล้วสามารถกำจัดเชื้อออกไปจากร่างกายได้ ดังนั้น การออกแบบวัคซีนโดยอาศัยหลักการว่าเมื่อร่างกายติดเชื้อไวรัสแล้ว จะกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติจึงใช้ไม่ได้สำหรับ HIV สาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งได้แก่การที่ HIV มีการเพิ่มจำนวน และกลายพันธุ์อย่างรวดเร็วแต่อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์เหล่านี้ถูกควบคุมในระดับหนึ่ง เนื่องจากกรดอะมิโนบางตำแหน่งมีความสำคัญต่อโครงสร้าง [4] หรือหน้าที่ของโปรตีนของ HIV การกลายพันธุ์ในตำแหน่งเหล่านี้จึงอาจทำให้ไวรัสไม่สามารถมีชีวิตต่อไปได้ (abortive mutation) ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของ HIV มีข้อจำกัด และเมื่อกระบวนการหลบหลีกภูมิคุ้มกันโดยการกลายพันธุ์ดำเนินไปเรื่อยๆ ในที่สุดแล้ว HIV จะไม่สามารถกลายพันธุ์หนีต่อไปได้ และอาจมีลักษณะของลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะซึ่งสามารถนำข้อมูลส่วนนี้เพื่อใช้ในการออกแบบวัคซีนได้นอกจากนี้ในประชากรหนึ่งที่มี 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 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

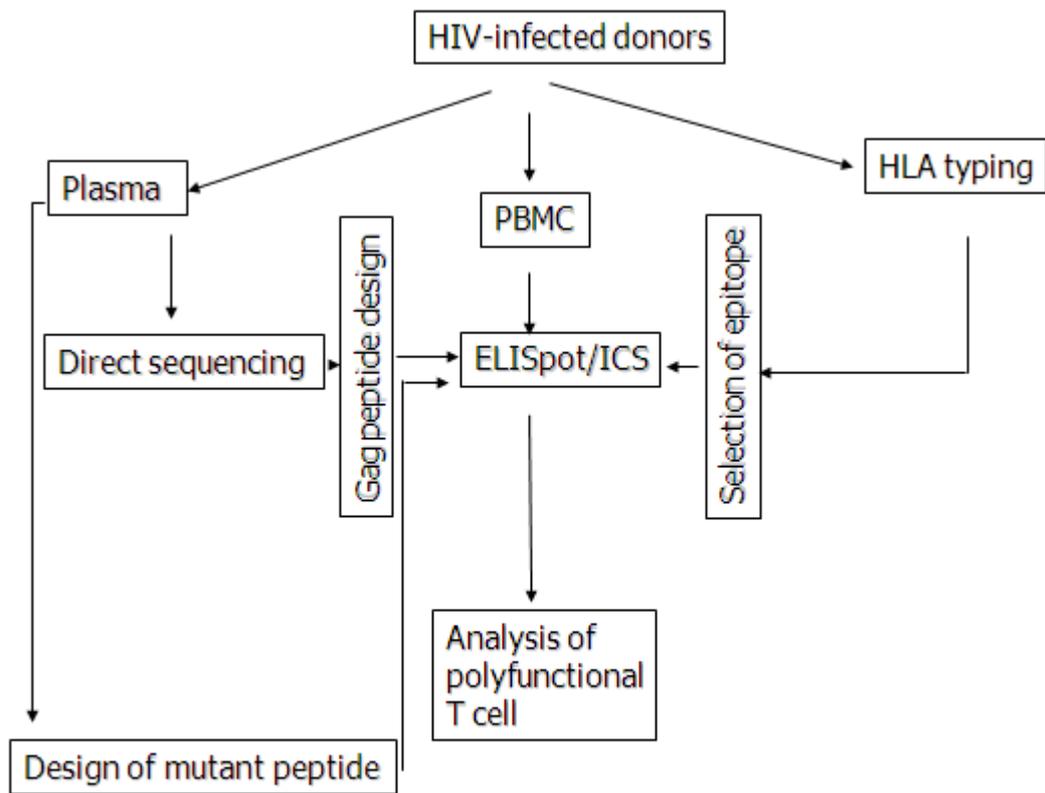
งานวิจัยนี้ทำการศึกษาในผู้ที่ติดเชื้อ HIV ที่มีปริมาณ CD4 มากกว่า 300 cells/mm^3 โดยได้ชี้แจงรายละเอียดของโครงการให้แก่อาสาสมัครได้รับทราบแล้ว และได้รับการอนุญาตจากคณะกรรมการจริยธรรม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

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

แผนภูมิแนวคิดการทำวิจัย



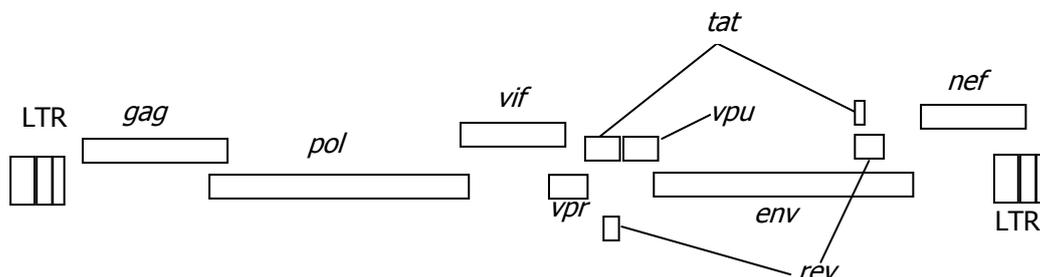
บทบทวนวรรณกรรม

HIV เป็นสมาชิกของไวรัสใน Genus Lentivirusซึ่งอยู่ใน Family Retroviridae ไวรัสนี้มีพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยวสองเส้น HIV เป็น enveloped virus ที่มี glycoprotein spikes (gp160) ที่มีบทบาทสำคัญในการเข้าสู่เซลล์ของไวรัส สมาชิกของ Lentivirusนอกจาก HIV แล้วยังมี 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 SIVcpzหรือ SIVที่มาจากชิมแปนซี (*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 เรียกกลุ่มย่อยๆนี้ว่า 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 นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ยังพบว่ายังมี HIV ลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ CRF01_AE และ subtype B ซึ่งได้ตั้งชื่อว่า CRF15_01B[10] HIVบางสายพันธุ์เป็นลูกผสมของสายพันธุ์ต่างๆมากกว่าหรือเท่ากับ ๔ สายพันธุ์ขึ้นไป หรือที่เรียกว่าเป็น mosaic viruses จะใช้คำต่อว่า cpxซึ่งหมายถึง complex เช่น subtype I ซึ่งปัจจุบันพบว่าเป็นสายพันธุ์ลูกผสมแบบ mosaic จึงตั้งชื่อใหม่ว่าเป็น CRF04-cpx เป็นต้น

HIV-1 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ ๑๐๐ ถึง ๑๕๐ นาโนเมตร และมีขนาดของ genome ประมาณ ๑๐ กิโลเบสซึ่งมี long-terminal repeats (LTRs) ขนานอยู่สองข้าง 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] และยังพบอีกว่าแอนติบอดีดังกล่าวอาจจะมีบทบาทน้อยมาก ในการควบคุมการติดเชื้อในระยะ primary infection โดยจะเห็นได้จากว่า การลดลงของปริมาณไวรัสในระยะ primary infection เกิดขึ้นก่อนมี neutralising antibodies เสียอีก [14] และที่สำคัญ neutralising antibodies เหล่านี้ส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ค่อนข้างสูง มี neutralising antibodies อยู่เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่มีความสามารถในการ neutralisation ข้ามสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในขณะที่ยังมีข้อสงสัยอยู่ว่าแอนติบอดีจะมีประสิทธิภาพเพียงใด ในการควบคุมและป้องกันการติดเชื้อ 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]ไม่เพียงแต่หลักฐานในผู้ที่ติดเชื้อเท่านั้น CTL ยังมีบทบาทในการป้องกันการติดเชื้อผู้ที่สัมผัสเชื้อแต่ไม่ติด (Highly-exposed persistently seronegative persons, HEPS) อีกด้วย[18-21]ด้วยหลักฐานดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นผู้เชี่ยวชาญในการพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ HIV ในปัจจุบันจึงมีแนวคิดว่าจะพัฒนาวัคซีนที่มีองค์ประกอบหลักในการกระตุ้น CTL ต่อโปรตีนของ HIV

ถึงแม้ว่า CTL จะมีบทบาทสำคัญในการควบคุม HIV แต่ไวรัสชนิดนี้มีความสามารถในการกลายพันธุ์หลบหลีกภูมิคุ้มกัน และในบางกรณีปรากฏการณ์ในลักษณะนี้นำไปสู่การดำเนินโรคที่เลวร้ายลง[22] และไวรัสกลายพันธุ์ดังกล่าวในกรณีที่มีการติดเชื้อ HIV สามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกได้ [23] อย่างไรก็ตาม การหลบหลีกจาก CTL นี้ อาจจะไม่ได้เกิดขึ้นในทุกกรณี 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) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะบริเวณดังกล่าวมีความสำคัญต่อ HIV จนไม่สามารถเกิดการกลายพันธุ์ได้ เช่นเดียวกับกรณีของ HLA-B*2705 และทั้งที่ HLA-A*1101 มีความชุกมากในประชากรคนไทยจึงน่าจะเกิดการหลบหนีภูมิคุ้มกันแล้วทั้งร่องรอยไว้ในสายพันธุ์ของ HIV ที่ระบาดอยู่บริเวณประเทศไทย 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 นำข้อมูลจากการวิเคราะห์ลำดับยีนมาสังเคราะห์เปปไทด์เพื่อใช้ใน ขั้นตอนต่อไป

๖ วิเคราะห์ T cell response โดยวิธี ELISpot assay เพื่อได้ข้อมูลของการตอบสนองเบื้องต้น

๗ วิเคราะห์การตอบสนองด้วย Intracellular cytokine staining

ระยะเวลาการทำวิจัย และแผนดำเนินการวิจัย

- ๑ เตรียมอุปกรณ์ น้ายา 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
- ๘ 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.) อาสาสมัครทุกรายยังไม่ได้ได้รับการรักษาด้วยยาต้านไวรัส (antiretroviral treatment, ART) รายละเอียดของข้อมูลกรณาดูตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ ตารางแสดงข้อมูลของอาสาสมัคร

| | ID | Sex | Age | Time since seroconversion (years) | CD4 counts (cells/mm³) | CD8 counts (cells/mm³) | 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 | 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 |
| | 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 | |

| | 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

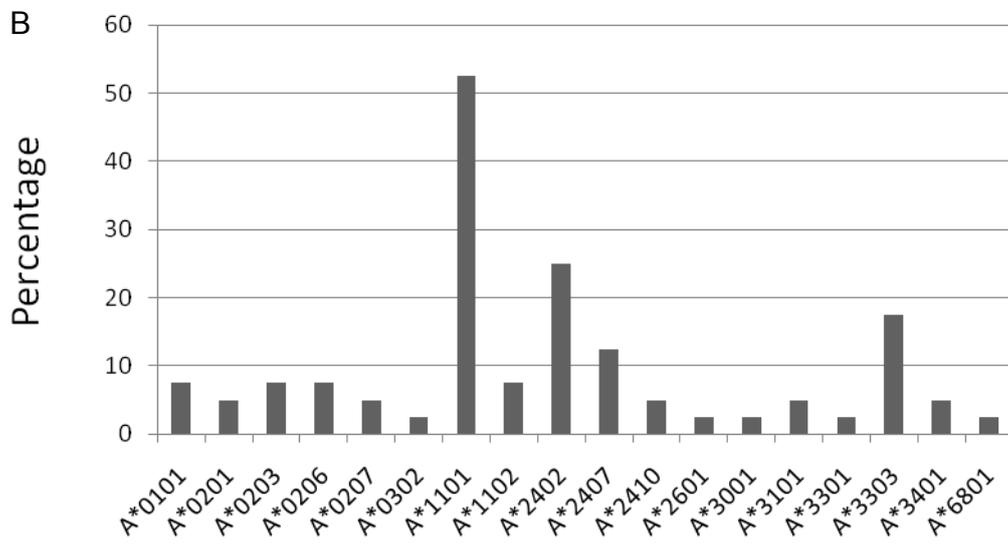
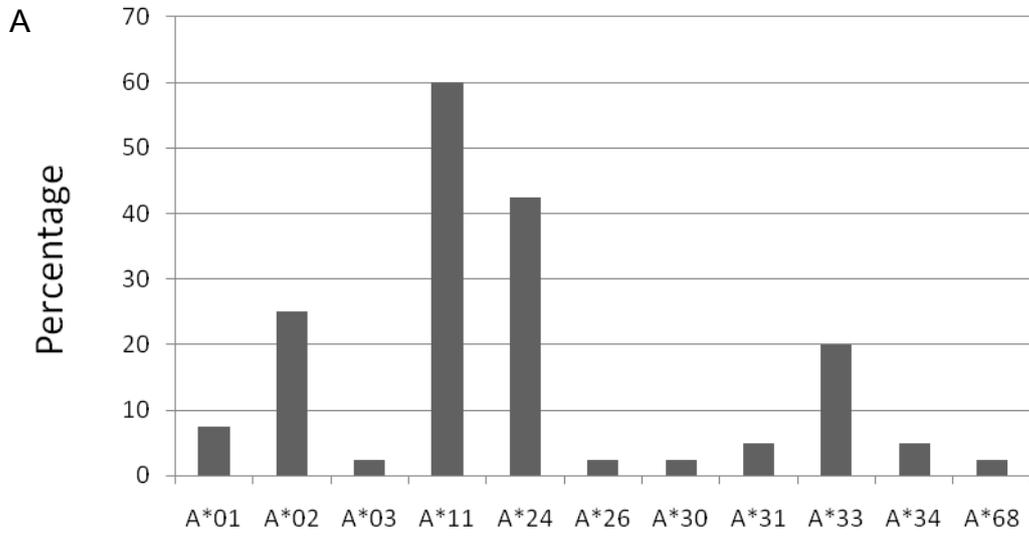
ข้อมูล Human Leucocyte Antigen class I (HLA-I) ในอาสาสมัคร

HLA-I เป็นโมเลกุลที่ถูกรายงานว่ามีความสำคัญและมีความสัมพันธ์ในการควบคุมปริมาณ HIV-RNA และผลลัพธ์ของการติดเชื้อ HIV ในกลุ่มชาติพันธุ์คอเคเซียนและกลุ่มชาติพันธุ์แอฟริกา ผู้วิจัยจึงต้องการวิเคราะห์ว่าในผู้ติดเชื้อซึ่งเป็นกลุ่มชาติพันธุ์อาเซียน (โดยใช้คนไทยเป็นตัวแทน) จะมีลักษณะความสัมพันธ์ของ 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

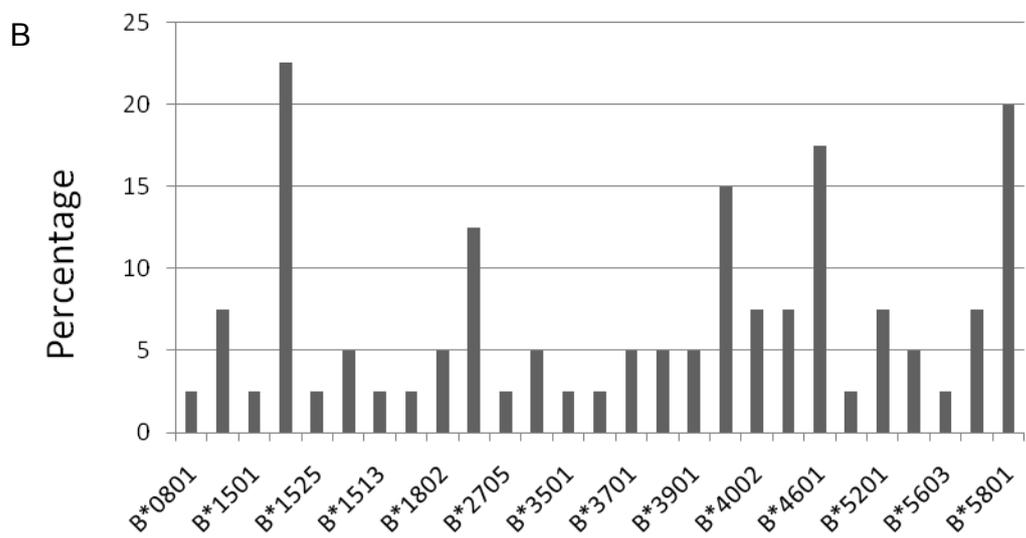
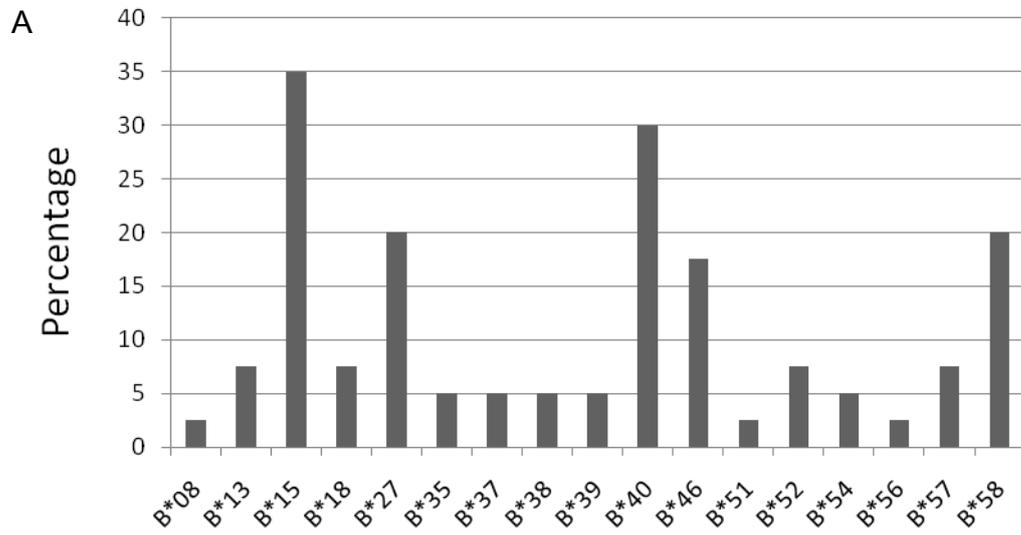
ตารางที่ ๒ ข้อมูล HLA ของอาสาสมัคร

| | 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 | 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† | 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 |
| | SYU | 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 |
| TP | 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 |
| | 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† | |

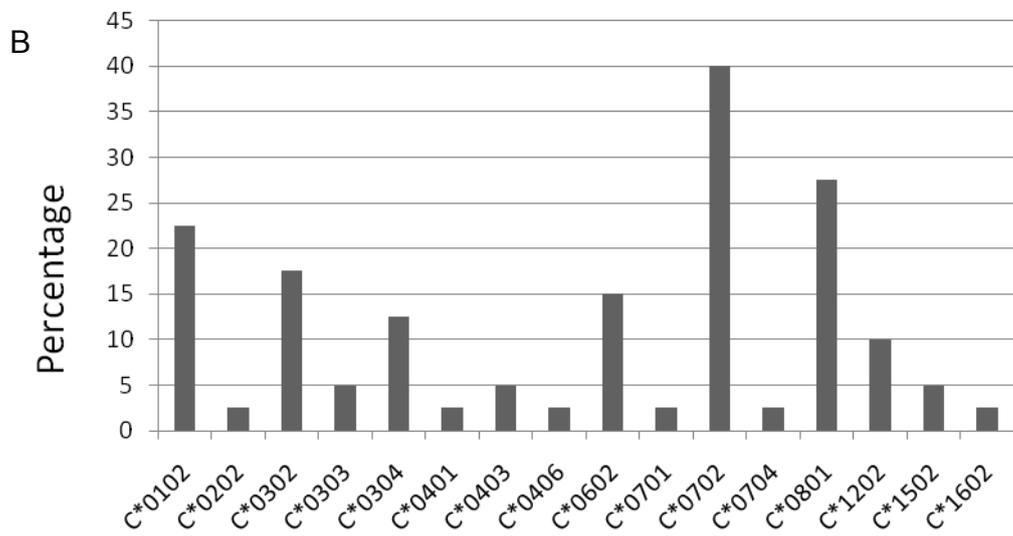
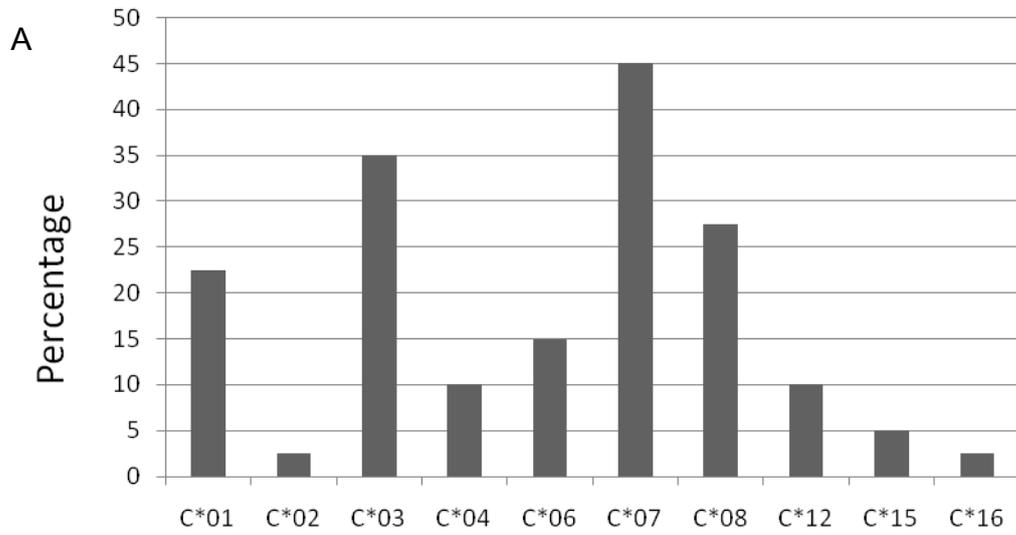
na† Not available



รูปที่ ๑ สัดส่วนของ HLA-A alleles ในอาสาสมัคร



รูปที่ ๒ สัดส่วนของ HLA-B alleles ในอาสาสมัคร



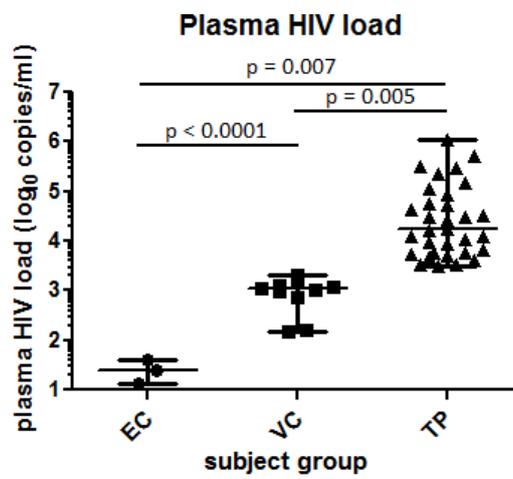
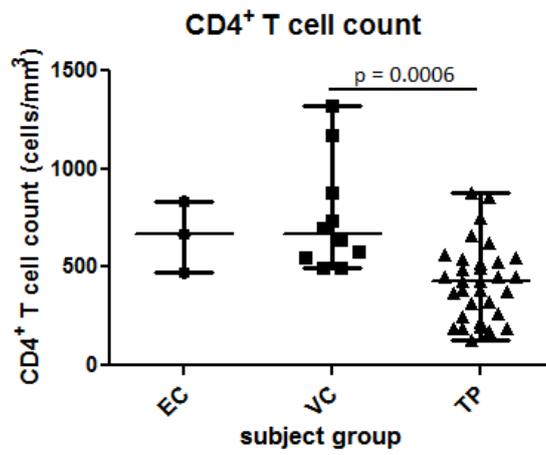
รูปที่ ๓ สัดส่วนของ HLA-C alleles ในอาสาสมัคร

การเปรียบเทียบปัจจัยที่อาจมีผลต่อปริมาณ HIV-RNA ในอาสาสมัคร

มีปัจจัยหลายประการที่อาจมีผลต่อการควบคุมการเพิ่มจำนวนของ HIV อาทิอายุ เพศระยะของการติดเชื้อและปริมาณ CD4⁺/CD8⁺ T cells สำหรับอายุนั้นพบว่ากลุ่ม EC มีอายุมากที่สุดรองลงมาเป็น TP และ VC แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับเพศระยะที่ติดเชื้อและปริมาณ 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) การเปรียบเทียบผลลัพธ์ทางคลินิكدังกล่าวไม่ขึ้นกับระยะเวลาการติดเชื้อ 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/mm³) | CD4⁺ T cell counts (cells/mm³) | 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

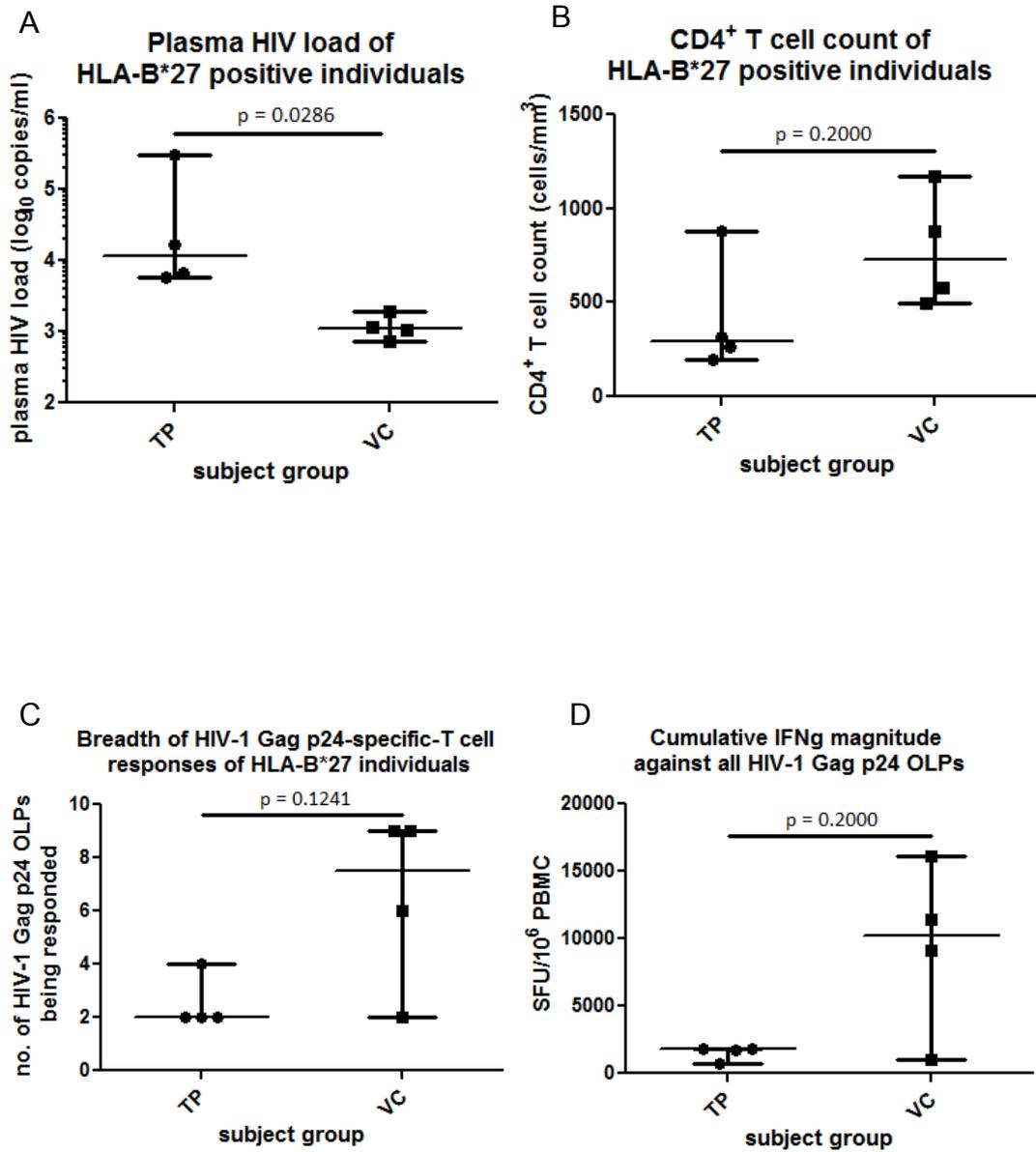
| | HLA-B*27 group | | HLA-B*57/58 group | |
|--|------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------|
| | TP (4) | VC (4) | TP (9) | VC (3) |
| Age (years) | 34.5 (27-44) | 25 (19-30) | 34 (21-49) | 28 (27-34) |
| HIV-1 duration (years) | 3.5 (2-10) | 3 (2-3) | 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) † | 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,

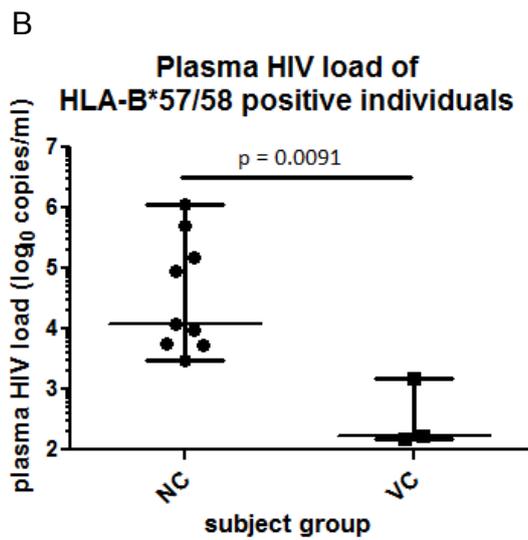
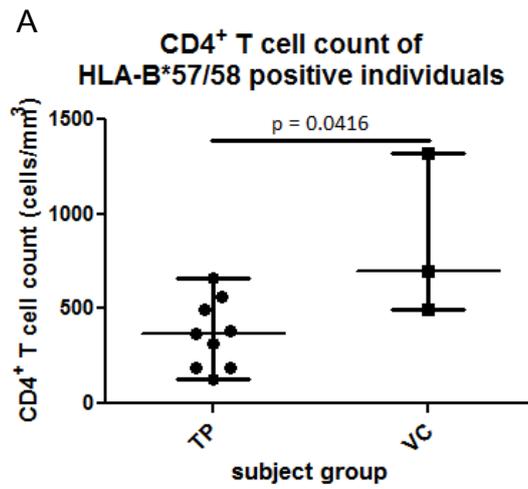
† HLA-B27-restricted epitope: KRWILGLNK, KK10;

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

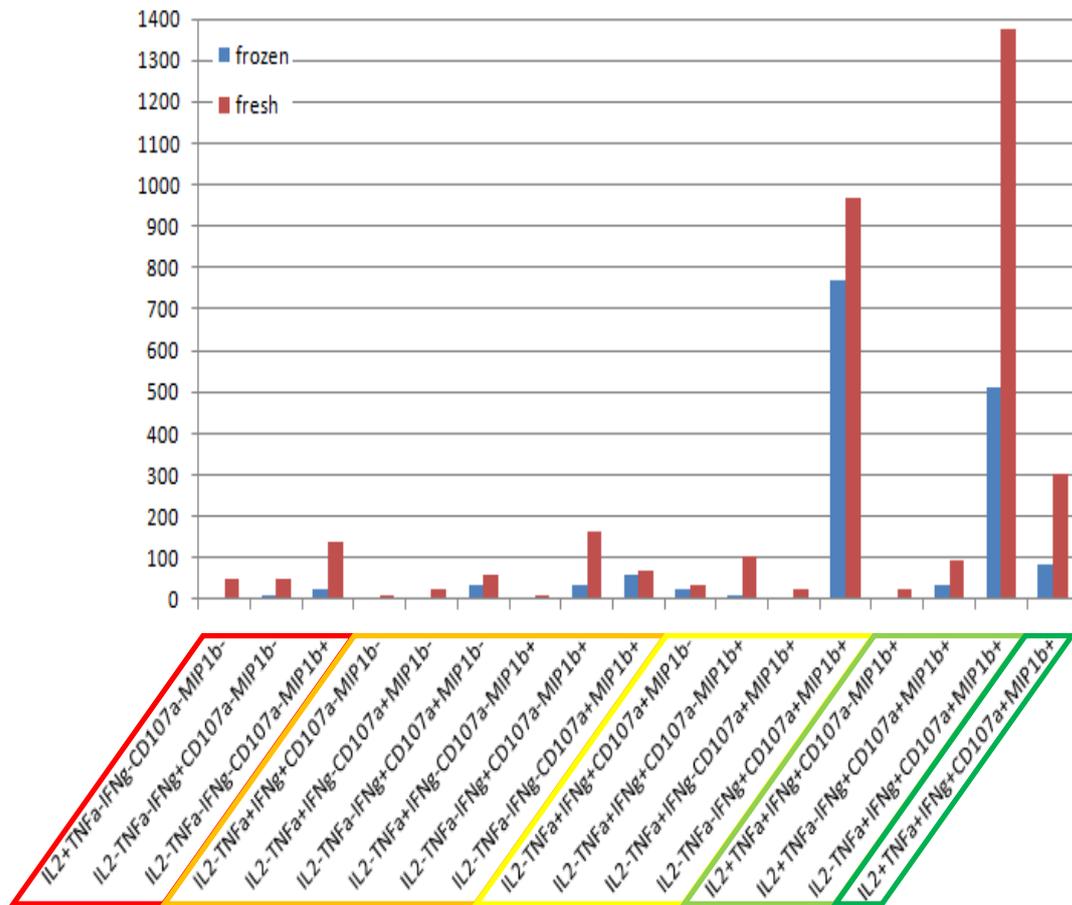
๓. การวิเคราะห์คุณภาพของการตอบสนองของ T cells ใน TP และ VC

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 การเปรียบเทียบการวิเคราะห์ cytokine ภายในเซลล์ (intracellular cytokine staining, ICS) ในเซลล์ที่แยกมาใหม่ (fresh) กับเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง (frozen)

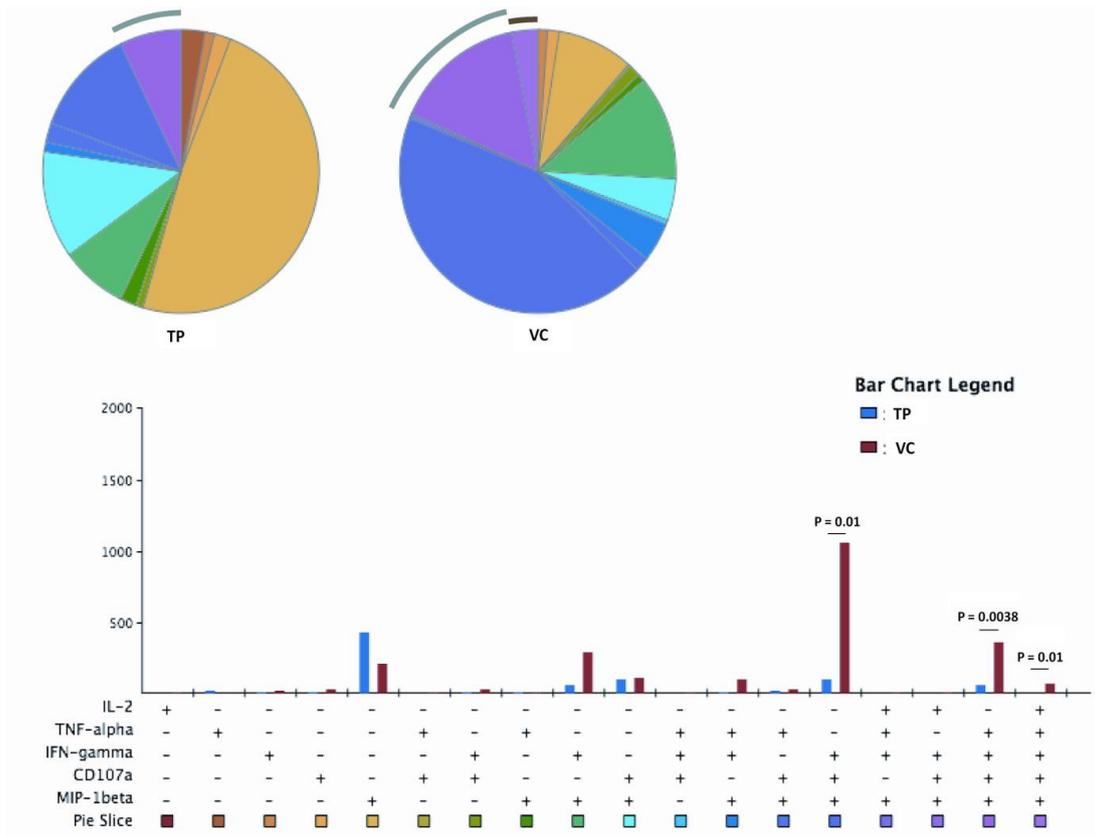
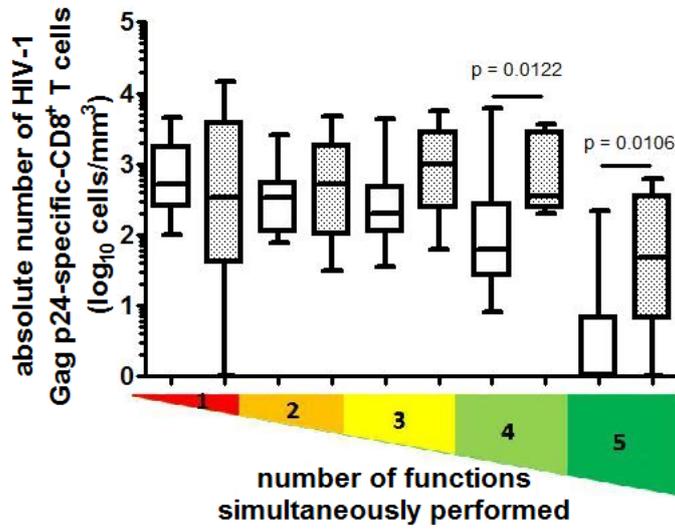
ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์คุณภาพของการตอบสนองของ T cells โดยวิธี Intracellular cytokine staining (ICS) วิเคราะห์การสังเคราะห์ MIP-1 β , IFN γ , TNF- α , IL-2 และ CD107a T cells ที่มีการแสดงออกของ markers เหล่านี้ในเซลล์เดียวกันเรียกว่ามี polyfunctional T-cell response ซึ่งมีหลักฐานว่าเป็นเซลล์ที่มีคุณภาพดีและมีความสัมพันธ์กับการควบคุมการติดเชื้อ 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 ๕ 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

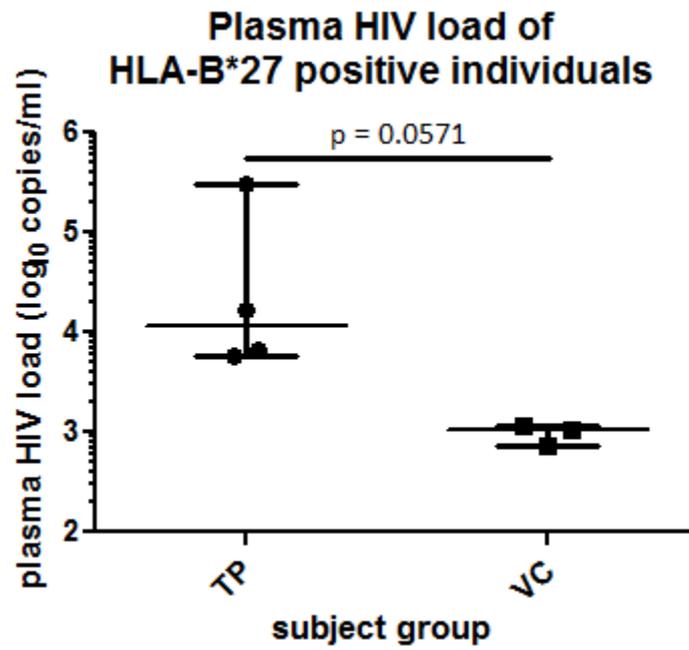
เช่นเดียวกับเหตุผลที่เคยไว้แล้วเมื่อวิเคราะห์ T-cell response โดย ELISpot assay ผู้วิจัยได้วิเคราะห์เปรียบเทียบคุณภาพของ T cells ด้วยเทคนิค ICS และเปรียบเทียบในกลุ่มอาสาสมัครที่มี HLA allele(s) เหมือนกันโดยจะแบ่งเป็นการวิเคราะห์ในกลุ่ม VC/TP ที่มี HLA-B*27 และกลุ่ม VC/TP ที่มี HLA-B*57/58

๔.๑ คุณภาพของการตอบสนองของ T cells ในอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*27 VC มีอายุค่อนข้างน้อยกว่าแต่ติดเชื้อในระยะเวลาใกล้เคียงกันปริมาณ 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

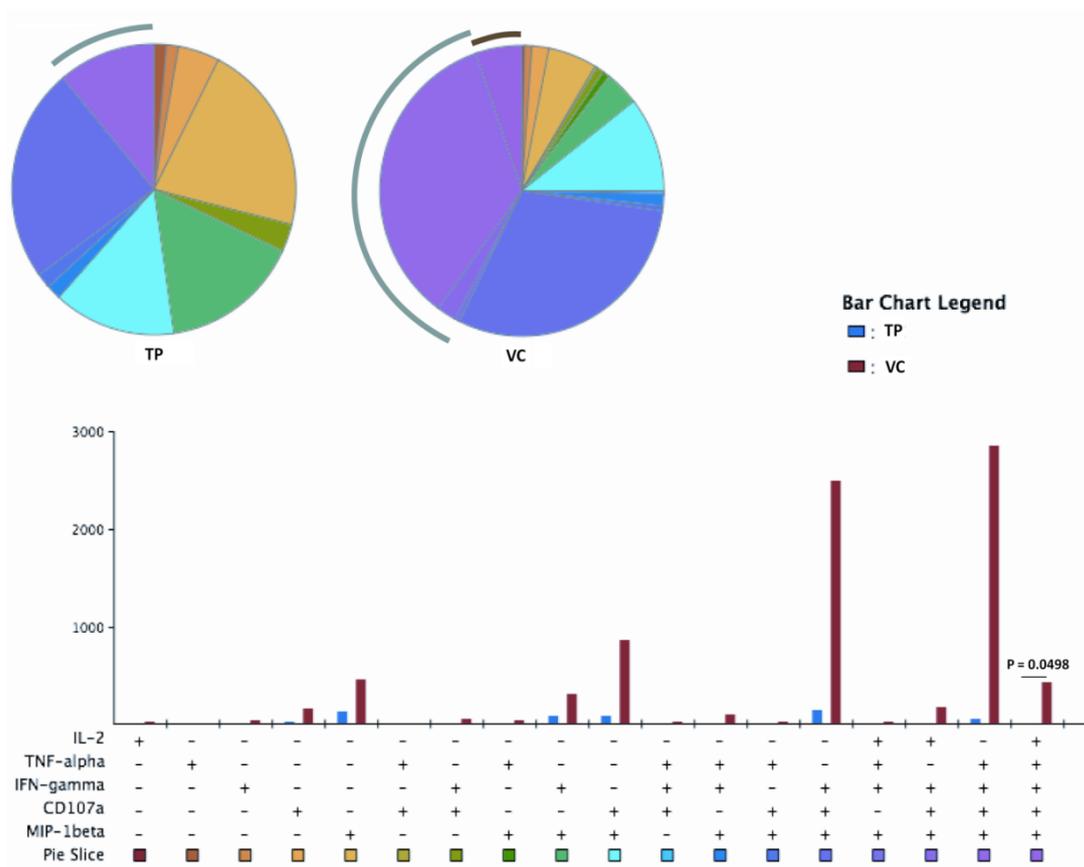
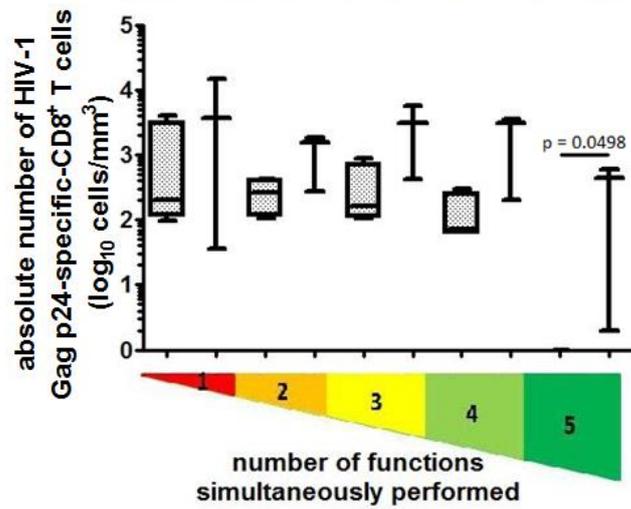
| Demographic data | TP (4) | VC (3) |
|--|---------------------|------------------------------|
| Age (years) | 34.5 (27-44) | 26 (24-30) |
| Years after seroconversion | 3.5 (2-10) | 3 (3) |
| CD4 ⁺ T cell count (cells/mm ³) | 292 (195-881) | 578 (493-1169) |
| CD8 ⁺ T cell count (cells/mm ³) | 1285 (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,)



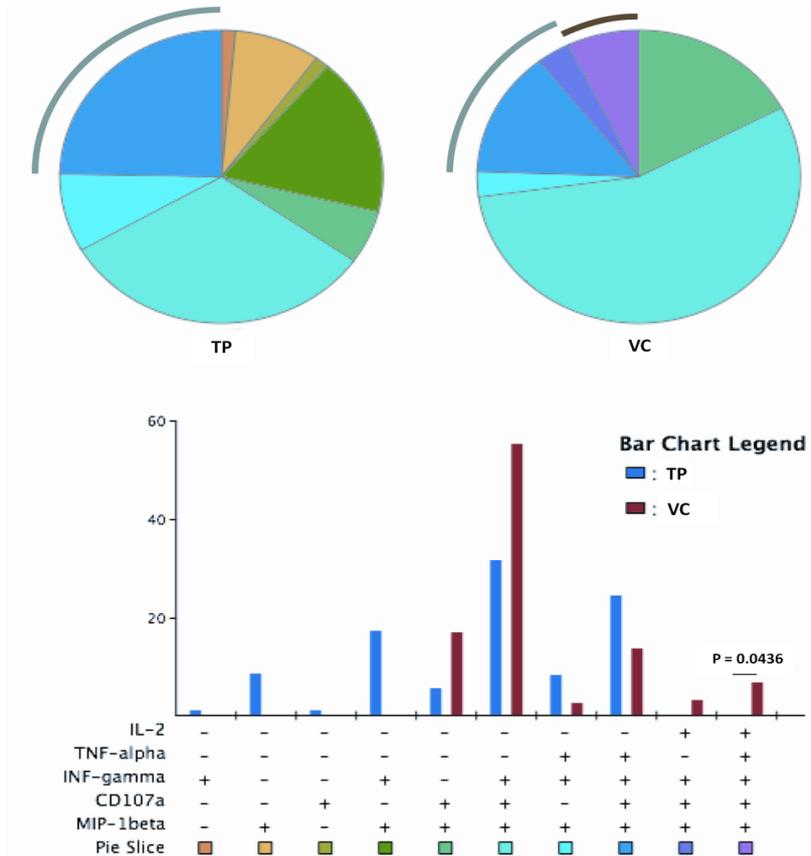
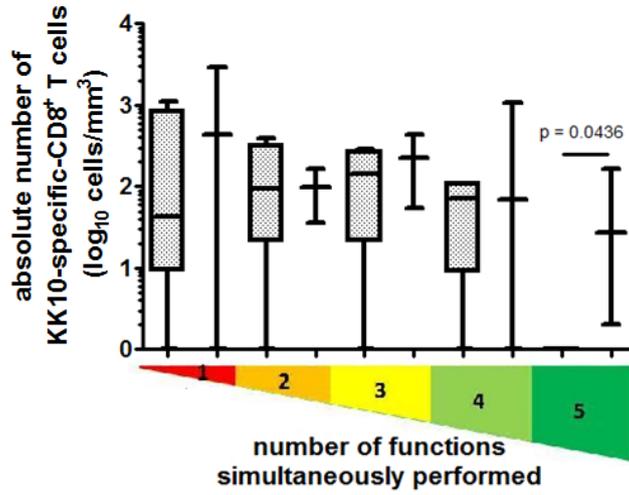
รูปที่ ๑๐ ปริมาณ HIV-RNA (pVL) ของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*27

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



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

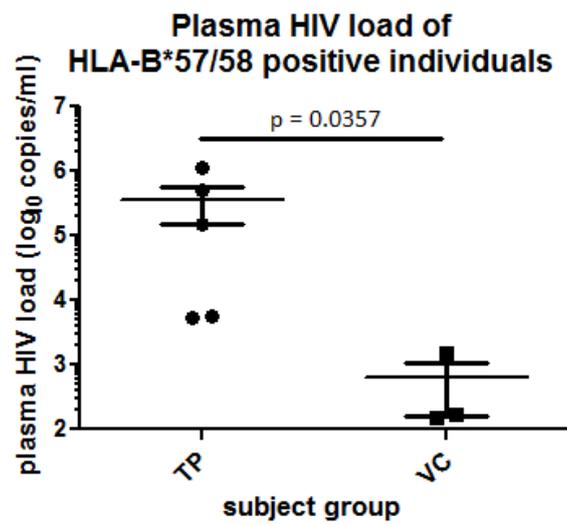
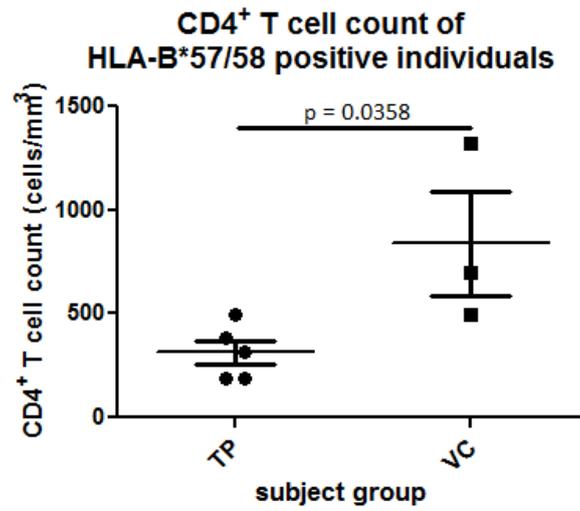


รูปที่ ๑๓ และ ๑๔ การเปรียบเทียบ functional quality ของ VC และ TP ต่อ epitope KK10

๔.๒ คุณภาพของการตอบสนองของ T cells ในอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*57/58 VC มีอายุค่อนข้างน้อยกว่า TP ติดเชื้อมานานกว่า 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)

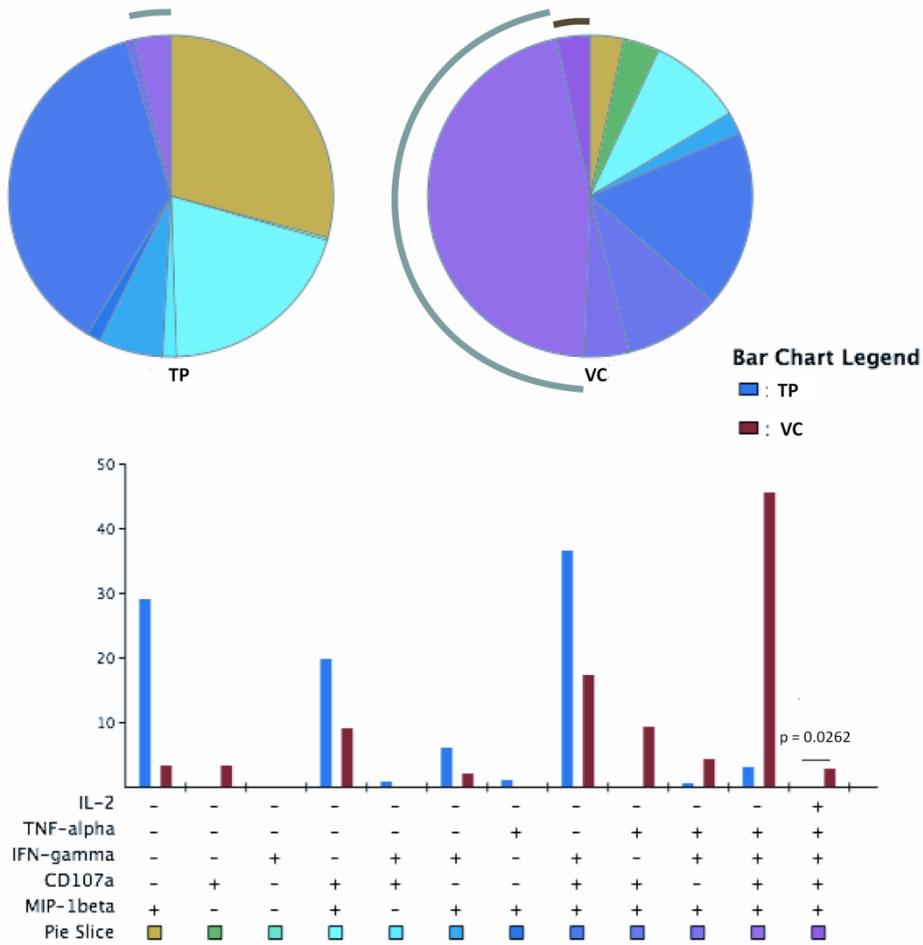
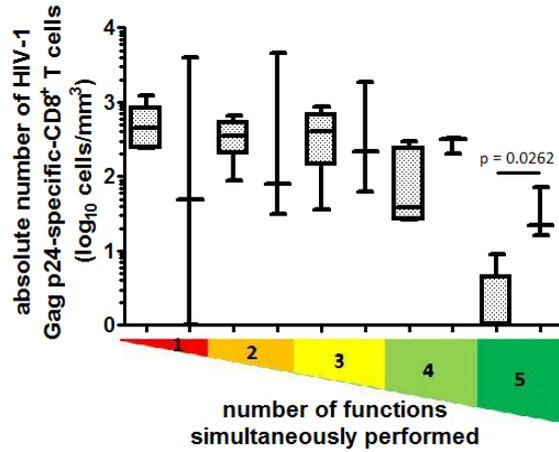
ตารางที่ ๑๑ ลักษณะของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*57/58

| 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/mm³) | 319 (187-493) | 699 (495-1,319)* |
| CD8⁺ T cell counts (cells/mm³) | 974 (550-2,008) | 810 (791-2,232) |
| Plasma HIV-1 load (copies/ml) | 154,253 (5385-1,132,883) | 165 (151-1,549)** |



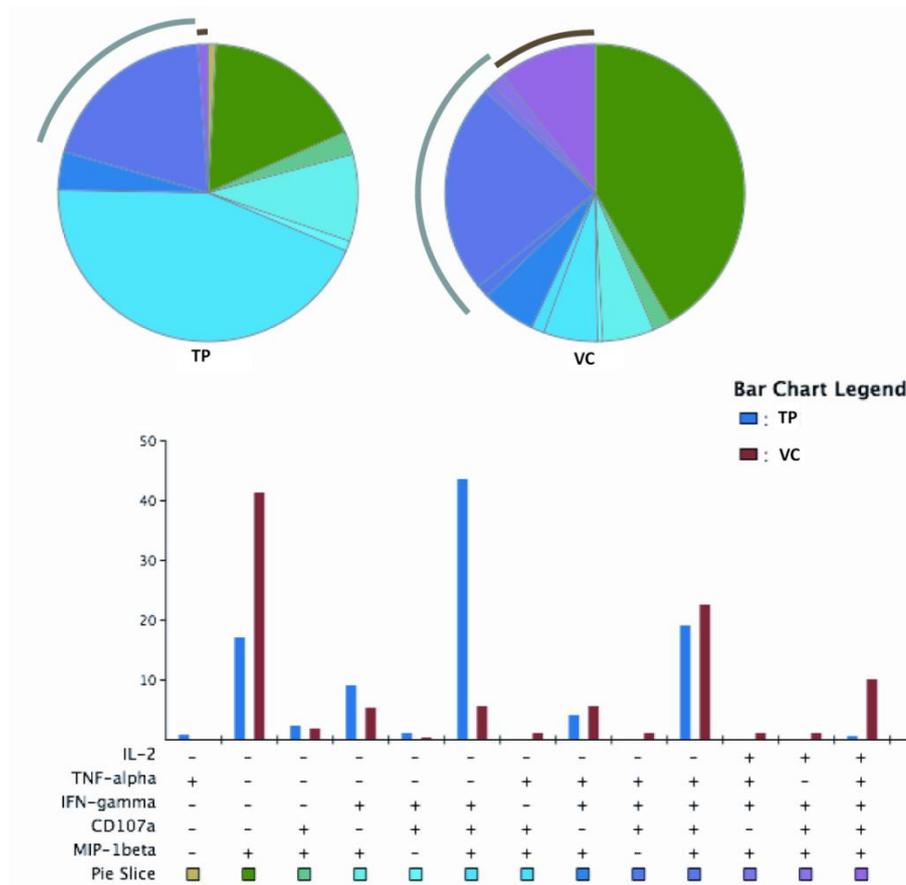
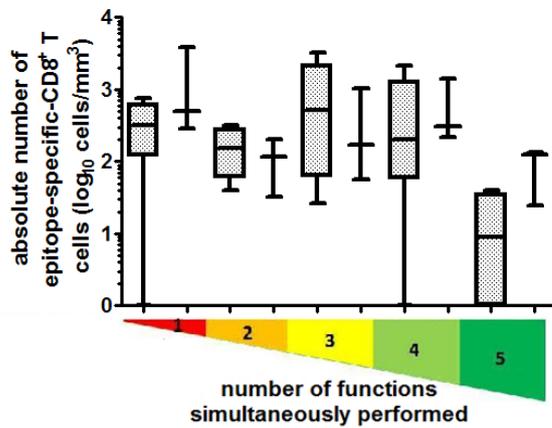
รูปที่ ๑๕ ปริมาณ HIV-RNA (pVL) ของอาสาสมัคร VC และ TP ที่มี HLA-B*57/58

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



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

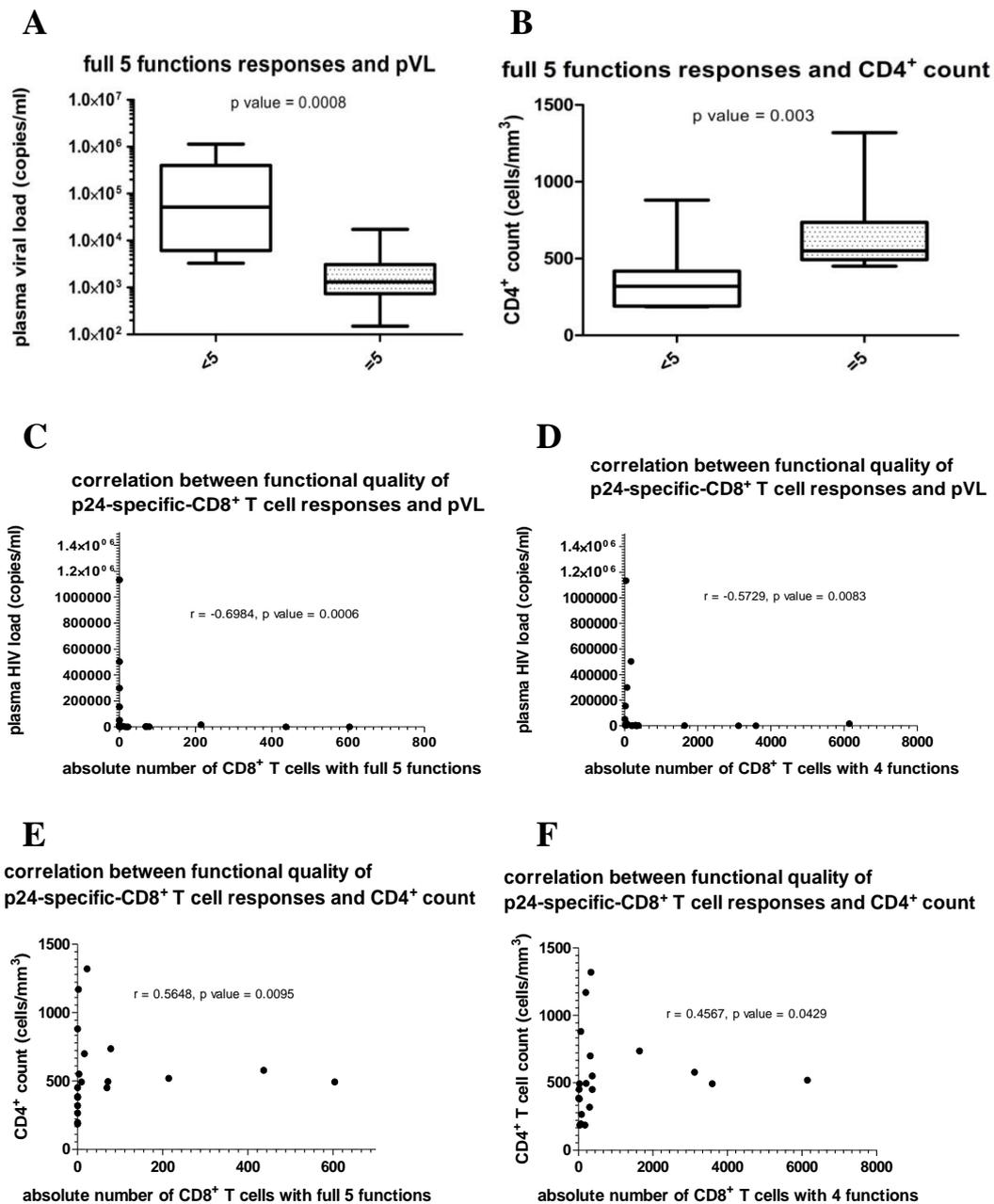
**Comparison of functional quality of all
6 HLA-B*57/58 restricted epitopes-specific-CD8⁺ T cell
responses between HLA-B*57/58 TP and VC**



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 และมีการดำเนินของโรคร้าง 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 ณตำแหน่งที่ ๒ เปลี่ยนเป็น A แต่ epitope variations ทั้งหมดนี้เป็น cross-reactive epitopes ดังนั้นจึงไม่ได้เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากการคัดเลือกพันธุ์โดยการตอบสนองผ่าน T cells ในการวิเคราะห์ 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

ถึงแม้ว่าการทดสอบวัคซีนโรคเอดส์ในประเทศไทยครั้งล่าสุดพบว่าวัคซีนมีประสิทธิภาพประมาณ ๓๑ เปอร์เซ็นต์ แต่ระดับการป้องกันดังกล่าวยังไม่เพียงพอที่มาใช้ได้จริง และยังไม่ทราบกลไกแน่ชัดว่าวัคซีนดังกล่าวสามารถป้องกันการติดเชื้อ HIV ได้อย่างไร แต่เนื่องจากโครงสร้างของวัคซีนดังกล่าวไม่สามารถกระตุ้น T cells แสดงว่าผลการทดสอบของวัคซีนชนิดนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของ T cells ดังนั้น มีความเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพของวัคซีนที่ไม่ดีมากนักอาจเนื่องมาจากการที่วัคซีนไม่ได้กระตุ้นการตอบสนองของ 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 ผู้วิจัยจึงแบ่งกลุ่มอาสาสมัครออกเป็น 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 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าคุณภาพของ T cells (ที่สะท้อนโดย polyfunctional T cells) อาจมีความสัมพันธ์กับการควบคุม HIV มากกว่า จึงได้วิเคราะห์คุณภาพของ T cells ดังกล่าวโดย intracellular cytokine staining (ICS)

องค์ประกอบในการจัดทำโครงการวิจัย

คณะผู้วิจัย บทบาทของนักวิจัยแต่ละคนในการทำวิจัย และสัดส่วนที่ทำการวิจัย (%)

| | | |
|-----------------------------|--------|--|
| หัวหน้าโครงการวิจัย | ไทย | นายปกรัฎฐ์ หังสสุต |
| | 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] Tovanabuttra 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, Biliska 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.