

**ENHANCED GREEN FLUORESCENT PROTEIN (EGFP)-FLOW
CYTOMETRIC ASSESSMENT OF NATURAL KILLER (NK) CELL
FUNCTION IN HIV-1 INFECTED INDIVIDUALS**

SURAT JONGRAKTHAITAE

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003**

**ISBN 974-04-4054-1
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

วิธี ENHANCED GREEN FLUORESCENT PROTEIN (EGFP)-FLOW CYTOMETRY ด้วยการประเมินหน้าที่ของ NATURAL KILLER CELL ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี (HIV)

สุรัตน์ จงรักไทยแท้ 4337143 SIMI/M

วท.ม. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วรณี กัญฐกมลาลกุล, Ph.D., โกวิท พัฒนาปัญญาทัศน์, Ph.D., จิตรพร วรรณสุต, Ph.D.

บทคัดย่อ

Natural killer (NK) cells เป็นเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes ที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์มะเร็งด้วยกลไกแบบไม่จำเพาะต่อแอนติเจนและไม่ต้องอาศัย MHC Class I ด้วยวิธี NK cytotoxicity นอกจากนี้ NK cells ยังสามารถทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสโดยความช่วยเหลือของแอนติบอดีด้วยกระบวนการ antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) การประเมินค่า activity ทั้งสองกลไกของ NK cell ในปัจจุบันใช้วิธีมาตรฐานที่เรียกว่า Chromium (^{51}Cr) release assay แม้วิธีนี้จะเป็วิธีที่เชื่อถือได้ แต่ต้องเกี่ยวข้องกับสารกัมมันตรังสีซึ่งก่อปัญหาเรื่องความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงานและการกำจัดกากรังสี การศึกษาในครั้งนี้ได้นำวิธี enhanced green fluorescent protein (EGFP)-K562 flow cytometric assay ที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการของเรามาใช้สำหรับประเมินค่า NK cytotoxic activity ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี นอกจากนี้ จะทำการสร้าง EGFP-CEM-NK^r cell line ซึ่งจะใช้เป็นเซลล์เป้าหมายในการวัดค่า ADCC activity ของ NK cells ด้วย

การทดสอบวัดค่า NK cytotoxic activity ของผู้ติดเชื้อเอชไอวี 30 รายโดยใช้วิธี EGFP-K562 flow cytometry เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่าที่เวลาอบ (incubation time) 4 ชม. แสดงความสัมพันธ์สูงสุดโดยมีค่า intraclass correlation coefficient; ICC = 0.840 ขณะที่เวลา 2 ชม. พบว่ามีความสัมพันธ์สูงเช่นกัน (ICC = 0.705) ลำดับต่อไปได้ทำการวัดค่า NK cytotoxic activity ของ fresh PBMC กับ frozen PBMC ที่เก็บแช่แข็งไว้ในช่วงระยะเวลาแตกต่างกัน (ที่ 1, 2, 4, 6, 9 หรือ 12 เดือน) พบว่าค่า NK activity ของ frozen PBMC ที่ 1, 2 และ 4 เดือน เมื่อวัดที่เวลา 2 ชม. และ 4 ชม. โดยวิธี flow cytometric assay ยังคงความสามารถรักษา activity ได้หลังจากขบวนการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง (ที่ 2 ชม. ICC = 0.686, 0.527, 0.775; ที่ 4 ชม. ICC = 0.710, 0.729, 0.757) ขณะที่ NK activity ของ frozen PBMC ที่ 6, 9 หรือ 12 เดือน มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ fresh PBMC ทั้งที่ 2 ชม. และ 4 ชม. (2 ชม. ICC = 0.489, 0.529, 0.510; 4 ชม. ICC = 0.542, 0.476, 0.526) สำหรับการวัดค่า NK activity ของ fresh กับ frozen PBMC โดยวิธี ^{51}Cr release assay พบว่าค่า NK activity ของ frozen PBMC ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจาก fresh PBMC (ICC = 0.910, 0.874, 0.807, 0.556, 0.848, 0.798)

สำหรับการสร้าง EGFP-CEM-NK^r cell line นั้นสร้างโดย CEM-NK^r cell ถูก transfected ด้วยพลาสมิด pEGFP-N1 และคัดเลือก stable cell line ด้วยวิธี flow activated cell sorting และ limiting dilution โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะชื่อ G418 สำหรับ EGFP-CEM-NK^r cell ที่สร้างสำเร็จถูกใช้เป็นเซลล์เป้าหมายสำหรับวัด ADCC activity ของ PBMC จากอาสาสมัคร 5 ราย โดยวิธี flow cytometric assay และทำการศึกษาที่เวลาต่างๆกัน (kinetic study) เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบใหม่นี้ โดยเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่าที่เวลา 2 ชม. มีความสัมพันธ์ดีที่สุดกับวิธีมาตรฐาน (ICC = 0.838; $r = 0.837$, $p < 0.001$) ขณะที่เวลา 1, 4 และ 6 ชม. แสดงความสัมพันธ์ดี (ICC = 0.642, 0.605, 0.566; $r = 0.642, 0.645, 0.656$, $p < 0.001$)

การศึกษากครั้งนี้พบว่า flow cytometric assay จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้สำหรับประเมินค่า NK cytotoxic activity ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี สำหรับการประเมินค่า ADCC activity ยังอยู่ในขั้นต้นของการพัฒนา ทั้งสองวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และปลอดภัย สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปได้

ENHANCED GREEN FLUORESCENT PROTEIN (EGFP)-FLOW CYTOMETRIC ASSESSMENT OF NATURAL KILLER (NK) CELL FUNCTION IN HIV-1 INFECTED INDIVIDUALS

SURAT JONGRAKTHAITAE 4337143 SIMI/M

M.Sc. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: WANNEE KANTAKAMALAKUL, Ph.D., KOVIT PATTANAPANYASAT, Ph.D., CHITRAPORN KARNASUTA, Ph.D.

ABSTRACT

Natural killer (NK) cells are a subset of peripheral blood lymphocytes that mediate non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity against viral infection and tumor cells. In addition, NK cells can lyse target cells in the presence of a specific antibody through the mechanism of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). The ^{51}Cr release assay has been recommended as a gold standard method for measuring both NK activities. Although this method is reliable, the problems of health risk due to radioactive exposure and radioactive disposal still exist. This present study proposed to evaluate the NK cytotoxic activity of HIV-1 infected individuals using the enhanced green fluorescent protein (EGFP) K562-flow cytometric method previously established in our laboratory. In addition, establishment of the EGFP-CEM-NK^T cell line for use as target cells in measuring ADCC activity was also proposed.

Examination of NK cell cytotoxic activity of 30 HIV-1 infected individuals using EGFP-K562 flow cytometric assay compared with standard ^{51}Cr release assay suggested that a four hour incubation time showed the highest correlation (intraclass correlation coefficient; ICC = 0.840) whereas a two hour incubation time also showed a high correlation (ICC = 0.705). Moreover, NK cytotoxic activity of fresh versus frozen peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was tested at different time points (1, 2, 4, 6, 9 or 12 months) by these two methods. NK of frozen PBMC at 1, 2 and 4 months measured at two and four hour incubation times by flow cytometric assay retained their cytotoxic capacity after cryopreservation (2 h ICC = 0.686, 0.527, 0.775; 4 h ICC = 0.710, 0.729, 0.757). However, NK activity of frozen PBMC at 6, 9 or 12 months decreased when compare with fresh PBMC for both two and four hour incubation times (2 h ICC = 0.489, 0.529, 0.510; 4 h ICC = 0.542, 0.476, 0.526). Measurement of NK activity of fresh versus frozen PBMC by using ^{51}Cr release assay demonstrated that the NK activity of frozen PBMC was not significantly different from that of fresh PBMC (ICC = 0.910, 0.874, 0.807, 0.556, 0.848, 0.798). To establish the EGFP-CEM-NK^T cell line, CEM-NK^T cells were transfected with pEGFP-N1 plasmid and then selected as a stable cell line by flow activated cell sorting and limiting dilution technique with medium containing antibiotic G418. EGFP-CEM-NK^T cells were used as target cells for measuring the ADCC activity of PBMC from five normal individuals with pooling HIV-1 sera in flow cytometric assay. Kinetic study was used to obtain an optimal incubation time for this new method. A two hour incubation time showed the best correlation with the ^{51}Cr release assay (ICC = 0.838; $r = 0.837$ at $p < 0.001$), whereas at one, four and six hour incubation times a good correlation was indicated (ICC = 0.642, 0.605, 0.566; $r = 0.642, 0.645, 0.656$ at $p < 0.001$). The present study provides an alternative assay for evaluating NK cytotoxic activity in HIV-1 infected individuals and also a preliminary novel flow cytometric assay for measuring ADCC activity. These methods are simple, rapid and safe. These approaches could be introduced into the clinical laboratory in order to study the function of NK cells.

KEY WORDS: NATURAL KILLER CELLS / ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR CYTOTOXICITY /
FLOW CYTOMETRIC ASSAY / ENHANCED GREEN FLUORESCENT PROTEIN