

การเปรียบเทียบการเจริญของ HERPES SIMPLEX VIRUS
ใน T LYMPHOCYTE และ EPITHELIAL CELL

นางสาวปฐมาวรณ ฉิมมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-0905-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20470757

**COMPARISON OF HERPES SIMPLEX VIRUS REPLICATION
IN T LYMPHOCYTE AND EPITHELIAL CELL**

Miss Phattamawan Chimma

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Microbiology**

Inter-Department of Medical Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-0905-6

Thesis Title **Comparison of Herpes Simplex Virus Replication in T lymphocyte
and Epithelial Cell**

By **Miss Patthamawan Chimma**

Field of Study **Medical Microbiology**

Thesis Advisor **Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph. D.**

Thesis Co-Advisor **Chintana Chirathaworn, Ph. D.**

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

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

Thesis committee:

Somatat Wongsawang
.....Chairman
(Associate Professor Somatat Wongsawang, Dr. med. vet.)

Parvapan Bhattarakosol
.....Thesis Advisor
(Associate Professor Parvapan Bhattarakosol, Ph. D.)

Chintana Chirathaworn
.....Thesis Co- Advisor
(Chintana Chirathaworn, Ph. D.)

Wasun Chantratita
.....Member
(Assistant Professor Wasun Chantratita, Ph. D.)

ปฐมววรรณ ฉิมมา : การเปรียบเทียบการเจริญของ HERPES SIMPLEX VIRUS ใน T LYMPHOCYTE และ EPITHELIAL CELL (COMPARISON OF HERPES SIMPLEX VIRUS REPLICATION IN T LYMPHOCYTE AND EPITHELIAL CELL) อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. กวพันธ์ ภัทรโกศล, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร. จินตนา จิรदार ; 108 หน้า. ISBN 974-17-0905-6

การติดเชื้อ HSV สามารถเกิดขึ้นที่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย ได้แก่ ผิวหนัง ปาก ตา อวัยวะสืบพันธุ์และสมอง เป็นต้น การติดเชื้อส่วนใหญ่เป็นการติดเชื้อเฉพาะที่ และมักพบที่บริเวณผิวหนังและเนื้อเยื่อเมือกต่าง ๆ แต่ต่อมามีรายงานว่า HSV สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อทั่วร่างกายได้ ซึ่งพบบ่อยในผู้ที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ มีการศึกษาการเพิ่มจำนวนของ HSV ในเซลล์ต่าง ๆ รวมทั้ง peripheral blood mononuclear cells โดยเฉพาะ T lymphocyte แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีรายงานอธิบายกลไกการเจริญของ HSV ใน T lymphocyte

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเพิ่มจำนวนของ HSV-1 และ HSV-2 ในเซลล์ Vero, HEp-2, Jurkat และ PHA-activated Jurkat ที่เวลา 12,24 และ 48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการสร้างไวรัสแอนติเจนด้วยวิธี Indirect immunofluorescence assay ที่เวลา 2,4,6,9 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้ anti-HSV antibody ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิดและ anti-ICP0, anti-ICP22 และ anti-ICP47 antibody รวมทั้งหาปริมาณเซลล์ติดเชื้อไวรัสที่สร้างขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง โดยการวิเคราะห์ทาง Flow cytometry นอกจากนี้ทำการศึกษาความสามารถของเซลล์แต่ละชนิดในการดูดซับไวรัสและศึกษาการแสดงออกของ HveA mRNA ในเซลล์ Jurkat ปกติและภายหลังกระตุ้นด้วยสาร PHA โดยวิธี RT-PCR

ผลการศึกษาพบว่า HSV-1 และ HSV-2 สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ Jurkat ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็ง T lymphocyte ของมนุษย์ แม้ว่าปริมาณการสร้างไวรัสในเซลล์ T lymphocyte จะต่ำกว่ามากเมื่อเทียบกับปริมาณที่สร้างในเซลล์เยื่อบุผิวสองชนิดคือเซลล์ Vero และ HEp-2 แต่เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสาร PHA HSV-1 ก็สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นได้ ในขณะที่ปริมาณการสร้างของ HSV-2 ไม่เพิ่มขึ้น พบว่ามีความล่าช้าในการสร้างโปรตีนจำเพาะต่อไวรัสในเซลล์ Jurkat เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ HEp-2 และจากการศึกษาลำดับการสร้างของ IE โปรตีนพบว่า ICP22 ในเซลล์ติดเชื้อ HSV-1 และ HSV-2 ของเซลล์ Jurkat ปกติและเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย PHA และ ICP0 ในเซลล์ติดเชื้อ HSV-2 ของเซลล์ Jurkat ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย PHA สร้างล่าช้ากว่าการสร้างในเซลล์ HEp-2 เป็นเวลา 2 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ จากการตรวจวัดปริมาณเซลล์ติดเชื้อโดยวิธี Flow cytometry พบว่าจำนวนเซลล์ติดเชื้อ HSV-1 ระหว่างเซลล์ HEp-2 และ Jurkat มีความแตกต่างกัน (71.58% vs 22.71%) และเพิ่มขึ้นในเซลล์ Jurkat ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA (40.07%) กรณีของเซลล์ติดเชื้อ HSV-2 พบว่าปริมาณเซลล์ HEp-2 และ Jurkat ที่ติดเชื้อเป็น 57.01% และ 47.15 % โดยที่ปริมาณเซลล์ติดเชื้อใน Jurkat ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA กลับลดต่ำลง (29.13%) จากการศึกษาความสามารถในการดูดซับไวรัสเข้าสู่เซลล์พบว่า เซลล์ HEp-2 และ Jurkat ที่ถูกกระตุ้นด้วย PHA สามารถดูดซับ HSV-1 ได้ดีกว่า HSV-2 (93% vs 64% และ 97% vs 47%) ในขณะที่เซลล์ Jurkat สามารถดูดซับ HSV-1 และ HSV-2 ได้เท่ากัน (89%) นอกจากนี้พบว่าภายหลังเซลล์ Jurkat ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร PHA จะมีการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของ mRNA ของ HSV receptors (HveA) ในเซลล์ดังกล่าว

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนของ HSV ในเซลล์ HEp-2 และ T lymphocyte มีความแตกต่างกัน ระยะเวลาของความล่าช้าตามขั้นตอนต่าง ๆ ในขบวนการเพิ่มจำนวนขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ ชนิดของไวรัสและปริมาณไวรัสที่ได้รับในการติดเชื้อ และเมื่อเซลล์ Jurkat ได้รับการกระตุ้นด้วย PHA พบว่ามีการเพิ่มปริมาณของ HSV receptor ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่งในการทำให้ได้ปริมาณไวรัส HSV-1 เพิ่มสูงขึ้นภายหลังการกระตุ้น

สหสาขาวิชา สหสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ ลายมือชื่อนิติ.....

สาขาวิชา..... จุลชีววิทยาทางการแพทย์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2545..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4289676320 : MAJOR MEDICAL MICROBIOLOGY

KEYWORD: HERPES SIMPLEX VIRUS/ REPLICATION / T LYMPHOCYTE / EPITHELIAL CELL

PHATTAMAWAN CHIMMA : THESIS TITLE : COMPARISON OF HERPES SIMPLEX VIRUS REPLICATION IN T LYMPHOCYTE AND EPITHELIAL CELL. THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR PARVAPAN BHATTARAKOSOL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : CHINTANA CHIRATHAWORN, Ph.D. 108 pp. ISBN 974-17-0905-6

HSV can cause infection at various parts of the human body such as skin, mouth, eyes, genital area and brain. HSV usually causes localized infection at skin and mucous tissue which are known to be their tissue tropism. It has been reported that HSV can cause systemic infection in the immunocompromised host. Several studies of HSV replication in many cell types including peripheral blood mononuclear cells especially T lymphocyte have been reported. However, until now the mechanism of HSV replication in T lymphocyte has not been defined.

In this study, the comparison of the ability of HSV-1 and HSV-2 replication in Vero, HEp-2, Jurkat and PHA-activated Jurkat cells at 12,24,48 hours post infection (h.p.i.) was done. The viral antigen detection by Indirect immunofluorescence assay was determined at two, four, six, nine and 24 h.p.i by using polyclonal anti-HSV-1 or HSV-2, anti-ICP0, anti-ICP22 and anti-ICP47 antibodies. The number of infected cells at 24 h.p.i were detected by Flow cytometry. Moreover, the adsorption ability of virus to each cell type and HveA mRNA expression in Jurkat and PHA-activated Jurkat cells by RT-PCR were studied.

The results showed that HSV-1 and HSV-2 can replicate in Jurkat cell, human leukemia T cell line. Although the yield production in T lymphocyte was very low when it was compared to the other two epithelial cells, Vero and HEp-2 cells, the HSV-1 yield production could be enhanced after PHA activation while yield production of HSV-2 was not increased. The specific HSV proteins synthesis in Jurkat cells was delayed compared to that in HEp-2 cells. The kinetics study of IE₁ proteins expression demonstrated that the expression of ICP22 in both HSV-1 and HSV-2 infected Jurkat and PHA-activated Jurkat cells and ICP0 in HSV-2 infected PHA-activated Jurkat cells were delayed 2 and 4 hours, compared to those HEp-2 cells. Detection of infected cells by using Flow cytometry showed that the number of HSV-1 infected cells between HEp-2 and Jurkat cells were different (71.58% vs 22.71%) and increased in PHA-activated Jurkat cells (40.07%). In the case of HSV-2 infected cells, the number of positive cells in HEp-2 and Jurkat cells were 57.01% and 47.15% whereas in PHA-activated Jurkat cells, the number of infected cell was declined (29.31%). The results from the adsorption experiment demonstrated that HEp-2 and PHA-activated Jurkat cells did absorb HSV-1 better than HSV-2 (93% vs 64% and 97% vs 47%) but the ability of Jurkat cells to adsorb HSV-1 was equal to HSV-2 (89%). Moreover, it was found that activation of Jurkat cells by PHA increased HSV receptor (HveA) mRNA expression in these cells.

This study revealed that the replication of HSV in HEp-2 and T lymphocyte are different. The duration of successive steps in the replication cycle depends upon the types of cells, the virus strain and the multiplicity of infection. Increasing of HveA receptor in PHA-activated Jurkat cells could be demonstrated. This might be a reason for increasing HSV-1 production occurred after PHA activation.

Inter-Department Medical Microbiology..... Student's signature..... *Phatt. Chima*

Field of study..... Medical Microbiology..... Advisor's signature..... *Parvapan Bhattarakosol*

Academic year..... 2002..... Co-Advisor's signature..... *Chintana Chirathaworn*

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deep gratitude to the following individuals who have helped in making this thesis possible:

My sincere appreciation is expressed to my advisor, Associate Professor Dr. Parvapan Bhattarakosol, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for her excellent advisor guidance, kindness, devotion and indispensable help in supervising this thesis.

I am particularly grateful to Dr. Chintana Chirathaworn, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, my co-advisor, for her kind assistance, valuable advice and encouragement.

I am very grateful to Professor Dr. Roizman Bernard, University of Chicago, for his kindness providing anti IE protein antibodies, Professor Dr. Praphan Phanupak, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his kindness supporting Flow cytometry instrument, Professor Dr. Kovit Pattanapanyasat, Office for Research and Development, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, for his intellectual advice about Flow cytometry technique, Dr. Pokrath Hansasuta, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his valuable suggestion.

I am indebted to the Asahi Glass Foundation, Japan, the Graduate School and Research Affairs, Chulalongkorn University, for funding of my study.

My sincere thanks are also given to Miss. Supranee Buranapradit, the Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for her kind assistance and providing the facilities needed for Flow cytometry analysis. Special appreciation is also expressed to all personnel of the Department of Microbiology for their friendship and encouragement.

Sincere thanks and appreciation are extended to the members of my thesis committees, for their kindness, constructive criticisms and helpful suggestions for completeness of this thesis.

Finally, I owe eternal gratitude to my parents and my sister for their love, patience, kindness and support and understanding throughout my life.

CONTENTS

	page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. OBJECTIVES.....	4
III. REVIEW OF LITERATURE.....	5
History.....	5
Virology.....	7
HSV proteins.....	10
The human receptors for HSV entry.....	15
HSV replication cycle.....	17
Replication of HSV in lymphocyte.....	21
Pathogenesis and diseases of HSV infection.....	24
Latency.....	25
Immune response to HSV infection.....	26
Epidemiology.....	28
IV. MATERIALS AND METHODS.....	29
Part I. Preparation of cells and stock seeds of viruses.....	29
1. Cell cultures.....	29
2. Viruses.....	30
3. Plaque titration assay.....	31
Part II. Study of cell growth and viral growth in each cell type.....	32
1. Study of cell growth.....	32

CONTENTS (continued)

	page
2. Study of HSV-1 and HSV-2 growth in HEp-2 cells or Jurkat cells	32
Part III. Viral antigen detection.....	33
1. Indirect-immunofluorescence detection of viral antigens.....	33
2. Flow cytometry detection of viral antigens.....	34
Part IV. The adsorption ability of virus.....	36
Adsorption of virus.....	36
Part V. Study of HveA gene expression by RT-PCR.....	36
1. Sample.....	36
2. Total RNA isolation.....	36
3. cDNA synthesis.....	37
4. PCR amplification.	38
5. Detection of amplification products.....	39
V. RESULTS.....	40
Study of cell growth.....	40
HSV replication in Vero, HEp-2 and Jurkat cells..	43
Viral replication in PHA-activated Jurkat cells.....	48
The kinetics expression of HSV proteins.....	52
HSV protein expression.....	52
Immediately HSV protein expression.....	57
Detection of HSV infected cells by Flow cytometry.....	62
Adsorption ability of HSV among different cell types.....	65
HveA-mRNA expression in Jurkat cells and PHA-activated Jurkat cells.....	67
RT-PCR assay.....	67
VI. DISCUSSION.....	70
REFERENCES.....	77
APPENDICES.....	100

CONTENTS (continued)

	page
APPENDIX I	101
APPENDIX II.....	103
BIOGRAPHY.....	108



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		page
1. Properties distinguishing the Herpesviruses		6
2. Growth rate of Vero, HEp-2 and Jurkat cells.....		41
3. Efficiency of HSV-1 growth in different cell types at various MOI.....		44
4. Efficiency of HSV-2 growth in different cell types at various MOI.....		46
5. Efficiency of HSV-1 and 2 growth in PHA activated Jurkat cells at MOI=5.....		49
6. Efficiency of HSV-1 and HSV-2 growth in normal Jurkat and PHA-activated Jurkat cells at MOI = 5		50
7. Timing of the detected HSV-proteins (ICP0, ICP22, ICP47) in three different cell types.....		58
8. Timing of detecting HSV-proteins located in nucleus.....		58
9. Percentage of HSV-1 or HSV-2 antigen expressing cells in HEp-2, Jurkat and PHA-activated Jurkat cells at 24 h.p.i. detected by Flow cytometry.....		63
10. The HSV adsorption ability of HEp-2, Jurkat and activated Jurkat cells.....		66

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	page
1. (a) Schematic representation of the architecture of the HSV virion and electronmicrograph of HSV virion.....	9
(b) Schematic representation of the HSV genome.....	9
2. Schematic representation of the initial steps in HSV infection—HSV entry.....	19
3. Schematic representation of an HSV replication cycle.....	22
4. Growth curve of Vero, HEp-2 and Jurkat cells.....	42
5. The amount of HSV-1 produced in Vero, HEp-2 cells (A) and Jurkat cells (B) from cells and supernatant at 24 h.p.i.....	45
6. The amount of HSV-2 produced in Vero (A), HEp-2 cells and Jurkat cells (B) from cells and supernatant at 24 h.p.i.....	47
7. The amount of HSV-1 and HSV-2 produced in Jurkat and PHA activated Jurkat cells in cells and supernatant at 24 h.p.i.....	51
8. The staining patterns of HSV-1 and HSV-2 infected cells.....	54
9. Fluorescent staining of HSV-1 and HSV-2 infected HEp-2 cells using rabbit anti HSV-1 and HSV-2 antibodies.....	55
10. Fluorescent staining of HSV-1 or HSV-2 infected Jurkat (A) and PHA-activated Jurkat (B) cells, using rabbit anti HSV-1 and HSV-2 antibodies....	56
11. Fluorescent staining of HSV-1 or HSV-2 infected HEp-2 cells, using rabbit anti HSV ICP0, ICP22 and ICP47 antibodies.....	59
12. Fluorescent staining of HSV-1 or HSV-2 infected Jurkat cells, using rabbit anti HSV ICP0, ICP22 and ICP47 antibodies.....	60
13. Fluorescent staining of HSV-1 or HSV-2 infected PHA-activated Jurkat cells, using rabbit anti HSV ICP0, ICP22 and ICP47 antibodies.....	61
14. Graph showing the percentage of HSV-1 and HSV-2 infected HEp-2, Jurkat and PHA activated Jurkat cells at 24 h.p.i. detected by Flow cytometry.....	64
15. RT-PCR of HveA (B) and β -actin (A) from various amounts of RNA extracted from Jurkat cells.....	68
16. Comparison of HveA product between Jurkat and PHA-activated Jurkat cells.....	69

ABBREVIATIONS

Ab	=	Antibody
ADCC	=	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AIDS	=	Acquired Immunodeficiency Syndrome
bp	=	Base pair
°C	=	Degree Celsius
CD	=	Cluster of differentiation
CD3/PerCP	=	Periclinin chlorophyl protein-conjugated anti CD3 monoclonal antibodies
CDC	=	Center for Diseases Control
cDNA	=	Complementary deoxyribonucleic acid
CTL	=	Cytotoxic T lymphocyte
DDW	=	Double-deionized distilled water
DEPC-H ₂ O	=	Diethyl pyrocarbonate treated water
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	Deoxyribonucleotide triphosphate
DW	=	Distilled water
et. al.	=	et alii
FACS	=	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	=	Fluorescein isothiocyanate
g	=	Gram
gD	=	Glycoprotein D
gp	=	Glycoprotein
GM	=	Growth Medium
HIV	=	Human Immunodeficiency Virus
HSV	=	Herpes Simplex Virus
HveA	=	Herpes virus entry mediator A
HveB	=	Herpes virus entry mediator B
HveC	=	Herpes virus entry mediator C
IFN-β	=	Interferon beta
IFN-γ	=	Interferon gamma

ABBREVIATIONS (continued)

IL	=	Interleukin
Ig	=	Immunoglobulin
JNK/AP-1	=	Jun-containing transcription factor AP-1
kDa	=	Kilodalton
M	=	Molar
MHC	=	Major histocompatibility complex
MgCl ₂	=	Magnesium chloride
µg/ml	=	Microgram per milliliter
µl	=	Microliter
ml	=	Milliliter
mM	=	Millimolar
NaCl	=	Sodium chloride
ng	=	Nanogram
nm	=	Nanometer
NF-κB	=	Nuclear factor kappa B
NK	=	Natural killer
OD	=	Optical density
PBMC	=	Peripheral blood mononuclear cells
PHA	=	Phytohemagglutinin
RNA	=	Ribonucleic acid
rpm	=	Round per minute
RT	=	Reverse transcriptase, Reverse transcription
TAP	=	Transporter associated with antigen presentation
TNF	=	Tumor necrosis factor
TNFR	=	Tumor necrosis factor receptor
TRAF	=	TNFR- associated factor
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
UV	=	Ultraviolet