

**Eintritt des Herpes simplex Virus Typ 1 in Keratinozyten:
Charakterisierung der beteiligten zellulären Faktoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Elena Rahn
aus Köln

Januar 2014

Die Keratinozyten der Haut und Schleimhäute stellen die primäre Eintrittspforte für Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) *in vivo* dar. Das Ziel dieser Arbeit war es zu verstehen wie HSV-1 die Barrierefunktion des Epithels überwindet und welche zellulären Faktoren zur HSV-1 Aufnahme beitragen.

Zunächst wurde die HSV-1 Aufnahme mit Hilfe von Inhibitorstudien charakterisiert. Dabei lieferten die Ergebnisse erste Hinweise darauf, dass die Aktindynamik zur HSV-1 Aufnahme beiträgt, während die Myosin II-vermittelten Prozesse keine Rolle spielen. Weiterhin konnte eine Abhängigkeit von Dynamin für den Aufnahmeprozess von HSV-1 gezeigt werden, der nach Hemmung der endosomalen Ansäuerung weniger effizient ablief. Da die PACSIN-Proteine als Bindeglieder zwischen der anfänglichen Einstülpung von Membranen und der nachfolgenden Endozytose gelten, wurde ihre Beteiligung an der HSV-1 Aufnahme untersucht. Die Infektion von PACSIN2-defizienter Epidermis sowie von kultivierten primären Keratinozyten zeigte dabei keine Effekte auf die HSV-1 Aufnahmeeffizienz. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf einen Dynamin-abhängigen Aufnahmeprozess von HSV-1 in Keratinozyten hin, dessen Effizienz von der endosomalen Ansäuerung beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu war die virale Aufnahme unabhängig von der Tension des Aktins, von PACSIN2, von der Tyrosinphosphorylierung sowie von Caveolae.

Um zu verstehen wie HSV-1 die Barrierefunktion von Epithelien überwindet, um an die zellulären Rezeptoren zu gelangen, wurden *ex vivo* Infektionsstudien in muriner Haut durchgeführt. Dabei lag der Fokus auf der mechanischen Barriere, die das Eindringen des Pathogens ins Epithel unabhängig von der Immunantwort begrenzt. Bei Infektion intakter Hautstücke wurden keine infizierten Zellen beobachtet, was darauf hinweist, dass das Stratum corneum eine effektive Barriere für HSV-1 darstellt. Daher wurde murine Haut vor Infektion verletzt um das Stratum corneum zu entfernen. Nach Infektion wurden nur vereinzelt infizierte Zellen beobachtet. Um die Barrierefunktion für die HSV-1 Aufnahme weiter zu charakterisieren wurden stratifizierte Kulturen primärer Keratinozyten infiziert. Die ersten Ergebnisse liefern Hinweise, dass die *tight junctions* eine weitere Barriere für die Aufnahme von HSV-1 darstellen. Um die Limitierung der Infektion durch Stratifizierung und Kornifizierung zu charakterisieren wurden Infektionsstudien im organotypischen Hautmodell aus primären humanen Keratinozyten durchgeführt. Dabei wurden infizierte Keratinozyten im einschichtigen Epithel beobachtet, wobei die HSV-1 Aufnahme mit einsetzender Stratifizierung und Kornifizierung verhindert wurde. Erst die mechanische Verletzung des Hautmodells ermöglichte eine Infektion der Keratinozyten.

Die Trennung der Epidermis von der Dermis führte zu einer kompletten Infektion der basalen Keratinozyten, wobei Zellen im Bereich der interfollikularen Epidermis und zum Teil im Haarfollikel infiziert wurden. Die Kultivierung der Epidermis führte zu einer zeitabhängigen Reduktion des Viruseintritts in die Zellen der interfollikularen Epidermis. Hier lieferten elektronenmikroskopische Untersuchungen einen Hinweis auf den Übergang der Keratinozyten zum Zelltod, welcher die Reduktion der Infektion nach 18-stündiger Kultivierung der Epidermis begründete. Die Infektion der Epidermis von Mäusen verschiedenen Alters deutete auf eine Abhängigkeit der HSV-1 Aufnahmeeffizienz vom jeweiligen Haarzyklus. Die Infektionsstudien in ILK-defizienter Epidermis mit Beeinträchtigungen im Follikelwachstum verwiesen auf eine Beteiligung der zellulären Proliferation auf die Infektionseffizienz. Nachfolgende Untersuchungen zur Proliferation zeigten allerdings keine

Evidenz für eine Proliferations-abhängige Aufnahme von HSV-1 in die Keratinozyten der Haarfollikel oder der interfollikularen Epidermis. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die HSV-1 Infektion von der Zugänglichkeit der Keratinozyten nach Verletzung der Haut oder der Trennung von der Dermis abhängt. Weiterhin gibt es Evidenz für die *tight junctions* als interne Barriere für die HSV-1 Infektion des Epithels. Die beobachtete Infektionseffizienz der Haarfollikel ist abhängig von dem Haarzyklus und wird nicht von der Proliferation beeinflusst.

Keratinocytes of skin and mucosa represent the primary entry portals for herpes simplex virus type 1 (HSV-1) *in vivo*. The long term goal is to understand how HSV-1 overcomes the barrier function of the epithelia and to characterize the cellular determinants that contribute to the HSV-1 entry into keratinocytes.

Initially, HSV-1 entry into keratinocytes was characterized by inhibitor studies. The results suggest that actin dynamics contributes to initial entry steps of HSV-1, whilst the myosin II driven tension plays no role. Furthermore, HSV-1 uptake was shown to be dynamin-dependent, and the inhibition of endosomal acidification reduced the efficiency of entry. Since PACSIN proteins serve as molecular linker of membrane curvature and endocytosis, the role of PACSIN2 was analyzed. After infection of PACSIN2-deficient epidermis or primary keratinocytes, the efficiency of entry was not influenced. Taken together, these results provide evidence for a dynamin-dependent uptake mechanism of HSV-1 into keratinocytes, which involves endosomal acidification and is independent of actin tension, the linker protein PACSIN2, tyrosin phosphorylation and caveolae.

To understand how HSV-1 overcomes the barrier function of the epithelia to reach its receptors and initiate infection, *ex vivo* infection studies in murine skin samples were performed. Here, the focus was on mechanical barriers that restrict viral invasion into the epithelium in the absence of immune responses. No infected cells were detectable, when complete murine skin samples were infected, suggesting that the cornified layer acts as an efficient barrier. Thus, murine tissue samples were mechanically wounded prior to infection to remove the cornified layer of the epithelium. Upon infection only some infected cells were observed. To further investigate the barrier function during HSV-1 entry, stratified cultures of primary keratinocytes were infected. Initial results suggest that tight junctions form a further barrier against successful HSV-1 entry. To confirm the limitation of HSV-1 infection by stratification and cornification infection studies in organotypic skin cultures of primary human keratinocytes were performed. Infected cells were observed in keratinocyte monolayers, however, stratification and cornification prevented HSV-1 entry. The infection proceeds only after mechanical wounding of the skin culture. After separation of the epidermis from the dermis, entry occurred throughout the basal layer of keratinocytes. Infected cells were detected in the interfollicular epidermis and to some extent in the hair follicles. The cultivation of epidermal sheets restricted entry into the interfollicular epidermis in a time dependent manner. Electron microscopy studies suggested the induction of cell death upon cultivation which led to a loss of infection when epidermal sheets were kept in culture longer than 18 hours. Infection of epidermis prepared from mice of different ages suggested that the efficiency of entry was dependent on the hair cycle. Infection studies in ILK-deficient epidermis with impaired hair follicle outgrowth further suggested a role of hyper proliferation on infection efficiency. However, no evidence for a proliferation dependent HSV-1 entry into hair follicles or interfollicular epidermis was found. In summary the results suggest that the HSV-1 initiates infection in epidermal keratinocytes once they are accessible by wounding or separation from the dermis. Furthermore there is evidence that tight junctions serve as an internal barrier for HSV-1 infection of the epithelia. The infection pattern of the hair follicles depends on the hair cycle and is not affected by proliferation.

I Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf betreut worden.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgenden Titeln publiziert:

Rahn, E., Petermann, P., Hsu, M.-J., Rixon, F. J. & Knebel-Mörsdorf, D. (2011)

Entry pathways of herpes simplex virus type 1 into human keratinocytes are dynamin- and cholesterol-dependent. PLoS ONE 6, e25464.

Köln, den 10.09.14

Elena Rahn