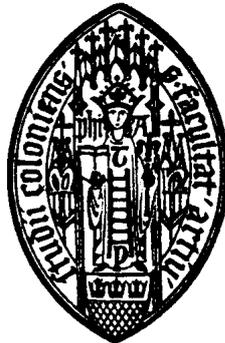


MEINEN ELTERN

UNTERSUCHUNGEN ZU EINTRITTSMECHANISMEN DES
HERPES SIMPLEX VIRUS TYP 1 IN EPITHELZELLEN

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



vorgelegt von

Mario Schelhaas

aus Köln

Dezember 2003

Die vorliegende Arbeit wurde
am Max-Planck-Institut für neurologische Forschung, Köln,
im Zeitraum von Oktober 1999 bis Dezember 2003 angefertigt.



Referentin: Prof. Dr. D. Knebel-Mörsdorf
Max-Planck-Institut für neurologische Forschung
und Klinik für Neurologie, Universität zu Köln

Koreferent: Prof. Dr. J. Brüning
Institut für Genetik, Universität zu Köln

Datum der mündlichen Prüfung: 5. Februar 2004

Inhaltsverzeichnis

Prolog	1
I. Einleitung	3
1 Das <i>Herpes simplex</i> Virus Typ 1	3
1.1 Aufbau und Struktur des HSV-1 Virions	4
1.2 Virale Genexpression, Replikation und Ausbreitung in Zellkulturen	4
1.3 Infektionszyklus <i>in vivo</i>	7
1.4 Eintritt von HSV-1 in die Wirtszelle	9
2 Epithelien	10
2.1 Polarität von Epithelien	10
2.2 Epithelmodelle	13
2.3 Eintritt von HSV-1 in Epithelien	14
3 Das Aktin-Zytoskelett	15
3.1 Aufbau und Struktur	16
3.2 Dynamik des Aktin-Zytoskeletts	16
3.3 Interaktionen von HSV-1 mit dem Zytoskelett ¹	18
4 Signaltransduktion der Rho-ähnlichen GTPasen	19
4.1 Rho-ähnliche GTPasen	20
4.2 Biologische Aktivitäten der Rho-ähnlichen GTPasen	20
4.3 Wechselseitige Signaltransduktion von Rho GTPasen	21
4.4 Effektoren von RhoGTPasen in Epithelzellen	22
II. Zielsetzung	25
III. Material und Methoden	26
1 Materialien	26
1.1 Chemikalien	26
1.2 Kulturmedien	28
1.2.1 Bakterienmedien	28
1.2.2 Säugerzellkultur-Medien	29
1.3 Enzyme	29
1.4 Größenstandards	30
1.5 Säulen und Säulenmaterial	30
1.6 Oligonukleotide	30
1.7 Plasmide	31
1.8 Antiseren, Antikörper und Substanzen für die Immunfluoreszenz	32
1.8.1 Primäre Antikörper und Antiseren	32
1.8.2 Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz	36
1.8.3 Fluorochrom-gekoppelte Phalloidine	37
1.9 Inhibitorsubstanzen	38
1.10 Bakterien	38
1.11 Säugetier-Zellkulturen	38
1.12 Primäre Humankulturen	39
1.13 Viren	39

1.13.1 AcMNPV	39
1.13.2 HSV-1	40
1.14 Computer / Software	40
1.15 Geräte und sonstiges Material	41
2 Methoden	42
2.1 Methoden der DNA-Präparation	42
2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	42
2.1.2 Isolierung von viraler DNA	42
2.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion	43
2.1.4 Auftrennung von DNA mittels Elektrophorese	43
2.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	44
2.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen	44
2.2 Enzymatische DNA-Methoden	44
2.2.1 Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme	44
2.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Einzelstrangenden	45
2.2.3 Polymerasekettenreaktion	45
2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten	46
2.2.4 DNA-Sequenzierung	46
2.3 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	46
2.3.1 Lagerung	46
2.3.2 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	47
2.3.3 Hitzeschocktransformation	47
2.4 Arbeiten mit Säugetier-Zellkulturen	47
2.4.1 Kultivierung der Zelllinie Vero-B4	48
2.4.2 Kultivierung der Zelllinie BHK21	48
2.4.3 Kultivierung der Zelllinie HeLa	49
2.4.4 Kultivierung der Zelllinie MDCKII	49
2.4.5 Kultivierung der Zelllinie MDCKII Aktin-GFP (Klon A10)	49
2.4.6 Kultivierung der Zelllinien MDCKII T23	50
2.4.7 Lagerung der Zelllinien	51
2.4.8 Überprüfung auf Mykoplasmenkontaminationen	52
2.4.9 Bestimmung der Zellzahl	52
2.4.10 Subklonieren der MDCKII T23 Zelllinien	53
2.4.11 Transfektionsmethoden	54
2.4.12 Induktion von Transgenexpression in MDCKII T23 Zellen	54
2.5 Arbeiten mit primären Humankulturen	55
2.5.1 Isolierung und Kultivierung von humanen Epithelexplant-Kulturen	55
2.5.2 Isolierung von Kultivierung von humanen Keratinozyten	55
2.6 Arbeiten mit <i>Herpes simplex</i> Virus Typ 1	56
2.6.1 Virusvermehrung und -aufreinigung	56
2.6.2 Bestimmung der Infektiosität des Virus-Inokulums	57
2.6.3 HSV-1 und AcMNPV Infektion von Zellkulturen	58
2.6.4 HSV-1 Infektion von Explantkulturen	58
2.6.5 HSV-1 Infektion von MDCKII Filterkulturen	58
2.6.6 Verwundungsexperimente vor HSV-1 Infektion	59
2.7 Arbeiten mit zellulären Inhibitoren	60
2.7.1 Jasplakinolide und Cytochalasin D	60
2.7.2 Monensin	60

2.7.3 Toxin B	61
2.8 Antikörper-Blockierungsexperimente	62
2.8.1 Blockierung von HSV-1 gD	62
2.9 Elektronenmikroskopie	62
2.9.1 Zellpräparation und Fixierung	62
2.9.2 Färbung, Schnitt und Analyse	63
2.9.3 Negativ-Färbung von HSV-1 Virione	63
2.10 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung und - mikroskopie	63
2.10.1 Zellpräparation	64
2.10.2 Fixierung der Zellen	64
2.10.3 Antikörperbindung	65
2.10.4 Doppelfärbungen	65
2.10.5 Immunfärbung von Gewebeschnitten	66
2.10.6 Fluoreszenzmikroskopie	66
IV. Ergebnisse	67
1 Experimentelle Grundlagen der HSV-1 Eintrittsstudien	67
1.1 ICP0 als Marker für die HSV-1 Infektion	67
1.2 Gereinigte Virus-Präparation	69
1.3 Charakteristika von MDCKII Zellen	71
1.3.1 Morphologie und Polarität	71
1.3.2 Weitere Komponenten des Zytoskeletts	75
2 Tropismus der HSV-1 Infektion polarer Epithelzellen	78
2.1 HSV-1 Infektionsstudien in MDCKII Zellen	78
2.1.1 Eintrittsstudien in konfluente polare MDCKII Zellen	78
2.1.2 Eintrittsstudien in subkonfluente MDCKII Zellen	80
2.1.3 Infektion von MDCKII Zellen	82
2.2 Tropismus der HSV-1 Infektion von Hautmodellen	82
2.2.1 Infektion von Epithel-Explant-Kulturen	84
2.2.2 Infektion von stratifizierenden Keratinozyten	86
2.2.3 Infektion von undifferenzierten Keratinozyten	89
3 Studien zur Beteiligung von Komponenten des HSV-1 Eintritts	91
3.1 Lokalisierung von Nectin-1 in Epithelzellen	91
3.1.1 Nectin-1 Lokalisierung in MDCKII Zellen	92
3.1.2 Nectin-1 Lokalisierung in Epithelexplant-Kulturen	92
3.1.3 Nectin-1 Lokalisierung in stratifizierenden Keratinozyten	92
3.1.4 Nectin-1 Lokalisierung in undifferenzierten Keratinozyten	94
3.2 Vermittlung des HSV-1 Eintritts durch Glykoprotein D	96
3.2.1 Blockierung des HSV-1 Eintritts in MDCKII Zellen durch anti-gD-Antikörper	96
3.2.2 Blockierung des HSV-1 Eintritts in Keratinozyten durch anti-gD-Antikörper	98
3.3 Aufnahme der Virionen in MDCKII Zellen	100
3.3.1 Mechanismus der HSV-1 Penetration der Plasmamembran	101
3.3.2 Vergleichende Eintrittsstudien	101
4 Einfluss der zellulären Signaltransduktion des Aktin-Zytoskeletts auf den HSV-1 Eintritt	105

4.1 Hemmung der Aktin-Dynamik	105
4.2 Hemmung endogener Cdc42/Rac1-Signaltransduktion durch Toxin B	108
4.3 Einfluss Rho-ähnlicher GTPasen auf die HSV-1 Infektion vereinzelter MDCKII Zellen	111
4.3.1 Einfluss dominanter Isoformen auf die HSV-1 Infektion	112
4.3.2 Einfluss der Wildtyp-Isoformen auf die HSV-1 Infektion	114
4.3.3 Einfluss dominanter Isoformen auf sehr frühe HSV-1 Genexpression	116
4.3.4 Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts vereinzelter MDCKII Zellen durch Rho-ähnliche GTPasen	116
4.4 Einfluss Rho-ähnlicher GTPasen auf die HSV-1 Infektion subkonfluenten MDCKII Zellen	125
4.4.1 Infektionsstudien	126
4.4.2 Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts subkonfluenten MDCKII Zellen durch Rho-ähnliche GTPasen	132
4.5 Einfluss von Effektoren der Cdc42/Rac1 Signaltransduktionswege auf die HSV-1 Infektion	139
4.5.1 Einfluss der Rac1-Effektorenbindung auf die HSV-1 Infektion	139
4.5.2 Einfluss von PAK-1 auf die HSV-1 Infektion	143
4.5.3 Einfluss von N-WASP auf die HSV-1 Infektion	146
4.6 HSV-1 induzierte Veränderungen des Zytoskeletts	149
4.6.1 Veränderungen der ZO-1 Lokalisierung im Verlauf der HSV-1 Infektion	149
4.6.2 Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts im Verlauf der HSV-1 Infektion	151
V. Diskussion	157
1 Polarität des HSV-1 Eintritts	157
1.1 Basolaterale Membrandomänen fungieren als primärer HSV-1 Eintrittsort in einfachen Epithelien	157
1.2 Limitierende Barriere-Funktion apikaler Oberflächen für den HSV-1 Eintritt in komplexe humane Epithelien	160
2 Potentielle Determinanten des HSV-1 Eintritts in Epithelzellen	161
2.1 Rolle des HSV-1 Korezeptors Nectin-1 für den polaren HSV-1 Eintritt in Epithelien	161
2.2 Beteiligung des HSV-1 Glykoproteins D am Eintritt in Epithelzellen	163
2.3 Hinweise auf die mechanistischen Grundlagen zur Penetration der Plasmamembran	164
3. Wechselseitige Beeinflussung von Aktin-Dynamik und HSV-1 Infektion	165
3.1 Hemmung der HSV-1 Infizierbarkeit von Epithelzellen durch Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts	166
3.3 Einfluss der Signaltransduktion von Rac1 / Cdc42 auf die HSV-1 Infizierbarkeit von Epithelzellen	167
3.4 Einfluss von Effektoren der Cdc42/Rac1 Signaltransduktionswege auf die HSV-1 Infizierbarkeit von MDCKII Zellen	171
3.5 HSV-1 induzierte Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts	174

3.6 Implikationen der Cdc42/Rac1 Signaltransduktionsprozesse in der HSV-1 Infektion	176
4 Modell des HSV-1 Eintritts in Epithelzellen	178
5 Ausblick	180
5.1 Wird die Aktivität von Cdc42 / Rac1 während des Eintritts von HSV-1 beeinflusst ?	180
5.2 Sind Cdc42 oder Rac1 Signaltransduktionsprozesse am Eintritt von HSV-1 beteiligt ?	180
5.3 Welche frühen Ereignisse der HSV-1 Infektion werden durch die Cdc42/Rac1 Signaltransduktion beeinflusst ?	181
5.4 Sind Integrine am HSV-1 Eintritt als Rezeptoren beteiligt ?	181
VI. Zusammenfassung	183
VII. Literaturverzeichnis	186
VIII. Kurzzusammenfassung	203
IX. Abstract	205
X. Erklärung	206
XI. Lebenslauf	207
XII. Danksagung	208
XIII. Anhang	209

Abkürzungen

AA	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> Kernpolyedervirus
BHK	engl. Baby Hamster Kidney
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CMV	Cytomegalovirus
d.h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-(b-aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
et al.	und andere
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
XX [g]	Zentrifugalkraft ausgedrückt als XX-faches der Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HeLa	Sugerzelllinie HeLa
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonäure)
HHV	Humanes Herpesvirus
h p.i.	Stunden nach Infektion
HSV	<i>Herpes simplex</i> Virus
IgG	Immunglobulin G
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	Molar
MDCK	engl. Madin-Darby canine kidney (Zelllinie)
min.	Minute(n)
mind.	mindestens
MOI	Multiplizität der Infektion (engl. multiplicity of infection)

NaAc	Natriumacetat
OD _{xxx}	Optische Dichte bei XXX nm
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFU	Plaque formende Einheit (engl. plaque forming unit)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde(n)
sog.	sogenannt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (Unit)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
Vgl.	Vergleich
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren

A	(Ala)	Alanin	M	(Met)	Methionin
---	-------	--------	---	-------	-----------

C	(Cys)	Cystein	N	(Asn)	Asparagin
D	(Asp)	Asparaginsäure	P	(Pro)	Prolin
E	(Glu)	Glutaminsäure	Q	(Gln)	Glutamin
F	(Phe)	Phenylalanin	R	(Arg)	Arginin
G	(Gly)	Glycin	S	(Ser)	Serin
H	(His)	Histidin	T	(Thr)	Threonin
I	(Ile)	Isoleucin	V	(Val)	Valin
K	(Lys)	Lysin	W	(Trp)	Tryptophan
L	(Leu)	Leucin	Y	(Tyr)	Tyrosin

Nukleotide

A	Adenin	dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
C	Cytosin	dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
G	Guanin	dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
T	Thymin	dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
N	A/C/G/T	dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
M	A/C	V	A/C/G
R	A/G	H	A/C/T
W	A/T	D	A/G/T
S	C/G	B	C/G/T
Y	C/T		
K	G/T		

Prolog

Wenn Du den Feind und Dich selbst kennst, brauchst Du den Ausgang von hundert Schlachten nicht zu fürchten. Wenn Du Dich selbst kennst, doch nicht den Feind, wirst Du für jeden Sieg, den Du erringst, eine Niederlage erringen. Wenn Du weder den Feind noch Dich selbst kennst, wirst Du in jeder Schlacht unterliegen.

Sun Tse (ca. 500 v. Chr.), Die Kunst des Krieges

Die moderne Erforschung von Krankheiten steht unter dem Aspekt, molekulare Determinanten als Ziele für Therapieansätze zu finden. Krankheitserreger, insbesondere Viren, die als intrazelluläre Parasiten auf ihren Wirt für die eigene Vermehrung angewiesen sind, zeigen eine enge Ko-Evolution mit ihrem Wirt. So war die Erforschung des Lebenszyklus von Viren immer eine Erforschung der Virus-Wirtszell-Interaktion, die häufig neue Schlüsse über die vom Virus genutzten zellulären Prozesse zuließ. Klassische antivirale Therapie, die gegen virale Komponenten gerichtet ist, resultiert häufig in der Ausbildung mutierter Viren. Diese sind meistens gegen die entsprechende Therapie resistent. Es mag also nicht genügen, antivirale Strategien ausschließlich auf das Virus auszurichten. Um die antivirale Therapie auf zelluläre Determinanten ausweiten zu können, ist es unerlässlich, auch die beteiligten Wirtszellfaktoren zu kennen, die an der Vermehrung von Viren beteiligt sind. Man mag den zitierten Philosophen Sun Tse vielleicht auch in diesem Sinne verstehen, wenn man das Virus und seinen Wirt selbst kenne, brauche man den Ausgang von hundert Infektionen nicht zu fürchten. Darüber hinaus werden Viren, deren letztendliche Geheimnisse der Virusvermehrung und der Wirtszell-Interaktionen es noch zu erforschen gilt, in jüngerer Zeit auch als Gentherapie-Vehikel eingesetzt. Auch in diesem Zusammenhang mag man in Anlehnung an Sun Tse erst an eine erfolgreiche Nutzung dieser Viren zur Gentherapie denken - ohne die vielen Rückschläge und Fehlentwicklungen, der die virale Gentherapie seit ihrer ersten gedanklichen Konzeption ausgesetzt ist -, wenn die meisten der beteiligten Faktoren der Virus-Wirtszell-Interaktionen erforscht worden sind.

Die vorliegende Arbeit versteht sich als ein weiterer Schritt in der Erforschung von

Virus-Wirtszell-Interaktionen. Dabei wurde das human-pathogene *Herpes simplex* Virus Typ 1 (HSV-1) auf Determinanten untersucht, die den erfolgreichen Eintritt von HSV-1 in Epithelzellen bestimmen könnten. Zur Einleitung in diese Thematik wird daher im Folgenden auf den Stand der Forschung zum HSV-1 Lebenszyklus und der Polarität der primären Vermehrungsorte der *Herpes simplex* Viren, Haut- und Schleimhaut-Epithelien, eingegangen. Zusätzlich werden zentrale Aspekte der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts eingeführt.

I. Einleitung

1 Das *Herpes simplex* Virus Typ 1

Der Name Herpesviren leitet sich von *herpein* (griechisch = kriechen, schleichen) ab. In der griechischen Antike wurde so die kriechende Ausbreitung des von *Herpes simplex* Viren verbreiteten Hautauschlages beschrieben (zur Übersicht Wildy, 1973). Herpesvirusinfektionen treten nicht nur beim Menschen, sondern auch bei vielen Wirbeltierarten auf - von Affen über Katzen bis hin zu Fröschen und Fischen. Die Familie der Herpesviren wird gekennzeichnet durch eine ähnliche Partikelmorphologie und ihre biologischen Eigenschaften. Insbesondere ihre Fähigkeit, nach der Erstinfektion latent im Organismus zu verbleiben, ist ihnen gemein. Zu den *Herpes simplex* Viren gehören zwei Serotypen, HSV-1 und HSV-2, die zunächst über serologische Untersuchungen und später über ihren Restriktionslängenpolymorphismus unterschieden wurden (Schneweiss, 1962, zur Übersicht Roizman und Sears, 1996). HSV-1 und HSV-2 zeigen eine 85%ige Homologie der Nukleotidsequenz. Dabei unterscheiden sie sich nicht nur in den Aminosäuresequenzen, sondern auch in der apparenten Größe viraler Proteine (zur Übersicht Whitley, 1996). Während HSV-1 Infektionen hauptsächlich im orofacialen Bereich auftreten, führt HSV-2 Infektion meistens zu genitalen Erkrankungen (zur Übersicht Whitley und Roizman, 2001).

HSV-1 Erkrankungen manifestieren sich am häufigsten in ulcerierenden oder vesiculären Läsionen des orofacialen Bereichs der Haut oder Schleimhaut. Es treten seltener Infektionen des okularen oder genitalen Bereichs auf. Nach einer Primärinfektion der Epidermis erlangt HSV-1 Zugang zum peripheren Nervensystem. Dort etabliert das Virus in Zellen der sensorischen Ganglien eine lebenslange latente Infektion (Stevens und Cook, 1971) und kann in unregelmäßigen Abständen reaktiviert werden. Verschiedenste Stimuli wie UV-Strahlung, Fieber, psychische Einflüsse und hormonelle Faktoren können zu einer solchen Reaktivierung führen. Diese manifestiert sich in rezidiven Hauterkrankungen, meist an den gleichen Stellen wie bei der Primärinfektion. Selten führen Rezidive zusätzlich zu Infektionen des zentralen Nervensystems in Form einer Enzephalitis, die ohne Behandlung in hohem Maße lebensbedrohlich ist. Primärinfektionen Neugeborener sowie Rezidive immun-kompromittierter Patienten können schwere generalisierte und ohne Behandlung häufig tödliche Erkrankungen hervorrufen.

Aufgrund der neurotrophen Eigenschaften von HSV-1 wird in verschiedenen Studien die Möglichkeit zur Nutzung als Gentransfer-Vehikel in neuronale Zellen untersucht (zur Übersicht Latchman, 2001).

1.1 Aufbau und Struktur des HSV-1 Virions

Das HSV-1 Virion hat einen Durchmesser von etwa 150 nm und besteht aus mehr als 30 Strukturproteinen (Abb. I.1) (zur Übersicht Roizman und Sears, 1996). Im Inneren des Partikels befindet sich das Virus-Core mit der das doppelsträngige, lineare DNA-Genom einer Größe von etwa 152 kB assoziiert ist. Ungefähr 84 Polypeptide werden vom HSV-1 Genom kodiert, das aus einem langen (126 kB) und einem kurzen (26 kB) Segment besteht. Diese Segmente werden von invertierten Einheiten wiederholter Sequenzen flankiert (McGeoch *et al.*, 1985; McGeoch *et al.*, 1988). Das Virus-Core selbst ist umgeben von einem icosaedrischen Kapsid, das aus 162 Kapsomer-Untereinheiten aufgebaut ist. Das Viruskapsid ist umgeben von einer proteinhaltigen Matrix, dem Tegument, und einer Lipid-Hüllmembran. In die Hüllmembran inseriert sind 11 Glykoproteine (gB-gM); die Existenz eines weiteren Glykoproteins (gN) ist postuliert. Neben infektiösen Virionen werden von Zellen L-Partikel produziert, die nur aus Hüllmembran und Tegument bestehen und nicht infektiös sind (Szilágyi und Cunningham, 1991).

1.2 Virale Genexpression, Replikation und Ausbreitung in Zellkulturen

In Zellkultur erfolgt die Expression des Virusgenoms nach Freisetzung in den Zellkern in einem kaskadenartig ineinander übergehenden, zeitlich regulierten Zyklus (zur Übersicht Roizman und Sears, 1996). Zunächst erfolgt die Expression der sehr frühen Gene (α -Gene), die unter Einfluss des viralen Transkriptionsaktivators VP16 (Virionprotein 16) verstärkt wird, das als Tegumentprotein Bestandteil des Virions ist. VP16 bindet dabei in Kooperation mit zellulären Proteinen die Promotoren der sehr frühen Gene und leitet die Transkription durch die RNA-Polymerase II ein. Die α -

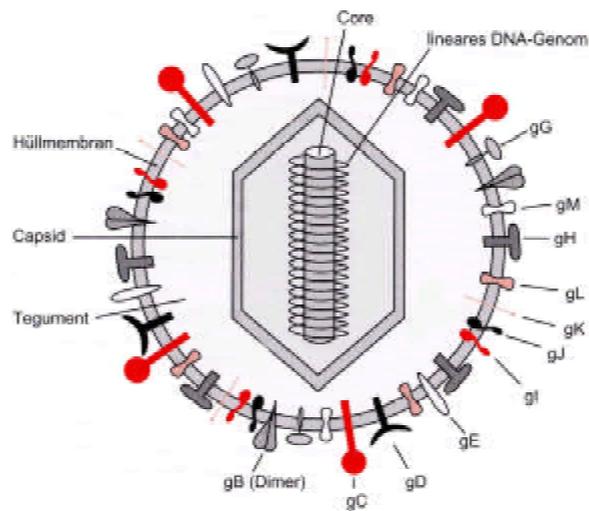


Abb. I.1: Schematische Darstellung des Aufbaus von HSV-1 Virionen

(aus Modrow, S. und D. Falke (1997): *Molekulare Virologie. Spektrum Verlag Heidelberg.*)

Gene kodieren für insgesamt fünf Proteine, die als wichtige Regulatoren im Zellkern die Promotoren der frühen Gene (β -Gene) aktivieren. Ein Produkt der α -Genexpression ist das gut charakterisierte Protein ICP0 (engl. infected cell protein 0).

Neben seiner Funktion als Transaktivator für β -Gene kann ICP0 im Infektionsverlauf auch als E3-Ubiquitin-Ligase in Proteasom-abhängigen Abbauwegen wirken (Boutell *et al.*, 2001; Hagglund *et al.*, 2002).

Zu den β -Proteinen gehören die Proteine und Nukleinsäure-bindenden Polypeptide, die für die Replikation des Virusgenoms benötigt werden. Zeitgleich mit der DNA-Synthese werden die späten Gene (γ -Gene) exprimiert. Sie kodieren für strukturelle Proteine und Faktoren, die am Zusammensetzen der Virionen und an der Freisetzung von Viren beteiligt sind. Das Zusammensetzen der Virionen beginnt im Zellkern, wo das replizierte Virusgenom in neu gebildete Kapside verpackt wird. Über einen aufwendigen Mechanismus unter Beteiligung von Tegumentproteinen werden diese Kapside aus dem Kern ausgeschleust, wobei sie an der inneren Kernmembran ihre erste Hülle erhalten. Diese Hüllmembran scheint später wieder verloren zu werden, so dass reife Virionen vermutlich erst bei der Ausschleusung an der Plasmamembran entstehen. Dabei werden unter Zellkultur-Bedingungen Virionen in die extrazelluläre Umgebung abgegeben (sog. cell released virus, CRV), die weitere Zellen infizieren können. Daneben findet eine extensive Ausbreitung der Viren über Zell-Zell-Kontakte oder Zellfusion statt. Klinische Isolate von HSV-1 werden dabei durch Ausbildung unterschiedlicher zytopathischer Effekte unterschieden. Während der erste Subtyp eine Abrundung und Ablösung der Zellen von ihrer Matrix induziert und sich über den interzellulären Raum von Zell-Zell-Verbindungen verbreitet, zeichnet sich der zweite Subtyp durch Fusion infizierter mit uninfizierten Zellen und Bildung von Riesenzellen aus. Unterschiede im syn-Lokus (für syncytial) der Aminosäuresequenzen der Glykoproteine gB, gD, und gH bestimmen die Art der Ausbreitung entweder über Zell-Zell-Kontakte oder Zellfusion. Im späten Infektionsstadium findet zudem eine Freisetzung von intrazellulär akkumulierten Viruspartikeln (engl. cell associated virus, CAV) durch Lyse der Wirtszelle statt .

1.3 Infektionszyklus *in vivo*

Die Primärinfektion durch HSV-1 bedingt den intimen, persönlichen Kontakt eines

seronegativen Individuums mit jemandem, der HSV-1 sekretiert. Der Kontakt von Schleimhaut- oder Haut-Oberflächen mit vesikulärer Flüssigkeit der gebildeten Bläschen initiiert die Infektion, wobei allgemein angenommen wird, dass Verwundungen oder Mikroläsionen der Haut für eine erfolgreiche Infektion vorliegen müssen (zur Übersicht Whitley, 1996). Die primäre Infektion ist dabei hauptsächlich limitiert zum Bereich des Oropharynx. In Tiermodellen führt die initiale Replikation zum direkten Zugang von HSV-1 zu dorsalen Nervenendigungen, in die das Virus vermutlich über direkte Ausbreitung von Zelle zu Zelle eintritt (zur Übersicht Hill, 1985). Das Viruskapsid gelangt zu dorsalen Nervenganglia über retrograden axonalen Transport (Stevens und Cook, 1971), wo die latente Infektion etabliert wird. In latent infizierten Nervenzellen werden zehn bis 100 episomale Virusgenome gefunden. So ist das fundamentale Prinzip viraler Pathogenese die Eigenschaft des Virus zur Replikation an mucosalen Oberflächen gefolgt von der Etablierung einer latenten Infektion in dorsalen Nervenganglia. Verschiedene Stimuli führen zur Reaktivierung des Virus, der über anterograden axonalen Transport häufig an der initialen Stelle der Infektion eine Sekundärinfektion auslöst. Dabei tritt das Virus diesmal an der Unterseite des primär über die Oberfläche infizierten Hautgewebes ein und löst vesikuläre Bläschenbildung oder mucosale Ulcer aus, über die eine Verbreitung zu weiteren Individuen stattfinden kann (vgl. Abb. 1.2).

Die Infektionswege *in vivo* implizieren einen Zugang des Virus zu den hochpolarisierten Geweben der Hautepithelien und Nerven. Dabei erlangt HSV-1 Zugang zu Haut-Oberflächen, die durch entgegengesetzte Polarität gekennzeichnet sind. Der potentielle Einfluss dieser Polarität auf den Eintritt von HSV-1 wird bislang nur wenig verstanden.

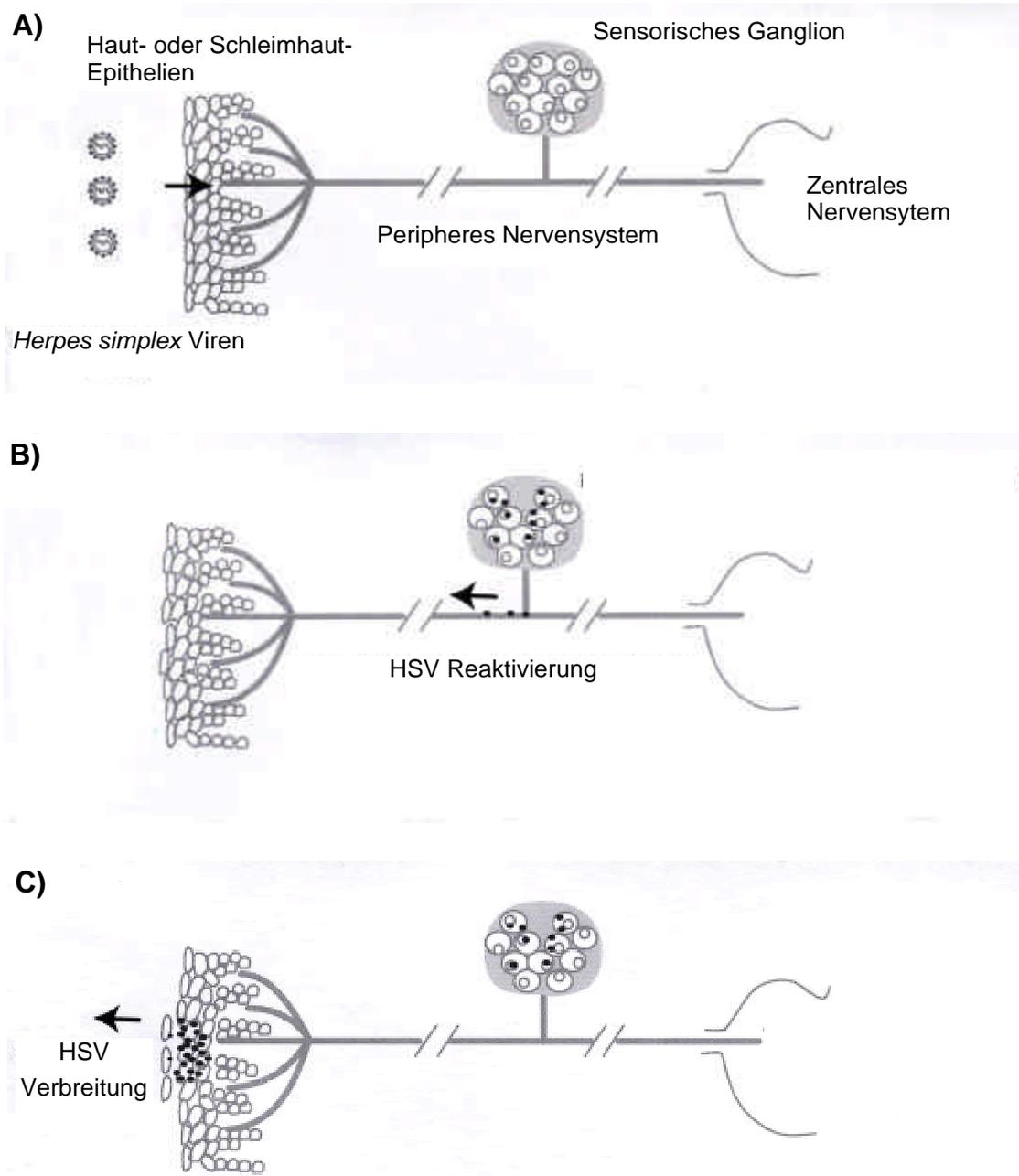


Abb. I.2: Schematische Darstellung des HSV-1 Infektionsverlaufs *in vivo*

A) Primärinfektion, B) Reaktivierung, C) Verbreitung von HSV-1
(modifiziert nach einer öffentlich zugänglichen Quelle des Internets)

1.4 Eintritt von HSV-1 in die Wirtszelle

Der virale Eintritt in die Wirtszelle gliedert sich in verschiedene Schritte: Nach der

initialen Bindung von HSV-1 an die Zelloberfläche folgt die Penetration des Virions ins Zytoplasma. Anschließend wird das Nukleokapsid zum Zellkern transportiert und das virale Genom in den Zellkern freigesetzt (zur Übersicht Spear *et al.*, 2000). Im Folgenden werden zelluläre und virale Determinanten vorgestellt, die den zellulären Eintritt von HSV-1 vermitteln.

Die initiale Adsorption von HSV-1 an die Zelloberfläche wird über Interaktion der viralen Glykoproteine gC und / oder gB mit Heparan Sulfat vermittelt (WuDunn und Spear, 1989; Herold *et al.*, 1991, Herold *et al.*, 1994). Diese Bindung an eine Komponente der extrazellulären Matrix ist vermutlich reversibel und könnte zur Konzentration von Virus auf der Zelloberfläche dienen. Diese Konzentration von Virus könnte eine Bindung an weitere Korezeptoren erleichtern, die für die Penetration des Virions ins Zytoplasma notwendig ist. Die Penetration kann mechanistisch auf zwei Weisen erfolgen, wobei nicht geklärt ist, ob diese Eintrittsmechanismen sich gegenseitig ausschließen oder gleichzeitig auftreten können. Der in der Literatur favorisierte Mechanismus beinhaltet eine pH-unabhängige Fusion der viralen Hüllmembran mit der Zellmembran verbunden mit der Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma (zur Übersicht Spear *et al.*, 2000). Eine neuere Studie legt jedoch auch eine Rolle für endozytische Aufnahme von Virionen verbunden mit niedrigem pH-Wert in einigen Zelllinien nahe (Nicola *et al.*, 2003), bei der anschließend die Freisetzung des Kapsides aus Endosomen durch Fusion der endosomalen Membran und viraler Hülle erfolgen muss. Beide Prozesse setzen die Bindung eines zellulären Korezeptors durch den viralen Liganden gD voraus. Bisher wurden drei Klassen von Zelloberflächenmolekülen als HSV-1 Rezeptoren identifiziert: ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie (engl. tumor necrosis factor), vier Mitglieder der Superfamilie der Immunglobuline sowie eine modifizierte Form von Heparan Sulfat, die durch Glucosaminyl-Sulfotransferasen generiert wird (zur Übersicht Campadelli-Fiume *et al.*, 2000, Spear *et al.*, 2000). Der bisher am intensivsten studierte Korezeptor ist das ubiquitär vorkommende, interzelluläre Adhäsionsmolekül Nectin-1 (Cocchi *et al.*, 1998, Geraghty *et al.*, 1998, zur Übersicht Spear *et al.*, 2000, Spear und Longnecker, 2003, Takai und Nakanishi, 2002). Rezeptorbindung wird für alle bisher identifizierten Korezeptoren durch das Glykoprotein gD als viralem Liganden vermittelt. Ein erfolgreicher Eintritt benötigt

jedoch eine Kooperation der viralen Glykoproteine gB, gD und einem Heterodimer aus gH und gL (zur Übersicht Spear, 1993). Nach der Penetration der Nukleokapside in das Zytoplasma erfolgt ein Transport entlang von Mikrotubuli zu den Kernporen, wo die Freisetzung des viralen Genoms in den Kern erfolgt (Kristensson *et al.*, 1986, Sodeik *et al.*, 1997, zur Übersicht Sodeik, 2000, Topp *et al.*, 1994).

2 Epithelien

Die Charakterisierung der molekularen Determinanten des HSV-1 Eintritts basiert hauptsächlich auf Studien in unpolarisierten Zellkultur-Modellen (zur Übersicht Spear *et al.*, 2000). *In vivo* findet der initiale Eintritt von Virus-Partikeln jedoch in die polaren Epithelgewebe der Haut bzw. Schleimhaut statt. Epithelgewebe dienen im Prinzip zwei Hauptfunktionen: Schutz vor der Umwelt und Trennung von zwei verschiedenen chemischen Milieus. Ein Epithel ist eine lateral kohärente Schicht von Zellen mit bestimmter apikal-basaler Polarität (zur Übersicht Schöck und Perrimon, 2002). Die meisten Epithelien bestehen aus einer einzelnen Zellschicht, nur wenige aus mehreren Zellschichten wie stratifizierte Haut bzw. Schleimhaut (zur Übersicht Schöck und Perrimon, 2002).

Die Epithelgewebe der Haut/Schleimhäute dienen vor allem dem Schutz vor Verletzungen und dem Eindringen von pathogenen Krankheitserregern oder toxischen Substanzen. Daneben versorgen die Epithelgewebe der Schleimhäute das Immunsystem mit einem kontinuierlichen Fluss an Informationen.

Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Begriffe zur epithelialen Polarität eingeführt und einige Epithelmodelle vorgestellt, um schließlich auf Ergebnisse von HSV-1 Infektionsstudien in Epithelmodellen einzugehen.

2.1 Polarität von Epithelien

Epithelzellen sind alle in derselben Art und Weise polarisiert, ansonsten werden sie als mesenchymal bezeichnet (zur Übersicht Fristrom, 1988). Eine Zelle selbst kann als polarisiert bezeichnet werden, wenn morphologische und/oder funktionale Unterteilungen ihrer Kompartimente vorgenommen werden können.

Polarität einfacher Epithelien:

Einfache einschichtige Epithelien wie die Oberfläche des Rectums, der Endocervix und des Gastrointestinal-Traktes besitzen eine Plasmamembran, die in zwei distinkte Domänen geteilt wird (Abb 1.3). Die apikale Domäne ist dem luminalen Trakt zugewandt, während die basolaterale Domäne der serosalen Seite gegenübersteht. Die Domänen werden definiert und separiert durch eine enge Zell-Zell-Verbindung, der Zonula occludens. Diese wird entlang der apikalen Kontaktpunkte lateraler Oberflächen von benachbarten Zellen gebildet. Durch diese enge Verbindung von Zellen wird die Permeabilität zwischen luminaler und serosaler Seite stark limitiert (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1989). Zusätzlich verhindert sie einen Lipidfluss und Proteinaustausch zwischen apikaler und basolateraler Membrandomäne, so dass die Zonula occludens die Grundlage der Apikal-Basolateral-Polarität bildet. Dabei besitzt die apikale Oberfläche eine Polypeptid- und Lipidkomposition unterschiedlich zur basolateralen Domäne. Unterhalb der Zonula occludens liegen weitere Zell-Zell-Verbindungen vor: die Zonula adhaerens sowie die Desmosomen. Die polare Abfolge von Zell-Zell-Verbindungen ist dabei charakteristisch für einschichtige Epithelien (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1989). Die Ausbildung und der Erhalt dieser Polarität wird unterstützt durch das Aktin-Zytoskelett und Mikrotubuli. Einfache Epithelien besitzen polarisierte Endozytose-Wege (distinkt apikal bzw. basolateral), die eine komplexe Folge von Kompartimenten nutzen. Diese Wege können zu Recycling, Degradation oder Transzytose führen, die im Gegenzug die epitheliale Polarität sowie die Barriere-Funktion kontrollieren (zur Übersicht Bomsel und Alfsen, 2003).

Polarität komplexer Epithelien:

Die Besonderheiten der Polarität mehrschichtiger Epithelien wie menschlicher Haut liegen in der Ausbildung mehrerer, unterschiedlich differenzierter Zellschichten. Die menschliche Haut besteht aus insgesamt drei Schichten: der Epidermis als eigentlichem Epithelgewebe, dem Bindegewebe der Dermis und dem fettreichen Bindegewebe der Hypodermis. Während Dermis und Hypodermis die mechanische

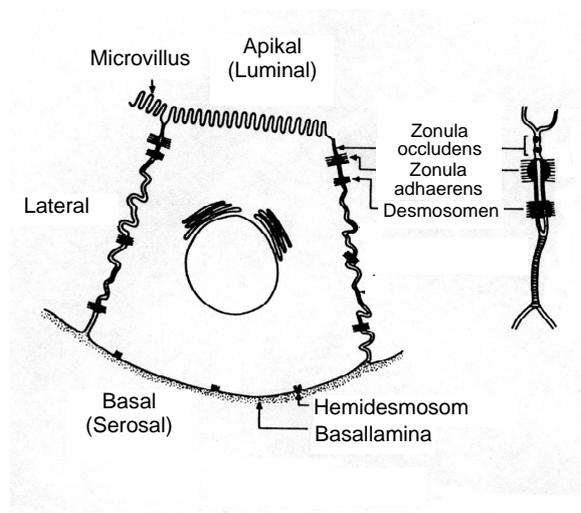


Abb. I.3: Schematische Darstellung einer Epithelzelle im Zellverband
(aus Simons und Fuller, 1985)

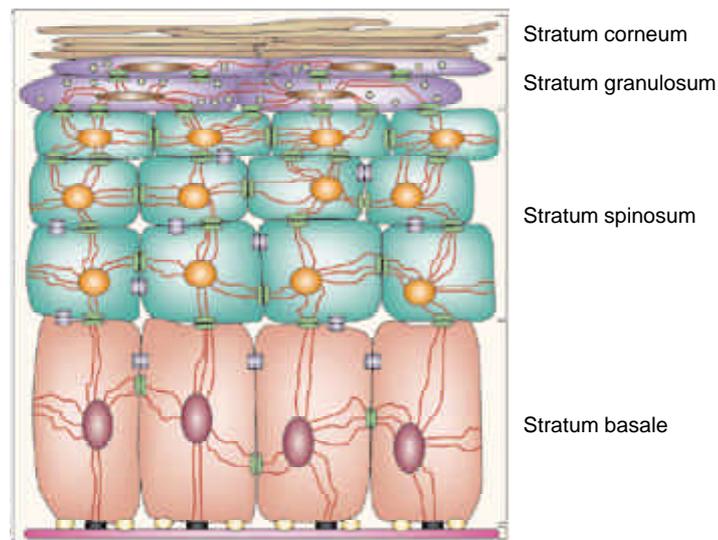


Abb. I.4: Schematische Darstellung des Aufbaus von Hautepidermis
(aus Fuchs und Raghavan, 2002)

Stabilität der Haut durch Bildung der extrazellulären Matrix unterstützen, ist die oberhalb der Basallamina liegende Epidermis das eigentliche polare Epithelgewebe. In diesem Gewebe wandern differenzierende Zellen nach außen, ausgehend von einer basalen Schicht relativ undifferenzierter Stammzellen, dem Stratum basale.

Normalerweise zeigen nur Zellen der basalen Schicht Mitose. Suprabasale Zellschichten sind das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das im Gegensatz zur Schleimhaut in der Haut vorkommende Stratum corneum (Abb. 1.4) (zur Übersicht Fuchs und Raghavan, 2002). Das Stratum spinosum kennzeichnet die Ausbildung vieler Desmosomen, Zellverbindungen, in denen dicke Bündel von Keratinfilamenten verankert sind. Das Stratum granulosum ist eine relativ dünne Schicht von Zellen, die den anfänglichen Verlust von Zellkernen und zytoplasmatischen Organellen sowie die Ausbildung einer Zonula occludens zeigen (zur Übersicht Vasioukhin und Fuchs, 2001). Die darüber im Stratum corneum liegenden schuppenartigen Zellen der Haut besitzen weder Zellkerne noch Organellen und sind angefüllt mit dicht gepackten Keratinen.

2.2 Epithelmodelle

Viele verschiedene Techniken werden benutzt, um Epithelzellen zu kultivieren. Dabei sind Modellsysteme für einfache und stratifizierte Epithelien entwickelt worden, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Einfache Epithelien:

Modellsysteme für einschichtige Epithelgewebe werden von immortalisierten Zelllinien epithelialen Ursprungs repräsentiert, die aus unterschiedlichsten Geweben verschiedener Säugetiere isoliert wurden. Unter diesen nehmen die von Madin und Darby isolierten MDCK (Madin-Darby canine kidney) Zellen eine Sonderstellung ein, insoweit sie das wohl am besten untersuchte und charakterisierte Modellsystem für einfache Epithelien darstellen. Die MDCK Zelllinie wurde aus der Niere eines weiblichen Cocker-Spaniels isoliert (Madin und Darby, 1958) und zeigt Charakteristika eines renalen Epithels. Aus der heterogenen parentalen Zelllinie wurden Anfang der 80er Jahre zwei homogene Subklone isoliert, die sich in Morphologie, transepithelialer Resistenz und Lipidverteilung unterscheiden (zur Übersicht Tucker und Compans, 1993).

Die Kultivierung von polaren Epithelzelllinien wird zum Teil auf porösen Filtermembranen durchgeführt, da sie Konditionen schaffen, die eher der Situation *in vivo* entsprechen (Van Meer und Simons, 1982).

Stratifizierte Hautmodelle:

Ein Epithelmodell, das die *in vivo* Physiologie der Epidermis wiedergibt, ist das organotypische Raft-Kultur-System (Bell *et al.*, 1981; zur Übersicht Meyers und Laimins, 1994). Organotypische Epithelkulturen bestehen aus Keratinozyten, die auf einem dermalen Äquivalent kultiviert werden. Vielfach besteht dieses dermale Äquivalent aus einer Collagen-Matrix, in die Fibroblasten eingebettet sind. Werden diese Kulturen entlang der Luft-Medium-Grenze kultiviert, stratifizieren die Keratinozyten und differenzieren innerhalb von ein bis zwei Wochen in ein ausgebildetes hautähnliches Epithel. Proliferations-defiziente Fibroblasten, die durch Mitomycin-C-Behandlung erhalten werden, können alternativ als dermales Äquivalent dienen (Watt, 1998). Bei dieser Art der Kultivierung findet keine Differenzierung zu einem voll ausgebildeten Epithel statt, da eine Ausbildung des Stratum granulosum bei der allgemein kurzen Kultivierungsdauer nicht beobachtet wird. Neben diesen *in vitro* Modellen können Studien an *ex vivo* Epidermis-Kulturen durchgeführt werden, die aber durch die kurze Lebensdauer der Kulturen limitiert werden.

2.3 Eintritt von HSV-1 in Epithelien

Die Pathogenese der HSV-1 Infektion wird an verschiedenen Tiermodellen vom Kaninchen bis zur Maus untersucht. Obwohl all diese Modelle die epidermale Route der Infektion nutzen, liegt der Fokus der Studien insbesondere auf Untersuchungen zur Latenz und therapeutischen Interventionen. Nur wenige Studien untersuchen den initialen Infektionsprozeß und die Ausbreitung von HSV-1 in einfachen oder voll stratifizierten und differenzierten Epithelien. Dabei bleibt der zugrunde liegende Mechanismus, wie HSV-1 in individuelle Zellen des Gewebeverbandes eindringt, weitgehend unklar.

HSV-1 Infektion einfacher Epithelien:

MDCK Zellen (engl. Madin-Darby Canine Kidney) sowie CaCo-2 Zellen bilden polare einfache Epithelien mit minimaler Stratifizierung in Kultur aus. Untersuchungen zur Adsorption von HSV-1 zeigen keine signifikanten Unterschiede gebundener Virus-

mengen im Vergleich apikaler und basolateraler Membrandomänen humaner CaCo-2 Zellen (Griffiths *et al.*, 1998). Infektionsstudien in polaren MDCK Zellen zeigen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse: Eine signifikant limitierte HSV-1 Infektion und Replikation wird bei der Applikation von Virus zur apikalen Seite polarer MDCK Zellen beobachtet (Hayashi, 1995). In anderen Studien wird die HSV-1 Infektion von MDCK Zellen auf Filtermembranen sowohl von der apikalen als auch von der basolateralen Seite beobachtet (Sears *et al.*, 1991, Tran *et al.*, 2000) oder alternativ mit einer Präferenz für basolaterale Zelloberflächen (Topp *et al.*, 1997).

Infektionsstudien komplexer Epithelien:

In organotypischen dreidimensionalen Keratinozytenkulturen wird eine effiziente HSV-1 Replikation vorwiegend in Zellen der basalen Schicht beobachtet (Visalli *et al.*, 1997). Produktive HSV-1 Infektion wird in organotypischen Epithel-Kulturen nur beobachtet, wenn keine Ausbildung eines Stratum corneums vorliegt (Syrjänen *et al.*, 1996, Hukkanen *et al.*, 1999). Virus-Ausbreitung wird dabei hauptsächlich lateral in den oberen Zellschichten beobachtet (Hukkanen *et al.*, 1999).

3 Das Aktin-Zytoskelett

Das Zytoskelett von eukaryontischen Zellen ist eine hochdynamische Struktur, die kontinuierlich reorganisiert wird, so dass die Zelle ihre Form verändern, sich teilen und auf Umwelteinflüsse reagieren kann. Das Aktin-Zytoskelett besteht aus einem filamentösen Netzwerk, das unter anderem eine entscheidende Rolle in der Zell-Bewegung und der Etablierung epithelialer Polarität spielt (zur Übersicht Vasioukhin und Fuchs, 2001). Auch in der Pathogenese viraler Infektionen besitzt das Zytoskelett entscheidende Funktionen während des Eintritts, der Replikation und dem Austritt von Viren (zur Übersicht Smith und Enquist, 2002).

3.1 Aufbau und Struktur

Die Protein-Untereinheit Aktin, der auch Mikrofilamente genannten Polymere, hat diesem Subtyp des Zytoskeletts seinen Namen verliehen. Aktin ist ein evolutionär

hochkonserviertes Protein, das bis zu 5% des zellulären Proteingehaltes eukaryontischer Zellen ausmachen kann. Aktin-Filamente werden aus dem zytosolisch vorkommenden, globulären Monomer (G-Aktin) durch Polymerisierung gebildet (zur Übersicht Carlier, 1991). Diese auch F-Aktin genannten Filamente haben einen Durchmesser von 7-9 nm und besitzen eine Polarität, die aufgrund der Form der Verknüpfung von Aktin-Monomeren als (+) (schneller polymerisierendes) Ende oder (-) (langsamer polymerisierendes) Ende bezeichnet wird. Aktin-Filamente sind doppelsträngig und helikal angeordnet, treten aber im Gegensatz zu Microtubuli selten als individuelle Einheiten auf. Vielmehr liegen sie durch Aktin-bindende Proteine gebündelt oder netzartig verknüpft vor.

Aktin-Filamente werden zwar verteilt durch das Zellinnere gefunden, sind jedoch am stärksten als Cortex unterhalb der Plasmamembran konzentriert und geben dadurch der Zelle ihre Form. F-Aktin wird in tierischen Zellen dabei in drei Organisationsarten vorgefunden (zur Übersicht Bretscher, 1991): (i) in parallelen Bündeln, wie sie in Filopodia, finger-ähnlichen Membranausstülpungen, gefunden werden. (ii) in antiparallelen, ziehbaren Bündeln, den Stressfibrillen. (iii) in einem Gel-ähnlichem Netzwerk, der Zell-Cortex, wo die Filamente durch zahlreiche orthogonale Verbindungen verknüpft vorliegen. Diese unterschiedlichen Organisationsarten von F-Aktin werden in derselben Zelle moduliert und aufrecht erhalten von einer Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen (zur Übersicht Hartwig und Kwiatkowski, 1991).

3.2 Dynamik des Aktin-Zytoskeletts

Die grundlegenden Erkenntnisse über Funktion und Dynamik des Aktin-Zytoskeletts wurden in Studien der Zellbewegung gesammelt (zur Übersicht Pollard, 2003). Die Dynamik der Zell-Migration ist hochreguliert und kann prinzipiell in drei verschiedene Prozesse unterteilt werden: das Vorschieben der Zell-Front, die Bindung der extrazellulären Matrix durch das Aktin-Zytoskelett und die Zugleistung, die das Aktin-Zytoskelett aufbringt, um den Zellkörper zu transportieren (zur Übersicht Stossel, 1993).

Das Vorschieben der Zell-Front wird durch Aktin-Polymerisierung in F-Aktin reiche Lamellipodia- und Filopodia-Strukturen über die extrazelluläre Matrix in

Migrationsrichtung erreicht. Lamellipodia stellen ein dünnes Netzwerk querverknüpfter Aktin-Filamente dar. Die Bindung cortikalen Aktins an die extrazelluläre Matrix erfolgt über die Bildung von Fokalkontakten (zur Übersicht Burridge *et al.*, 1988). Die Plasmamembran der Zelle ist in diesen Fokalkontakten an Komponenten der extrazellulären Matrix gebunden. Transmembran-Proteine der Fokalkontakte, hauptsächlich Mitglieder der Integrin-Proteinfamilie, binden über die Adapterproteine Talin und Vinculin die Enden von Stressfibrillen. So wird über eine Kette von Proteinwechselwirkungen die Bindung von F-Aktin an die extrazelluläre Matrix erreicht. Der Transport des Zellkörpers kann über aktive Kontraktion von Aktin-Myosin-Bündeln erfolgen oder alternativ passiv über eine cortikale Spannung, die erzeugt wird, wenn die Aktin-Cortex an der Zell-Front vorgeschoben wird (zur Übersicht Stossel, 1993). Um eine kontinuierliche Bewegung der Zelle zu erreichen, müssen die beschriebenen Strukturen wiederholt lokal polymerisiert und depolymerisiert werden. Aktin-Polymerisierung ist bei allen F-Aktin dynamischen Prozessen die treibende Kraft. Ihre lokale Regulation erfolgt über die Proteinfamilie der Rho GTPasen, auf die später näher eingegangen wird. An den molekularen Mechanismen von Aktin-Polymerisierung ist darüber hinaus eine Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen direkt beteiligt (zur Übersicht Hartwig und Kwiatkowski, 1991). Entscheidend ist häufig die Keimbildung von Aktin-Filamenten. Der aus sieben Untereinheiten bestehende Multiproteinkomplex Arp2/3 (engl. actin related protein) und Profilin sind die am besten untersuchten Proteine, die an Keimbildung und Elongation von Filamenten mitwirken (Mullins *et al.*, 1998). Regulatorisch wirken ferner Proteine der Mena/VASP-Familie (engl. mammalian enabled und vasodilator stimulated phosphoprotein) (Gertler *et al.*, 1996; Halbrugge *et al.*, 1990). Die Aktin-bindenden Mena/VASP-Proteine sind in Bereichen der Aktin-Dynamik konzentriert und fungieren als positive Regulatoren der Aktin-Polymerisierung (zur Übersicht Bear *et al.*, 2001; Hu und Reichardt, 1999; Reinhard *et al.*, 2001). So lokalisieren diese Proteine in Fokalkontakten, entlang von Stressfibrillen, in den Spitzen von Filopodia und entlang Lamellipodia (Gertler *et al.*, 1996; Haffner *et al.*, 1995, Reinhard *et al.*, 1992, Rottner *et al.*, 1999). Ob Mena/VASP-Proteine allerdings direkt wie der Arp2/3-Komplex an der Keimbildung und Elongation von Aktin-Filamenten beteiligt sind oder indirekt über kompetitive Hemmung von Aktin-depolymerisierenden Proteinen

wirken, wird nach wie vor kontrovers diskutiert (zur Übersicht Krause *et al.*, 2002). Aktin-depolymerisierende Proteine können im Gegenzug über Bindung an freie (+) Enden von Aktin-Filamenten, an denen die Polymerisationsrate am höchsten ist, eine weitere Polymerisierung verhindern (Weeds und Maciver, 1993).

3.3 Interaktionen von HSV-1 mit dem Zytoskelett

Viren nutzen die zelluläre Maschinerie des Zytoskeletts unter anderem zum intrazellulären Transport während des Ein- und Austritts aus der Wirtszelle sowie häufig zur Exozytose (zur Übersicht Smith und Enquist, 2002). Direkte Hinweise zur Nutzung des Zytoskeletts durch HSV-1 beschränken sich weitgehend auf einen microtubuli-basierten Transportweg der Kapside (zur Übersicht Sodeik, 2000). Während des Eintritts von HSV-1 in nicht neuronale Zelllinien werden Kapside mit Microtubuli assoziiert beobachtet (Sodeik *et al.*, 1997). Werden Microtubuli durch Inhibitoren depolymerisiert, wird eine Reduktion des HSV-1 Transports beobachtet (Kristensson *et al.*, 1986; Sodeik *et al.*, 1997, Topp *et al.*, 1994). Die Überexpression von p50/Dynamitin führt zur Zerlegung des Dynein-Motor-Komplexes von Microtubuli und bei der HSV-1 Infektion von nicht-neuronalen Zellen zu einer Reduktion des viralen Transports (Döner *et al.*, 2002). Der retrograde Transport von HSV-1 Partikeln in Axonen ist durch virale GFP-markierte Strukturproteine visualisiert worden. Dabei bewegen sich HSV-1 Partikel mit einer Geschwindigkeit von 2,2 $\mu\text{m/s}$ (Bearer *et al.*, 2000). Ähnliche Transportgeschwindigkeiten entlang von Microtubuli sind für das Pseudorabies Virus (PRV), einem HSV-1 eng verwandten Herpesvirus, bestimmt worden. Während des Eintritts wird PRV Transport hauptsächlich in retrograder Transportrichtung beobachtet, während der Transport bei Austritt in anterograder Richtung stattfindet. (Smith *et al.*, 2001; zur Übersicht Smith und Enquist, 2002). Der intrazelluläre Transport von Herpesvirus Partikeln findet somit während des Ein- und Austritts in entgegengesetzter Richtung entlang von Microtubuli statt.

Im Gegensatz zu Untersuchungen zum microtubuli-basierten Transport von HSV-1 Partikeln ist relativ wenig bekannt über eine Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts an der HSV-1 Infektion. HSV-1 Internalisierung wird durch aktin-depolymerisierende

Substanzen gehemmt, so dass Rosenthal *et al.* (1985) eine Rolle für F-Aktin für den erfolgreichen Eintritt in HEP-2 Zellen postulieren. FRAP-Experimente (engl. fluorescence recovery after photobleaching) zeigen eine Zunahme der Mobilität von Zelloberflächenproteinen bei Eintritt von HSV-1 (Rosenthal *et al.*, 1984, Rosenthal *et al.*, 1988). Eine Modulation der Verankerung von Membranproteinen im kortikalen Aktin-Zytoskelett durch die Fusion der Virus-Hüllmembran und Plasmamembran wird dabei als zugrunde liegender Mechanismus postuliert. Obwohl zahlreiche Studien zur Beteiligung des Aktin-Zytoskeletts bei dem viralen Austritt aus der Wirtszelle publiziert wurden, konnte sich keine einheitliche Idee über eine Funktionalität ausbilden. In der späten Phase der Infektion treten Veränderungen der Zellmorphologie aufgrund des zytopathischen Effekts der Zellyse auf. Dabei ist die Signifikanz der in Zellkulturen auftretenden Zellyse für Virus-Ausbreitung *in vivo* nicht klar. Mutierte Herpesviren, die keine infektiösen Partikel in Zellkultur in das Medium freisetzen können, verbreiten sich im Nervensystem identisch zu Wildtyp-Virus durch direkte Zelle-zu-Zelle-Ausbreitung (Heffner *et al.*, 1993, Mulder *et al.*, 1996). Eine Unterscheidung der morphologischen Veränderungen des zytopathischen Effekts und funktioneller, struktureller Veränderungen des Zytoskeletts, die der Ausschleusung des Virus oder der Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle dienen könnten, ist außerordentlich schwierig, da der zytopathische Effekt sowie der Austritt und die Ausbreitung des Virus zeitnah auftreten.

4 Signaltransduktion der Rho-ähnlichen GTPasen

Die Ausbildung zellulärer Polarität ist eng verbunden mit der Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen. Diese sind wiederum verankert im Aktin-Zytoskelett. So besteht eine funktionelle Wechselwirkung zwischen Polarität und Aktin-Dynamik, die sich gegenseitig beeinflusst. Als Schaltzentrale dieser Wechselwirkungen dient die Proteinfamilie der Rho-ähnlichen GTPasen, die als molekulare Schalter eine zusammenfassende Regulationsebene bilden (Rojas *et al.*, 2001; zur Übersicht Schmitz *et al.*, 2000).

4.1 Rho-ähnliche GTPasen

Rho-ähnliche GTPasen sind Signaltransduktionsproteine der Ras-Superfamilie. Sie binden Guanin-Nukleotide (GDP oder GTP) und hydrolysieren GTP. Dabei üben sie eine molekulare Schalterfunktion aus. Die Proteine sind aktiv, wenn sie GTP gebunden haben, und inaktiv, falls sie GDP gebunden vorliegen (zur Übersicht Hall, 1998). Obwohl bereits 21 Rho-ähnliche GTPasen aus Säugetieren bekannt sind, bezieht sich die intensivste Forschung auf drei Rho GTPasen, RhoA, Rac1 und Cdc42. RhoA (engl. Ras homologous A) ist die erste identifizierte Rho GTPase, die der Familie den Namen gab (Madaule und Axel, 1985). Rac1 (engl. Ras related C3 botulinum toxin substrate 1) wurde auf der Grundlage einer humanen cDNA identifiziert (Didsbury *et al.*, 1989). Cdc42 wurde zunächst als beteiligtes Protein in der Ausbildung von Zellpolarität in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert, kurze Zeit später das humane Homolog (Johnson und Pringle, 1990; Shinjo *et al.*, 1990).

4.2 Biologische Aktivitäten der Rho-ähnlichen GTPasen

Über 2000 Publikationen beschreiben die Funktionen von RhoA, Rac1 und Cdc42 in einer Fülle von fundamentalen biologischen Prozessen wie Zell-Adhäsion und -Motilität, Proliferation, Transformation, Apoptose und Differenzierung. Die Aktivität der Rho-GTPasen wird dabei zunächst in Verbindung mit der Organisation des Zytoskeletts gebracht. Durch Studien in Fibroblasten ist nachgewiesen worden, dass Rac1 Zell-Spreizung durch Membranprotusion und Lammellipodia-Ausbildung kontrolliert (Ridley *et al.*, 1992). RhoA hingegen reguliert die Zellkontraktion durch Ausbildung von kontraktile Aktin-Stressfibrillen (Ridley und Hall, 1992). Cdc42 schließlich ist über die Ausbildung von Filopodia ebenfalls an Zell-Motilität und Zell-Spreizung beteiligt (Nobes und Hall, 1995). Neben ihrer Rolle in Zell-Motilität und Zell-Matrix-Adhäsion sind Rho-GTPasen an der Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen wie der Zonula occludens und Zonula adhaerens beteiligt (zur Übersicht Hall, 1998; Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997). Viele Schlussfolgerungen auf die zellulären Funktionen der Rho GTPasen beruhen auf Untersuchungen nach Expression konstitutiv-aktiver bzw. dominant-aktiver oder dominant-inaktiver Mutanten (zur Übersicht Feig, 1999). Dabei aktivieren dominant-

aktive Isoformen ihre Effektoren über Bindung, die auch ohne GTP-Bindung durch eine veränderte Konformation der GTPase ermöglicht wird. Dominant-inaktive Isoformen wirken über kompetitive Bindung von Aktivatoren der Rho GTPasen, ohne dabei Effektoren zu binden und ein Signal weiterzugeben. So wird eine Aktivierung endogener Rho GTPasen durch die Titration von Aktivatoren vermindert.

Im Folgenden werden Prinzipien der Signaltransduktion von Rho GTPasen sowie einige beteiligte Komponenten der Signaltransduktionswege vorgestellt, soweit sie Zell-Motilität und / oder Zell-Zell-Adhäsion beeinflussen.

4.3 Wechselseitige Signaltransduktion von Rho GTPasen

Die Prozesse der Zellmigration müssen in einer koordinierten Folge ablaufen, um eine kontinuierliche Bewegung zu erreichen. So ist es nicht verwunderlich, dass auch ihre Regulatoren sich wechselseitig beeinflussen. Eine lineare Kaskade der Aktivierung von Rho GTPasen existiert für die Bildung spezifischer F-Aktin Strukturen in Fibroblasten. Cdc42 regt die Bildung von Filopodia an, die gefolgt ist von Rac1-abhängiger Lamellipodia-Ausbildung (Nobes und Hall, 1995). Rac1 im Gegenzug besitzt die Fähigkeit, nicht nur die Ausbildung von Lamellipodia zu fördern sondern auch die Bildung von Stressfibrillen durch die Aktivierung von RhoA zu ermöglichen (Ridley *et al.*, 1992). Obwohl dieser Prozeß in bestimmten zellulären Systemen auftritt, ist in den meisten Situationen RhoA den anderen GTPasen gegenübergestellt. In Epithelzellen führt die Aktivierung von Rac1 und Cdc42 zu Stressfibrillen-Abbau (Zondag *et al.*, 2000). Die Inhibierung von RhoA kann hingegen die Zytoskelett-Veränderungen hervorrufen, die denen von aktiviertem Rac1 und Cdc42 entsprechen.

Serielle sowie gleichzeitige Aktivierung von Rho GTPasen kann über drei Klassen von Regulationsproteinen erfolgen: RhoGAPs (engl. Rho GTPase-activating proteins), RhoGDIs (engl. Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors) und RhoGEFs (engl. Rho guanine nucleotide exchange factors) (zur Übersicht Böttner und Van Aelst, 1999; Bishop und Hall, 2000). RhoGAPs fördern den inaktiven Status einer GTPase durch Erhöhung der intrinsischen Nukleotid-Hydrolyse-Geschwindigkeit. RhoGDIs interferieren in variablem Maße mit beiden Prozessen,

dem Austausch von GDP zu GTP sowie GTP-Hydrolyse. RhoGEFs fördern den aktiven GTP-gebundenen Zustand und binden die GTPase zu spezifischen subzellulären Orten. Die Spezifität dieser Regulatoren kann variieren. Viele RhoGEFs besitzen eine klare Spezifität, so z.B. Tiam1 für Rac1. RhoGAPs und RhoGDIs besitzen meist eine breitere Spezifität. Diese sowie einige wenige RhoGEFs können auf zwei oder drei Rho GTPasen gleichzeitig wirken, so z.B. Dbp, das gleichzeitig Cdc42, Rac1 und RhoA aktivieren kann. Über 100 dieser Regulatorproteine wurden bisher identifiziert. Ihre Aktivierung erfolgt wahrscheinlich über Phosphorylierung und/oder Translokation durch extrazelluläre Stimuli. Dadurch konvertieren sie ein Signal wie z.B. Rezeptorbindung in die Aktivierung einer oder mehrerer RhoGTPasen.

4.4 Effektoren von RhoGTPasen in Epithelzellen

Zahlreiche Effektoren von Cdc42, Rac1 und RhoA wurden identifiziert. Von diesen vermitteln einige die bereits beschriebene Aktivitäten dieser GTPasen in bezug auf die Zell-Migration und Zell-Adhäsion (Abb. 1.5).

Effektoren von Cdc42 und Rac1:

Das ubiquitär exprimierte und neuronal angereicherte N-WASP (engl. neuronal Wiskott-Aldrich-Syndrom protein) ist ein Gerüst-Protein spezifisch für Cdc42 (Miki *et al.*, 1996; Kolluri *et al.*, 1996). N-WASP sowie der Arp2/3-Komplex sind beide essentiell für die Cdc42-abhängige Aktin-Filament-Bildung in Fildopodia (Welch *et al.*, 1997; Rohatgi *et al.*, 1999).

MRCKs (engl. Myotonic dystrophy kinase-related Ccd42-binding kinases) sind Cdc42-spezifische Effektoren, welche die leichte Kette des Myosin II Moleküls (MLC, engl. myosin light chain) über eine ROK-Domäne phosphorylieren können (Leung *et al.*, 1998). Phosphorylierung der MLC ist Voraussetzung für die Bildung von Actomyosin-Komplexen und Kontraktion. Das Gleichgewicht zwischen MLC und

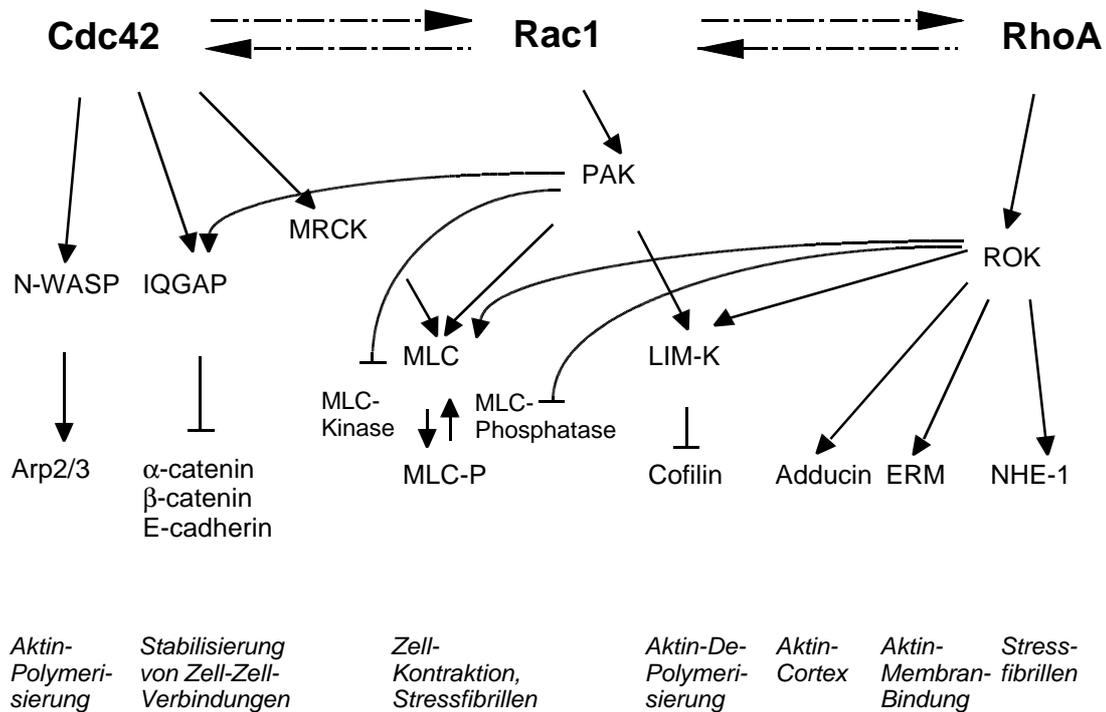


Abb. I.5: Übersicht von ausgewählten Signaltransduktionswegen der Rho GTPasen

Transmembran-Rezeptoren und deren Liganden aktivieren Rho GTPasen durch GEFs (nicht gezeigt). Aktivierte Rho GTPasen binden und aktivieren Proteinkinasen, wie MRCK, PAK und ROK. Diese und weitere Effektoren interagieren ihrerseits mit verschiedenen Proteinen und bewirken spezifische Effekte auf das Aktin-Zytoskelett (untere Reihe).

(modifiziert nach Schmitz *et al.*, 2000)

Phospho-MLC reguliert die Kraft notwendig zur Translokation des Zellkörpers während der Zell-Migration. Dabei ist dieses Gleichgewicht hauptsächlich reguliert durch die entgegengesetzten Effekte der MLC-Kinase (MLCK) und der MLC-Phosphatase.

PAK (p21-aktivierte Kinase) ist eine Ser/Thr-Kinase, die als Effektor sowohl von Cdc42 als auch von Rac1 aktiviert werden kann (Manser *et al.*, 1994). PAK besitzt eine wichtige Rolle in Aktin-Dynamik sowie Zell-Adhäsion. Phosphorylierung der MLCK durch PAK führt zu einer Abnahme von Phospho-MLC (Sanders *et al.*, 1999). Folglich resultiert dieser Prozeß in einer Abnahme von Stressfibrillen und

Fokalkontakten, die auf eine Rolle in Zell-Motilität hindeuten. Das Aktin-Zytoskelett wird des Weiteren durch PAK über Phosphorylierung und nachfolgende Aktivierung der LIM-Kinase reguliert. Phospho-LIM-Kinase phosphoryliert das Aktin-depolymerisierende Protein Cofilin. Wenn Rac1 aktiviert vorliegt, wird Aktin-Depolymerisierung inhibiert, so dass starke Lamellipodia-Bildung gefördert wird (Arber *et al.*, 1998, Edwards *et al.*, 1999).

Der Cdc42- und Rac1-Effektor IQGAP reguliert Zell-Zell-Adhäsion vermutlich durch Aktin-Polymerisierung und Ausschluß von β -Catenin, einem Adhäsions-Komplex-Molekül. IQGAP kompetitiert mit α -Catenin bei der Bindung zu β -Catenin und verhindert so eine Bindung des E-Cadherin/ α -Catenin/ β -Catenin-Komplexes zum Aktin-Zytoskelett. Es folgt der Abbau von Zell-Zell-Kontakten. Dieser Prozeß kann unterbunden werden durch die Bindung von aktiviertem Cdc42 zu IQGAP (Kuroda *et al.*, 1996, Kuroda *et al.*, 1998).

Effektoren von RhoA:

Die wichtigste Familie von RhoA Effektoren ist die ROK-Familie (engl. Rho-associated kinases). ROK ist wie PAK eine Ser/Thr-Kinase, die zahlreiche weitere Effektoren aktivieren kann. ROK phosphoryliert und inaktiviert dabei die MLC-Phosphatase (Kimura *et al.*, 1996). Zusätzlich kann ROK die MLC direkt phosphorylieren (Amano *et al.*, 1996). Die Anhäufung phosphorylierter MLC resultiert in erhöhter Actomyosin- und Stressfibrillen-Bildung, somit auch in Adhäsion und Kontraktionsfähigkeit. Die Stabilisierung von F-Aktin wird durch die Phosphorylierung von LIM-Kinase und nachfolgende Inaktivierung Cofilins durch ROK erreicht (Maekawa *et al.*, 1999). ROK phosphoryliert des Weiteren Adducin (Fukata *et al.*, 1999), das wie Spectrin ein wichtiger Bestandteil des kortikalen Aktin-Netzwerkes und potentiell an der Zell-Migration beteiligt ist. ERM Proteine (Ezrin/Radexin/Moesin) können ebenfalls durch ROK phosphoryliert werden (Matsui *et al.*, 1998). Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Verbindung von Plasmamembran und Aktin-Zytoskelett. Ein weiteres ROK-Substrat ist NHE-1, ein ubiquitäres Na^+/H^+ -Austausch Protein, das Stressfibrillen-Bildung fördert (Tominaga *et al.*, 1998).

II. Zielsetzung

Die mechanistische und molekulare Grundlage für den Eintritt von HSV-1 in die polaren Epithelzellen der Haut- oder Schleimhaut-Epidermis, den primären Wirtszellen von HSV-1 *in vivo*, ist trotz zahlreicher Studien in unpolarierten Zellkultur-Modellen weiterhin unklar. Daher bestand das zentrale Interesse der vorliegenden Arbeit darin, zum Verständnis der Eintrittsmechanismen von HSV-1 in polare Epithelien beizutragen.

Zunächst sollte der primäre Ort des Viruseintritts in polaren Epithelmodellen analysiert werden. Dazu wurden Eintritts-Studien in der epithelialen MDCKII Zelllinie, primären humanen Keratinozytenkulturen sowie humaner Vorhaut-Epidermis durchgeführt.

Im Folgenden sollten molekulare Determinanten des Virus-Eintritts untersucht werden. Dabei wurde die Lokalisierung des HSV-1 Korezeptors Nectin-1 in MDCKII Zellen, primären Keratinozyten und Vorhaut-Epidermis untersucht. Die Beteiligung des HSV-1 Glykoproteins gD am viralen Eintritt sollte mittels Antikörper-Blockierungsexperimente analysiert werden.

Die Aktin-Cortex bildet neben der Plasmamembran eine natürliche Barriere für den Zugang von HSV-1 zum Zytoplasma und zum Kern der Wirtszellen. Daher sollte untersucht werden, inwieweit die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts einen Einfluss auf den HSV-1 Eintritt hat. Aktin-dynamische Prozesse sind ein hochregulierter Vorgang. Eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion zum Aktin-Zytoskelett spielen die Rho-ähnlichen GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA. Durch die Expression von konstitutiv aktiven bzw. dominant inaktiven Rho GTPasen sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit die durch Cdc42, Rac1 und RhoA regulierten Signalkaskaden den Eintritt von HSV-1 in Epithelzellen beeinflussen. Schließlich sollte die Manipulation Aktin-dynamischer Prozesse im HSV-1 Infektionsverlauf in MDCKII Zellen untersucht werden.

III. Materialien und Methoden

1 Materialien

1.1 Chemikalien

Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose (Standard, für Agarosegele)	Eurobio, Les Ulis Cedex, B
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extract USA	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
CITIFLUOR AF100-Fluoreszenz-Einbettmedium	CITIFLUOR Ltd., London, UK
Chloroform	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
DAKO-Fluoreszenz-Einbettmedium	DAKO, Carpinteria, Kalifornien, USA
Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate (dNTPs)	Boehringer, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Baker Chemicals, Deventer, NL
Essigsäure	Fischer Scientific, Düsseldorf
Ethanol	Baker Chemicals, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum (FCS)	Boehringer, Mannheim
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Baker Chemicals, Deventer, NL
Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Isopropanol	Baker Chemicals, Deventer, NL
Kaliumacetat	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Kaliumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kristall-Violett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Magnesiumsulfat	Baker Chemicals, Deventer, NL
Manganchlorid 4-Hydrat	Baker Chemicals, Deventer, NL
Methanol	Baker Chemicals, Deventer, NL
MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat (NaAc)	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natriumchlorid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natriumhydrogencarbonat	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natriumhydroxid	Baker Chemicals, Deventer, NL
Natriumsiliciumwolframat	Plano, Wetzlar
Paraformaldehyd	Fluka, Steinheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA, Linz, AU
Phenol	Fluka, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Baker Chemicals, Deventer, NL
Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol)	Eurobio, Les Ulis Cedex, B
Triton-X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol)	Sigma, Steinheim
Tryptose Broth	DIFCO, Detroit, USA
Zinkacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim

1.2 Kulturmedien

1.2.1 Bakterienmedien

LB (Luria-Bertani) - Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

Die angegebenen Mengen wurden jeweils in 1000 ml H₂O gelöst und mit 1M NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Für Festmedien wurden 9 g Agar-Agar hinzugefügt.

Je nach Resistenzmarker der verwendeten Plasmide wurden folgende Antibiotika in den angegebenen Endkonzentrationen kurz vor Gebrauch hinzugegeben:

- Ampicillin: 100 µg/ml

- Kanamycin: 25 µg/ml

YT Medium (Sambrook *et al.*, 1989):

Trypton	8 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	2,5 g

Die angegebenen Mengen wurden jeweils in 1000 ml H₂O gelöst und mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt

1.2.2 Säugerzellkultur-Medien

Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM), hoher Zuckergehalt: Invitrogen GmbH, Karlsruhe, (Kat.-Nr. 41966)

DMEM, niedriger Zuckergehalt: Invitrogen GmbH, Karlsruhe, (Kat.-Nr. 31885)

Dem Medium wurde 10% FCS (fötales Kälberseum un 100 IU/ml (1%) Penicillin/Streptomycin (P/S) beigemischt.

Keratinozyten-Kultur-Medium: Geschenk von Ingo Haase, Hautklinik der Universität zu Köln

(Zusammensetzung:
Ham's F12 / DMEM 1:3 (Invitrogen),
1,8 mM Ca²⁺, 10% FCS, 100 IU/ml P/S,
1,8·10⁻⁴ M Adenin, 2 mM Glutamin,
0,5 µg/ml Hydrocortison, 10 ng/ml EGF ('Epidermal Growth Factor'),
1·10⁻¹⁰ M Cholera Enterotoxin,
5 µg/ml Insulin, 50 µg/ml Vitamin C)

1.3 Enzyme

Für die Reaktionen mit Restriktionsenzymen wurden in dieser Arbeit die von den Firmen mitgelieferten Reaktionspuffer verwendet. Die Inkubation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Restriktionsenzyme:

BamHI	Boehringer, Mannheim
EcoRI	Boehringer, Mannheim
XhoI	Boehringer, Mannheim
XbaI	Boehringer, Mannheim

Weitere Enzyme:

Dispase II	Boehringer, Mannheim
Phosphatase (SAP)	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach/Taunus
Taq Polymerase	Promega, Heidelberg

1.4 Größenstandards

DNA-Größenmarker (1 kb-Leiter)	GibcoBRL, Karlsruhe
--------------------------------	---------------------

1.5 Säulen und Säulenmaterial

Plasmid-Maxi-Kit	QIAGEN, Hilden
QIAEX Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Qiaquick Spin Kit	QIAGEN, Hilden

1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, bezogen oder wurden aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf zur Verfügung gestellt.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Verwendung
pRK5myc_seq	CAA CTG CAC CTC GGT TC	Sequenzierung
T7 Primer	AAT ACG ACT CAC TAT AG	Sequenzierung
US3 up	GGG GGA AGC TTG CCA CCA TGG CCT GTC GTA AGT TTT G	PCR Primer (Us3)
US3 down	GGG GGG TGA CCC TGT TGA AAC AGC GGC AA	PCR Primer (Us3)

1.7 Plasmide

pRK5myc WT RhoA	Geschenk von Alan Hall, University College London, UK
pRK5myc L63 RhoA	Geschenk von Vania Braga, Imperial College, London, UK
pRK5myc N19 RhoA	Geschenk von Alan Hall, University College London, UK
pRK5myc WT Rac1	Geschenk von Alan Hall, University College London, UK
pRK5myc L61 Rac1	Geschenk von Vania Braga, Imperial College, London, UK
pRK5myc N17 Rac1	Geschenk von Ingo Haase, Hautklinik der Universität zu Köln
pRK5myc L61Rac1 37A	Geschenk von Ingo Haase, Hautklinik der Universität zu Köln
pRK5myc L61Rac1 40C	Geschenk von Ingo Haase, Hautklinik der Universität zu Köln
pRK5myc WT Cdc42	Geschenk von Alan Hall, University College London, UK
pRK5myc L61 Cdc42	Geschenk von Vania Braga, Imperial College, London, UK
pRK5myc N19 Cdc42	Geschenk von Ingo Haase, Hautklinik der Universität zu Köln
pRK5myc C3 toxin	Geschenk von Ingo Haase, Hautklinik der Universität zu Köln
pRK5myc L107F PAK-1	Geschenk von Ingo Haase, Hautklinik der Universität zu Köln
pCMV6 WT PAK-1	Geschenk von Stephan Ludwig, Zentrum für Molekulare Medizin, Universität zu Düsseldorf
pCMV6 K299R PAK-1	Geschenk von Stephan Ludwig, Zentrum für Molekulare Medizin, Universität zu Düsseldorf
pCS2myc N-WASP Fragment	Geschenk von Vania Braga, Imperial College, London, UK
pEGFP-C1	Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA
pcDNA 3.1 myc/his C	Invitrogen GmbH, Carlsbad, CA, USA

pIE1-ECFP-ICP0	Geschenk von Roger Everett, Medical Research Council Virology Unit, Glasgow, UK
pUs3 myc	Auf Basis von pcDNA 3.1 myc/his C kloniertes Plasmid mit Insertion von HSV-1 Us3

Die als Geschenke erhaltenen Plasmide wurden amplifiziert und über Restriktion und Ansequenzierung vor ihrer Verwendung überprüft.

1.8 Antiseren, Antikörper und Substanzen für die Immunfluoreszenz

1.8.1 Primäre Antikörper und Antiseren

AcMNPV Kapsid:

Der monoklonale Antikörper Mab39 gegen das AcMNPV Kapsid wurde von L. Volkman, University of California, Berkeley, USA, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:100 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

C-myc Antikörper (Maus):

Der monoklonale Antikörper 9E10 gegen das c-myc Epitop wurde von der Firma Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 (Stamm-Lösung: 200µg/ml) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

E-cadherin / Uvomorulin (Ratte):

Der monoklonale Antikörper DECMA1 gegen das canine Protein E-Cadherin (Uvomorulin) wurde von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

E-Cadherin (Maus):

Der monoklonale Antikörper hecD gegen das humane Protein E-Cadherin wurde von C. Niessen, Hautklinik der Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:500 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

gp 64 Antikörper:

Der monoklonale gp64 Antikörper wurde von G. Blissard, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde für gD-Blockierungsexperimente verwendet.

HSV-1 gD Antikörper:

gD (DL11, Maus)

Der monoklonale Antikörper DL11 gegen das HSV-1 Glykoprotein D (gD) wurde von G. Cohen, Department of Microbiology, University of Pennsylvania, USA, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde für gD-Blockierungsexperimente verwendet.

gD (IV-3-4, Maus)

Der monoklonale Antikörper DL11 gegen das HSV-1 Glykoprotein D (gD) wurde von J. Kühn, Institut für Mikrobiologie, Universität zu Münster, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde für gD-Blockierungsexperimente verwendet.

HSV-1 Kapsid Antikörper (Maus):

Der monoklonale Antikörper DM 165 gegen das HSV-1 Kapsid wurde von F. Rixon, Medical Research Council/Virology Unit, University of Glasgow, UK, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:100 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

ICP0 Antisera (Kaninchen):

Die polyklonalen Antisera r190/r191 gegen das HSV-1 Protein ICP0 wurde von R. Everett, Medical Research Council/Virology Unit, University of Glasgow, UK, zur Verfügung gestellt. Die Antisera wurden in der Verdünnung 1:500 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

ICP0 Antikörper (Maus):

Der monoklonale Antikörper Mab11060 gegen das HSV-1 Protein ICP0 wurde von R. Everett, Medical Research Council/Virology Unit, University of Glasgow, UK, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

IE2 Antiserum (Maus):

Das polyklonale Antiserum gegen das AcMNPV Protein IE2 wurde aus der Laborsammlung von D. Knebel-Mörsdorf zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde für gD-Blockierungsexperimente verwendet.

Mena Antiserum (Kaninchen):

Das polyklonale Antiserum 2197 gegen das zelluläre Protein Mena wurde von F. Gertler, Massachusetts Institute of Technology, Boston, Massachusetts, USA, zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:500 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Nectin-1/HveC Antikörper und Antisera:

CK41 (Maus)

Der monoklonale Antikörper CK 41 gegen humanes Nectin-1 wurde von G. Cohen, Department of Microbiology, University of Pennsylvania, USA, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:250 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

CK8 (Maus)

Der monoklonale Antikörper CK8 gegen humanes Nectin-1 wurde von G. Cohen, Department of Microbiology, University of Pennsylvania, USA, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper zeigte keine Reaktivität für die indirekte Immunfluoreszenz.

R165 (Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum R165 (Kaninchen) gegen humanes Nectin-1 wurde von G. Cohen, Department of Microbiology, University of Pennsylvania, USA, zur

Verfügung gestellt. Der Antikörper zeigte keine Reaktivität für die indirekte Immunfluoreszenz.

R1.302.12 (Maus)

Der monoklonale Antikörper R1.302.12 (Maus) gegen humanes Nectin-1 wurde von M. Lopez, Institut de Cancérologie et d'Immunologie de Marseille, FR, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper zeigte keine Reaktivität für die indirekte Immunfluoreszenz.

TK (Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum TK (Kaninchen) gegen den C-Terminus von humanem Nectin-1 wurde von Y. Takai, Department of Molecular Biology and Biochemistry, Osaka University, Japan, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper zeigte keine Reaktivität für die indirekte Immunfluoreszenz.

Phospho-Tyrosin (Maus):

Der monoklonale Antikörper 4G10 gegen das Phospho-Tyrosin Epitop wurde von der Firma Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:1000 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

VASP Antiserum (Kaninchen):

Das polyklonale Antiserum 2010 gegen das zelluläre Protein VASP wurde von F. Gertler, Massachusetts Institute of Technology, Boston, Massachusetts, USA, zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:500 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Vinculin Antikörper (Maus):

Der monoklonale Antikörper V9131 gegen das zelluläre Protein Vinculin wurde von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:200 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt (Stamm-Lösung: 7,7 mg/ml).

ZO-1 Antikörper (Ratte):

Der monoklonale Antikörper mAB1520 gegen das zelluläre Protein ZO-1 (Zonula Occludens 1) wurde von der Firma Chemicon, Temecula, Kalifornien, USA, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:250 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Humanes Mischserum:

Das zur Plaque-Test-Methode verwendete humane Mischserum wurde von verschiedenen Spendern erhalten und auf anti-HSV-Reaktivität getestet. Nach Mischung erfolgte die Lagerung bei -20 °C. Es wurde in einer Konzentration von 0,5 % dem Wachstumsmedium der Zellen beigemischt.

1.8.2 Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Der AF488-gekoppelte anti-Maus spezifische Antikörper des Typs IgG, generiert in Ziegen, wurde von der Firma Molecular Probes, Leiden, NL, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 (Stamm-Lösung: 2 mg/ml) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Der AF488-gekoppelte anti-Kaninchen spezifische Antikörper des Typs IgG, generiert in Ziegen, wurde von der Firma Molecular Probes, Leiden, NL, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 (Stamm-Lösung: 2 mg/ml) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Der AF488-gekoppelte anti-Ratte spezifische Antikörper des Typs IgG, generiert in Ziegen, wurde von der Firma Molecular Probes, Leiden, NL, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:1000 (Stamm-Lösung: 2 mg/ml) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Der AF555-gekoppelte anti-Kaninchen spezifische Antikörper des Typs IgG, aus Ziegen, wurde von der Firma Molecular Probes, Leiden, NL, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Der AF555-gekoppelte anti-Maus spezifische Antikörper des Typs IgG generiert in Ziegen wurde von der Firma Molecular Probes, Leiden, NL, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Der Cy3-gekoppelte anti-Kaninchen spezifische Antikörper des Typs IgG, generiert in Ziegen, wurde von der Firma Amersham, Buckinghamshire, GB bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:1000 (Stamm-Lösung: 1 mg/ml) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Der Cy3-gekoppelte anti-Maus spezifische Antikörper des Typs IgG generiert in Schafen wurde von der Firma Dianova/Jackson, Hamburg, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Der FITC-gekoppelte anti-Ratte spezifische Antikörper des Typs IgG, generiert in Ziegen, wurde von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:50 für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

1.8.3 Fluorochrom-gekoppelte Phalloidine

FITC-gekoppeltes Phalloidin aus *Amanita phalloides* wurde von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen. FITC-gekoppeltes Phalloidin wurde in der Verdünnung 1:1000 (Stamm-Lösung 0,2 mg/ml in Methanol) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

TRITC-gekoppeltes Phalloidin aus *Amanita phalloides* wurde von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen. TRITC-gekoppeltes Phalloidin wurde in der Verdünnung 1:2000 (Stamm-Lösung 0,2 mg/ml in Methanol) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

1.9 Inhibitorsubstanzen

Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, Steinheim
Jasplakinolide	Molecular Probes, Leiden, NL
Monensin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Toxin B	Geschenk von Ingo Haase, Hautklinik der Universität zu Köln

1.10 Bakterien

Escherichia coli

- DH10B: F^- , $\Phi 80d/lacI^qZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)$, U169, *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, (r_k^- - m_k^+), *deoR*, *thi-1*, *supE44*, λ^- , *gyrA96*, *relA1*;
(Hanahan, 1985)

1.11 Säugetier-Zellkulturen

Säugerzelllinie BHK21 (Stoker und MacPherson, 1964):

BHK21 Zellen wurden von der American Type Culture Collection, Manassas, USA (ATCC) bezogen.

Säugerzelllinie HeLa (Scherer *et al.*, 1953):

HeLa Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ) bezogen.

Säugerzelllinie MDCKII (Louvard, 1980):

Zellen der 41. Zellkulturpassage wurden von A. Meisner, Institut f. Virologie (Marburg), zur Verfügung gestellt.

Säugerzelllinie MDCKII Aktin-GFP (Klon A10) (Robbins et al., 1999):

MDCKII Aktin-GFP Zellen wurden von A. Barth, Stanford University, USA, zur Verfügung gestellt.

Säugerzelllinien MDCKII T23 N17 Cdc42, V12 Cdc42, N17 Rac1 und V12 Rac1 (Jou et al., 1998a und 1998b):

MDCKII T23 Zellen wurden in folgenden Zellkulturpassagen von J.W. Nelson, Stanford University, USA, zur Verfügung gestellt:

N17 Cdc42	17. Zellkulturpassage
V12 Cdc42	11. Zellkulturpassage
N17 Rac1	8. Zellkulturpassage
V12 Rac1	7. Zellkulturpassage

Säugerzelllinie Vero-B4 (Yasumura et al., 1963):

Vero-B4 Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig (DSMZ) bezogen.

1.12 Primäre Humankulturen

Humane Vorhaut wurde durch Beschneidungen adulter Spender in der Hautklinik der Universität zu Köln gewonnen. Die Gewinnung und Kultivierung primärer Keratinozyten-Kulturen erfolgte im Labor von Ingo Haase, Hautklinik der Universität zu Köln.

1.13 Viren

1.13.1 AcMNPV

Das erste Isolat des *Autographa californica* Kernpolyedervirus (AcMNPV) wurde von Vail et al. (1971) beschrieben. Das Plaqueisolat E, mit dem alle Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde von Tjia et al. (1979) aus infektiösem Zellkulturmedium gereinigt. A. McIntosh, Rutgers University, USA stellte dem Labor

dieses Inokulum zur Verfügung.

Virusinokulum zu Infektionsstudien wurde von D. Mainz im Labor zur Verfügung gestellt.

1.13.2 HSV-1

Für alle Experimente mit HSV-1 wurden klinische Wildtyp-Isolate von HSV-1 verwendet.

Ein Inokulum von HSV-1 (S17) (McGeoch, D.J. et al. 1988) wurde von G. Elliott vom Marie Curie Research Institute, Surrey, UK, zur Verfügung gestellt.

Ein Inokulum von HSV-1 (ANG path) (Heeg et al., 1986) wurde von D. Falke vom Institut für Virologie der Universität zu Mainz zur Verfügung gestellt.

1.14 Computer / Software

Hardware: Apple Macintosh iBook G3 800 Mhz
DDS PC [Windows 2000], (DDS Systeme)

Software: Adobe Photoshop 7.0 (Adobe)
Focus Control 400 (Intas)
LCS Software (Leica Mikrosysteme)
Microsoft Excel 2000 (Microsoft)
RagTime 5.6.1 (B&E Software)

Die Aufnahme der digitalen mikroskopischen Bilder erfolgte unter Benutzung von Focus Control 400 oder LCS Software. Deren Bearbeitung und Zusammensetzung erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0.

Die statistische Auswertung und Darstellung von Infektionsstudien erfolgte mit Microsoft Excel 2000.

1.15 Geräte und sonstiges Material

Blaukappröhrchen	(15 ml, 50 ml) Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK
Cryo-Gefäße	Greiner, Solingen
Deckgläser (20 x 20 mm)	Menzel
Durchlichtmikroskop	Leitz, Wetzlar
Geldokumentationsgerät	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
<u>Gewebekulturflaschen</u> :	Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK
(25 cm ² , 75 cm ² , 300 cm ² mit Gasaustauschkappe)	
- Multiwell-Platten	Falcon, New Jersey, USA
(6, 24, 96 Loch)	
- Transwell Clear Filter	Costar, Bodenheim
Handschuhe	Meditrade und N-Dex, Aartselaar, B
Heizblock (Digi-Block)	neoLab, Heidelberg
<u>Immunfluoreszenzmikroskope:</u>	
- Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
<u>Inkubatoren:</u>	
- Bakterien	Heraeus, Hanau
- Säugerzellkulturen	WTB Binder, Tuttlingen
Jung Gewebe-Einfriermedium	Leica, Bensheim
Jung CM3000 Microtom	Leica, Bensheim
<u>Kameras:</u>	
- Digitalkamerasystem Focus 400	Intas, Göttingen
Kanülen	Terumo
<u>Konfokales Immunfluoreszenzmikroskop:</u>	
- DM IRBE Mikroskop / TCS-SP/2 Einheit	Leica, Bensheim
Kulturschüttler (Orbital shaker)	Farma Scientific, Life Sciences International, Frankfurt
Küvetten (1,5 ml)	Brand, Wertheim
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Minicycler PTC-150 (für PCR)	Biozym, Oldendorf
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel
Parafilm „M“	American Can Comp., Greenwich, USA
Petrischalen	Falcon, Becton Dickinson, Plymouth, UK
pH-Meter	WTW, Weilheim
<u>Photometer:</u>	
- Novaspec II	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
- GeneQuant	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Pinzetten	Millipore, Eschborn
Quarzküvetten	Pharmacia, Freiburg
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg

Skalpelle	Bayha, Tuttlingen
Spritzen	HSW, Tuttlingen
Sterilbank	Nunc, Wiesbaden
Sterilfilter-Einmalfilter (0,2 µm und 0,45 µm Porengröße)	Schleicher & Schuell, Dassel
Sterilfilter	Nalgene, Rochester, USA
<u>Transformatoren:</u>	
- ESPS 3000/150	Pharmacia, Freiburg
- GPS 200/400	Pharmacia, Freiburg
UV-Lampe	Herolab
Vortex	Bender & Hobein, Zürich
Wasserbäder	GFL, Burgwedel
Weißkappröhrchen	(12 ml PPN-Röhrchen) Kleef, Bonn
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zentrifugen	Hettich, Tuttlingen
	Heraeus, Osterode
	Sorvall, Bad Homburg
	Beckman, XXX

2 Methoden

2.1 Methoden der DNA-Präparation

2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

5 (250) ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie (1 ml einer Übernachtskultur) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienkulturen wurden bei 4°C pelletiert. Die anschließende Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe des Qiaquick Spin Kit (Plasmid MAXI Kit) nach den Angaben des Herstellers (*Qiagen*, Hilden). Die DNA-Präzipitate wurden in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 gelöst.

2.1.2 Isolierung von viraler DNA

Zur Isolierung viraler DNA aus HSV-1 Virionen wurde wie folgt vorgegangen:

Zell-freies Virus wurde präpariert und pelletiert (vgl. 2.6.1) und in 10mM Tris/HCl (pH 7,6), 1mM EDTA, 1% SDS, 50 ng/ml Proteinase K resuspendiert und vier Stunden bei 50°C inkubiert. Die DNA wurde daraufhin mit zwei Volumina Isopropanol, dem 1/

10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung zugesetzt wurde, gefällt, pelletiert und über Nacht (ÜN) in 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 gelöst. Nach Phenol-Chlorform-Extraktion (vgl. 2.1.3) wurde die virale DNA in einem geeigneten Volumen Wasser gelöst.

2.1.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die zu reinigende DNA-Lösung sollte ein Mindestvolumen von 200 µl besitzen und wurde gegebenenfalls verdünnt. Nach Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1:1:24) wurde geschüttelt und zur Phasentrennung 1 min. zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und durch Schütteln und Zentrifugation mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol zur wäßrigen Phase wurde die gereinigte DNA für 2 h bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugation für 20 min. bei 4°C wurde die DNA pelletiert und mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris/HCl pH 8,5 gelöst.

2.1.4 Auftrennung von DNA mittels Elektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

Mittels Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in TBE-Puffer aufgekocht, Ethidiumbromid wurde zu einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugegeben und die Lösung in eine Gelkammer mit Kamm als Probenaschenformer gegossen. Die Gelkammer wurde anschließend mit TBE-Puffer gefüllt. Dann wurden die Proben, die mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt waren, eingefüllt. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein DNA-Standard (s. 1.5) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 35 bis 120 V. Nach der Auftrennung konnte die Position der DNA-Fragmente durch Fluoreszenz des Ethidiumbromid-DNA-Komplexes mittels UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden.

TBE-Puffer: 90 mM Tris/HCl, pH 8; 90 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA;
Probenpuffer: 20% Glycerin; 75 mM EDTA, pH 8; 0,25% Bromphenolblau

2.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Messung der OD₂₆₀ bestimmt. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, bei einzelsträngiger DNA 40 µg/ml, bei Oligonukleotiden 20 µg/ml.

2.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Bei der Elution von aufgetrennten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde zunächst die entsprechende Bande mit einem Skalpell aus dem Gel entfernt. Die entsprechende DNA wurde dann mit Hilfe des QIAEX Gel Extraction Kit (150) nach Angaben des Herstellers (*Qiagen*, Hilden) eluiert und in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris/HCl pH 8,5 gelöst.

2.2 Enzymatische DNA-Methoden

2.2.1 Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme

Der Verdau von DNA erfolgte in den vom Hersteller gelieferten Puffern bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur. Das Volumen der eingesetzten Restriktionsendonukleasen darf 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da der Lagerungspuffer Glycerin enthält, das inhibitorisch auf die Reaktion wirkt.

Bei Restriktion der Plasmid-DNA wurden 1-2 µg DNA mit 5 U Restriktionsenzym 1-4 h bei geeigneter Temperatur inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.2 Dephosphorylierung von DNA-Einzelstrangenden

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die Dephosphorylierung soll nach Restriktion von Plasmid-DNA deren Religation verhindern. Dazu wurde dem Restriktionsansatz folgender Reaktionsmix hinzugefügt und für 1h bei 37°C inkubiert :

- 1 µl bzw. 5 U alkalische Phosphatase (SAP) (*Boehringer*, Mannheim),
- 1 µl 10x Reaktionspuffer (*Boehringer*, Mannheim),
- 8 µl H₂O.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, Saiki *et al.*, 1988) dient der selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten (Template-DNA). Eine Reaktionsmischung aus DNA, zwei Oligonukleotid-Startermolekülen (Primern), die das gewünschte DNA-Fragment flankieren, der thermisch stabilen *Taq*-DNA-Polymerase und dNTPs wird einem mehrfach wiederholten Zyklus unterworfen. Nach einem Denaturierungsschritt bei 95°C erfolgt die Anlagerung der Oligonukleotide (Primer) an die DNA-Einzelstränge bei 45-65°C. An diesem Primern setzt die DNA-Polymerase an. Die Kettenverlängerung findet bei 72°C statt. Durch Wiederholungen dieses Zyklus findet die Amplifikation des DNA-Fragmentes statt.

Zur Amplifikation des herpesviralen *Us3*-Gens wurden die spezifischen Oligonukleotide *Us3up*, *Us3down* synthetisiert und im folgenden Ansatz verwendet:

PCR-Ansatz:	0,5 µl	HSV-1 DNA aus einer Viruspräparation (0,2 µg/µl)
	4 µl	dNTPs (200µM)
	5 µl	10 x PCR Puffer (<i>Promega</i> , Mannheim)
je	1 µl	spezifische Primer-Lsg. (20 pmol/µl)
	1 µl	2,5 U / µl <i>Taq</i> -Polymerase (<i>Promega</i> , Mannheim)
auf	50 µl	mit Wasser auffüllen.

PCR-Bedingungen:	5 min.	95°C	Schritt 1
	1 min.	95°C	Schritt 2
	45 sec.	50°C	Schritt 3
	90 sec.	72°C	Schritt 4
	5 min.	72°C	Schritt 5

Die Schritte 2 - 4 wurden 30 x in der entsprechenden Reihenfolge wiederholt.

Nach Abschluß der PCR wurde die amplifizierte DNA auf einem Agarosegel (s. 2.1.5) aufgetrennt und auf Produkte überprüft.

2.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von geschnittenem, dephosphoryliertem Vektor (pcDNA 3.1 MycHis C) und geschnittenem *Us3*-PCR-Amplifikats erfolgte ÜN bei 16°C in folgender Reaktionsmischung:

1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) (*Boehringer*, Mannheim),

1 µl 10x Ligationspuffer (*Boehringer*, Mannheim),

und die geschnittene, gereinigte DNA im Verhältnis Vektor zu Insert von 1:10 in einem Gesamtvolumen von 10 µl.

2.2.5 DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977)

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Methode. Durchgeführt wurden die Sequenzierungen vom ZMMK-Servicelabor der Universität zu Köln mit dem ABI Prism 377-Sequenzierautomaten nach den Angaben des Herstellers (*Applied Biosystems*, Weiterstadt).

2.3 Arbeiten mit *Escherichia coli*

2.3.1 Lagerung

Escherichia coli (*E. coli*) Bakterien (DH10B) wurden in TFB II Puffer (s. 2.3.2) in 200 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

2.3.2 Herstellung kompetenter *E. coli*

Ein Milliliter einer *E. coli* (DH10B) Übernachtskultur wurde 1:200 in 200 ml YT-Medium, dem 2 ml 1 M KCl-Lösung und 4 ml 1 M MgSO₄-Lösung zugesetzt wurden, verdünnt. Bei 32°C wurden die Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,4 angezogen. Die Bakterien wurden bei 4°C und 3000 g 15 min pelletiert und die Überstände verworfen. Die Bakterien wurden in 60 ml TFB I Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gelagert. Nachdem die Bakterien ein weiteres Mal unter vorgenannten Bedingungen pelletiert wurden, wurden sie in 8 ml TFB II Puffer resuspendiert und in 200 µl Aliquots auf Trockeneis schockgefroren.

TFB I Puffer: 30 mM Natriumacetat pH 6; 50 mM MnCl₂; 100 mM CaCl₂;
15% Glycerin.

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

TFB II Puffer: 10 mM MOPS; 75mM CaCl₂; 10mM NaCl; 15% Glycerin

2.3.3 Hitzeschocktransformation

Ein Aliquot kompetenter *E. coli* Bakterien wurde auf Eis aufgetaut, 200-500 ng zu transformierende Plasmid-DNA zugegeben, weitere 10 min auf Eis inkubiert und dann für 90 sec bei 42°C transformiert. Anschließend wurden ca. 800 µl LB-Medium zugegeben und die Bakterien bei 37°C 1 h unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann auf LB-Platten mit Resistenzantibiotikum ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.4 Arbeiten mit Säugetier-Zellkulturen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Bei den verwendeten Zelllinien handelt es sich ausschließlich um Säugerzelllinien, die als Einzelschichtkultur am Boden von Zellkulturflaschen wachsen. Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in DMEM (Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium) kultiviert, das zusätzlich 10% FCS (fötales Kälberserum) und 100 Einheiten (IU) P/S (Penicillin/Streptomycin) pro Milliliter

enthielt. Die benötigten Lösungen und Zellkulturmedien wurden in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Es wurden sterile Einweg-Zellkulturflaschen der Größen 25 cm², 75 cm² und 300 cm², sowie autoklavierte Pipetten und Glasgefäße verwendet.

2.4.1 Kultivierung der Zelllinie Vero-B4 (Yasumura *et al.*, 1963)

Die Säugerzelllinie Vero-B4 wurde aus einer grünen Meerkatzeniere im Jahre 1962 isoliert. Vero-B4 Zellen bilden im konfluenten Zustand einer Einzelschichtkultur mit epithelähnlicher Morphologie aus. Vero-B4 Zellen wurden kurz vor Erreichen des konfluenten Zustands einmal in PBS-d (phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, sterilfiltriert) gewaschen und 5 min. in 0,25%iger Trypsin-Lösung inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden 1:6 in frisches Kulturmedium überführt und anschließend 2-3 Tage vermehrt.

PBS-d: 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄; pH 7,4,
sterilfiltriert

Trypsin-Lösung: 0,25 % Trypsin in PBS-d

2.4.2 Kultivierung der Zelllinie BHK21 (Stoker und MacPherson, 1964)

Die Säugerzelllinie BHK21 (Baby Hamster Kidney) stammt von Isolaten aus der Niere eines syrischen Hamsters ab. BHK21 Zellen weisen in der Morphologie ein fibroblastenähnliches Erscheinungsbild auf und wachsen in Kultur zu einem dichten Zellrasen. Die Zellen wurden kurz nach Erreichen des konfluenten Zustands einmal in PBS-d gewaschen und anschließend 1 min. in 0,25%iger Trypsin-Lösung inkubiert. Danach wurden die abgelösten Zellen 1:30 in eine neue Kulturflasche überführt und 2-3 Tage vermehrt.

2.4.3 Kultivierung der Zelllinie HeLa (Scherer *et al.*, 1953)

Die humane Zelllinie HeLa wurde 1951 aus der Biopsie eines Cervix-Karzinoms einer 31-jährigen Afroamerikanerin etabliert. HeLa Zellen weisen ein fibroblastenähnliches Erscheinungsbild auf und wachsen in Kultur zu einem dichten Zellrasen. Die Zellen wurden kurz vor Erreichen des konfluenten Zustandes einmal in PBS-d gewaschen und anschließend 2-3 min. in 0,25%iger Trypsin-Lösung inkubiert. Danach wurden die abgelösten Zellen 1:3 in eine neue Kulturflasche überführt und 2-3 Tage vermehrt.

2.4.4 Kultivierung der Zelllinie MDCKII (Louvard, 1980)

Die Säugerzelllinie MDCKII (engl. Madin Darby Canine Kidney) wurde ausgehend von der parentalen Zelllinie MDCK subkloniert, die wiederum vom Nierengewebe eines weiblichen Cocker-Spaniels abstammt und 1958 von Madin und Darby isoliert wurde. MDCKII Zellen bilden im konfluenten Zustand ein einschichtiges Epithel mit polaren Eigenschaften aus. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal in PBS-d gewaschen. Zur Ablösung vom Substrat wurden die Zellen zunächst 10-15 min. in einer 0,25%igen Trypsin-Lösung inkubiert und dann durch vorsichtiges Klopfen in Suspension gebracht. Anschließend wurden die Zellen im Volumen-Verhältnis 1:15 in eine neue Kulturflasche überführt und 2-3 Tage vermehrt.

2.4.5 Kultivierung der Zelllinie MDCKII Aktin-GFP (Klon A10)

(Robbins *et al.*, 1999)

Die Säugerzelllinie MDCKII Aktin-GFP (Klon A10) ist ein Klon der oben genannten Zelllinie MDCKII, die humanes Beta-Aktin fusioniert mit EGFP (engl. enhanced green fluorescent protein) unter Kontrolle des Cytomegalievirus (CMV) Promotors exprimiert. Bei dem exprimierten Fusionsprotein handelt es sich um eine Fusion vom N-Terminus des Beta-Aktins zum C-Terminus des EGFPs. Das verwendete Expressionsplasmid pEGFP-C1 (Clontech) trägt das Resistenzgen für Geneticin

(G418), so dass durch Zugabe von 300 µg G418 pro ml Medium für plasmidtragende Zellen selektioniert werden kann. Diese Zelllinie wurde im Labor von Angela Barth (Stanford University) etabliert.

MDCKII Aktin-GFP Zellen bilden wie MDCKII Zellen im konfluenten Zustand ein einschichtiges Epithel mit polaren Eigenschaften aus. Das konstitutiv exprimierte Aktin-GFP Fusionsprotein wird in Aktinfilamente eingebaut, so dass diese Zellen bei Anregung autofluoreszierende Filamente aufweisen. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal in PBS-d gewaschen. Zur Ablösung vom Substrat wurden die Zellen zunächst 10-15 min. in einer 0,25%igen Trypsin-Lösung inkubiert und dann durch vorsichtiges Klopfen in Suspension gebracht. Anschließend wurden die Zellen im Volumen-Verhältnis 1:15 in eine neue Kulturflasche überführt und 2-3 Tage vermehrt. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in DMEM mit vermindertem Zuckergehalt, was eine höhere und stabilere Transgenexpression zur Folge hatte. Zusätzlich wurde dem Wachstumsmedium 300µg/ml G418 als Selektionsdruck des Plasmid-Konstrukts zugefügt. G418 wurde zwei bis drei Tage vor Experimenten mit diesen Zellen aus dem Wachstumsmedium entfernt, da es die Morphologie der Zelle beeinflussen könnte (A. Barth, persönl. Mitteilung).

2.4.6 Kultivierung der Zelllinien MDCKII T23 N17Rac1, V12 Rac1, N17 Cdc42, V12 Cdc42 (Jou *et al.*, 1998a und 1998b)

Die Säugerzelllinien MDCKII T23 N17Rac1, V12 Rac1, N17 Cdc42 und V12 Cdc42 sind Klone, die auf der oben genannten Zelllinie MDCKII basieren. Diese Zellen exprimieren die Proteine N17 Rac1, V12 Rac1, N17 Cdc42 und V12 Cdc42 unter der Kontrolle des tetracyclin-reprimierbaren Transaktivators (sog. TetOff-Kontrolle). Das tTA Gen wurde hierzu im Labor von Keith Mostov in einem Plasmid mit Puromycin Resistenz in die Zellen transfiziert (Regulator-Plasmid), der ausgewählte Klon T23 ist die Grundlage der oben genannten Zelllinien. Das Regulator-Konstrukt kodiert für einen Transkriptionsaktivator (genanntes tTA Gen), der in Gegenwart von Tetracyclin inhibiert wird. Die induzierbaren Transgene N17 Rac1, V12 Rac1, N17 Cdc42 und V12 Cdc42 wurden im Labor von James W. Nelson in Plasmid HMR272 mit

Hygromycin Resistenz in die Zellen transfiziert (Antwort-Plasmid). Das Antwort-Konstrukt beinhaltet die zu exprimierende DNA des Transgens unter der Kontrolle eines Promotors, der von dem Transkriptionsaktivator des Regulator-Plasmids aktiviert wird. Folglich wird das Transgen auf dem Antwort-Plasmid in Abwesenheit von Tetracyclin exprimiert und in Anwesenheit von Tetracyclin nicht exprimiert.

Im nicht-induzierten Zustand wurden die Zellen in Medium kultiviert, das zusätzlich Doxycyclin (40 ng/ml), ein Tetracyclin-Derivat, enthielt. Entsprechend wurden die Zellen zur Transgen-Expression in doxycyclin-freies Medium überführt, das außerdem tetracyclin-freies FCS enthielt (s. 2.4.11). Die Kultivierung erfolgte wie 2.4.4.

2.4.7 Lagerung der Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden in einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Atmosphäre bei -196° in Wachstumsmedium mit 20% FCS und 4% DMSO (Dimethylsulfoxid) gelagert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-80% einmal in PBS-d gewaschen und durch Behandlung mit 0,25%iger Trypsin-Lösung in Suspension gebracht. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium für 1-2 min. bei 1000 G und 4°C pelletiert und danach vorsichtig in 1 ml Kulturmedium, das zusätzlich 20% FCS und 4% DMSO enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun in ein Cryo-Gefäß überführt, zunächst für zwei Tage bei -80°C eingefroren und nachfolgend in einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Atmosphäre bei -196°C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen von -196°C unmittelbar bei 37°C inkubiert und anschließend 1-2 Minuten bei 800 G pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in Medium (+ 20% FCS) vorsichtig resuspendiert, in eine Kulturflasche überführt und bei 37°C inkubiert. Nach 1-2 Stunden waren die Zellen adhärent, das Medium wurde zur Entfernung toter Zellen abgenommen und durch frisches Kulturmedium (+ 10% FCS) ersetzt.

2.4.8 Überprüfung auf Mykoplasmenkontaminationen (Russel *et al.*, 1975)

Alle verwendeten Zelllinien wurden etwa einmal pro Monat auf Mykoplasmenkontaminationen getestet. Zellen wurden dazu über Nacht auf Deckgläsern ausgesät und am folgenden Tag fixiert und gefärbt. Die Fixier- und Färbe-Lösung enthielt den DNA-Hoechst-Farbstoff 33258 (1 µg/ml) in Methanol. Zunächst wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und nachfolgend 10 Minuten mit der Farbstoff-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen nach kurzem Antrocknen an der Luft in DAKO-Medium eingebettet. Der Hoechst-Farbstoff 33258 färbt DNA durch Interkalierung spezifisch an und emittiert nach UV-Anregung im blauen Wellenlängenbereich. Blaue Färbung von DNA außerhalb des Zellkerns deutet auf Kontaminationen mit Mykoplasmen hin, die als punktierte Strukturen im Zytoplasma oder auf der Plasmamembran sichtbar sind.

2.4.9 Bestimmung der Zellzahl

A) Mittels Neubauer-Zählkammer:

Die Anzahl der Zellen in einer Kulturflasche wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ein Tropfen Zellsuspension wurde an den Rand der Zählkammer gesetzt, und das Deckglas auf die Kammer aufgelegt. Infolge der Kapillarkräfte verteilte sich die Zellsuspension über die gesamte Zählkammer. Es wurden nun zweimal je vier große Quadrate ausgezählt, die sich wiederum aus jeweils 16 kleinen Quadraten zusammensetzen. Jedes große Quadrat weist ein Volumen von 0,1 µl auf. Nach Berechnung des Mittelwertes der großen Quadrate, konnte die Zellzahl deshalb nach folgender Formel näherungsweise bestimmt werden:

Anzahl der Zellen pro ml Suspension = Mittelwert der großen Quadrate x Volumen der Zählkammer x 10^4

B) Mittels Coulter Partikelzähler Z1:

Die Anzahl der Zellen in einer Kulturflasche wurden des weiteren mit Hilfe eines Coulter Partikelzählers bestimmt. Dazu wurden 0,5 ml der Zellsuspension in 9,5 ml ISOTON II in einem Probengefäß verdünnt. Dieses Probengefäß wurde in den Partikelzähler eingesetzt und die Messung gestartet. Der Partikelzähler bestimmt durch photometrische Messung die Partikelanzahl pro Milliliter bei Durchfluß durch eine Glaskapillare.

Der Vergleich beider Bestimmungsmethoden zeigte keine signifikanten Unterschiede bei der Zellzahlbestimmung.

2.4.10 Subklonieren der MDCKII T23 Zelllinien

Bei Kultivierung stabil transfizierter Zelllinien kann es zum Verlust der Transgen-Expression in einem Teil der Zellpopulation kommen. Daher ist es notwendig, solche Zelllinien gelegentlich zu subklonieren, um wiederum eine homogene Population mit gleichmäßiger Transgenexpression zu erhalten. Dazu wurde wie folgt vorgegangen: Nach Ablösen der Zellen durch Trypsinisieren wurde die Zellsuspension auf zehn Zellen pro Milliliter verdünnt. Es wurden je 100 µl dieser Zellsuspension oder durchschnittlich eine Zelle in ein Multiwell einer 96-Multiwell-Platte gegeben und die Zellen zwei bis drei Wochen darin kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde dazu das Wachstumsmedium, das Selektionsantibiotika enthielt, gewechselt. Bei einer 70%igen Konfluenz wurden die Einzelklone der Zellen durch Trypsinisieren abgelöst und etwa 80% davon wurden in je ein Multiwell einer 24-Multiwell-Platte überführt. 20% der Zellsuspension wurden auf Multiwell-Objektträger gebracht und am folgenden Tag der Erfolg der Subklonierung durch Nachweis des Transgens mittels Immunfluoreszenz überprüft. Vier bis sechs Klone wurden dann weitervermehrt und in niedriger Passage eingefroren und gelagert.

2.4.11 Transfektionsmethoden

Zur Untersuchung des Einflusses zellulärer Proteine auf die HSV-1 Infektion wurden verschiedene mutierte Isoformen dieser Proteine vor Infektion transient in MDCKII Zellen exprimiert. Dazu wurden Expressionsplasmide mittels der sog. Nucleofector™ Technologie (Amaxa GmbH, Köln) in MDCKII Zellen transfiziert. Die Nucleofector™ Transfektionsmethode basiert auf Elektroporation von Zellen. Dazu benötigt wird ein Nucleofector™-Gerät, dass die elektrischen Parameter liefert, Nucleofector™ Lösungen, in denen die Zellen in Suspension gehalten werden, während die Elektroporation durchgeführt wird:

Zur Transfektion von MDCKII Zellen wurden die Lösungen des Nucleofector™ Cell Line Kits T verwendet. Zunächst wurden die Zellen wie gewohnt durch Trypsinisieren abgelöst, nach Pelletieren in PBS-d resuspendiert und gezählt um nach erneutem Pelletieren in Nucleofector™ Lösung resuspendiert zu werden. Parallel wurden zu 90 µl der Nucleofector™ Lösung 1-2 µg zu transfizierende DNA gegeben und die Lösung in eine Küvette eingefüllt. 10 µl der Zellsuspension wurden nun zugegeben (etwa $2 - 4 \cdot 10^5$ Zellen) und das Programm P29 im Nucleofector™-Gerät durchgeführt. Die Zellen wurden in 0,5 ml DMEM (10% FCS, P/S) aus der Küvette gespült, in ein Multiwell einer 6-Multiwell-Platte ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Sechs Stunden nach der Transfektion wurden Experimente mit den transfizierten Zellen durchgeführt.

2.4.12 Induktion von Transgenexpression in MDCKII T23 N17Rac1, V12 Rac1, N17 Cdc42, V12 Cdc42 (Jou *et al.*, 1998a und 1998b)

Die Induktion der Transgen-Expression in den vorgenannten Zelllinien erfolgt über Entfernung des Antibiotikums Doxycyclin (vgl. 2.4.5). Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

Zellen kultiviert in der Gegenwart von 40 ng/ml Doxycyclin wurden bei 60-75% Konfluenz trypsinisiert und in 5 ml Kulturmedium ohne Doxycyclin überführt. Die Zellen wurden pelletiert und in Kulturmedium ohne Doxycyclin aufgenommen. Die Zellen wurden im Volumenverhältnis 1:3 in zwei T75 Zellkulturflaschen überführt, bei

denen jeweils eine Medium mit und eine Medium ohne Doxycyclin enthielt. Am folgenden Tag wurde dieser Prozess wiederholt und die Zellen in der nötigen Dichte von etwa $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Deckglas in Multiwellplatten ausgesät, um einen weiteren Tag später die Experimente durchzuführen.

2.5 Arbeiten mit primären Humankulturen

2.5.1 Isolierung und Kultivierung von humanen Epithelexplant-Kulturen

Epidermisexplant-Kulturen wurden aus normaler menschlicher Vorhaut gewonnen. Der bei Beschneidungen gewonnenen Vorhaut wurde das meiste Fett und Bindegewebe mit Hilfe einer gekrümmten Schere entfernt. Hautstückchen von sechs Millimeter Durchmesser wurden ausgestanzt und für 15-18 h auf Eis in DMEM, das zusätzlich 100 IU/ml P/S und 10 mg/ml Dispase II (Boehringer, Mannheim) enthielt, inkubiert. Mittels Pinzetten wurden die Epidermis als intakte Epithelexplant-Kultur und die durch die Dispase abgelöste Dermis voneinander getrennt. Die so gewonnene Epidermis wurde umgehend für Infektionsstudien verwendet.

2.5.2 Isolierung von Kultivierung von humanen Keratinozyten (Watt, 1998)

Humane VorhautKeratinozyten wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Ingo Haase (Hautklinik der Universität zu Köln) aus vorgenannten Epidermis-Explanten gewonnen und kultiviert

2.5.2.1 Isolierung von humanen Keratinozyten

Humane Vorhautepidermis (vgl. 2.5.1) wurde in 0,25%iger Trypsin-Lösung inkubiert, die Zellsuspension wurde durch Gaze-Filter filtriert, gesammelt, resuspendiert und in Kulturschalen ausgesät, die NIH3T3 (Stamm J2) Feeder-Zellen enthielten.

2.5.2.2 Kultivierung von differenzierenden Keratinozyten-Kulturen

Um die Differenzierung von Keratinozyten zu erreichen, wurden sie in Anwesenheit von Mitomycin C behandelten NIH3T3 (Stamm J2) Feeder-Zellen (s.o.) in Keratinozyten-Kultur-Medium kultiviert.

2.5.2.3 Kultivierung von Einzelschicht-Keratinozyten-Kulturen

Um die Differenzierung von Keratinozyten zu vermeiden und Einzelschichtkulturen zu erhalten, wurde der Ca^{2+} -Gehalt des Kulturmediums auf 50 μM reduziert.

2.6 Arbeiten mit *Herpes simplex Virus Typ 1*

2.6.1 Virusvermehrung und -aufreinigung (Powell und Watson, 1975)

Zur Herstellung eines Virus-Inokulums wurden BHK21 Zellen zunächst in 300 cm^2 Zellkulturflaschen kultiviert. Kurz vor Erreichen des konfluenten Zustands wurden die Zellen mit Virus aus Stamm-Inokulum mit einer MOI (Multiplizität der Infektion, engl. Multiplicity of Infection) von 0,01 PFU (Plaque formende Einheit, engl. Plaque Forming Unit) pro Zelle infiziert und bei 31°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 31°C, da bei dieser Temperatur weniger defekte Virus-Partikel gebildet werden im Vergleich zur Inkubation bei 37°C. Am folgenden Tag wurde das Inokulum abgenommen und durch frisches Kulturmedium ersetzt und für weitere drei bis vier Tage bei 31°C inkubiert. Nach vier bis fünf Tagen waren nahezu alle Zellen infolge des zytopathischen Effektes in Suspension. Zur Virusaufreinigung wurden die Zellen zunächst 10 Minuten bei 3000 rpm pelletiert und das Pellet anschließend samt intrazellulärem Virus (CAV = Cell-Associated Virus) verworfen. Der Überstand mit extrazellulärem Virus (CRV = Cell-Released Virus) wurde abgenommen und für 2 h bei 15.000 G und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Virus-Sediment in einem Aliquot Zellkulturmedium resuspendiert, vorsichtig auf einen linearen Ficoll-400-Gradienten (5-15%) aufgetragen und die Virus-Fraktion 2 h bei 15.000 G und 4°C entsprechend ihrer Dichte zentrifugiert. Die unter gebündeltem Licht sichtbare Virus-Bande wurde nun abgenommen und nochmals 90 Minuten bei 25.000 G und

4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Virus-Sediment in 0,5-1 ml Zellkulturmedium ÜN bei 4°C resuspendiert. Am nächsten Tag wurde die Virus-Suspension zu je 50 µl aliquotiert und auf –80°C gelagert. Die konzentrierte und aufgereinigte CRV-Fraktion (extrazelluläres Virus) hat im Gegensatz zur CAV-Fraktion (intrazelluläres Virus) den Vorteil, dass sie keine Zellfragmente mehr enthält, die möglicherweise die virale Infektion der Zellen beeinflussen könnten, und wurde daher bei allen Experimenten als Virus-Inokulum eingesetzt.

2.6.2 Bestimmung der Infektiösität des Virus-Inokulums

Etwa $4-5 \cdot 10^5$ Vero-B4 Zellen wurden in Multiwell-Platten mit sechs Vertiefungen ausgesät und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die konfluenten Zellkulturen in Doppel-Ansätzen mit Virus-Inokulum in einer Verdünnungsreihe (Faktor 10^{-6} - 10^{-8} in Zehnerschritten) infiziert und bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurde das Virus-Inokulum abgenommen und durch Zellkulturmedium ersetzt, das zusätzlich 0,5% HSV-1-reaktives humanes Mischserum enthielt, und für drei Tage bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe des Serums wurde eine Virus-Ausbreitung nur von Zelle zu Zelle (engl. cell-to-cell spread) gewährleistet, die in der Bildung von Plaques, Bereichen in denen sich die Zellen abgelöst haben, resultierte. Die Ausbreitung von ins Medium freigesetzten Viren wurde dagegen durch das HSV-1-reaktive humane Mischserum verhindert. Nach 72 h wurden die Zellen zunächst 20 min. in 2% Paraformaldehyd fixiert, 15 min. in 0,1% Kristall-Violett (in 10% Methanol) gefärbt und zuletzt vorsichtig unter Leitungswasser ausgewaschen. Die Plaques, als weiße Löcher vor dem Hintergrund der violett-gefärbten Zellen sichtbar, wurden ausgezählt. Die Infektiösität, d.h., die Menge an infektiösen Virus-Partikeln in einem definierten Volumen, konnte nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{PFU / ml} = \text{Anzahl Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Endwert wurde durch Bildung des Mittelwertes aus dem Doppelansatz eines jeden Verdünnungsfaktors, sowie anschließend durch Bildung des Mittelwertes aus den Zwischenergebnissen der jeweiligen Verdünnungsfaktoren berechnet.

2.6.3 HSV-1 und AcMNPV Infektion von Zellkulturen

Zellen wurden mit einer PFU von 0,1 bis 100 (entsprechende Verdünnung des Ausgangs-Inokulums in Zellkulturmedium) pro Zelle infiziert und bei 37°C inkubiert. Ausgehend von der Annahme, dass ein infektiöses Virus-Partikel für die Bildung eines Plaques ausreicht, ist die Einheit PFU ein relatives Maß für die Anzahl infektiöser Virus-Partikel. Die Infektion hängt jedoch von der zufälligen Kollision von infektiösen Virus-Partikeln und Zellen ab. Demnach steigt mit zunehmender Anzahl von infektiösen Virus-Partikeln die Wahrscheinlichkeit, dass mehr Zellen infiziert werden. Darauf basierend entstand der Begriff MOI, der in dieser Arbeit immer in PFU pro Zelle angegeben wird. Dies bedeutet, dass beispielsweise bei einer MOI 10 durchschnittlich zehn infektiöse Virus-Partikel auf eine Zelle kommen. Nach 1 h wurde das Virus-Inokulum abgenommen und durch Zellkulturmedium ersetzt. Die Zugabe des Virus wurde als Zeitpunkt Null definiert.

2.6.4 HSV-1 Infektion von Explantkulturen

Humane Vorhautepidermis (s. 2.5.1) wurden mit einer errechneten PFU von 10 oder 100 pro Zelle infiziert und bei 37°C inkubiert. Dazu wurde die Vorhautepidermis mit der Unterseite auf der Virussuspension schwimmend oder mit der Oberseite in Virussuspension untergetaucht inkubiert. Nach sechs Stunden wurde das Virus-Inokulum abgenommen und die Epithelexplant-Kultur fixiert. Die Zugabe des Virus wurde als Zeitpunkt Null definiert.

2.6.5 HSV-1 Infektion von MDCKII Filterkulturen (Topp *et al.*, 1997)

Die Ausbildung der Polarität von MDCKII auf Filtern ist außerordentlich gut charakterisiert. Zum Vergleich zu Infektionsstudien, bei denen MDCKII Zellen auf Deckgläsern kultiviert wurden, wurden auch Infektionen von Filterkulturen durchgeführt.

Dazu wurden MDCKII Zellen in unterschiedlichen Dichten auf Transwell Clear Filtern (Costar GmbH, Bodenheim) ausgesät. Nachdem die Kulturen zwei bis drei Tage im

konfluenten Zustand oder subkonfluent kultiviert wurden, erfolgten die Infektionsstudien wie folgt:

Das Virusinokulum wurde entweder in die obere Kammer (vgl. Abb. III.1) oder in die untere Kammer gegeben. Dabei wurden im Falle der oberen Kammer nur die apikalen Membranen von MDCKII Zellen Virus-exponiert, im Falle der unteren Kammer nur die basalen Membranen der Zellen im Porenbereich. Die Zellen wurden mit einer PFU von 10 oder 100 pro Zelle infiziert und bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde wurde das Virus-Inokulum abgenommen und durch Zellkulturmedium ersetzt. Die Zugabe des Virus wurde als Zeitpunkt Null definiert. Kontrollexperimente zeigten allerdings, dass HSV-1 die Poren zwischen den Kammern nur schwer passiert und selbst bei Abwesenheit von Zellen maximal 1% der infektiösen Virione in der oberen Kammer nach einer Stunde wiedergewonnen werden konnten (vgl. auch Topp *et al.*, 1997).

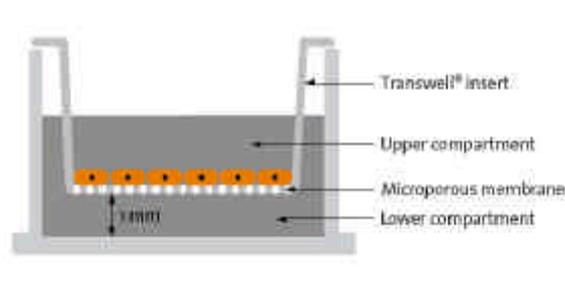


Abb. III.1 Schematische Darstellung einer Filterkultivierung
(entnommen www.costar.com)

2.6.6 Verwundungsexperimente vor HSV-1 Infektion

Humane VorhautKeratinozyten und MDCKII Zellen wurden in einigen Experimenten vor der HSV-1 Infektion verwundet. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

MDCKII Zellen und humane VorhautKeratinozyten wurden eine Stunde vor Infektion verwundet, indem eine Nadel der Bereite 27 gauge (im Falle der MDCKII Zellen) oder ein rundgeschmolzener Glasstab (im Falle der Keratinozyten) durch die Wachstumsfläche gezogen wurde. Die Infektion erfolgte analog 2.6.3.

2.7 Arbeiten mit zellulären Inhibitoren

2.7.1 Jasplakinolide und Cytochalasin D

Um den Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf den HSV-1 Eintritt zu untersuchen, wurden Inhibitoren, die die Aktin-Dynamik beeinflussen, eingesetzt. Jasplakinolide (JAS, aus *Jaspis johnstoni*) ist ein zell-permeables Peptid, das mit Phalloidin bei der Bindung von filamentösem Aktin (F-Aktin) kompetitiert. Es setzt die kritische Konzentration zur Aktin-Polymerisierung herab und stabilisiert so F-Aktin oder führt in höheren Konzentration zu Aktin-Polymerisierung (Bubb *et al.*, 1994). Cytochalasin D (CD, aus *Ascomycotina*) bindet stöchiometrisch das spitze Ende von Aktin-Filamenten und verhindert den Monomer-Austausch. CD führt somit bei längerer Exposition zur Depolymerisierung von F-Aktin (Walling *et al.*, 1988).

Beide Inhibitoren wurden in den angegebenen Mengen 30 min. vor der Infektion dem Wachstumsmedium der Zellen zugesetzt. Dann wurde das Medium gegen Virus-inokulum (5 PFU pro Zelle) getauscht, das ebenfalls die angegebenen Inhibitormengen enthielt. Nach einer Stunde wurde das Virus-Inokulum abgenommen und durch Zellkulturmedium ersetzt. Die Zugabe des Virus wurde als Zeitpunkt Null definiert. Zwei Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert.

2.7.2 Monensin (Nicola *et al.*, 2003)

Der Eintritt von HSV-1 kann über Fusion der viralen Lipid-Hülle mit der Plasmamembran erfolgen (Spear, 1993). Neuere Studien zeigten jedoch, dass HSV-1 auch über Endozytose in HeLa und CHO-K1 Zellen eintritt. Um erste Hinweise über den Eintritt-Mechanismus in MDCKII Zellen zu erhalten, wurde Monensin, ein lysomotropisches Agens in Eintritt-Experimenten verwendet. Monensin ist ein Ionophor, das vesikulären Transport und die Ansäuerung früher Endosomen inhibiert (Brock und Smith, 1982; Fliesler und Basinger, 1987).

Monensin inhibiert die pH-induzierte Fusion der viralen Lipid-Hülle mit der Membran von Endosomen (Nicolai *et al.*, 2003). Experimentell wurde wie folgt vorgegangen:

Monensin wurde 30 min. vor der Infektion dem Wachstumsmedium (Endkonzentration 25 und 100 μM) der Zellen zugesetzt. Danach wurde das Medium gegen Virus-Inokulum (0,1; 1; 10 PFU pro Zelle) getauscht, dass ebenfalls die angegebenen Inhibitormengen enthielt. Nach einer Stunde wurde das Virus-Inokulum abgenommen und durch Zellkulturmedium ersetzt. Die Zugabe des Virus wurde als Zeitpunkt Null definiert. Zwei Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert.

2.7.3 Toxin B

Der zelluläre Inhibitor Toxin B (aus *Clostridium difficile*) glykosyliert Rac1 und Cdc42 an Thr35 und inhibiert dabei deren Funktion, in dem die Effektoren Bindung verhindert wird (zur Übersicht Just *et al.*, 2000). Um den Einfluss der Signaltransduktion von Rac1 und Cdc42 auf die HSV-1 Infektion zu untersuchen, wurde dieser Inhibitor eingesetzt. Das verwendete Toxin B wurde uns von Ingo Haase (Hautklinik der Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt. Experimentell wurde wie folgt vorgegangen:

Toxin B wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml dem respektiven Kulturmedium von MDCKII Zellen und stratifizierenden Keratinozyten zugesetzt. Die Zellen wurden für 15 h bei 37°C kultiviert, um danach das Medium gegen Virus-Inokulum (50 PFU pro Zelle) zu tauschen, dem ebenfalls 10 ng/ml Toxin B zugesetzt wurde. Nach 1 h wurde das Virus-Inokulum abgenommen und durch Zellkulturmedium ersetzt. Die Zugabe des Virus wurde als Zeitpunkt Null definiert.

2.8 Antikörper-Blockierungsexperimente

2.8.1 Blockierung von HSV-1 gD

Um den Einfluss von Glykoprotein D auf die HSV-1 Infektion der verwendeten Epithelmodelle zu untersuchen, wurden epitop-spezifische Antikörper zur Blockierung eingesetzt. Dazu wurden der monoklonale Mausantikörper α -gD (DL11) sowie weitere unten genannten Antikörper in verschiedenen Konzentrationen für eine Stunde mit HSV-1 (50 PFU pro Zelle) in 100 μ l Wachstumsmedium der Zellen bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die entsprechenden Kulturen wie unter 2.6.3 beschrieben mit diesem Inokulum infiziert.

Verwendete Antikörper zur gD Blockierung:

Antikörper	Antigen	erhalten von
DL11	gD (x-Domäne)	G. Cohen
IV-3-4	gD (terminal)	J. Kühn
IE2	AcMNPV IE2	Laborsammlung
gp64	AcMNPV gp 64	Laborsammlung

2.9 Elektronenmikroskopie

2.9.1 Zellpräparation und Fixierung

Zur Durchführung von elektronenmikroskopischen Studien wurden Zellen auf 20 x 20 mm Stückchen von Melinex-Film in Multiwell-Platten ausgesät. Dazu wurde der Melinex-Film zunächst zur Sterilisation in 70%igen Ethanol drei Mal gewaschen und luftgetrocknet. Die Melinex-Filme wurden dann 24 h in Kulturmedium bei 37°C inkubiert, das Medium gewechselt und MDCKII Zellen wurden in der nötigen Dichte von etwa $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Multiwell ausgesät. Nach Inkubation ÜN bei 37°C wurden die Zellen für 1 h mit Virusinokulum (100 PFU pro Zelle) inkubiert.

Danach wurde das Medium abgenommen und 37°C warmes Fixativ hinzugefügt und 30 min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Fixativ abgenommen und in Cacodylat-Puffer aufbewahrt.

Fixativ: 2,5% Glutaraldehyd, 0,09M Cacodylat, 3mM CaCl₂, pH 7.2
 Cacodylat-Puffer: 0,09M Cacodylat, 3mM CaCl₂, pH 7.2

2.9.2 Färbung, Schnitt und Analyse

Die Post-Fixierung, Färbung und der Schnitt der Präparate wurde von Ute Oschlies (MPI für neurologische Forschung) durchgeführt. Die Analyse der Präparate erfolgte an einem Elektronenmikroskop der Firma Zeiss. Bilder wurden auf einem Schwarzweiß-Film aufgenommen, entwickelt und digitalisiert.

2.9.3 Negativ-Färbung von HSV-1 Virionen (Brown und MacLean, 1998)

Bei der Negativ-Färbung erfolgen Fixierung und Färbung in einem Schritt. Die Virus-Suspension wurde dazu mit einem gleichen Volumen einer 1%igen Natriumsiliciumwolframat-Lösung gemischt. Die Suspension wurde sofort auf ein Elektronenmikroskop-Rastergitter aufgebracht, um nach 5 min. die überschüssige Lösung zu entfernen und die Probe zu analysieren.

2.10 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung und -mikroskopie (Harlow und Lane, 1988)

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz werden Antikörper zum Nachweis von Antigenen verwendet. Diese Methode wird vornehmlich zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation dieser Antigene eingesetzt. Prinzipiell werden die zu untersuchenden Zellen zunächst fixiert, permeabilisiert und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit einer Proteinlösung behandelt. Anschließend folgt die Inkubation mit einem primären Antikörper, der gegen ein oder mehrere Epitope des zu untersuchenden Antigens gerichtet ist. Der Nachweis des Antigens erfolgt letztlich über einen sekundären fluorochromgekoppelten Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Das Fluorochrom des sekundären Antikörpers emittiert nach Bestrahlung im Wellenlängenbereich des Anregungsspektrums, Licht eines längeren Wellenlängenbereichs und kann mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops detektiert werden.

2.10.1 Zellpräparation

Zur Durchführung von indirekten Immunfluoreszenzstudien wurden Zellen auf 20 x 20 mm Deckgläsern in Multiwell-Platten ausgesät. Dazu wurden die Deckgläser zunächst zur Sterilisation in 96%iges Ethanol getaucht und über dem Bunsenbrenner abgeflammt. Säugerzellen wurden in der nötigen Dichte von etwa $2 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Deckglas ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag (nach 16 bis 24 h Inkubationszeit) wurden die Zellen für die entsprechenden Experimente verwendet oder es wurden unbehandelte Zellen untersucht.

2.10.2 Fixierung der Zellen

Durch die Fixierung wird das Antigen immobilisiert, dabei sollte die Struktur und die subzelluläre Lokalisierung des Antigens möglichst nicht verändert werden. Nach der Fixierung sollte die zelluläre Architektur erhalten bleiben und Antikörper dennoch Zugang zu den zellulären Kompartimenten haben. Manche Epitope werden bei der Fixierung maskiert oder durch das Fixierungsagens verändert. In dieser Arbeit wurde zur Fixierung der Zellen Formaldehyd in frisch hergestellter Paraformaldehyd-Lösung verwendet.

Fixierung durch Vernetzung (Formaldehyd-Fixierung):

Formaldehyd fixiert Zellen, indem es Proteine durch Bildung intramolekularer Brücken zwischen Aminogruppen miteinander vernetzt. Die Methode der Formaldehyd-Fixierung ist relativ schonend für die Zellarchitektur und Membranstrukturen der Zellen bleiben weitestgehend intakt, während der Fixierungsgrad relativ niedrig ist. Zellen wurden zunächst in PBS gewaschen, 15 min. in 2% Paraformaldehyd-Lösung (in PBS) bei RT (Raumtemperatur) fixiert und erneut dreimal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch 15 minütige Inkubation bei RT mit 0,1% Triton-X-100 (in PBS) permeabilisiert und dreimal in PBS gewaschen.

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalz-Lösung):

140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4

Paraformaldehyd-Lösung:

2% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4

0,1% Triton-X-100-Lösung:
0,1 % Triton-X-100 in PBS

2.10.3 Antikörperbindung

Zunächst wurden die Zellpräparate zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen 45 min. in 3% BSA-Lösung (in PBS) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen eine Stunde mit dem primären Antikörper (verdünnt in 3% BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS zur Entfernung ungebundener Antikörper erfolgte die Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten sekundären Antikörper (verdünnt in 3% BSA) für 45 min. bei RT. Nachfolgend wurde dreimal in PBS gewaschen. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluorochrome wurden alle Inkubationsschritte von diesem Zeitpunkt an im Dunkeln durchgeführt. Die Präparate wurden abschließend in CITIFLUOR AF100 Medium eingebettet und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

BSA (bovines Serumalbumin) -Lösung: 3% in PBS, pH 7,4

2.10.4 Doppelfärbungen

Mit der Technik der indirekten Immunfluoreszenz ist es möglich durch Doppelfärbungen die subzelluläre Lokalisierung von zwei verschiedenen Antigenen simultan nachzuweisen. Dabei kann die Lokalisierung des einen Antigens in Relation zur Lokalisierung des anderen Antigens analysiert werden. Es ist wichtig für die Doppelfärbung, dass die beiden Antigene von zwei verschiedenen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen werden, indem primäre Antikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet werden. Durch Anwendung von sekundären Antikörpern, die speziesspezifisch die primären Antikörper erkennen und verschiedene Fluorochrome tragen, kann das eine Antigen vom anderen unterschieden werden. Doppelfärbungen mit zwei verschiedenen primären und sekundären Antikörpern erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie bereits im Abschnitt zur Antikörperbindung (Abschnitt 2.10.3) beschrieben. Dazu wurden die unterschiedlichen primären bzw. sekundären Antikörper in einer Inkubationslösung

gleichzeitig verwendet.

2.10.5 Immunfärbung von Gewebeschnitten

Die Immunfärbung von Gewebeschnitten erfolgte im Prinzip wie in 2.10.1 bis 2.10.4 beschrieben. Die Unterschiede waren wie folgt:

Die Fixierung der Vorhautepidermis erfolgte in 2%iger Paraformaldehyd-Lösung für 90 min. bei RT. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde das Gewebe mit Jung Gewebe-Einfrier-Medium über Nacht bei 4°C infiltriert. Danach wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und 10 µm dicke Querschnitte mit Hilfe eines Jung CM3000 Mikrotom (Leica) geschnitten.

Diese Schnitte wurden in 3% BSA für 60 min. bei RT geblockt und die Antikörper-Inkubationsschritte erfolgten weitere 90 min. bei RT. Alle anderen Schritte erfolgten analog 2.10.1 bis 2.10.4.

2.10.6 Fluoreszenzmikroskopie

2.10.6.1 Epifluoreszenz-Mikroskopie

Die Präparate wurden an einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss (Axiovert 135) mit digitalem Intas Kamerasystem (Mikroskop Imager Typ Focus 400) ausgewertet. Proben wurden gesichtet und Bilder mit entweder einem 10x Objektiv (0,25 numerische Apertur, NA), einem 20x Objektiv (0,4 NA) oder einem 100x Objektiv (1,30 NA) aufgenommen.

2.10.6.2 Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie

Die konfokale Analyse wurde mittels konfokalen Mikroskopsystems TCS-SP/2 der Firma Leica Microsystems an einem aufrechten Leica DMRE Mikroskop durchgeführt. Proben wurden gesichtet und Bilder mit entweder einem 40x Objektiv (1,25 NA) oder einem 63x Objektiv (1,32 NA) aufgenommen.

IV. Ergebnisse

Zur Untersuchung potentieller Eintrittsmechanismen von HSV-1 in Epithelien wurden Infektionsstudien der polarisierten Epithelzelllinie MDCKII, humaner primärer Keratinozyten und humaner Vorhautepidermis durchgeführt. Für das Verständnis der molekularen Determinanten des HSV-1 Eintritts in polare Epithelien ist es unerlässlich, zunächst den primären Ort des Viruseintritts in das Epithel festzustellen. Daraufhin wurden Studien zu einigen zellulären und viralen Komponenten durchgeführt, die am HSV-1 Eintritt beteiligt sind. Schließlich werden Untersuchungen zur zellulären Signaltransduktion und ihrer Beeinflussung des viralen Eintritts beschrieben.

Zunächst werden die experimentellen Grundlagen für die HSV-1 Eintrittsstudien geschildert, um anschließend auf Infektionsstudien der verschiedenen Epithelmodelle einzugehen.

1 Experimentelle Grundlagen der HSV-1 Eintrittsstudien

Der initiale Eintritt von HSV-1 in seine respektive Wirtszelle ist ein komplexer Vorgang. Die verschiedenen Schritte umfassen die Penetration der Plasmamembran, den Transport des Virions zum Nukleus, wo die Freisetzung der viralen DNA an der Kernpore stattfindet. In der vorliegenden Arbeit wurden Mechanismen untersucht, die zu jedem dieser Schritte beitragen könnten. Der erfolgreiche Viruseintritt in individuelle Zellen wurde anhand der Initiation der sehr frühen (engl. immediate early) viralen Genexpression sichtbar gemacht.

1.1 ICP0 als Marker für die HSV-1 Infektion

ICP0 gehört zu den ersten exprimierten Proteinen nach der Freisetzung der DNA in den Nukleus und wurde daher in den folgenden Infektionsstudien als Marker für den erfolgreichen Viruseintritt genutzt. Während ab 1 h p.i. ICP0 in einzelnen Zellen ausschließlich in distinkten Kernstrukturen lokalisierte (Daten nicht gezeigt), füllte es zusätzlich ab 2 h p.i. diffus den Nukleus aus (Abb. IV.1, B). Ab 3 h p.i. relokalierte

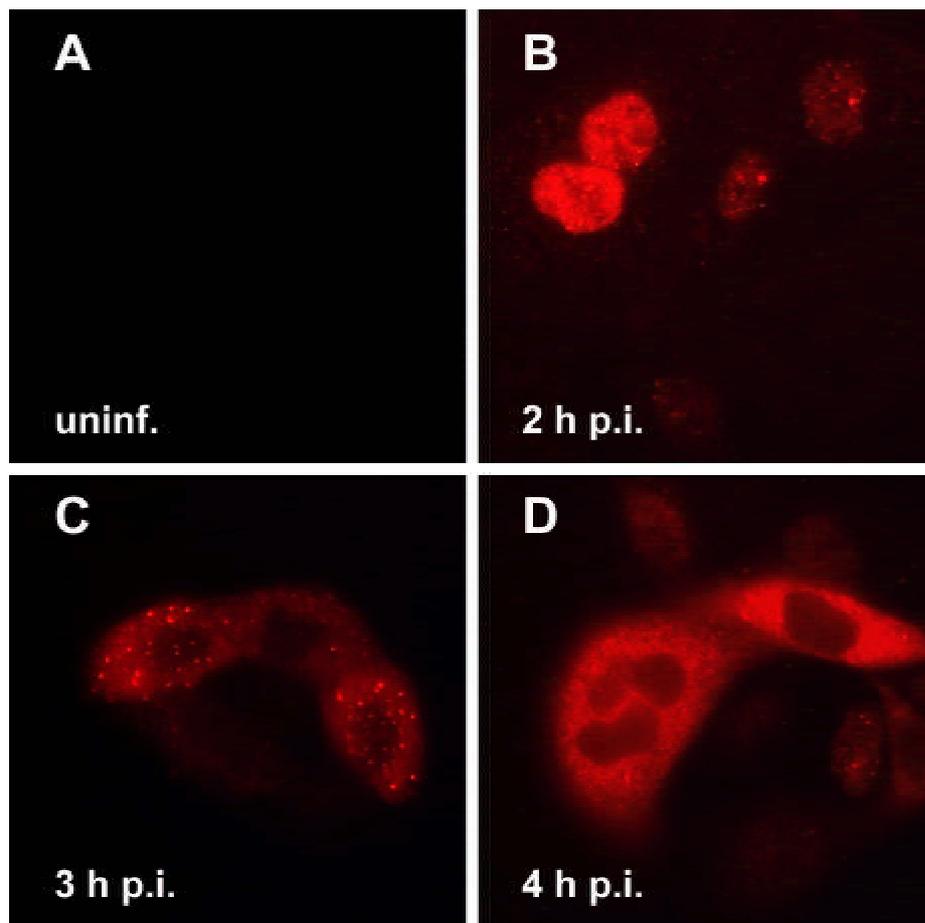


Abb. IV.1: ICP0 Lokalisierung im HSV-1 Infektionsverlauf

Subkonfluente MDCKII Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen mit HSV-1 infiziert (5 PFU/Zelle, B-D) oder mock infiziert (A). Entweder 2 h p.i. (B), 3 h p.i. (C) oder 4 h p.i. (D) wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. ICP0 Färbung wurde mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab 11060) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot) durchgeführt.

ICP0 zunächst zu Vesikel-ähnlichen Strukturen im Zytoplasma (Abb. IV.1, C), um 4 h p.i. diffus im Zytoplasma zu lokalisieren (Abb. IV.1, D).

Die Lokalisierung von ICP0 lieferte zusätzlich zur Funktion des Eintritts-Markers somit ein Maß, inwieweit der Infektionsverlauf in einer individuellen Zelle fortgeschritten war.

Bei allen folgenden Experimenten wurden uninfizierte Zellen zur Kontrolle verwendet (Abb. IV.1, A). Es wurde im Folgenden jedoch bis auf Einzelfälle auf die Abbildung dieser Kontrolle verzichtet.

1.2 Gereinigte Virus-Präparation

Die Präparation von infektiösen HSV-1 Virionen kann entweder aus extrazellulärem, d.h. aus der Wirtszelle freigesetzten Viren oder aus intrazellulären Viren erfolgen (Powell und Watson, 1975). Um den möglichen Einfluss dieser verschiedener Viruspräparationen auf den Viruseintritt zu überprüfen, wurden MDCKII Zellen mit zwei auf diese unterschiedlichen Weisen präparierten Virusinokula infiziert. Als sensitiver Marker für zellulären Stress wurde das Aktin-Zytoskelett mit Fluorochromgekoppeltem Phalloidin 1 h p.i. angefärbt. Ein Beispiel für eine solche Stressreaktion ist die Bildung von Stressfibrillen, gebündelten filamentösen Aktin (F-Aktin) Strukturen.

Extrazelluläres und über Gradienten aufgereinigtes Virus zeigte keine strukturellen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts im Vergleich zu uninfizierten Zellen (Abb. IV.2, A, B). Infektion mit intrazellulärem Virus hingegen zeigte eine Ausspreizung der Zellen und die Bildung von starken Aktin-Stressfibrillen (Abb. IV.2, D). Wenn eine Mock-Infektion mit einer Präparation uninfizierter Zellen auf MDCKII Zellen durchgeführt wurde, zeigte sich die Ausbildung ähnlicher Strukturen (Abb. IV.2, C). Es handelte sich vermutlich bei der beobachteten Stressreaktion von MDCKII Zellen auf intrazelluläres Virusinokulum um eine Reaktion auf Kontaminationen des Inokulums mit zellulären Membranen oder Proteinen.

Daher wurden für alle weiteren Experimente Virusinokula verwendet, die aufgereinigte extrazelluläre Viren enthielten.

Zur weiteren Charakterisierung der verwendeten Virusinokula wurden elektronen-

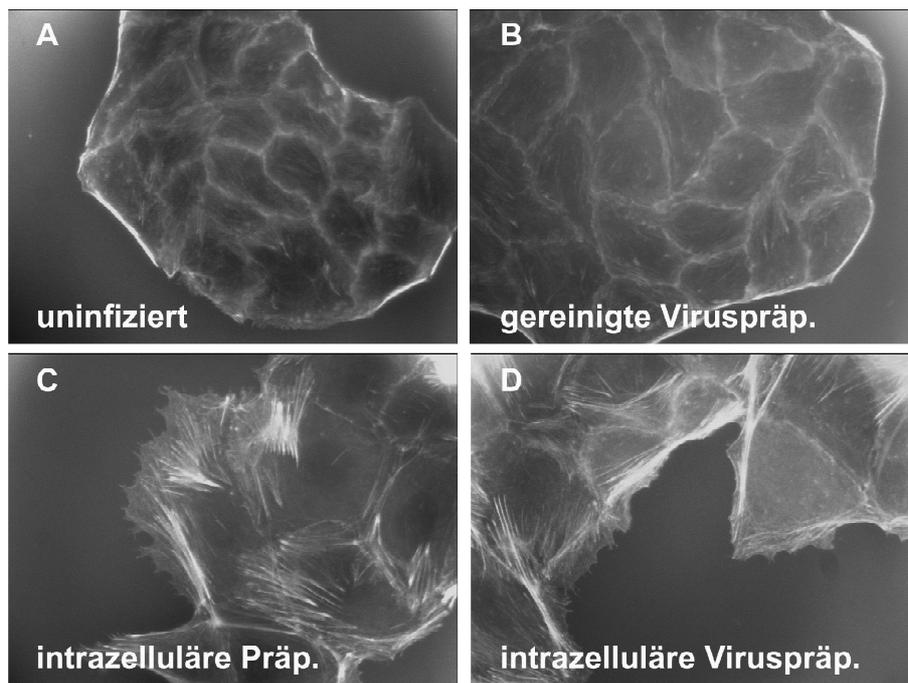


Abb. IV.2: Einfluss der Virus-Präparation auf die zelluläre Stressantwort
 Subkonfluente MDCK II Zellen wurden 16 h nach dem Aussäen nicht infiziert (A), mock infiziert (C) sowie mit entweder gereinigtem (B) oder intrazellulärem (D) HSV-1 Inokulum (5PFU/Zelle) infiziert. Nachfolgend wurden die Zellen 1 h p.i. in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert.

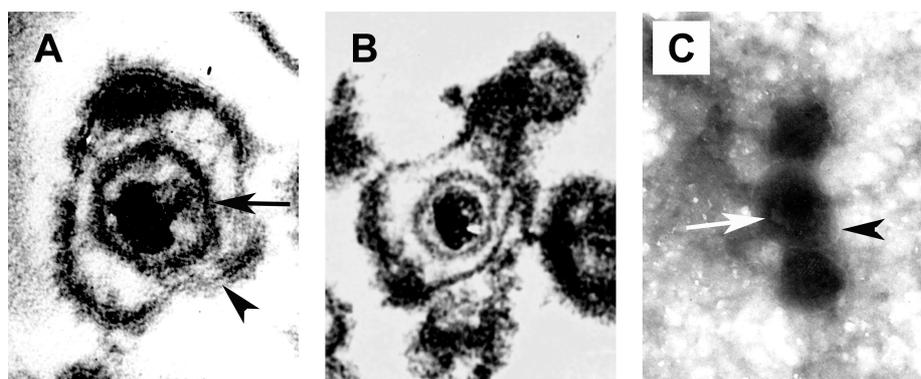


Abb. IV.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von HSV-1 Virionen
 Vero Zellen wurden für 1 h mit gereinigtes HSV-1 Inokulum (100 PFU/Zelle) inkubiert und nachfolgend für die Elektronenmikroskopie behandelt (A und B). Alternativ wurde das gereinigte HSV-1 Inokulum direkt für die elektronenmikroskopische Negativfärbung verwendet (C). Virionen hatten einen Durchmesser von 150-200 nm. Dargestellt sind Vergrößerungen von x90.000 (A) und x75.000 (B, C)

mikroskopische Untersuchungen zur ultrastrukturellen Integrität der Viruspartikel durchgeführt. Positiv wie negativ gefärbte Virus-Partikel zeigten die typischen Struktureinheiten der HSV-1 Virionen (Abb. IV.3, A, B, C). Außen erkannte man die Doppelmembran der Lipid-Hülle (Abb. IV.3, A, C, Pfeilspitzen). Weiter innen erkannte man ein elektronendichtes Sechseck, das ikosaedrische Kapsid (Abb. IV.3, A, C, Pfeile), das die DNA einschließt. Zwischen Hüllmembran und Kapsid liegt die lockere Proteinmatrix des Teguments. Die gezeigten Bilder stellen repräsentative Beispiele für die ultrastrukturelle Varianz der Virionen dar (Abb. IV.3, A, B).

1.3 Charakteristika von MDCKII Zellen

Für Eintrittsstudien in polarisierte Epithelien wurden MDCKII Zellen als Zellkultursystem verwendet. Diese Zelllinie ist ein Subklon der heterogenen parentalen Zelllinie MDCK, einer der am besten charakterisierten polaren Epithelzelllinien. Konfluente MDCKII Zellen bilden ein polares einschichtiges Epithel aus. Subkonfluente MDCKII Zellen wachsen in Zell-Inseln verschiedener Größe. Da Infektionsstudien in konfluenten und subkonfluenten MDCKII Zellen durchgeführt wurden, wurden subkonfluente Zellen zunächst auf zelluläre Polarität und Homogenität untersucht.

1.3.1 Morphologie und Polarität

Zur Charakterisierung der zellulären Apikal-Basolateral-Polarität subkonfluenter MDCKII Zellen wurde die Lokalisierung von Zell-Zell-Adhäsionsproteinen durch Immunfluoreszenzstudien untersucht.

Ausbildung der Zonula occludens (engl. tight junction):

Das Zonula Occludens Protein 1 (ZO-1) ist ein Bestandteil der Zonula occludens, die sich typischerweise an der apikalen Seite von Zellen an laterale Membranen anschließt. Durch ihre enge Verknüpfung trennt sie wie ein Gürtel apikale Membrandomänen von basolateralen Membrandomänen durch Hemmung lateraler Lipid- und Proteindiffusion und sorgen für eine feste Verbindung zwischen Epithelzellen (zur Übersicht Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2000).

Konfokale Analyse subzellulärer Lokalisierungsstudien zeigte ZO-1-Signale, die in einer apikalen Ebene wie ein Band zwischen Zell-Grenzen liegen (Abb. IV.4, A). Dagegen konnte ZO-1 selten in medialen oder basalen Ebenen detektiert werden, nur gelegentlich konnte eine Färbung in der Peripherie von Zell-Inseln erkannt werden (Abb. IV.4, B, C) oder kleinere Zellen zeigten ZO-1 in der als medial bezeichneten Ebene (Abb. IV.4, B, Pfeilspitze). Die Aufnahme der lateralen Ansicht zeigte ZO-1 lokalisiert zu den apikalen Kontaktpunkten der benachbarten Zellen (Abb. IV.4, D, Pfeile). Diese Anordnung ist konsistent mit der Ausbildung der Zonula occludens (Gottardi *et al.*, 1996).

Ausbildung der Zonula adhaerens (engl. adhesion junction):

Das Protein E-Cadherin ist ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, das in einer weiteren epithelialen Zell-Zell-Verbindung lokalisiert, der Zonula adhaerens (Aberle *et al.*, 1996). Die Zonula adhaerens verbindet entlang lateraler Membranen Epithelzellen und stabilisiert ihre feste Bindung.

E-Cadherin-Signale konnten in Lokalisierungsstudien subkonfluenten MDCKII Zellen entlang der Zell-Zell-Grenzen in apikalen, medialen und basalen Ebenen konfokaler Analysen gezeigt werden (Abb. IV.5, A, B, C). Die Ansicht der lateralen Ebene zeigte E-Cadherin entlang der lateralen Zell-Zell-Grenzen (Abb. IV.5, D, Pfeile). Diese Lokalisierung von E-Cadherin bestätigte die Ausbildung einer Zonula adhaerens (Aberle *et al.*, 1996).

Diese Anordnung zeigte in Verbindung mit der Lokalisierung von ZO-1 eine polare Verteilung der Zell-Zell-Verbindungen, die typisch für polare einschichtige Epithelien ist. Die Ausbildung zellulärer Polarität konnte in diesen Studien zusätzlich durch Ko-Färbung des Aktin-Zytoskeletts gezeigt werden, die die Ausbildung von Mikrovilli (Abb. IV.4, A und Abb. IV.5, A) apikal und Stressfasern basal (Abb. IV.4, C und Abb. IV.5, C) visualisierte. Bemerkenswert ist die Ausbildung von starken Aktinbündeln entlang der basalen peripheren Begrenzung der MDCKII Zell-Inseln.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass subkonfluente MDCKII Zellen, die auf Glasoberflächen wuchsen, Charakteristika polarer Epithelzellen zeigten.

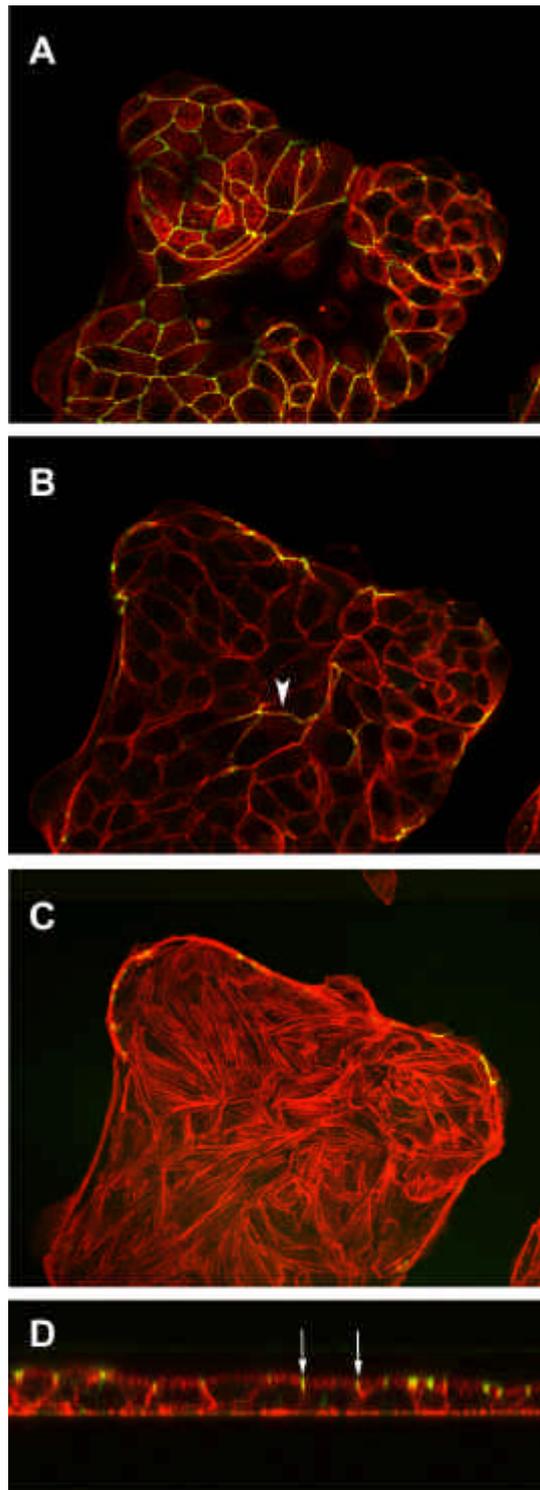


Abb. IV.4: Ausbildung der Zonula occludens in subkonfluenten MDCK II Zellen

Subkonfluente MDCK II Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert (rot). ZO-1 Färbung wurde mit anti-ZO-1-Antikörpern (Mab 1520) und FITC-konjugierten anti-Ratte IgG (grün) durchgeführt. Konfokale Aufnahmen der basalen (A), medialen (B), apikalen (C) und lateralen (D) Ebene sind dargestellt. Die Überlagerung der Färbungen ist gezeigt.

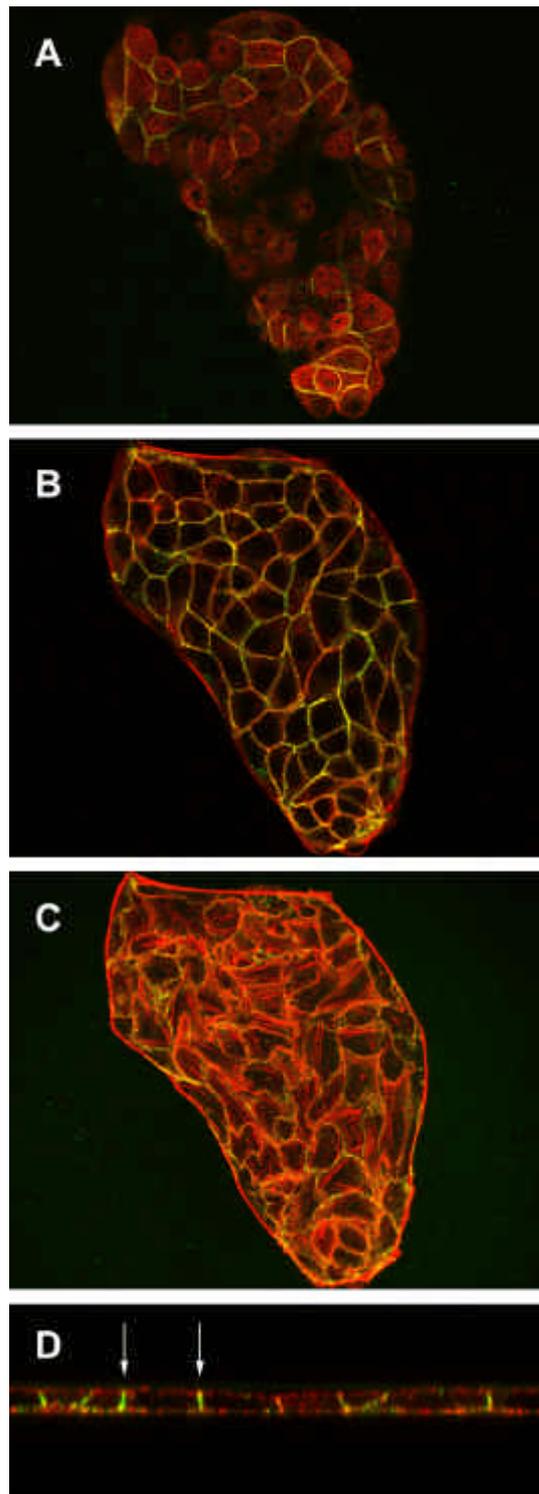


Abb. IV.5: Ausbildung der Zonula adhaerens in subkonfluenten MDCK II Zellen

Subkonfluente MDCK II Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert (rot). E-Cadherin/Uvomorulin Färbung wurde mit anti-Uvomorulin-Antikörpern (DECMA-1) und Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Ratte IgG (grün) durchgeführt. Konfokale Aufnahmen der basalen (A), medialen (B), apikalen (C) und lateralen (D) Ebene sind dargestellt. Die Überlagerung der Färbungen ist gezeigt.

1.3.2 Weitere Komponenten des Zytoskeletts

Zur weiteren Charakterisierung subkonfluenter MDCKII Zellen wurde die Lokalisierung zellulärer zytoskelettassoziierter Proteine untersucht. Im Folgenden werden die Lokalisierung der Zytoskelett-Proteine Mena (engl. mouse enabled) und VASP (engl. vasolidator stimulated phosphoprotein), des Adhäsionsmoleküls Vinculin und tyrosin-phosphorylierter Proteine dargestellt.

In subkonfluenten MDCKII Zellen wurden entweder Mena oder VASP und jeweils das Aktinzytoskelett gefärbt. Mena Lokalisierung konnte in punktierten Strukturen insbesondere entlang der Zell-Zell-Kontakte gezeigt werden (Abb. IV.6, A, B). VASP hingegen lokalisierte nicht nur entlang der Zell-Zell-Kontakte (Abb. IV.6, C, D, Pfeilspitze), sondern darüber hinaus auch basal in distinkten Strukturen entlang der Zellgrenzen peripherer Zellen (Abb. IV.6, C, D, Pfeile) und apikal in Mikrovilli (Abb. IV.6, E, F).

Subkonfluente MDCKII Zellen wurden weiterhin mit einem Antikörper gegen Vinculin gefärbt. Vinculin lokalisierte in distinkten Strukturen, den Adhäsionspunkten, an der basalen Membran von MDCKII Zellen (Abb. IV.7, A, B) und entlang der Zell-Zell-Kontakte (Abb. IV.7, B Pfeil). Bemerkenswert ist die hohe Anzahl der Adhäsionspunkte, insbesondere am Rand der peripheren Zellen von MDCKII Inseln, die auf eine besonders starke Zell-Matrix Adhäsion dieser Zellen schließen lässt (Abb. IV.7, A, B Pfeilspitzen). Die mit einem Antikörper gegen Phospho-Tyrosin-Epitope gefärbten Zellen zeigten im basalen Fokus Adhäsionspunkt-ähnliche Strukturen (Abb. IV.7, C). Im apikalen Fokus zeigten sich besonders deutlich Phospho-Tyrosin Signale entlang der Zell-Zell-Kontakte (Abb. IV.7, D). Die Färbung gegen Phospho-Tyrosin zeigte die Anwesenheit aktivierter phosphorylierter Proteine. Dabei ist bemerkenswert, dass nicht alle Zellen der MDCKII Zell-Inseln eine homogene Färbung aufweisen (Abb. IV.7, C, im Vgl. Pfeilspitze zu Pfeil). Diese Unterschiede folgten jedoch keinem ersichtlichen Muster.

Subkonfluente MDCKII Zellen zeigten grundsätzlich eine homogene Verteilung der angefärbten Proteine, wobei eine besondere Prominenz der peripheren Zellen in Bezug auf die Zell-Matrix-Adhäsion anzumerken ist.

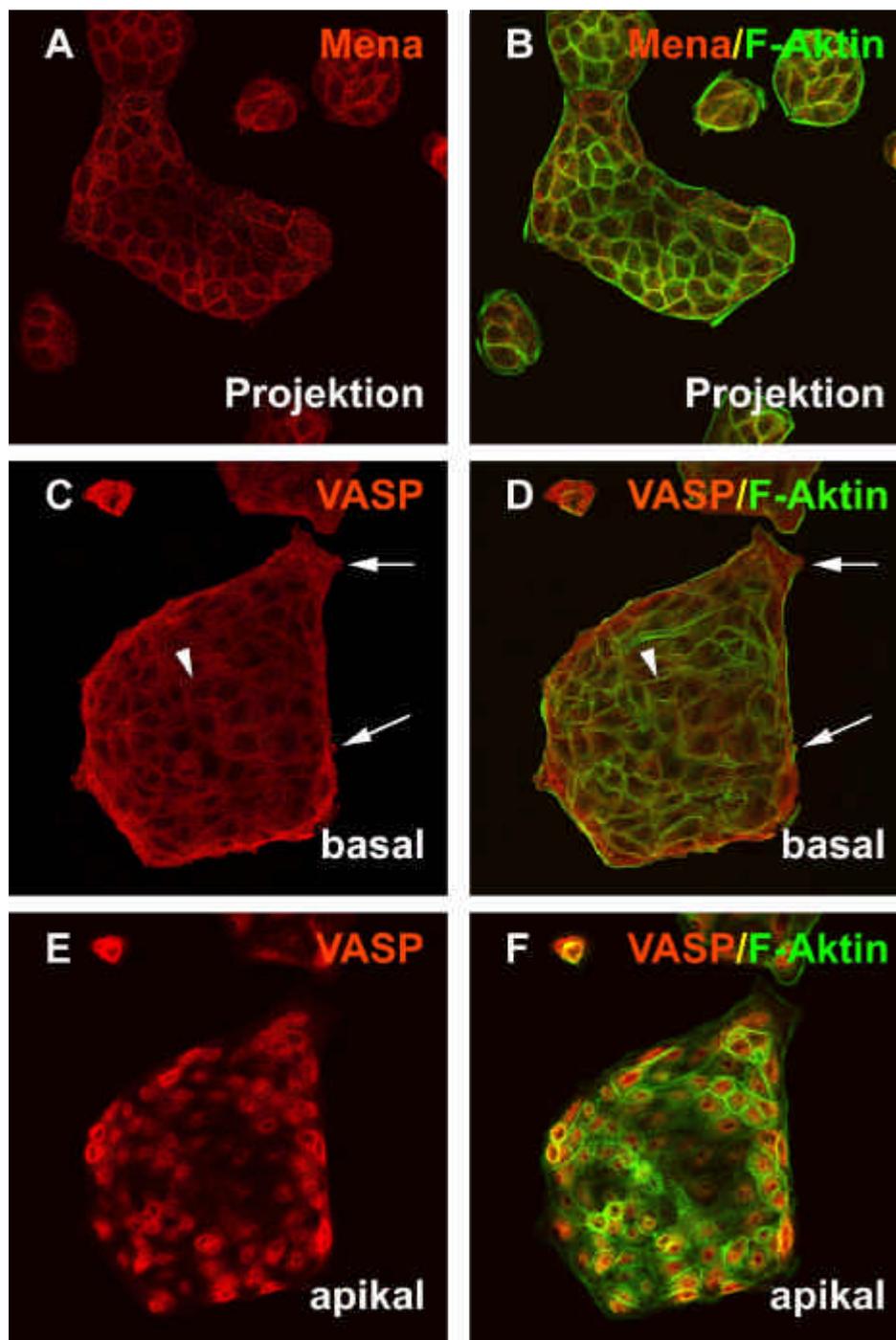


Abb. IV.6: Lokalisierung von Mena/VASP in subkonfluenten MDCK II Zellen

Subkonfluente MDCK II Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert (grün). Die Mena Färbung wurde mit anti-Mena-Antiserum (2197) und Cy3-konjugierten anti-Kaninchen IgG (rot) durchgeführt (A, B). Die VASP Färbung wurde mit anti-VASP-Antiserum (2010) und Cy3-konjugierten anti-Kaninchen IgG (rot) durchgeführt (C-F). Konfokale Projektionen (A, B) oder konfokale Aufnahmen der basalen (C, D) sowie apikalen (E, F) Ebene sind dargestellt. Die Mena- und VASP-Färbung (A, C, E) sowie die Überlagerung der Färbungen mit dem Aktin-Zytoskelett (B, D, F) sind gezeigt.

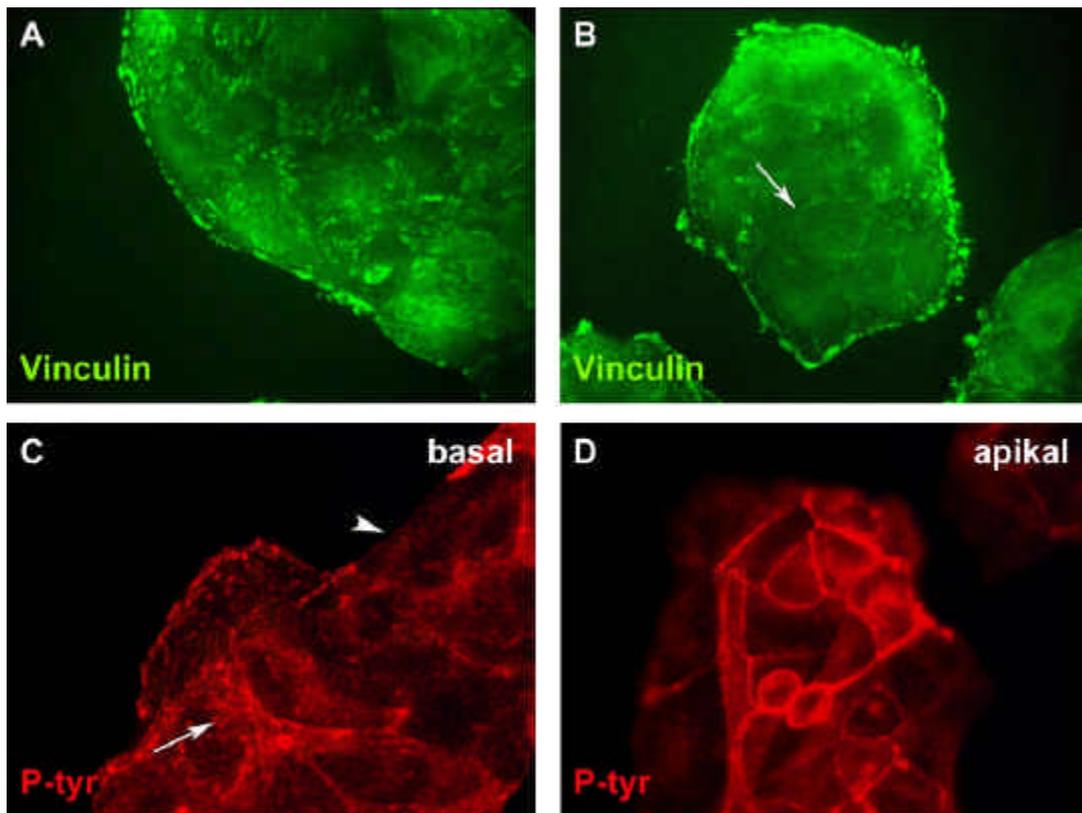


Abb. IV.7: Lokalisierung von Vinculin und Phosphotyrosin-Epitopen in subkonfluenten MDCK II Zellen

Subkonfluente MDCK II Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Die Vinculin Färbung wurde mit anti-Vinculin-Antikörpern (V9131) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (grün) durchgeführt. Zwei unabhängige Experimente sind gezeigt (A, B). Die Phospho-Tyrosin (P-Tyr) Färbung wurde mit anti-P-Tyr-Antikörpern (4G10) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot) durchgeführt. (C, D). Epifluoreszenz-Aufnahmen des basalen (C) sowie apikalen (D) Ebene sind dargestellt .

2 Tropismus der HSV-1 Infektion polarer Epithelzellen

2.1 HSV-1 Infektionsstudien in MDCKII Zellen

Um den Tropismus des Eintritts von HSV-1 in MDCKII Zellen zu untersuchen, wurden sowohl konfluente als auch subkonfluente MDCKII Zellen infiziert und 2 h p.i. auf sehr frühe Genexpression untersucht. Als Ko-Färbung wurde das Aktin-Zytoskelett angefärbt, um die individuelle Zellmorphologie und -homogenität zu visualisieren.

2.1.1 Eintrittsstudien in konfluente polare MDCKII Zellen

Konfluente MDCKII Zellen wurden infiziert und mit einem Antikörper gegen ICP0 gefärbt. Nur wenige Zellen zeigten ein Signal für ICP0 Genexpression 2 h p.i. (Abb. IV.8, A). Selbst bei höherer Multiplizität der Infektion waren nur wenige Zellen infiziert (Abb. IV.8, B).

Wurden konfluente MDCKII Zellen hingegen vor der Infektion verwundet, konnte ICP0 Färbung in Zellen direkt an der Wunde beobachtet werden (Abb. IV.8, C). Da die Zellen direkt an der Wunde keine Apikal-Basolateral-Polarität aufweisen, legt dieses Ergebnis eine Nutzung basolateraler oder unpolarisierter Membrandomänen durch HSV-1 für den Eintritt nahe.

Die Ausbildung der zellulären Polarität von MDCKII Zellen ist am besten bei Wachstum der Zellen auf Filtermembranen charakterisiert. Bei MDCKII Zellen, die auf Filtern wachsen, können apikale und basolaterale Membranen durch die Teilung des Multiwells z.B. unterschiedlichen Kulturmedien oder Wachstumsstimuli exponiert werden. Hier wurden entweder apikale oder basolaterale Membrandomänen von MDCKII Zellen gegen HSV-1 Inokulum exponiert. Bei der basolateralen Infektion von MDCKII Zellen mussten die HSV-1 Partikel durch die Poren des Filters diffundieren, um Zugang zu Zelloberflächen zu erhalten. Bei Infektion von MDCKII Zellen über die apikale Membrandomäne konnten keine infizierten Zellen festgestellt werden (Abb. IV.8, D). Bei basolateraler Infektion wurden hingegen wenige infizierte Zellen gefärbt (Abb. IV.8, E). Kontrollexperimente zeigten jedoch, dass HSV-1 die Poren des Filters

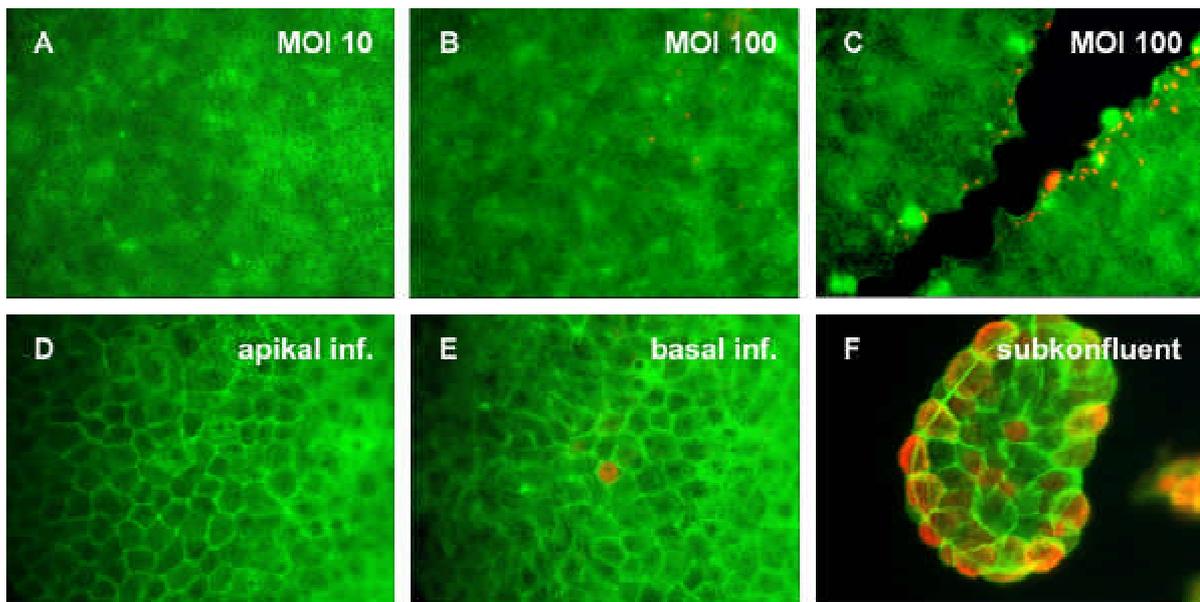


Abb. IV.8: Eintrittsstudien in konfluente polare MDCK II Zellen

MDCK II Zellen wurden entweder auf Glasoberflächen (A-C) oder auf Transwell Clear Filtern (D-F) für 16 h (F) oder 72 h kultiviert (A-E) und nachfolgend mit HSV-1 infiziert. Die HSV-1 Infektion erfolgte mit einer Multiplizität entweder von 10 PFU/Zelle (A) oder von 100 PFU/Zelle (B-F). Infektionsstudien wurden in unverwundeten (A,B, D-F) oder 1 h vor der Infektion verwundeten Kulturen durchgeführt. Bei Infektionsstudien von Zellen auf Filtern wurde das Virus-Inokulum entweder der apikalen (D, F) oder basolateralen (E) Membrandomäne exponiert. 2 h p.i. wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. ICP0 Färbung wurde mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab 11060) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot) durchgeführt. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert (grün). Die Überlagerung der Färbungen ist gezeigt.

nur unzureichend penetriert. Bei Experimenten, in denen HSV-1 Partikel durch Membranporen ohne Wachstum von Zellen diffundierten, konnte nach einer Stunde nur weniger als 1% der infektiösen Viruspartikel von der basalen in die apikale Teilung diffundieren (Daten nicht gezeigt). Die geringe Effizienz der Infektion über basale Membrandomänen von MDCKII Zellen könnte somit auf die experimentelle Versuchsführung zurückzuführen sein. Weitere Kontrollexperimente mit subkonfluent auf Filtern gewachsenen MDCKII Zellen zeigen, dass sich diese auf Filtern infizieren ließen (Abb. IV.8, F).

Daher lässt sich feststellen, dass konfluente MDCKII Zellen, die entweder auf Glas oder auf Filtern wuchsen, kaum HSV-1 Eintritt über apikale Membrandomänen zeigten.

2.1.2 Eintrittsstudien in subkonfluente MDCKII Zellen

Im Gegensatz zur Infektion konfluenter MDCKII Zellen, konnten bei der Infektion subkonfluenter MDCKII Zellen ICP0 Färbung insbesondere am Rand der Zell-Inseln beobachtet werden (Abb. IV.9, A, B). Die Färbung gegen ICP0 korrelierte mit der Färbung gegen Viruskapside. Anti-Kapsid-Antikörper färbten 2 h p.i. Viruspartikel insbesondere in den peripheren Zellen der Zell-Inseln (Abb. IV.9, C,D). Kapsid Färbung und ICP0 Färbung deuten auf eine Penetration der Virione insbesondere in unpolarierte periphere Zellen der Zell-Inseln hin, bei denen basolaterale Membrandomänen zugänglich sind. Nur wenn Zellen mit höherer Virusmenge infiziert wurden, wurden gelegentlich infizierte Zellen in zentraleren Bereichen der Zell-Inseln beobachtet (Abb. IV.9, B, F). Diese Zell-Inseln zeigten die Lokalisierung von ZO-1 an den apikalen Seiten lateraler Membranen. Unterschiede der ZO-1 Färbung zu Inseln mit ausschließlich peripherer Infektion konnten nicht beobachtet werden (Abb. IV.9, E). Da ICP0 zunächst im Nukleus lokalisiert und im Verlauf der Infektion eine zytoplasmatische Verteilung annimmt, ist es interessant zu beobachten, dass infizierte Zellen innerhalb der Insel eine nukleäre Verteilung von ICP0 zeigten, während Zellen in der Peripherie ausschließlich eine zytoplasmatische Verteilung aufwiesen (Abb. IV.9, F). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Infektion zunächst in peripheren Zellen erfolgt und mit Verzögerung Zellen innerhalb der Insel infiziert werden.

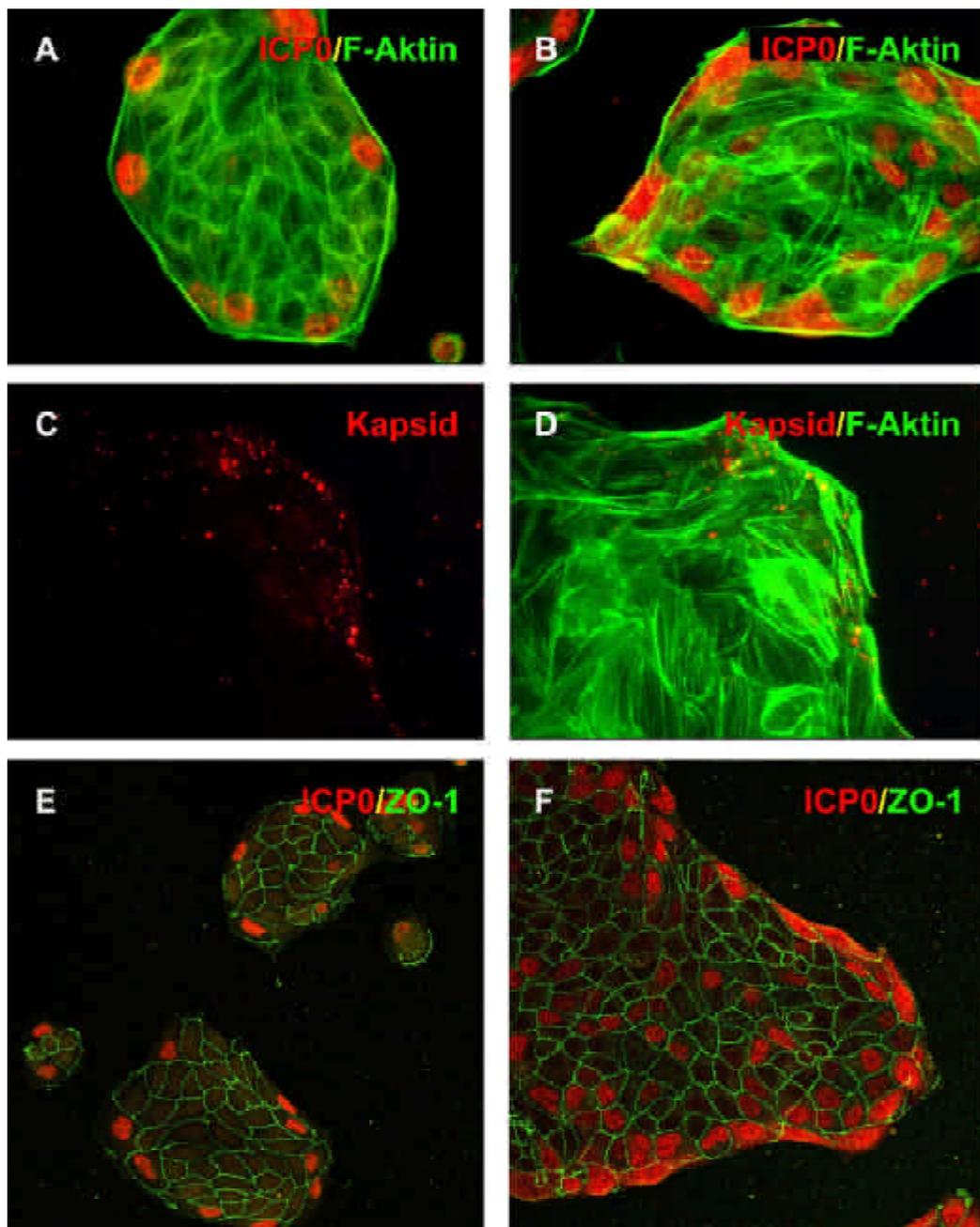


Abb.IV. 9: Eintrittsstudien in subkonfluente MDCK II Zellen

Subkonfluente MDCK II Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen mit 2-5 PFU/Zelle (A, E) oder 100 PFU/Zelle (B-D, F) infiziert. Die Zellen wurden 2 h p.i. fixiert und nachfolgend mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) und entweder mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab 11060) oder mit anti-Kapsid Antikörpern (DM165) ko-gefärbt. Die Antikörper-Färbung wurde dabei durch Cy3-konjugierte anti-Maus IgG (rot) visualisiert. Alternativ wurden Zellen mit anti-ICP0-Antiserum (r191) und anti-ZO1-Antikörpern (Mab 1520) ko-gefärbt. Diese Färbung wurde durch Cy3-konjugierte anti-Kaninchen IgG (rot) und Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Ratte IgG (grün) visualisiert. Die Doppelfärbungen sind entweder als Einzelfärbung (C) oder Überlagerungen der Färbungen (A, B, D-F) dargestellt.

2.1.3 Infektion von MDCKII Zellen

Um zu überprüfen, ob Zellen mit sehr früher Genexpression eine produktive Infektion zeigen, wurde die Ausbildung des zytopathischen Effektes (CPE, engl. cytopathic effect) in konfluenten und subkonfluenten MDCKII Kulturen sowie Wachstum des Virus in subkonfluenten MDCKII Zellen untersucht.

In Zeitkurven-Experimenten von konfluenten MDCKII Zellen konnte in Übereinstimmung mit der selten beobachteten ICPO Färbung kaum ein zytopathischer Effekt beobachtet werden (Abb. IV.10, A, B). Unpolare konfluente Vero Zellen bildeten zum Vergleich einen vollständigen CPE aus (Abb. IV.10, E, F). Wurden konfluente MDCKII Zellen vor der Infektion verwundet, bildete sich hingegen ebenfalls ein signifikanter CPE aus (Daten nicht gezeigt). Infektion von subkonfluenten MDCKII Zellen resultierte in einem vollständigen CPE (Abb. IV.10, C, D).

Wachstumskurven in subkonfluenten MDCKII Zellen verglichen mit permissiven Vero Zellen zeigten eine Verzögerung des Maximums der Virusproduktion um etwa 24 h (in Zusammenarbeit mit M. Jansen, Jansen, 2003).

Zellen, die sehr frühe Genexpression zeigten, können somit als produktiv infizierte Zellen bezeichnet werden.

Die Effizienz der HSV-1 Infektion von konfluenten MDCKII Zellen, die ein polares einschichtiges Epithel ausbildeten, war ausgesprochen niedrig. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine auffällige Erhöhung der Permissivität für den HSV-1 Eintritt in verwundeten Epithelien und in den peripheren Zellen subkonfluenter MDCKII Zellen. Dies legt einen Eintrittsmechanismus nahe, der auf der Zugänglichkeit basolateraler Membranen beruht.

2.2 Tropismus der HSV-1 Infektion von Hautmodellen

Da Haut und Schleimhäute die primären Epithelien der HSV-1 Infektion *in vivo* repräsentieren, wurden im Folgenden Eintrittsstudien in humanen Epidermis-Explant-Kulturen und in primären Keratinozyten durchgeführt.

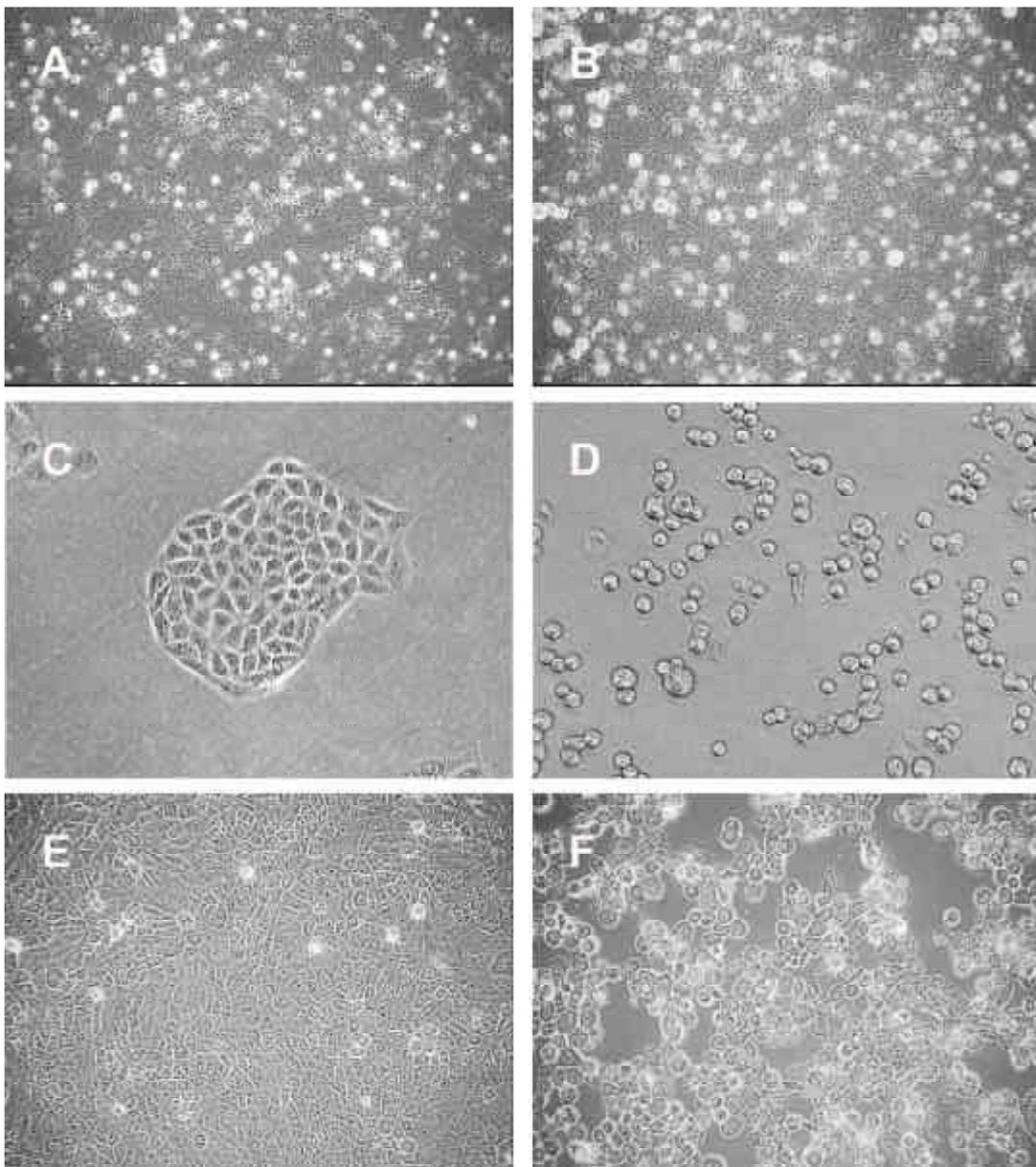


Abb. IV.10: Zytopathischer Effekt der HSV-1 Infektion

Konfluente MDCK II Zellen (A, B) oder konfluente Vero Zellen (E, F) wurden entweder mock-infiziert (A, C, E) oder infiziert mit 50 PFU/Zelle (B, F) drei Tage nach Aussähen. Subkonfluente MDCK II Zellen (C, D) wurden 16 h nach Aussähen entweder mock-infiziert (C) oder infiziert mit 5 PFU/Zelle (D). Der zytopathische Effekt ist 24 h p.i. durch Phasenkontrast-Aufnahmen mit 20x Vergrößerung gezeigt.

2.2.1 Infektion von Epithel-Explant-Kulturen

Um möglichst den Infektionsverlauf *in vivo* nachzuahmen, wurden Eintrittsstudien in humane Vorhautepidermis durchgeführt. Diese wurde aus Vorhaut durch Beschneidungen adulter Spender erhalten. Der Großteil der Dermis und des Bindegewebe wurde mit einer Schere entfernt und anschließend wurde die Epidermis von der verbleibenden Dermis durch Dispasell-Behandlung abgelöst. Die Integrität der Zell-Zell-Kontakte dieser Explantkulturen wurde dabei durch Färbung mit einem anti-E-Cadherin Antikörper bestätigt. Wie zu erwarten konnten E-Cadherin Signale entlang der Zell-Zell-Kontakte detektiert werden. Die Präsenz von E-Cadherin konnte so in allen Zellschichten bis zum Stratum granulosum nachgewiesen werden (Abb. IV.11, B).

Für die Eintrittsstudien wurde HSV-1 dem Medium zugegeben, in dem die Explant-Kultur kultiviert wurde. Die Proben wurden 6 h p.i. fixiert. Frühe virale Genexpression wurde mit einem Antikörper gegen ICP0 über Immunfluoreszenz nachgewiesen. Um die Polarität des Eintritts von HSV-1 zu untersuchen, wurden die Epidermisstücke zum einen auf Virusinokulum schwimmend inkubiert, so dass Virus nur Zugang zu basalen Keratinozyten hatte. Alternativ wurde die Epithel-Explant-Kultur in Virusinokulum eingetaucht, so dass HSV-1 Zugang zu allen Oberflächen der Gewebekultur hatte. In beiden Fällen konnte der Virus-Eintritt nur über basale Zellschichten nachgewiesen werden (Abb. IV.11, A, C-F). Bei höherer Virusmenge konnte virale Genexpression in mehreren Zellschichten bis zum Stratum spinosum nachgewiesen werden (Abb. IV.11, C-F). Basale Zellen zeigten ICP0 im Zytoplasma, während apikal gelegene Zellschichten eine nukleäre Lokalisierung von ICP0 aufwiesen (Abb. IV.11, F).

Aufgrund der zellulären Verteilung von ICP0 im Infektionsverlauf lässt sich vermuten, dass HSV-1 Infektion zunächst in basalen Zellen auftritt, gefolgt von einer Infektion der suprabasalen Zellschichten. Die verzögerte Infektion suprabasaler Zellen könnte einerseits eine Folge der Infektion basaler Zellen oder die Folge einer Diffusion des Virus in den interzellulären Raum sein.

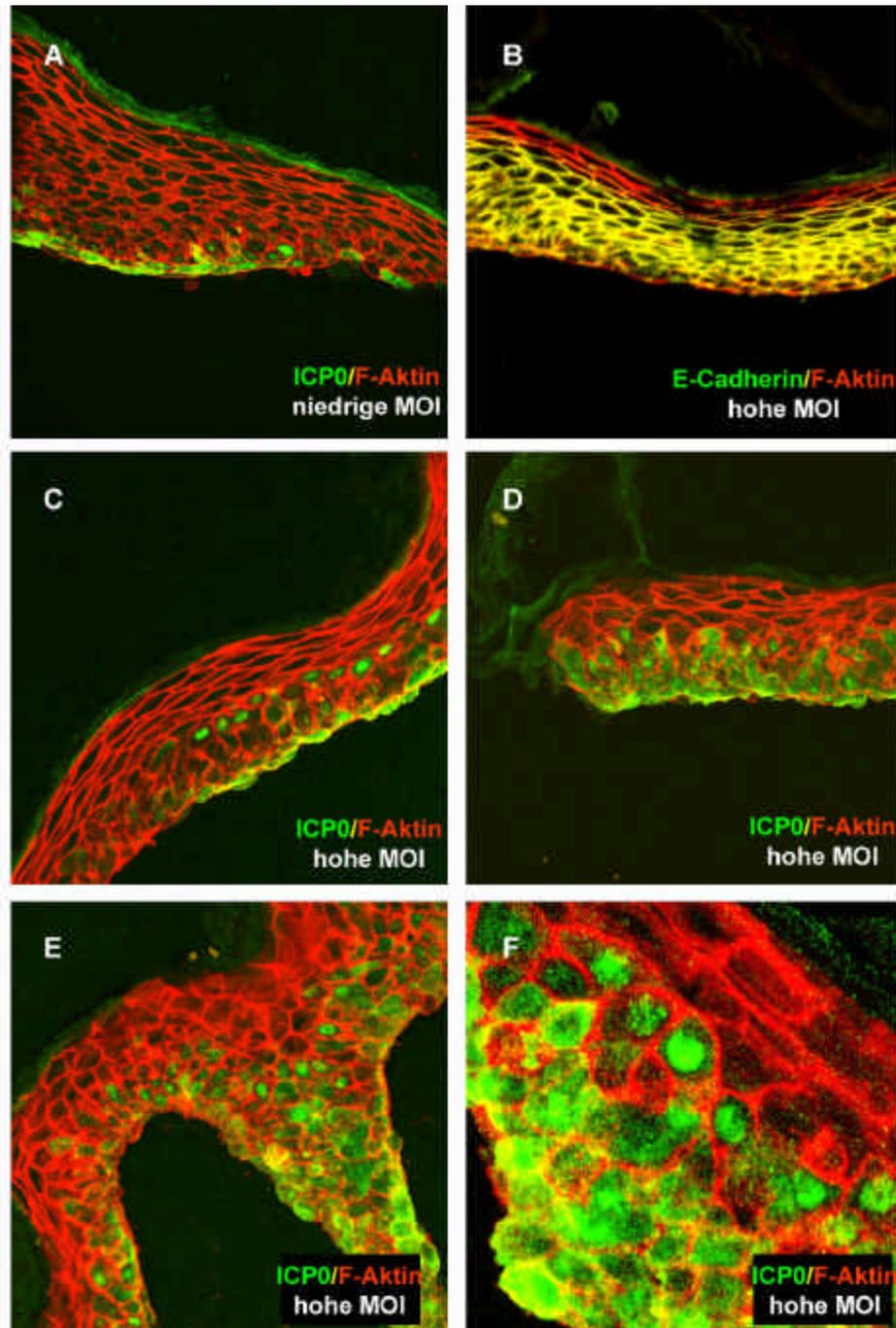


Abb. IV.11: HSV-1 Infektion humanen Vorhautepithels

Vorhautepidermis wurde entweder mit der basalen (A, C) oder apikalen Oberfläche (D-F) auf Keratinozyten-Kultur-Medium schwimmend infiziert. Virus wurde dem Medium in einer berechneten MOI von etwa 10 PFU / Zelle (A) oder 100 PFU / Zelle (C-F) zugegeben. Das Gewebe wurde 6 h p.i. fixiert und geschnitten, gefolgt von der Ko-Immunfärbung der Gewebeschnitte mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin (rot) und entweder anti-ICP0-Antikörpern (Mab 11060, A, C-F) oder anti-E-Cadherin-Antikörpern (hecD, B) und Alexa Fluor 488 anti-Maus IgG (grün). Die Gewebeproben wurden mit der apikalen Oberfläche oben und der basalen Schicht unten dargestellt. In allen Fällen wurde unspezifische Färbung des Stratum corneums apikal beobachtet (grün). Die Überlagerung konfokaler Projektionen ist gezeigt.

Da Infektion suprabasaler Zellschichten ohne die Infektion basaler Zellen nicht beobachtet werden konnte, lässt sich folgern, dass eine Infektion über die periphere Oberfläche nicht erfolgen konnte und dass HSV-1 Keratinozyten effizient infizierte, sobald die basalen Membranen dem Virus zugänglich waren.

2.2.2 Infektion von stratifizierenden Keratinozyten

Um auszuschließen, dass die Barriere des Stratum corneums, die hauptsächlich aus abgestorbenen Keratinozyten und Fetten besteht, der limitierende Faktor des HSV-1 Eintritts über die periphere Oberfläche ist, wurden Infektionsstudien in differenzierenden Keratinozyten-Kulturen durchgeführt. Dieses dreidimensionale Zellkultursystem erlaubt Keratinozyten zu stratifizieren, so dass ein partiell differenziertes Epithel ohne Stratum corneum ausgebildet wird.

Die Integrität der Zell-Zell-Kontakte wurde wiederum durch Färbung gegen E-Cadherin bestätigt. Wie in Abb. IV.12 A-I dargestellt, konnten E-Cadherin Signale durch konfokale Analyse entlang der Zell-Zell-Kontakte in allen Schichten des partiell differenzierten Epithels nachgewiesen werden.

Nach Zugabe von HSV-1 zum Kulturmedium wurden die Zellen 2 h p.i. fixiert und mit einem Antikörper gegen ICP0 gefärbt. Frühe virale Genexpression konnte selbst bei größerer Virusmenge nur in basalen peripheren Zellen detektiert werden (Abb. IV.13, A, B). Daraus lässt sich schließen, dass HSV-1 nur über basale undifferenzierte Keratinozyten in stratifizierende Kulturen eintritt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass das Stratum corneum der einzig limitierende Faktor für apikalen Eintritt in humane Epidermis ist.

In Analogie zu den Verwundungsstudien in MDCKII Zellen wurden auch stratifizierende Keratinozyten-Kulturen 1 h vor der Infektion verwundet. Interessanterweise wurde in diesen Kulturen frühe virale Genexpression nicht nur in peripheren basalen Zellen, sondern auch in apikalen differenzierenden Keratinozyten beobachtet (Abb. IV.13, C, D). Vermutlich erfolgte durch die Verwundung ein zellulärer Prozess, der stratifizierte Keratinozyten der Infektion durch HSV-1 zugänglich machte. Die Ko-Färbung des Aktin-Zytoskeletts zeigte, dass in verwundeten Kulturen die Zell-Zell-Kontakte in der obersten Keratinozytenschicht

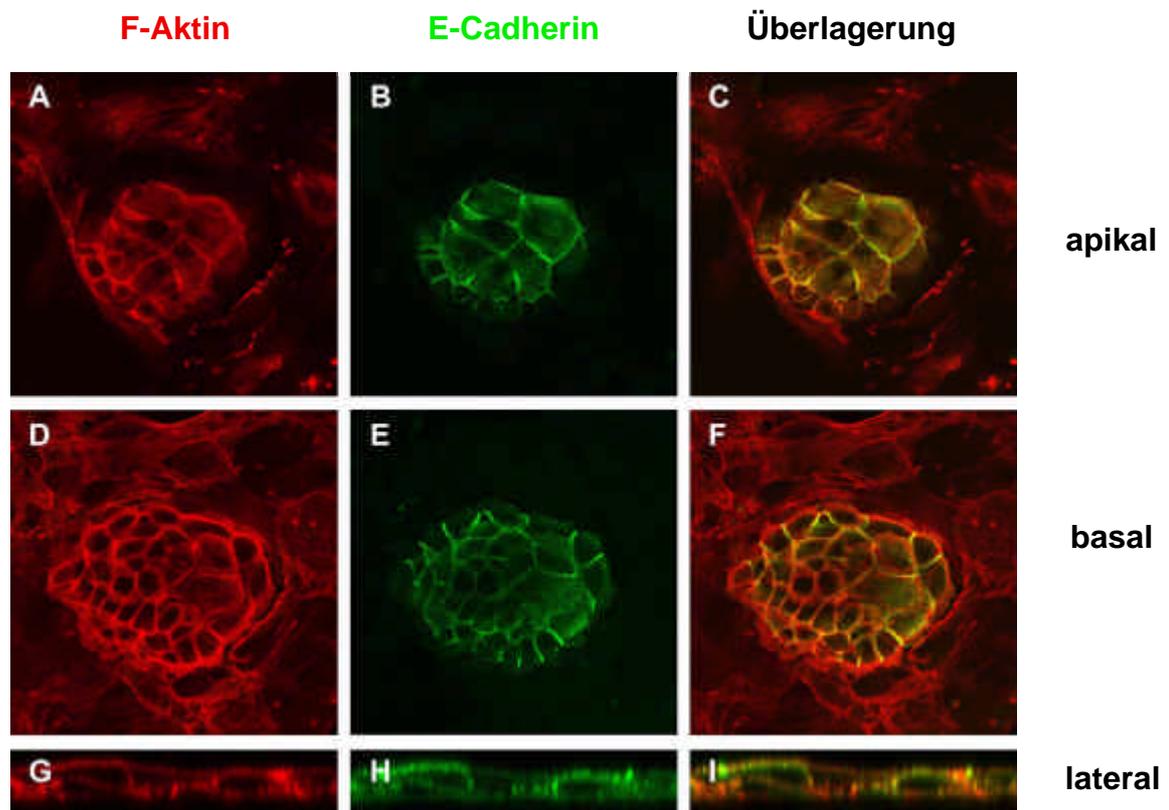


Abb. IV.12: Ausbildung der Zonula adhaerens in stratifizierenden Keratinozyten-Kulturen

Stratifizierende Keratinozyten-Kulturen wurden in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert (rot). E-Cadherin Färbung wurde mit anti-E-Cadherin-Antikörpern (hecD) und Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün) durchgeführt. Konfokale Aufnahmen der apikalen (A-C), basalen (D-F) und lateralen (G-I) Ebene sind dargestellt. Die Überlagerung der Färbungen ist in C, F, I gezeigt.

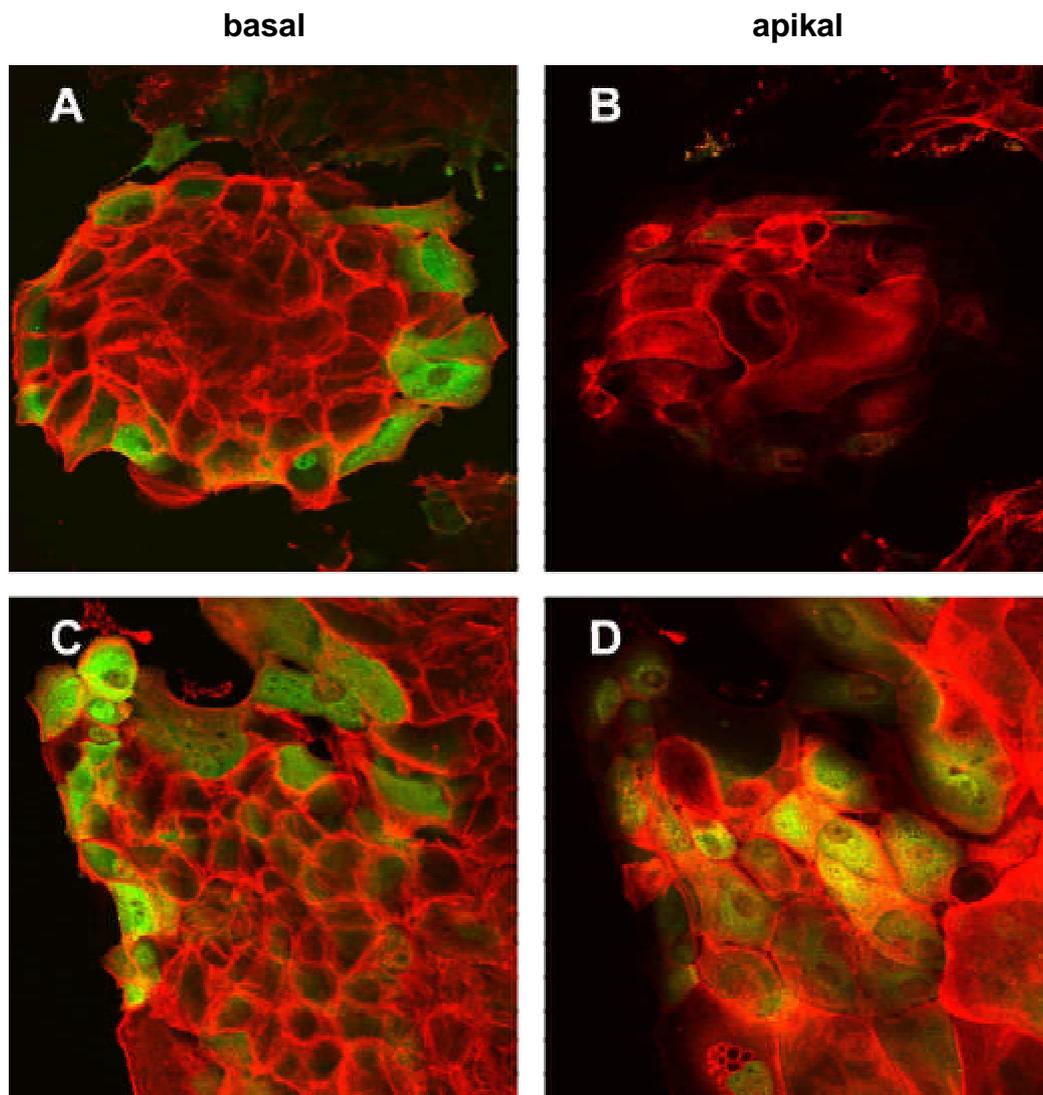


Abb. IV.13: HSV-1 Infektion stratifizierender Keratinocyten

Stratifizierende Keratinozyten-Kulturen wurden unverwundet (A, B) oder 1 h nach Verwundung (C, D) mit einer MOI von 50 PFU/Zelle infiziert. 2 h p.i. wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert (rot). ICP0 Färbung wurde mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab 11060) und Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün) durchgeführt. Konfokale Aufnahmen der basalen (A, C) und apikalen (B, D) Ebene sind dargestellt. Die Überlagerung der Färbungen ist gezeigt.

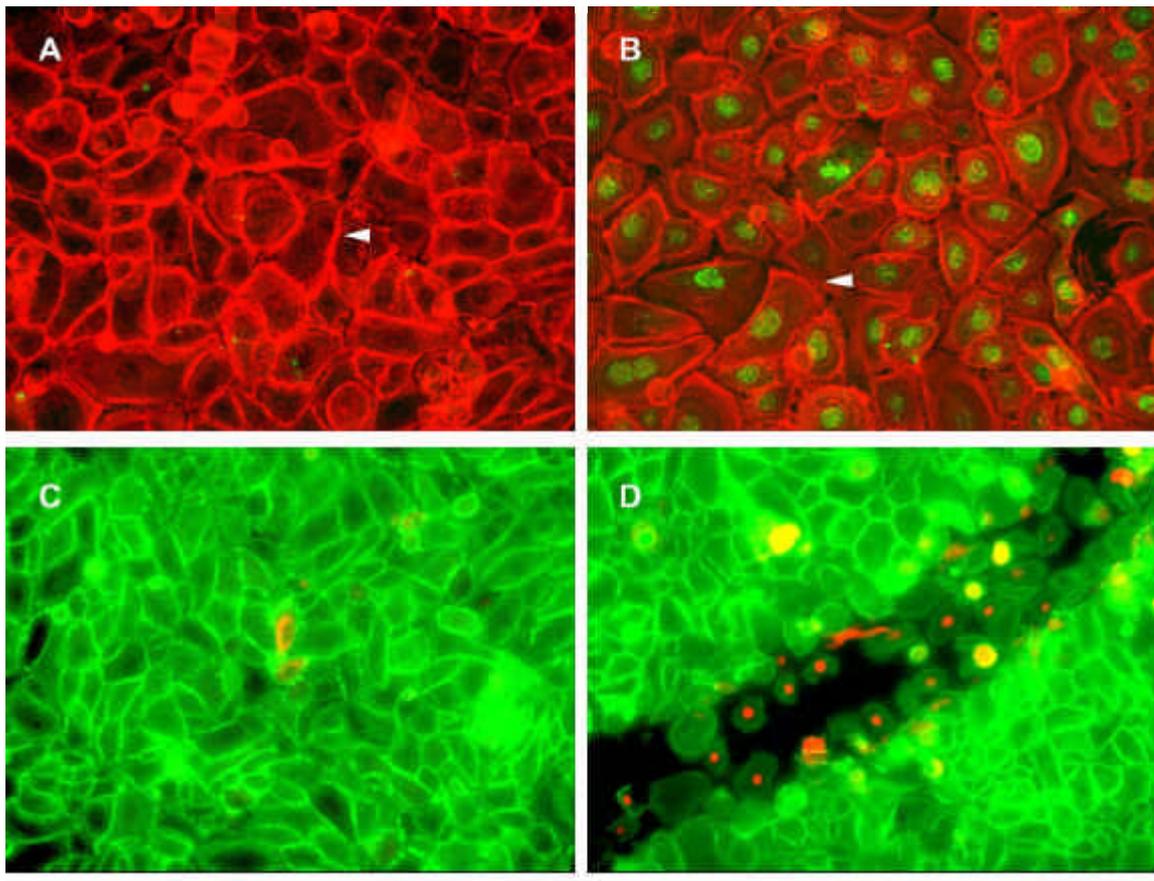
nicht so eng ausgebildet waren (Abb. IV.13, D, Pfeilspitze). Es könnte daher sein, dass die Lockerung der Zell-Zell-Kontakte es HSV-1 erlaubte, in Zell-Zell-Zwischenräume zu diffundieren und Zugang zu basolateralen Membrandomänen zu erlangen.

2.2.3 Infektion von undifferenzierten Keratinozyten

Um weitere Hinweise darüber zu erhalten, ob zelluläre Polarität von Keratinozyten den Tropismus des HSV-1 Eintritts beeinflussen, wurden Infektionsstudien in undifferenzierten primären Keratinozyten-Kulturen durchgeführt, die unter verminderten Kalziumbedingungen zu Einschichtkulturen unterschiedlicher Dichte wachsen.

In diesen Studien konnte beobachtet werden, dass die Permissivität für HSV-1 Eintritt in Keratinozyten von der unterschiedlichen Ausprägung der Zell-Zell-Kontakt Bildung abhängig war. Ko-Färbung des Aktin-Zytoskeletts und ICP0 zeigte, dass Kulturen mit geringerer Dichte und schwächeren Zell-Zell-Kontakten eine hohe Anzahl infizierter Keratinozyten aufwies (Abb. IV.14, B). In konfluenten Keratinozyten-Kulturen, die Zell-Zell-Kontakte zeigten, konnten hingegen kaum Zellen mit früher viraler Genexpression beobachtet werden (Abb. IV.14, A, C). Wenn einschichtige Kulturen mit ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten vor der Infektion verwundet wurden, konnten ICP0 Signale in Zellen innerhalb und entlang der Wundrändern beobachtet werden (Abb. IV.14, D). Diese Ergebnisse deuteten in Analogie zu den Experimenten mit polarisierten MDCKII Zellen auf eine Nutzung basolateraler Membrandomänen für den Eintritt von HSV-1 in Keratinozyten hin.

So kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die HSV-1 Eintrittsstudien in unterschiedliche Epithelmodell-Systeme wie polarisierten MDCKII Zellen, humaner Vorhautepidermis, stratifizierenden und undifferenzierten Keratinozyten, einen Tropismus des primären HSV-1 Eintritts zur Nutzung basolateraler Membrandomänen und basaler undifferenzierter Keratinozyten zeigten.

**Abb. IV.14: HSV-1 Infektion primärer Einschicht-Keratinozyten-Kulturen**

Verschiedene Präparationen von Keratinozyten wurden als Einschicht-Kulturen kultiviert und 1 h vor der Infektion verwundet (D). Die Zellen wurden mit 50 PFU/Zelle infiziert und 2 h p.i. in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden entweder mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (rot) und anti-ICP0-Antikörpern (Mab11060) sowie nachfolgend mit Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün) gefärbt (A, B). Oder die Zellen wurden mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) und anti-ICP0-Antikörpern (Mab11060) sowie nachfolgend mit Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot) gefärbt (C, D). Die Überlagerung konfokaler Projektionen (A, B) oder die Überlagerung von Epifluoreszenz-Aufnahmen (C, D) sind gezeigt. A und B zeigen unterschiedliche Bereiche einer Einschicht-Kultur. Kaum ausgebildete im Vergleich zu voll ausgebildeten Zell-Zell-Kontakten sind durch Pfeilspitzen angedeutet (A, B).

3 Studien zur Beteiligung von Komponenten des HSV-1 Eintritts

Der in verschiedenen Epithelmodellen beobachtete Tropismus von HSV-1 für basale Zellen/Membranen führt zu der Frage nach den zugrunde liegenden molekularen Determinanten. Im Folgenden wurde daher untersucht, welche zellulären und viralen Komponenten am HSV-1 Eintritt in diese Epithelmodelle beteiligt sind. Dazu wurden die subzelluläre Verteilung eines Virus-Rezeptors und die Beteiligung des viralen Glykoproteins D am HSV-1 Eintritt in Epithelien untersucht. Schließlich wurden erste Studien zur Untersuchung des Eintrittsmechanismus von HSV-1 Virionen in MDCKII Zellen durchgeführt.

3.1 Lokalisierung von Nectin-1 in Epithelzellen

Drei Klassen von Zelloberflächen-Molekülen können unabhängig voneinander als Korezeptoren für HSV-1 fungieren. Zur Zeit beziehen sich die intensivsten Untersuchungen auf Nectin-1, einem interzellulären Adhäsionsmolekül. Nectin-1 ist in vielen Zelllinien und humanen Geweben ubiquitär exprimiert (zur Übersicht Takai und Nakanishi, 2002). Im Folgenden wurde die subzelluläre Lokalisierung von Nectin-1 in den verwendeten Epithelmodellen untersucht. Bei diesen Studien wurden die folgenden Antikörper gegen humanes Nectin-1 verwendet:

Name	Ursprungsorganismus	erhalten von
CK41	Maus (monoklonal)	G. Cohen
CK8	Maus (monoklonal)	G. Cohen
R165	Kaninchenserum	G. Cohen
R1.302.12	Maus (monoklonal)	M. Lopez
TK	Kaninchen (affinitätsgereinigt)	Y. Takai

Tabelle IV. 1: anti-Nectin-1 Antikörper

3.1.1 Nectin-1 Lokalisierung in MDCKII Zellen

Mit den verwendeten Antikörpern konnte keine endogene Nectin-1 Lokalisierung in subkonfluenten MDCKII Zellen durch Immunfluoreszenzstudien nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Expression von Nectin-1 in MDCKII Zellen ist gezeigt, wobei Nectin-1 Lokalisierung zur Zonula adhaerens allerdings nur in Überexpressionstudien eindeutig nachgewiesen ist (zur Übersicht Takai und Nakanishi, 2002). Daher war vermutlich die endogene Expression von Nectin-1 in subkonfluenten MDCKII Zellen zu niedrig, um nachgewiesen werden zu können. Alternativ könnten die verwendeten Antikörper gegen humanes Nectin-1 nicht genügend Kreuzreaktivität zum caninen Homolog aufweisen, um Nectin-1 zu detektieren.

3.1.2 Nectin-1 Lokalisierung in Epithelexplant-Kulturen

Auch in humaner Vorhautepidermis konnte kein Nachweis der Expression von Nectin-1 in Immunfluoreszenzstudien mit den verwendeten Antikörpern erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Entweder ist Nectin-1 in humaner Vorhautepidermis nicht exprimiert oder die Expression von Nectin-1 ist zu niedrig, um Signale zur subzellulären Lokalisierung per Immunfluoreszenz zu erhalten.

3.1.3 Nectin-1 Lokalisierung in stratifizierenden Keratinozyten

In stratifizierenden Keratinozyten konnte durch Färbung gegen Nectin-1 und Ko-Färbung des Aktin-Zytoskeletts eine Lokalisierung entlang der Zell-Zell-Kontakte, insbesondere in apikalen Zellschichten, beobachtet werden (Abb. IV.15, A, B, E, F). In basalen Keratinozyten konnte Nectin-1 in der überwiegenden Anzahl der Experimente nicht detektiert werden (Abb. IV.15, C, D). In Einzelfällen wurde jedoch auch in basalen Zellschichten Nectin-1 entlang der Zell-Zell-Grenzen beobachtet (Abb. IV.15, G, H). Die den Experimenten zugrunde liegende Heterogenität primärer Keratinozyten-Kulturen lässt verschiedene Schlüsse zu. Die Expression von Nectin-1 könnte in basalen Keratinozyten häufig unterhalb der Detektionsgrenze liegen, so

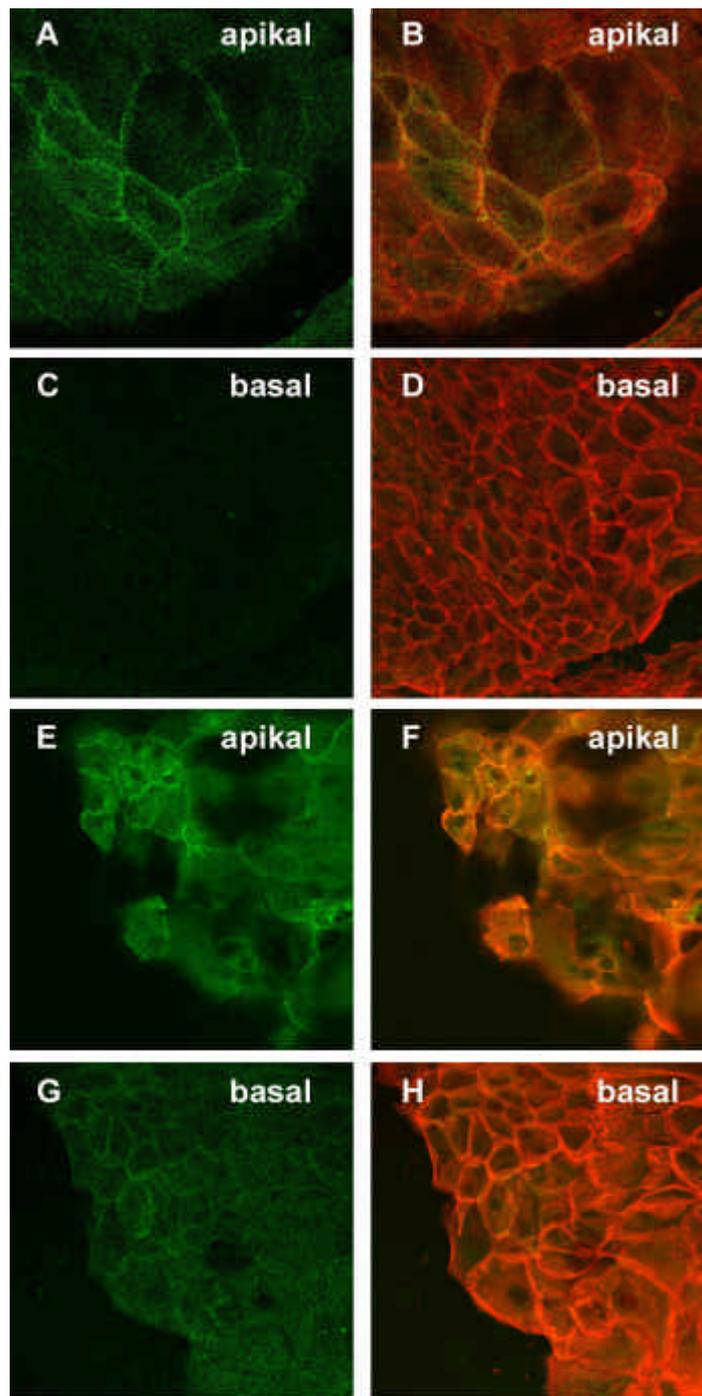


Abb. IV.15: Lokalisierung von Nectin-1 in stratifizierenden Keratinozyten-Kulturen

Verschiedene Präparationen (A-D gegenüber E-H) von stratifizierenden Keratinozyten-Kulturen wurden in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert (rot). Nectin-1 Färbung wurde mit anti-Nectin-1-Antikörpern (CK41) und Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün) durchgeführt. Konfokale Aufnahmen der apikalen (A, B, E, F) und basalen (C, D, G, H) Ebene sind dargestellt. Nectin-1 Färbung (A, C, E, G) sowie die Überlagerung der Färbungen (B, D, F, H) ist gezeigt.

dass Signale nur in wenigen Fällen beobachtet werden könnten. Alternativ könnte Nectin-1 in basalen Keratinozyten generell nicht exprimiert werden, so dass nur in Ausnahmefällen aufgrund spezieller Aktivierung Nectin-1 exprimiert wird. Apikale Keratinozyten zeigten jedoch in allen Fällen Nectin-1 Expression.

In HSV-1 infizierten Zellen 2 h p.i. konnte keine Nectin-1 Lokalisierung festgestellt werden, weder in basalen noch suprabasalen Keratinozyten (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Nectin-1 Lokalisierung in undifferenzierten Keratinozyten

Keratinozyten, die als Einschichtkultur unter verminderten Kalziumbedingungen wuchsen, wiesen eine relativ homogene sowie im Vergleich zu stratifizierenden Kulturen besonders prominente Nectin-1 Färbung entlang der Zell-Zell-Kontakte auf (Abb. IV.16, A, B). Nectin-1 Signale waren jedoch nicht auf laterale Membrandomänen beschränkt, sondern zeigten sich in geringerer Intensität auch entlang der apikalen Oberfläche (Abb. IV.16, C, D). Zusätzlich zeigten wenige Zellen zytoplasmatische Färbung von Nectin-1 (Abb. IV.16, E, F).

In Analogie zu den Infektionsstudien wurden Keratinozyten-Einschichtkulturen verwundet und auf Nectin-1 Lokalisierung untersucht. Die meisten Zellen entlang oder innerhalb der Wunde zeigten interessanterweise kaum Nectin-1 Färbung (Abb. IV.16, E, F, Pfeil). Einige Zellen in diesem Bereich zeigten zwar eine starke aber zytoplasmatische Lokalisierung von Nectin-1 (Abb. IV.16, E, F, Asterisk). In den dichteren Bereichen der Kultur konnte Nectin-1 entlang der Zell-Zell-Grenzen wie in unverwundeten Kulturen detektiert werden (Abb. IV.16, E, F, Pfeilspitze).

Zellen bevorzugter HSV-1 Infektion zeigten somit kaum Nectin-1 Lokalisierung in der Plasmamembran, während Zellen, die selten infiziert wurden, Nectin-1 auf der Oberfläche exponierten.

Die Verteilung von Nectin-1 in Keratinozyten-Kulturen korrelierte somit nicht mit Zellen bevorzugter HSV-1 Infektion.

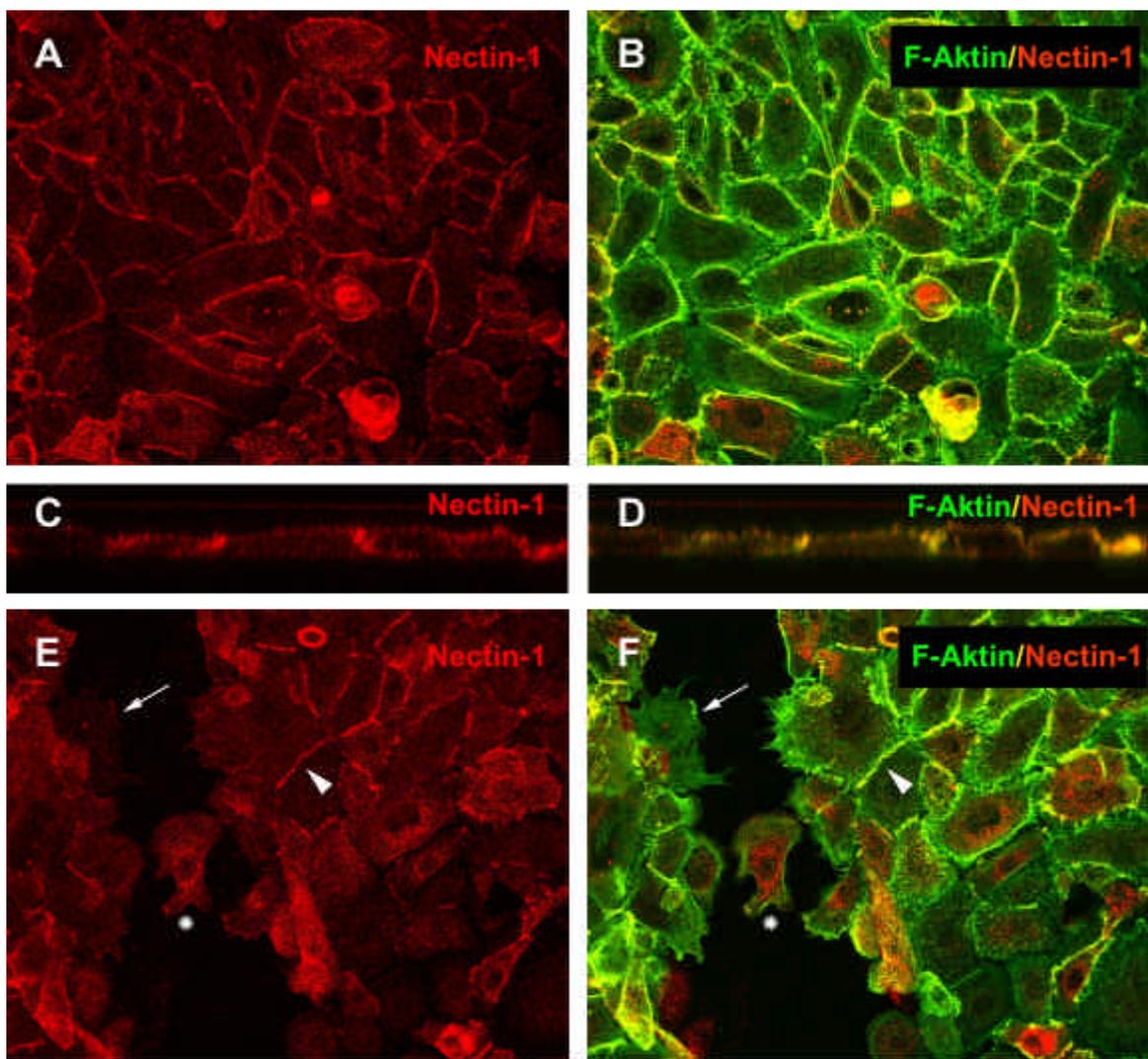


Abb. IV.16: Lokalisierung von Nectin-1 in Keratinozyten-Einschicht-Kulturen

Keratinozyten wurden als Einschicht-Kulturen kultiviert und 1 h vor der Infektion verwundet (E, F). Die Zellen wurden in 2 % Paraformaldehyd fixiert und mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) und anti-Nectin-1-Antikörpern (CK41) sowie nachfolgend mit Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot) gefärbt. Die Überlagerung konfokaler Projektionen (A, B, E, F) oder die Aufnahmen der lateralen Ebene (C, D) sind gezeigt. Die Nectin-1 Färbung (A, C, E) sowie die Überlagerung der Färbungen (B, D, F) sind abgebildet.

3.2 Vermittlung des HSV-1 Eintritts durch Glykoprotein D

Das Hüllmembranprotein gD wird als viraler Ligand für alle bisher identifizierten HSV-1 Korezeptoren beschrieben (zur Übersicht Spear *et al.*, 2000). Die Beteiligung von gD am Eintritt von HSV-1 in polare Epithelzellen wurde durch gD-Epitop-Blockierungsexperimente untersucht. Dazu wurden verschiedene Antikörper verwendet (Tabelle IV.2): Der neutralisierende anti-gD-Antikörper (DL11) ist in der Lage, die Bindung der zellulären Rezeptoren zu blockieren (Huber *et al.*, 2001). Der nicht-neutralisierende anti-gD-Antikörper (IV-3-4) diente als Kontrolle für die Spezifität der Neutralisierung. Ein Maus-Serum (IE2) und ein Antikörper gegen ein zu gD nicht verwandtes Glykoprotein (gp64) wurden zur weiteren Kontrolle auf unspezifische Hemmung des Eintritts durch Antikörper eingesetzt. Im Experiment wurden HSV-1 Virionen mit den Antikörpern 1 h inkubiert. Dieses Inokulum wurde dann auf die Zellen gegeben. Der Nachweis des HSV-1 Eintritts erfolgte über Färbung gegen ICP0 2 h p.i..

Antikörper	Antigen	Verwendete Mengen erhalten von	
DL11 (Maus)	gD (neutralisierend)	0,1-10 µg	G. Cohen
IV-3-4 (Maus)	gD (nicht neutralisierend)	bis 10 µg	J. Kühn
IE2 (Maus)	AcMNPV IE2	bis 10 µg	Laborsammlung
gp64 (Maus)	AcMNPV gp 64	bis 10 µg	Laborsammlung

Tabelle IV.2: Verwendete Antikörper zur gD-Neutralisierung

3.2.1 Blockierung des HSV-1 Eintritts in MDCKII Zellen durch anti-gD-Antikörper

Die Infektion subkonfluenter MDCKII Zellen zeigte eine Färbung von ICP0 2 h p.i. in vielen Zellen, falls sie mit einem Virus-Inokulum ohne Antikörper (Abb. IV.17, A, B) oder mit einem Virus-Inokulum infiziert wurden, das bis zu 10 µg der Kontrollantikörper (IE2 oder gp64) enthielt (Daten nicht gezeigt). Nicht neutralisierende anti-gD-Antikörper (IV-3-4) konnten selbst in Konzentrationen von 10 µg den viralen Eintritt nicht vollständig blockieren, so dass ICP0 Färbung zu erkennen war (Abb 17, C, D). Peripher lokalisierte MDCKII Zellen zeigten eine

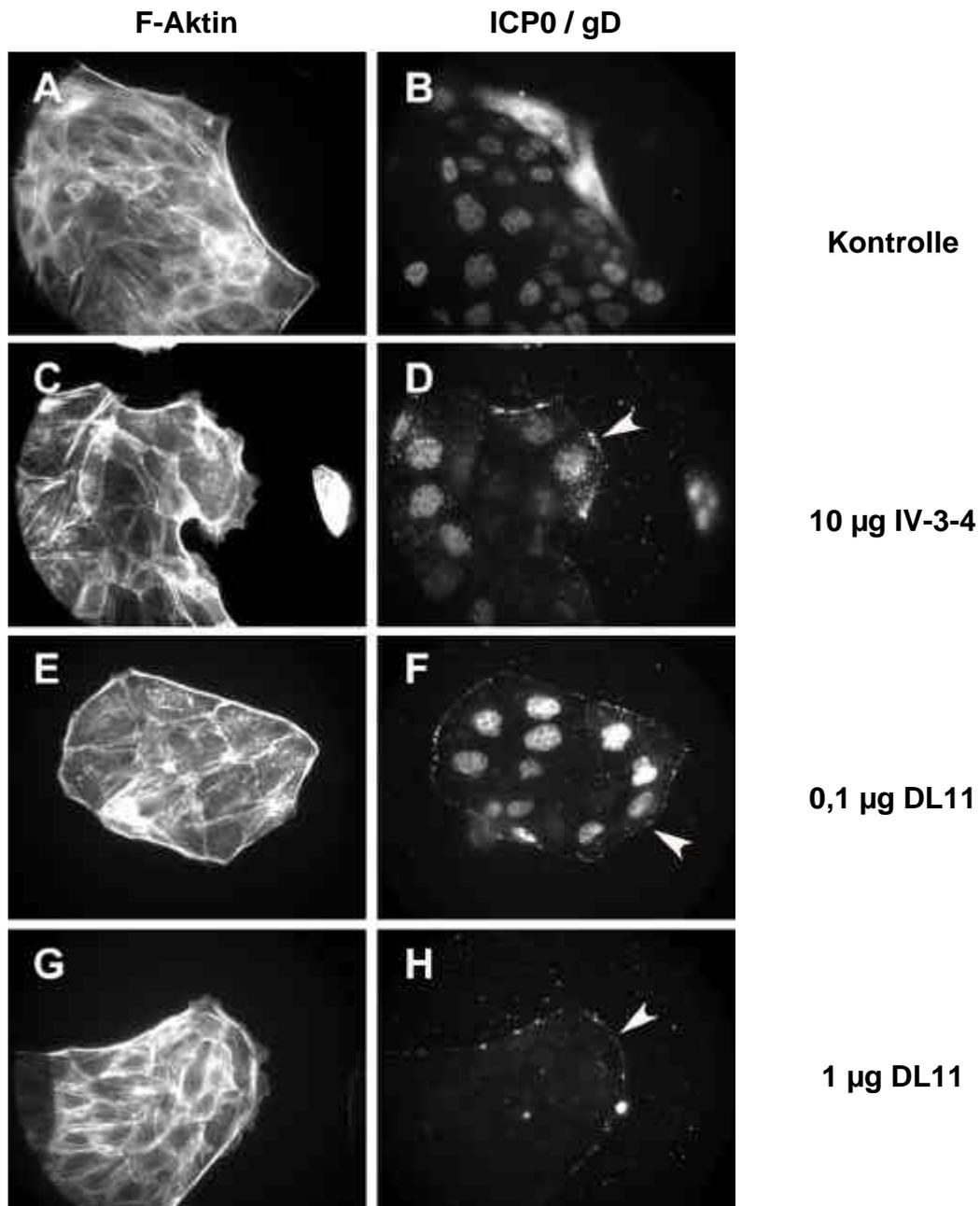


Abb. IV.17: Blockierung des HSV-1 Eintritts in MDCK II Zellen durch anti-gD-Antikörper
 Subkonfluente MDCKII Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen mit 10 PFU/Zelle infiziert. Die HSV-1 Inokula wurden mit den angegebenen Mengen an anti-gD-Antikörpern (Maus) 1 h vor der Infektion bei 37°C präinkubiert und nachfolgend auf die Zellen gegeben. 2 h p.i. wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert (A, C, E, G). Die ICP0 Färbung wurde mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab11060) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (B, D, F, H) durchgeführt. Die Pfeilspitzen deuten eine Färbung von HSV-1 gD an.

nukleäre Lokalisierung von ICP0. Im Gegensatz dazu wurde bei der Infektion mit Virus-Inokulum ohne Antikörper-Präinkubation eine zytoplasmatische ICP0 Lokalisierung in Randzellen von MDCKII Zell-Inseln beobachtet (Abb. IV.17, A-D). Dies deutet im Vergleich auf einen langsameren Infektionsverlauf hin, wenn das Virus-Inokulum mit nicht-neutralisierenden anti-gD-Antikörpern präinkubiert wurde. Vermutlich war dieser langsamere Infektionsverlauf auf eine partielle Hemmung des HSV-1 Eintritts durch nicht-neutralisierende anti-gD-Antikörper zurückzuführen. Wurden Virus-Inokula mit geringen Mengen (0,1 µg) neutralisierenden anti-gD-Antikörpers (DL11) präinkubiert, zeigte sich ein ähnlicher Effekt (Abb. IV.17, E, F). Wurde 1 µg dieses Antikörpers zur Blockierung verwendet, wurde ICP0 nicht in MDCKII Zellen detektiert (Abb. IV.17, G, H), was auf eine vollständige Blockierung des HSV-1 Eintritts in MDCKII Zellen schließen lässt. Zusätzlich zu ICP0 wurden in diesen Experimenten punktierte Signale auf der Zelloberfläche beobachtet (Abb. IV.17, D, F, H, Pfeilspitze). Diese lokalisieren gebundene Virione, da der sekundäre Antikörper zusätzlich zu ICP0 auch den anti-gD-Antikörper derselben Spezies detektierte.

In den gezeigten Experimenten konnten geringe Mengen an DL11 Antikörper spezifisch HSV-1 Eintritt vollständig blockieren, während eine vollständige Blockierung des HSV-1 Eintritts selbst durch höhere Mengen IV-3-4 Antikörper nicht erreicht wurde. Die Blockierungsexperimente in MDCKII Zellen legen daher nahe, dass gD am Viruseintritt beteiligt war.

3.2.2 Blockierung des HSV-1 Eintritts in Keratinozyten durch anti-gD-Antikörper

Infizierte Keratinozyten zeigten frühe virale Genexpression in den peripheren basalen Keratinozyten und den fibroblastischen Feeder-Zellen (Abb. IV.18, A-C). Infektionsstudien mit Virus-Inokulum, das vor der Infektion mit nicht-neutralisierendem anti-gD-Antikörper (IV-3-4) versetzt wurde, zeigten ebenfalls die Infektion peripherer basaler Keratinozyten und Feeder-Zellen (Abb. IV.18, D-F). Neutralisierende anti-gD-Antikörper (DL11) reduzierten die Anzahl infizierter Keratinozyten in einer dosisabhängigen Weise (Abb. IV.18, G-I im Vgl. zu J-L).

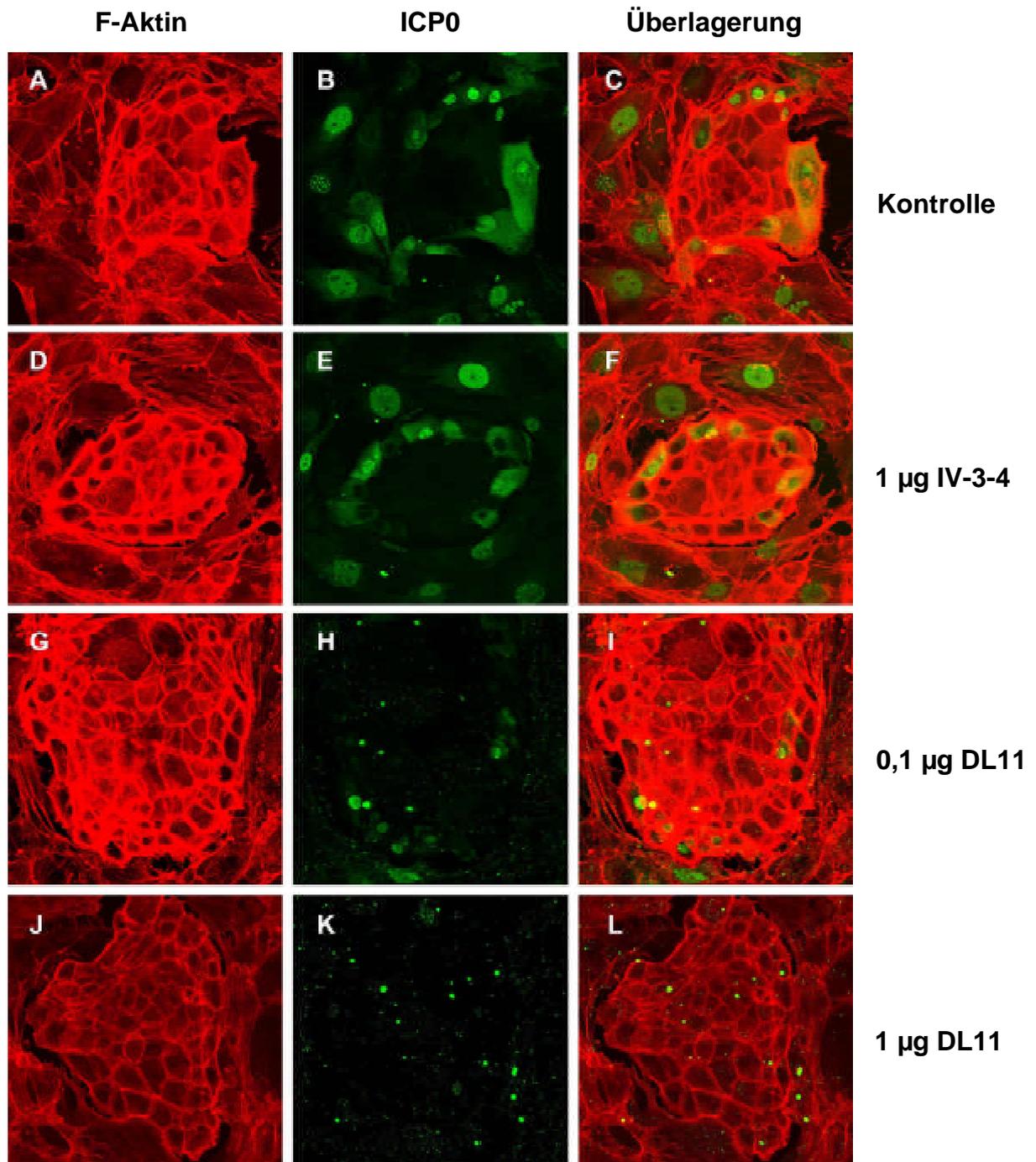


Abb. IV.18: Blockierung des HSV-1 Eintritts in Keratinozyten durch anti-gD-Antikörper

Stratifizierende Keratinozyten-Kulturen wurden mit 50 PFU/Zelle infiziert. Die HSV-1 Inokula wurden mit den angegebenen Mengen an anti-gD-Antikörpern (Maus) 1 h vor der Infektion bei 37°C präinkubiert und nachfolgend auf die Zellen gegeben. 2 h p.i. wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert (rot). Die ICP0 Färbung wurde mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab11060) und Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün) durchgeführt. Die Aktin Färbung (A, D, G, J), die ICP0 Färbung (B, E, H, K) sowie die Überlagerungen der Färbungen (C, F, I, L) sind gezeigt. Die Projektionen konfokaler Aufnahmen sind gezeigt.

Interessanterweise war bei den Blockierungsexperimenten eine punktierte gD-Färbung auf der gesamten Oberfläche der Keratinozyten-Kulturen zu beobachten, die auf eine Bindung von Virionen an die Oberfläche sämtlicher Keratinozyten schließen lässt (Abb. IV.18. H, I und K, L). DL11-Antikörper blockierten somit den Eintritt von viralen Partikeln.

Eintritt von HSV-1 in humane Keratinozyten, die als Einschichtkultur unter verminderten Kalziumbedingungen wuchsen, konnte ebenfalls mit gleichen Mengen DL11 Antikörper gehemmt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Blockierung des Eintritt von HSV-1 in MDCKII Zellen und primäre Keratinozyten durch neutralisierende anti-gD-Antikörper deutet auf eine Beteiligung des HSV-1 Glykoproteins gD hin.

3.3 Aufnahme der Virionen in MDCKII Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HSV-1 Eintritt in polare Epithelzellen vermutlich nicht über Nectin-1 vermittelt wird und das hingegen eine Beteiligung des viralen Glykoproteins D am Eintritt vermutlich für die Penetration essentiell ist. Als mechanistische Grundlage für die Penetration der zellulären Plasmamembran durch HSV-1 Virionen wurde lange Zeit ausschließlich Fusion der viralen Hüllmembran mit der Plasmamembran verbunden mit der Freisetzung des Kapsids in das Zytoplasma postuliert. Eine neuere Studie konnte jedoch nachweisen, dass in einigen Zelllinien HSV-1 über einen endozytotischen Mechanismus in die Zelle eintritt (Nicola *et al.*, 2003). Vergleichende Inhibitorstudien und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass HSV-1 in Vero Zellen den Vorgang der Fusion für die Penetration nutzt. Die Aufnahme von Virionen in HeLa und CHO Zellen konnte hingegen unter anderem durch die Gabe von lysotropischen Agenzien in Dosis-abhängiger Wirkweise inhibiert werden. Diese verhinderte eine pH-aktivierte Fusion der viralen Hüllmembran mit endosomalen Membranen und damit die Freisetzung des Kapsids ins Zytoplasma (Nicola *et al.*, 2003).

In Analogie zu diesen Untersuchungen wurde die Aufnahme von HSV-1 Partikeln in MDCKII Zellen untersucht, um erste Hinweise darüber zu erhalten, welcher Aufnahmemechanismus in MDCKII Zellen verwendet wird.

3.3.1 Mechanismus der HSV-1 Penetration der Plasmamembran

Monensin ist ein Ionophor, das den vesikulären Transport und die Ansäuerung früher Endosomen inhibiert (Brock und Smith, 1982; Fliesler und Basinger, 1987). Monensin inhibiert darüber hinaus die pH-induzierte Fusion der viralen Lipid-Hülle mit der Membran von Endosomen (Nicola *et al.*, 2003). Dem Kulturmedium von HeLa, Vero und MDCKII Zellen wurde Monensin in ansteigender Konzentration sowohl 30 min. vor, als auch während der HSV-1 Infektion zugesetzt. Als sensitiver Marker für zellulären Stress wurde das Aktin-Zytoskelett angefärbt und frühe virale Genexpression mit einem Antikörper gegen ICP0 2 h p.i. detektiert.

Subkonfluente HeLa Zellen zeigten in Dosis-abhängiger Wirkung mit höherer Menge zugesetzten Monensins weniger ICP0 gefärbte Zellen. Beim Einsatz von Monensin-Konzentrationen von 25 μM wurden weniger als 50% ICP0 gefärbte Zellen beobachtet (Abb. IV.19, B im Vgl. zu A). Frühe virale Genexpression wurde bei 100 μM Monensin-Konzentration kaum mehr in HeLa Zellen detektiert (Abb. IV.19, C). Im Gegensatz dazu zeigten Vero Zellen erst bei höheren Konzentrationen von Monensin eine Reduktion ICP0 gefärbter Zellen (Abb. IV.19, D-F). MDCKII Zellen zeigten hingegen im Vergleich zu Zellen ohne Monensin-Gabe (Abb. IV.19, G) sowohl bei niedriger, als auch bei höherer Monensin-Konzentration nicht signifikant geringere Mengen an Zellen mit früher viraler Genexpression (Abb. IV.19, H, I).

Dieser erste Hinweis deutet darauf hin, dass HSV-1 in MDCKII Zellen vermutlich über pH-unabhängige Fusion der Hüllmembran mit der Plasmamembran eintritt, wenn auch eine endozytotische Aufnahme von infektiösen HSV-1 Partikeln in MDCKII Zellen nicht ausgeschlossen werden kann.

3.3.2 Vergleichende Eintrittsstudien

Wie in dieser Arbeit beschrieben wurde, zeigte HSV-1 einen Tropismus für den Eintritt in Zellen entlang der Wundränder verwundeter MDCKII Epithelien und peripherer Zellen subkonfluenter Zell-Inseln. Um der Frage nachzugehen, ob die peripheren Zellen subkonfluenter MDCKII Inseln einen generell aktivierten Zustand für die Aufnahme viraler Partikel, z.B. durch endozytotische Vorgänge, zeigen, wurde

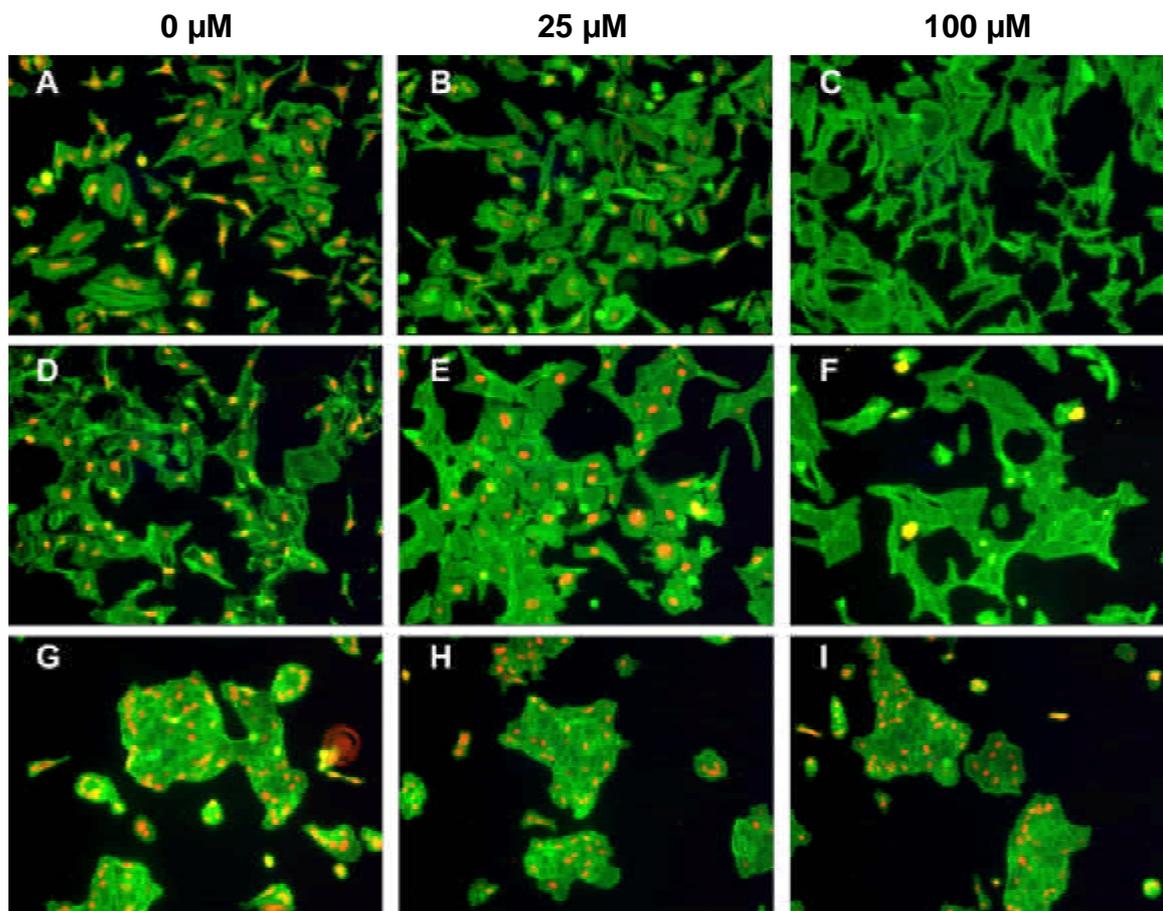


Abb. IV.19: Einfluss von lysotropischem Monensin auf den HSV-1 Eintritt

Subkonfluente HeLa (A-C), Vero (D-F) und MDCKII (G-I) Zellen wurden infiziert (1 PFU/Zelle) entweder unbehandelt (A, D, G) oder nach Behandlung mit 25 μM (B, E, H) sowie 100 μM (C, F, I) Monensin. 2 h p.i. wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) und anti-ICP0-Antikörpern (Mab11060) sowie nachfolgend mit Alexa Fluor 555-konjugierten anti-Maus IgG (rot) gefärbt. Die Überlagerung der Färbungen ist gezeigt.

in einer vergleichenden Studie der Eintritt von HSV-1 und eines weiteren DNA-Virus untersucht. Das insektenpathogene Baculovirus *AcMNPV* (*Autographa californica* Kernpolyedervirus) tritt über Endozytose in permissive Insektenzellen ein (Volkman und Goldsmith, 1988). Ein Eintritt, wenn auch keine produktive Infektion, konnte auch in Säuger-Zellen beobachtet werden (Boyce und Bucher, 1996).

Subkonfluente MDCKII Zellen wurden entweder mit HSV-1 Inokulum oder mit *AcMNPV* Inokulum infiziert und 1 h p.i. fixiert. Viruspartikel wurden mit Antikörpern gegen die respektiven Kapside angefärbt. Als Ko-Färbung wurde das Aktin-Zytoskelett visualisiert. In konfokaler Analyse konnten *AcMNPV* Kapside häufig als Punkte entlang der Oberflächen von MDCKII Zellen beobachtet werden (Abb. IV.20, F, G, H). Dies kennzeichnete nicht aufgenommene Virionen. Gelegentlich konnten aber auch Baculoviren im Zytoplasma beobachtet werden (Abb. IV.20. E, G, Pfeil, Pfeilspitze), die in Zellen der Peripherie (Abb. IV.20, E, Pfeilspitze) oder auch in der Mitte der Zell-Inseln zu finden waren (Abb. IV.20, E, Pfeil). Eintretende *AcMNPV* Partikel zeigten somit keine Präferenz für periphere Zellen der MDCKII Inseln.

HSV-1 Partikel konnten hingegen, sofern sie innerhalb des Zytoplasmas detektiert wurden, ausschließlich in peripheren Zellen von Zell-Inseln beobachtet werden (Abb. IV.20, A, C, D). Virionen konnten allerdings gebunden an der Oberfläche weiter innen liegender Zellen beobachtet werden (Abb. IV.20, B, D). Interessanterweise wurden penetrierte HSV-1 Kapside vorwiegend in peripheren Zellen beobachtet, die Lamellipodia ausbildeten (Abb. IV.20, A). Lamellipodia sind F-Aktin-reiche Strukturen, die an zellulärer Migration beteiligt sind. Diese Analogie zu der bevorzugten Infektion der migrierenden Zellen entlang verwundeter MDCKII Epithelien ist bemerkenswert.

HSV-1 Virione traten bevorzugt in periphere Zellen von MDCKII Inseln ein, insbesondere in solche, die Anzeichen von Migration zeigten. Dies beruhte vermutlich nicht auf einer generell stärkeren Aufnahme von Partikeln, wie der Vergleich mit dem Eintritt von *AcMNPV* Virionen nahelegte.

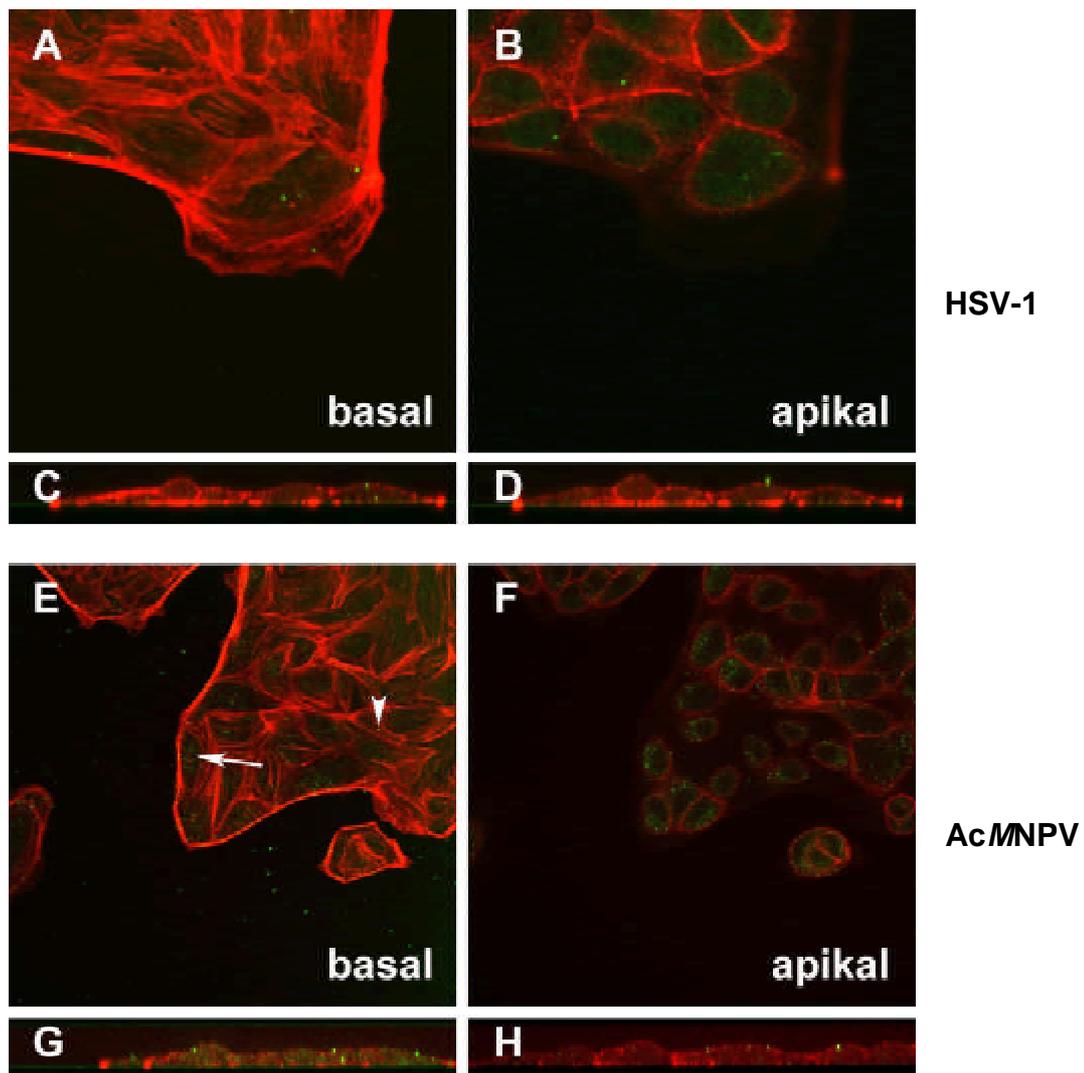


Abb. IV.20: Vergleichende Eintrittsstudien in subkonfluente MDCK II Zellen

Subkonfluente MDCKII Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen entweder mit HSV-1 (10 PFU/Zelle, A-D) oder mit AcMNPV (100 PFU/Zelle, E-H) infiziert. 1 h p.i. wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert (rot). Kapsid Färbung wurde mit anti-Kapsid-Antikörpern (DM165 [HSV-1] und Mab39 [AcMNPV]) und FITC-konjugierten anti-Maus IgG (grün) durchgeführt. Die Überlagerungen konfokaler Aufnahmen der basalen (A, E), apikalen (B, F) und lateralen (C, D, G, H) Ebene sind gezeigt.

4 Einfluss der zellulären Signaltransduktion des Aktin-Zytoskeletts auf den HSV-1 Eintritt

In den HSV-1 Eintrittsstudien in Epithelzellen wurde ein Tropismus des HSV-1 Eintritts zur Nutzung basolateraler Membrandomänen beobachtet. Die Lokalisierung von Nectin-1 in Keratinozyten korrelierte nicht mit Zellen bevorzugten HSV-1 Eintritts, so dass die Nutzung eines weiteren Korezeptors nicht ausgeschlossen werden kann. Darüber hinaus könnten neben der notwendigen Zugänglichkeit eines Virus-Rezeptors weitere Erfordernisse für einen erfolgreichen HSV-1 Eintritt existieren.

In Verwundungsstudien von MDCKII Zellen wurde erfolgreicher HSV-1 Eintritt vor allem in Zellen beobachtet, die Migration zeigten. In subkonfluenten MDCKII Zellen wurden eintretende HSV-1 Kapside hauptsächlich in peripheren Zellen von Zell-Inseln beobachtet, dabei insbesondere in migratorischen Zellen, die Lamellipodia ausbildeten. MDCKII Zellen, die bevorzugt infiziert wurden, zeigten ähnliche Eigenschaften neben dem Status ihrer zellulären Polarität. Sie schienen eine Epithel-Mesenchymal-Transition (EMT) durchlaufen zu haben, die durch Verlust der apikal-basolateralen Polarität und durch vermehrte Migration sowie Proliferation gekennzeichnet ist. Eine EMT tritt insbesondere entlang von Wundrändern auf, um durch Migration eine Wunde schließen zu können (zur Übersicht Schmitz *et al.*, 2000). Dabei wird zur Migration insbesondere ein dynamischeres Aktin-Zytoskelett genutzt. Die notwendige Umstellung zellulärer Prozesse zur EMT erfolgt über die Familie der Rho-ähnlichen GTPasen (zur Übersicht Schmitz *et al.*, 2000).

Diese Beobachtungen legten einen potentiellen Einfluss der Dynamik des Aktinzytoskeletts und der durch Cdc42/Rac1/RhoA-induzierten Signaltransduktion auf den HSV-1 Eintritt nahe, der im Folgenden untersucht wurde.

4.1 Hemmung der Aktin-Dynamik

Um erste Hinweise für die Bedeutung der Aktin-Dynamik auf die HSV-1 Infektion zu erhalten, wurden Inhibitorstudien durchgeführt. Dabei wurden zur Untersuchung der Aktin-Dynamik Inhibitoren eingesetzt, welche die Aktin-Polymerisierung beeinflussen. Jasplakinolide (JAS) ist ein zell-permeables Peptid, das mit Phalloidin bei der

Bindung von F-Aktin kompetitiert. Es setzt die kritische Konzentration zur Aktin-Polymerisierung herab und stabilisiert so F-Aktin oder führt in höheren Konzentration oder längerer Exposition zu Aktin-Polymerisierung (Bubb *et al.*, 1994). Cytochalasin D (CD) bindet stöchiometrisch das spitze Ende von Aktin-Filamenten und verhindert den Monomer-Austausch. CD führt somit bei längerer Exposition zur Depolymerisierung von F-Aktin (Walling *et al.*, 1988).

Da eine Färbung des Aktin-Zytoskeletts mit Fluorochrom-gekoppeltem Phalloidin aufgrund einer Konkurrenz mit JAS für dieselbe Bindungsstelle nur unzureichend gelingt, wurden subkonfluente MDCKII Zellen für diese Experimente verwendet, die stabil ein Aktin-GFP Fusionsprotein exprimieren. Wie durch Ko-Färbung mit Phalloidin-TRITC dargestellt, wird Aktin-GFP dabei in alle Aktin-Filamente eingebaut (Abb. IV.21, A-C). Zusätzlich konnte zytoplasmatisches G-Aktin beobachtet werden. Subkonfluente MDCKII Aktin-GFP Zellen wurden zunächst 30 min. mit ansteigenden Konzentrationen an JAS behandelt, dann wurde Virusinokulum, das JAS enthielt, zugegeben und 2 h p.i. gegen ICP0 gefärbt. Mit ansteigender JAS Konzentration wurden zunehmend weniger Zellen mit früher viraler Genexpression beobachtet (Abb. IV.22, A-C). Aktin lokalisierte dabei in vermehrtem Maße in globulären zytoplasmatischen Strukturen (Abb. IV.22, A-C, Pfeile). Um einen direkten Einfluss von JAS auf die Infektiosität von HSV-1 Virionen auszuschließen, wurden Virusinokula 1h mit entsprechenden Konzentrationen an JAS präinkubiert und subkonfluente MDCKII Zellen infiziert. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen Infektionen mit JAS-behandelten und mit unbehandelten Virusinokula festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Reduktion von HSV-1 infizierten Zellen durch JAS stimulierte Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts kann als erster Hinweis auf einen Einfluss von Aktin-Dynamik auf die Infizierbarkeit durch HSV-1 gewertet werden.

Analog wurden subkonfluente MDCKII Zellen mit ansteigender Konzentration von CD behandelt, infiziert und 2 h p.i. gegen ICP0 gefärbt. Dabei wurde eine zunehmende Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts und der Verlust von Zell-Zell-Kontakten bei ansteigender CD-Konzentration durch Ko-Färbung mit Phalloidin beobachtet (Abb. IV.22, D-F). Die CD-Behandlung führte zu einer Erhöhung der Anzahl HSV-1 infizierter Zellen, insbesondere in zentraleren Bereichen der Zell-Inseln (Abb. IV.22, D-F). Diese Ergebnisse legen einen Zugang von Viruspartikeln zu allen Zellen nahe,

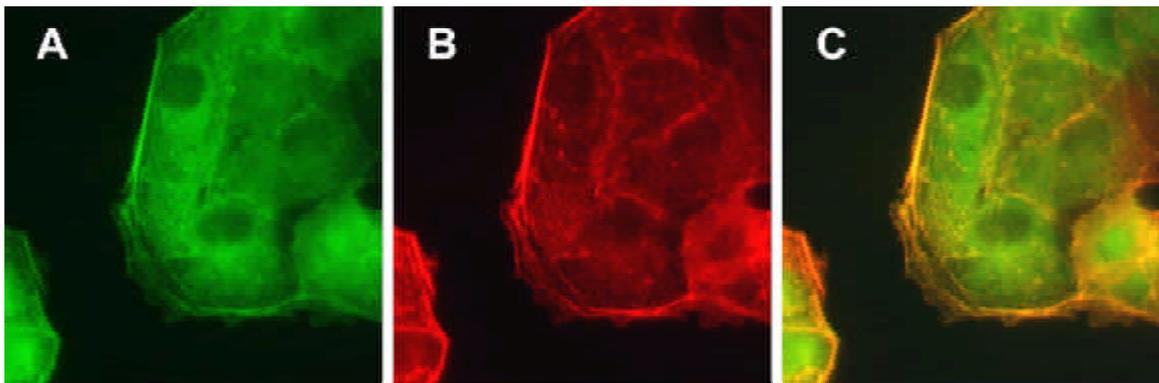


Abb. IV.21: Lokalisierung von Aktin-GFP in MDCK II Aktin-GFP Zellen

Subkonfluente MDCKII Aktin-GFP wurden 16 h nach dem Aussähen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. F-Aktin wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin visualisiert (rot). Aktin-GFP Färbung (grün, A), F-Aktin Färbung (B) und die Überlagerung der Färbung sind gezeigt.

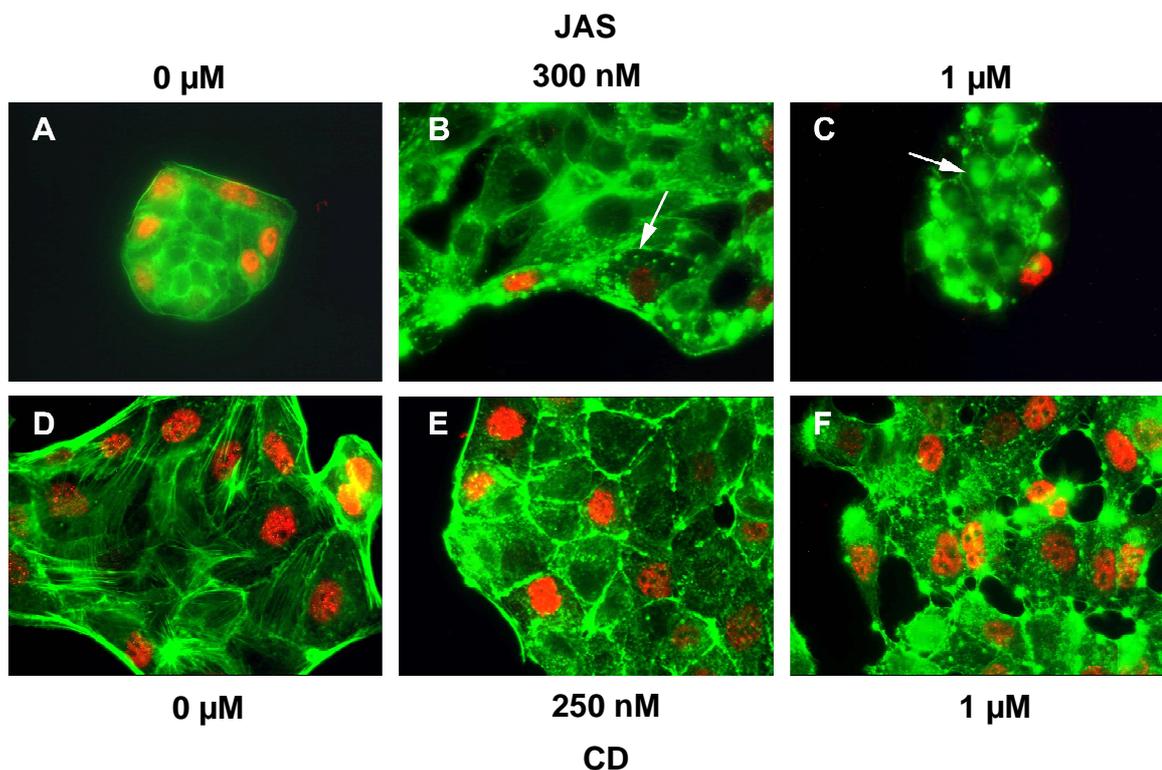


Abb. IV.22: HSV-1 Infektion von CD- oder JAS- behandelten MDCKII Zellen

Subkonfluente MDCKII Aktin GFP (grün, A-C) oder MDCKII (D-F) Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen entweder mit JAS (A-C) oder mit CD (D-F) in den angegebenen Konzentrationen behandelt und nachfolgend mit HSV-1 infiziert (5 PFU/Zelle). Das Aktin-Zytoskelett der MDCKII Zellen wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) visualisiert (D-F). ICP0 Färbung wurde mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab 11060) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot) durchgeführt. Die Überlagerung der Färbungen ist gezeigt.

sobald die Integrität von Zell-Zell-Kontakten verloren wird.

Diese Experimente liefern erste Hinweise auf einen Einfluss der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts auf die Infizierbarkeit von MDCKII Zellen durch HSV-1. F-Aktin Stabilisierung führte zu einer Verminderung der Infizierbarkeit. Dagegen hatte die Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts keinen Einfluss auf die Infizierbarkeit individueller Zellen. Da die Polarität von MDCKII Zellen durch Depolymerisierung des Aktin-Zytoskeletts beeinträchtigt wurde, waren auch MDCKII Zellen innerhalb von Zell-Inseln der Infektion durch HSV-1 zugänglich. Diese Beobachtungen deuten auf eine potentielle Barriere-Funktion des polymeren Aktin-Zytoskeletts gegenüber der HSV-1 Infektion hin.

4.2 Hemmung endogener Cdc42/Rac1-Signaltransduktion durch Toxin B

Die Rho-ähnlichen GTPasen Cdc42 und Rac1 führen im aktiven Zustand zur Ausbildung von Filopodia und Lamellipodia. Diese Aktin-reichen Protusionen bewirken am führenden Ende von migrierenden Zellen das Vorschieben der Zellmembran. Um in diesem Zusammenhang zunächst erste Hinweise zu erhalten, ob die Cdc42/Rac1-Signal-Transduktionswege einen Einfluss auf die Infizierbarkeit von MDCKII Zellen und primären Keratinozyten durch HSV-1 haben könnten, wurden die Zellen mit Toxin B inkubiert und anschließend infiziert. Toxin B glykosyliert dabei Thr36 von Rac1 und Cdc42 und verhindert damit die Bindung von Effektoren, so dass eine aktive Signaltransduktion zum Aktin-Zytoskelett verhindert wird (zur Übersicht Just *et al.*, 2000).

Subkonfluente MDCKII Zellen wurden 15 h vor der Infektion mit Toxin B behandelt. Anschließend wurde HSV-1 Inokulum zugesetzt und 2 h p.i. frühe virale Genexpression mit einem Antikörper gegen ICP0 detektiert. Toxin B bewirkte einen Verlust von cortikalem F-Aktin, wie durch Ko-Färbung des Aktin-Zytoskeletts gezeigt werden konnte (Abb. IV.23, A und D). Dies führte zur Ausspreizung von MDCKII Zellen. Es waren dabei hauptsächlich periphere Zellen von Zell-Inseln betroffen (Abb. IV.23, D). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen wurde bei phänotypisch veränderten Zellen entweder das Fehlen früher viraler Genexpression oder die Präsenz von ICP0 festgestellt (Abb. IV.23, D-F, Pfeile im Vgl. zu Pfeilspitzen). Die

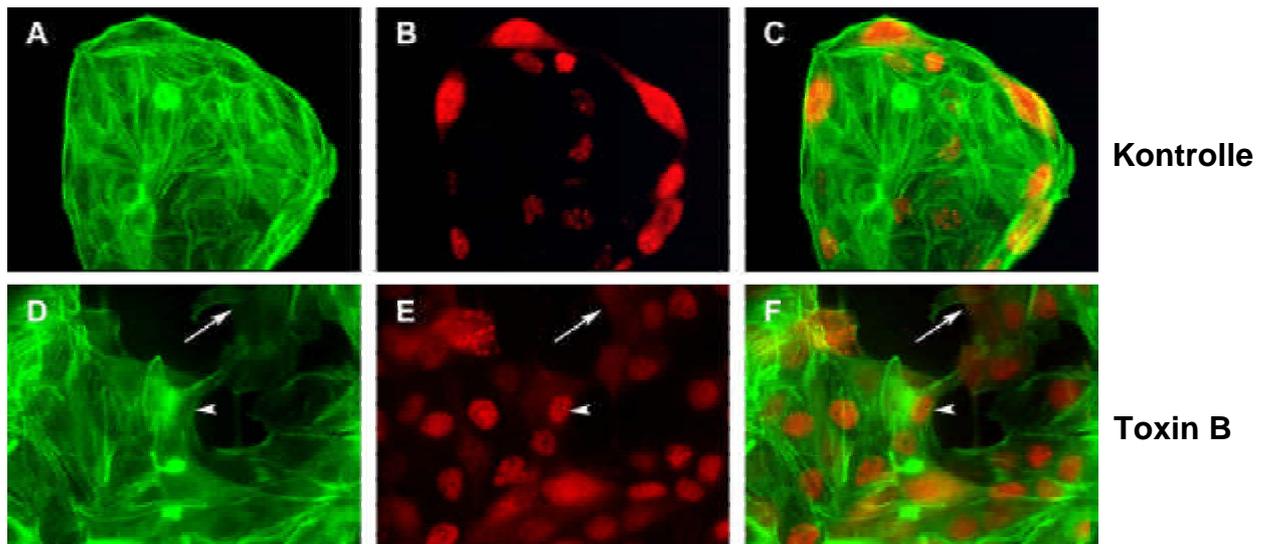


Abb. IV.23: HSV-1 Infektion von Toxin B- behandelten MDCK II Zellen

Subkonfluente MDCKII Zellen wurden 31 h nach dem Aussähen (A-C) oder 16 h nach dem Aussähen und nachfolgender 15 stündiger Toxin B Behandlung (D-F) mit HSV-1 infiziert (5 PFU/Zelle). 2 h p.i. wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) visualisiert. ICP0 Färbung wurde mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab 11060) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot) durchgeführt. Die Aktin Färbung (A, D), die ICP0 Färbung (B, E) und die Überlagerung der Färbungen (C, F) sind gezeigt.

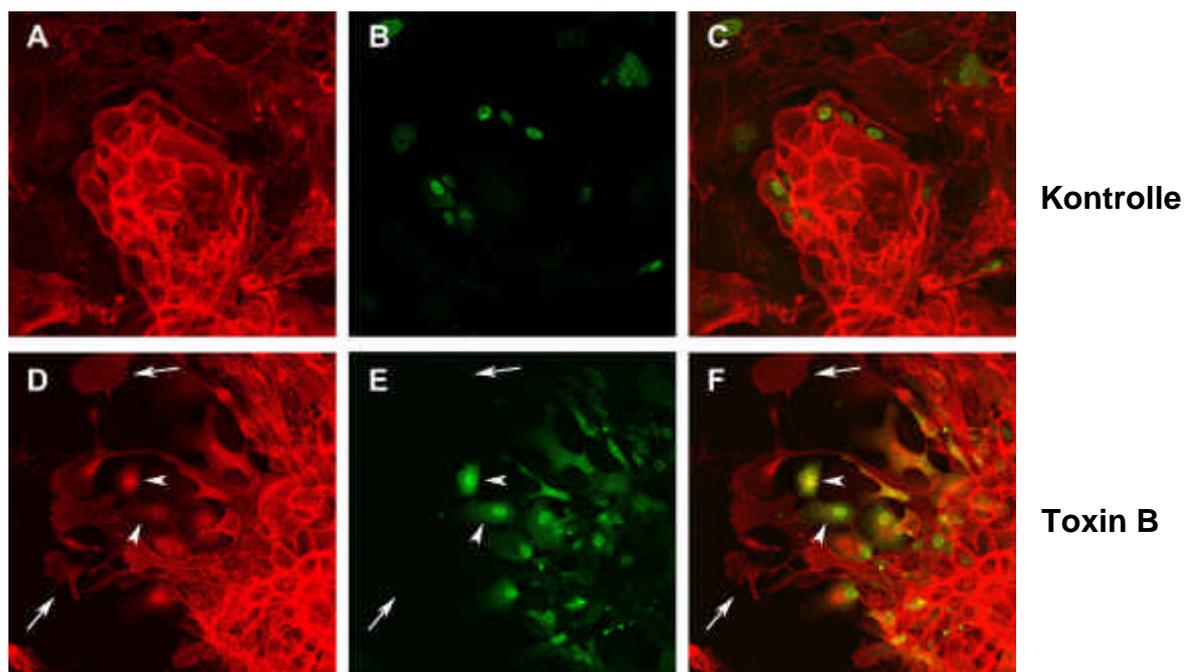


Abb. IV.24: HSV-1 Infektion von Toxin B- behandelten Keratinozyten

Stratifizierende Keratinozyten-Kulturen wurden ohne Toxin B Behandlung (A-C) oder nach 15 stündiger Toxin B Behandlung (D-F) mit HSV-1 infiziert (50 PFU/Zelle). 2 h p.i. wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (rot) visualisiert. ICP0 Färbung wurde mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab 11060) und Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (rot) durchgeführt. Die Aktin Färbung (A, D), die ICP0 Färbung (B, E) und die Überlagerung der Färbungen (C, F) sind gezeigt.

Inhibierung der Signaltransduktion von Rac1 und Cdc42 zu deren Effektoren führte damit zu einer teilweisen Inhibierung der HSV-1 Infektion.

In einem analogen Experiment wurden stratifizierende Keratinozyten-Kulturen mit Toxin B behandelt und anschließend mit HSV-1 infiziert. Zellen ohne Toxin B-Behandlung zeigten 2 h p.i. nukleäres ICP0 nukleär in peripheren basalen Zellen (Abb. IV.24, A-C). In Toxin B behandelten Keratinozyten, die wenig cortikales F-Aktin zeigten, wurde entweder keine frühe virale Genexpression (Abb. IV.24, D-F, Pfeile) oder zytoplasmatisches ICP0 detektiert (Abb. IV.24, D-F, Pfeilspitzen).

Die Toxin B Experimente weisen daher auf einen möglichen Einfluss der Signaltransduktion von Cdc42/Rac1 auf die HSV-1 Infizierbarkeit primärer Keratinozyten und von MDCKII Zellen hin.

4.3 Einfluss Rho-ähnlicher GTPasen auf die HSV-1 Infektion vereinzelter MDCKII Zellen

Die Inhibitorstudien ergaben erste Hinweise, dass der Eintritt von HSV-1 Partikeln in Epithelzellen möglicherweise durch Rho-ähnliche GTPasen beeinflusst wird. Der potentielle Einfluss einzelner Rho GTPasen wurde in MDCKII Zellen durch die Expression dominanter Isoformen untersucht. Einzelne Aminosäuresubstitutionen rufen bei Überexpression entweder einen dominant-aktiven (GTP-gebundenen) oder einen dominant-negativen (GDP-gebundenen) Phänotyp hervor und sind in Tabelle IV.3 zusammengefasst (zur Übersicht Feig, 1999).

Isoform	Effekt
L61 Cdc42	dominant aktiv
L61 Rac1	dominant aktiv
L61 RhoA	dominant aktiv
V12 Cdc42	dominant aktiv
V12 Rac1	dominant aktiv
V12 RhoA	dominant aktiv
N17 Cdc42	dominant inaktiv
N17 Rac1	dominant inaktiv
N17 RhoA	dominant inaktiv

Tabelle IV.3: Dominante Isoformen der Rho GTPasen

In den folgenden Experimenten wurden diese unterschiedlichen Isoformen von Cdc42, Rac1 und RhoA transient in MDCKII Zellen exprimiert und anschließend diese Zellen infiziert. Dazu war es zunächst erforderlich die Bedingungen der transienten Expression der Rho GTPasen zu optimieren. Optimale Voraussetzungen zur Auswertung dieser Experimente bedingten eine hohe Transfektionseffizienz, eine gleichmäßige Expressionsstärke der Transgene und eine kurze Expressionsdauer. Eine hohe Transfektionseffizienz war notwendig für eine statistisch relevante Auswertung der Experimente, in denen die Anzahl infizierter Zellen pro Transgen-exprimierender Zellen bestimmt wurde. Eine gleichmäßige Expressionsstärke trug zur Minimierung der Unterschiede im Effekt auf das Aktin-Zytoskelett bei. Eine kurze Expressionsdauer konnte zytotoxische Effekte minimieren, die nach längerer Expression der Transgene auftraten. Die besten Bedingungen zur transienten Expression dieser Transgene in MDCKII Zellen wurde durch Transfektion mit der Nucleofector-Methode, einer Elektroporationsmethode, bei sechsständiger Transgenexpression vor der Infektion erreicht (Daten nicht gezeigt).

In den folgenden Experimenten wurden die Transgene 6h nach Transfektion in MDCKII Zellen exprimiert. Anschließend wurden die Zellen mit hoher MOI infiziert und 2 h p.i. gegen ICP0 und das exprimierte Transgen gefärbt, das ein c-myc-Epitop als Marker trägt. Die Anzahl ICP0-exprimierender Zellen pro Transgen exprimierender Zellen wurde bestimmt und als Mittelwert mit Standardabweichung der generell dreifach durchgeführten Experimente in Prozent angegeben. Die zugrunde liegenden Daten aller Transfektionsexperimente sind im Anhang der vorliegenden Arbeit angefügt.

4.3.1 Einfluss dominanter Isoformen auf die HSV-1 Infektion

MDCKII Zellen wurden zunächst mit Expressionsplasmiden der dominanten Isoformen Rho-ähnlicher GTPasen transfiziert. Die Expression von GFP vor der Infektion diene als Kontrolle, ob die Transfektionsbedingungen und die transiente Expression von Transgenen generell die HSV-1 Infektion in MDCKII Zellen beeinflussen. Durch die Transfektionsbedingungen wurden MDCKII Zellen vereinzelt und durchschnittlich 85% aller GFP exprimierenden Zellen zeigten frühe virale

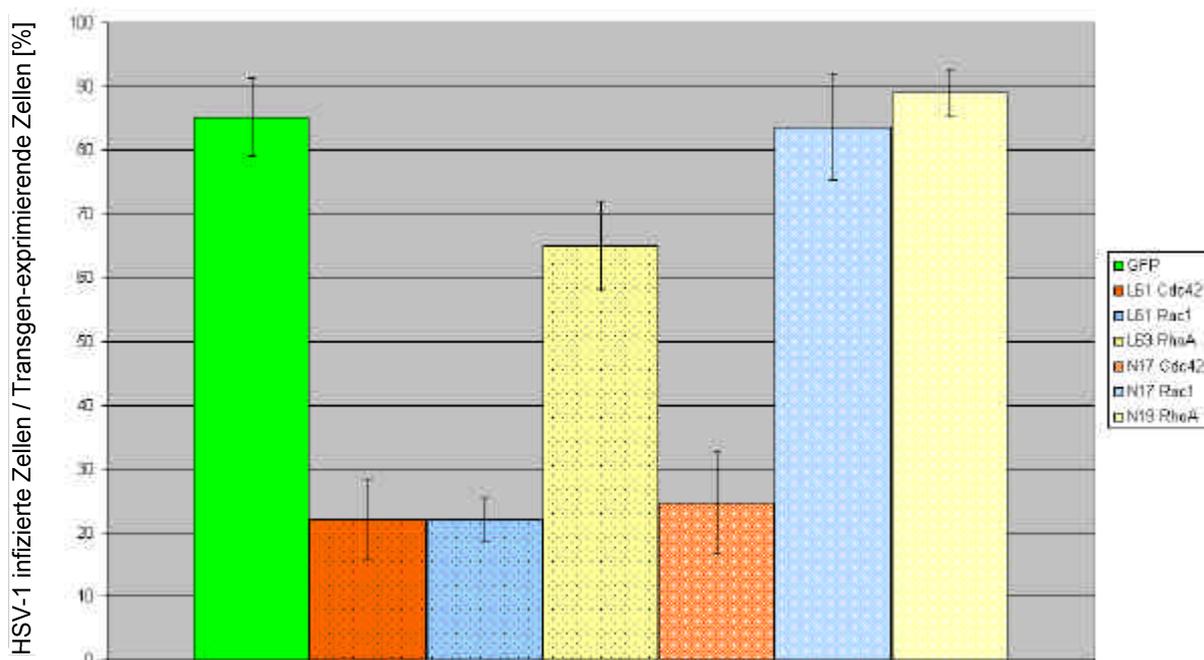


Abb. IV.25: Einfluss dominanter Isoformen Rho-ähnlicher GTPasen auf die HSV-1 Infektion

MDCKII Zellen wurden mit verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert und 6 h nach Transfektion mit HSV-1 (50 PFU/Zelle) infiziert. 2 h p.i. wurden die Zellen fixiert und mit anti-ICP0-Antiserum (r191) und anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gegen das Transgen gefärbt. Die Anzahl ICP0-exprimierender (infizierter) Zellen pro Transgen-exprimierender Zellen wurde bestimmt und als Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten in Prozent für das jeweilige Transgen angegeben (Y-Achse). Die Standardabweichung der Experimente ist als Fehlerbalken angegeben. Die Daten der einzelnen Experimente sind im Anhang angefügt. Die exprimierten Transgene sind rechts angegeben.

Genexpression (Abb. IV.25, 1. Balken). Die Transfektionsbedingungen wirkten nicht inhibierend auf die HSV-1 Infektion. Von den dominant aktiven Konstrukten Rho-ähnlicher GTPasen zeigten L61 Cdc42 und L61 Rac1 eine deutliche Reduktion in der Anzahl infizierter Zellen, so dass nur in 22% aller L61 Cdc42 oder L61 Rac1 exprimierenden Zellen ICP0 Expression detektiert werden konnte (Abb. IV.25, 2. und 3. Balken). Wurde L63 RhoA vor der Infektion exprimiert, konnte in 65% aller Transgen exprimierenden Zellen frühe Genexpression nachgewiesen werden (Abb. IV.25, 4. Balken). Von den dominant inaktiven Konstrukten zeigten N17 Rac1 und N19 RhoA ähnlich viele infizierte Zellen wie die GFP-Kontrolle (Abb. IV.25, 6. und 7. Balken). Im Gegensatz dazu konnte bei Expression von N17 Cdc42 bei nur 25% der Zellen frühe virale Genexpression nachgewiesen werden (Abb. IV.25, 5. Balken).

In diesen Untersuchungen wurde beobachtet, dass die Infizierbarkeit von MDCKII Zellen mit HSV-1 durch die Expression der dominant aktiven Isoformen von Cdc42 und Rac1 sowie der dominant inaktiven Isoform von Cdc42 deutlich herabgesetzt wurde. Dadurch zeigten diese Experimente erstmals den potentiellen Einfluss der Signaltransduktionsprozesse von Cdc42 und Rac1 auf die HSV-1 Infizierbarkeit von Zellen.

4.3.2 Einfluss der Wildtyp-Isoformen auf die HSV-1 Infektion

In analoger Weise wurden die Wildtyp-Isoformen der Rho-ähnlichen GTPasen vor der HSV-1 Infektion transient exprimiert, um festzustellen, ob ein Einfluss dieser Proteine selbst oder der zusammenhängenden Signaltransduktion besteht.

In diesen Experimenten zeigten 81% aller GFP exprimierenden Zellen frühe virale Genexpression (Abb. IV.26, 1. Balken). Weder die Überexpression von Cdc42, Rac1 noch RhoA zeigte eine signifikante Reduktion der Anzahl HSV-1 infizierter Zellen (Abb. IV.26, 2.-4. Balken).

Ein inhibierender Einfluss der Überexpression der Wildtyp-Isoformen von Cdc42, Rac1 und RhoA auf die Anzahl ICP0 exprimierender Zellen lag nicht vor.

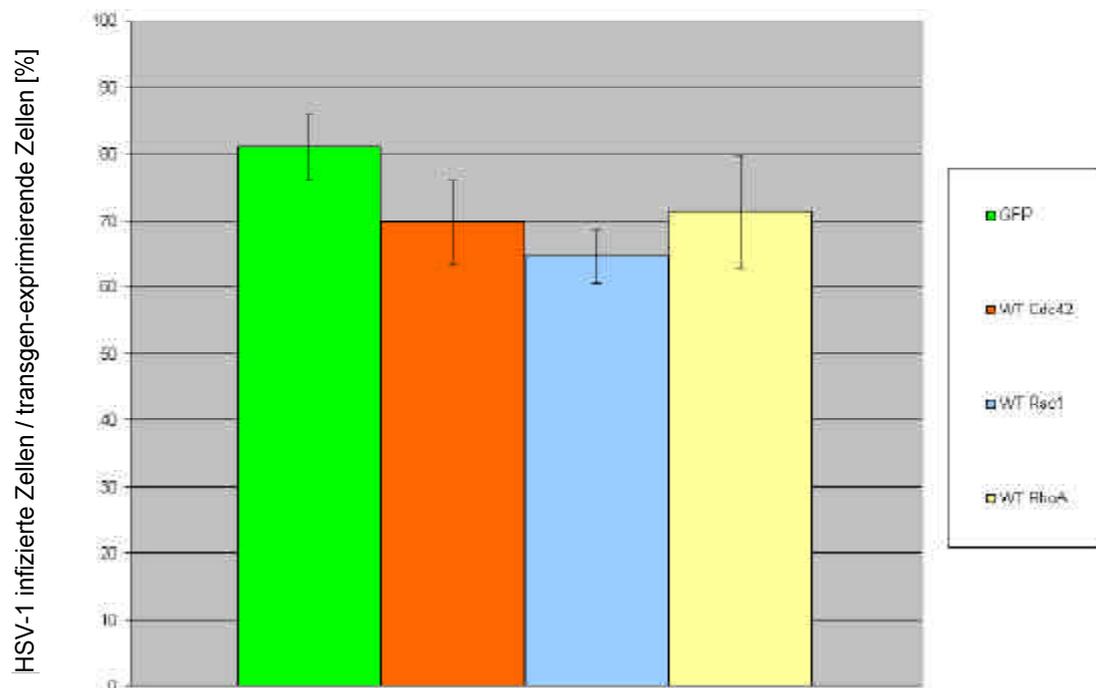


Abb. IV.26: Einfluss der Überexpression Rho-ähnlicher GTPasen auf die HSV-1 Infektion

MDCKII Zellen wurden mit verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert und 6 h nach Transfektion mit HSV-1 (50 PFU/Zelle) infiziert. 2 h p.i. wurden die Zellen fixiert und mit anti-ICP0-Antiserum (r191) und anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gegen das Transgen gefärbt. Die Anzahl ICP0-exprimierender (infizierter) Zellen pro Transgen-exprimierender Zellen wurde bestimmt und als Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten in Prozent für das jeweilige Transgen angegeben (Y-Achse). Die Standardabweichung der Experimente ist als Fehlerbalken angegeben. Die Daten der einzelnen Experimente sind im Anhang angefügt. Die exprimierten Transgene sind rechts angegeben.

4.3.3 Einfluss dominanter Isoformen auf sehr frühe HSV-1 Genexpression

Die Signaltransduktion Rho-ähnlicher GTPasen beeinflusst nicht nur die Organisation und Dynamik des Aktin-Zytoskeletts, sondern auch die zelluläre Genexpression (zur Übersicht Schmitz *et al.*, 2000). Um auszuschließen, dass die beobachtete Reduktion ICP0 exprimierender Zellen auf eine negative Regulation des ICP0 Promotors zurückzuführen ist, wurden Ko-Transfektionsexperimente durchgeführt. Dabei wurde ein Plasmid, das die Sequenz für ein ICP0-CFP (Cyan fluoreszierendes Protein) Fusionsprotein unter der Kontrolle des ICP0 Promotors enthielt, in äquimolaren Mengen mit je einem GTPase-Konstrukt ko-transfiziert. Die Anzahl der ICP0-CFP exprimierenden Zellen pro GTPase exprimierenden Zellen wurde bestimmt und als Mittelwert mit Standardabweichung der durchgeführten Experimente in Prozent angegeben.

Bei den Ko-Transfektions-Experimenten zeigten durchschnittlich 26,3% aller L61 Cdc42 exprimierenden Zellen auch eine Expression von ICP0-CFP (Abb. IV.27, 1. Balken). Für das dominant negative Konstrukt N19 RhoA, das die Anzahl ICP0 exprimierender Zellen in der Infektion nicht beeinflusst, wurden durchschnittlich 26,6% ICP0 exprimierender Zellen bestimmt (Abb. IV.27, 2. Balken). Die Transkription des ICP0 Promotors wurde im Vergleich der L61 Cdc42 und N19 RhoA exprimierenden Zellen nicht signifikant durch die Expression unterschiedlicher dominanter GTPase-Isoformen beeinflusst.

Der geringe Anteil ICP0 exprimierender Zellen in den Ko-Transfektions-Experimenten (etwa 26%) im Vergleich zur Infektion (etwa 80%) könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Expression sehr früher HSV-1 Gene in der Infektion durch den viralen Transkriptionsaktivator VP16 verstärkt wird (zur Übersicht Roizman und Sears, 1996).

4.3.4 Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts einzelner MDCKII Zellen durch Rho-ähnliche GTPasen

Cdc42, Rac1 und RhoA regulieren in ihren dominanten Isoformen das Aktin-Zytoskelett in einer für sie typischen Weise. Die Funktionalität der verwendeten

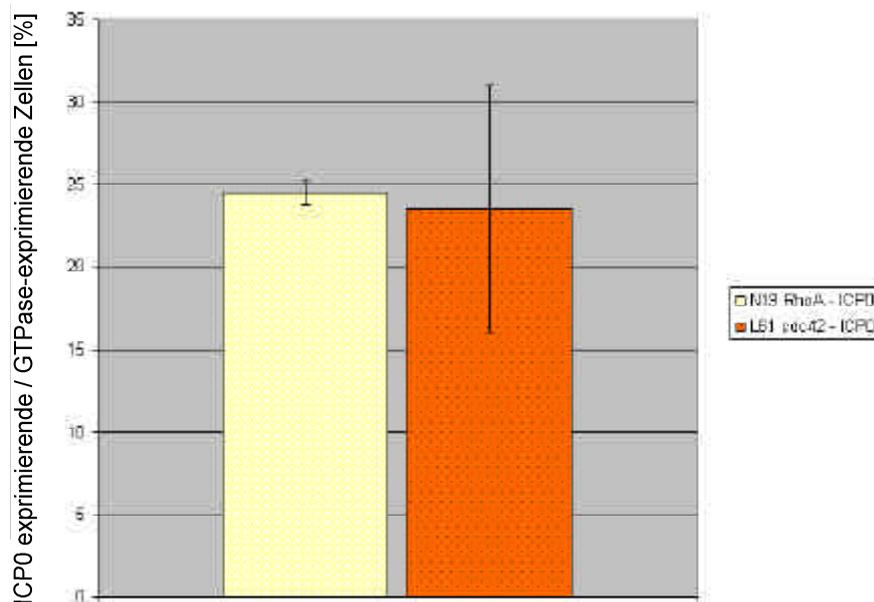


Abb. IV.27: Einfluss Rho-ähnlicher GTPasen auf den ICP0-Promotor

MDCKII Zellen wurden mit Expressionsplasmiden ko-transfiziert und 6 h nach Transfektion fixiert. Die ko-transfizierten Plasmide enthielten die Sequenzen für N19 RhoA oder L61 Cdc42 unter Kontrolle des CMV Promotors und für ein ICP0-CFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des ICP0 Promotors. Die Zellen wurden anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gegen das Transgen gefärbt. Die Anzahl ICP0-exprimierender Zellen pro GTPase-exprimierender Zellen wurde bestimmt und als Durchschnitt von zwei unabhängigen Experimenten in Prozent für die jeweilige GTPase angegeben (Y-Achse). Die Standardabweichung der Experimente ist als Fehlerbalken angegeben. Die Daten der einzelnen Experimente sind im Anhang angefügt.

Konstrukte wurde nach sechstündiger transienter Expression durch Färbung gegen das C-myc-Epitop und Ko-Färbung des Aktin-Zytoskeletts untersucht.

Die Expression von GFP diente hierbei wiederum als Vergleich. MDCKII Zellen wurden durch die Transfektionsprozedur vereinzelt und zeigten generell eine flache, ausgebreitete Morphologie (Abb. IV.28, A). In diesen Zellen wurde ein starkes cortikales Aktin beobachtet, wobei selten Stressfibrillen oder Filopodia zu erkennen waren. Einzelne Zellen bildeten ansatzweise Lamellipodia aus (Abb. IV.28, A, Pfeilspitze). Zwischen MDCKII Zellen, die keine GFP Expression zeigten und solchen, die GFP exprimierten, waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abb. IV.28, A, B).

Im Folgenden werden die Veränderungen der Morphologie und des Aktin-Zytoskeletts, die durch Expression der verschiedenen transient exprimierten dominanten Isoformen Rho-ähnlicher GTPasen hervorgerufen wurden, kurz beschrieben und anschließend tabellarisch zusammengestellt:

Dominant positive Isoformen

L61 Cdc42:

Die Expression von L61 Cdc42 führte häufig zur Ausbildung von Filopodia und Stressfibrillen (Abb. IV.29, A, B, Pfeilspitze), wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung (Abb. IV.29, A, B vgl. Asterisk).

L61 Rac1:

L61 Rac1 exprimierende Zellen zeigten entweder die Ausbildung vieler Stressfibrillen (Abb. IV.29, C, D, Asterisk) oder die Ausbildung von Lamellipodia (Abb. 28, C, D Pfeilspitze) und eines starken cortikalen Aktin-Signals entlang der Zell-Zell-Kontakte (Abb. IV.29, C, D, Pfeil).

L63 RhoA:

Die Ausbildung von ungeordneten kurzen Stressfibrillen zusammen mit der Formation von Filopodia konnte häufig in L63 RhoA exprimierenden Zellen beobachtet werden (Abb. IV.29, E, F Stern).

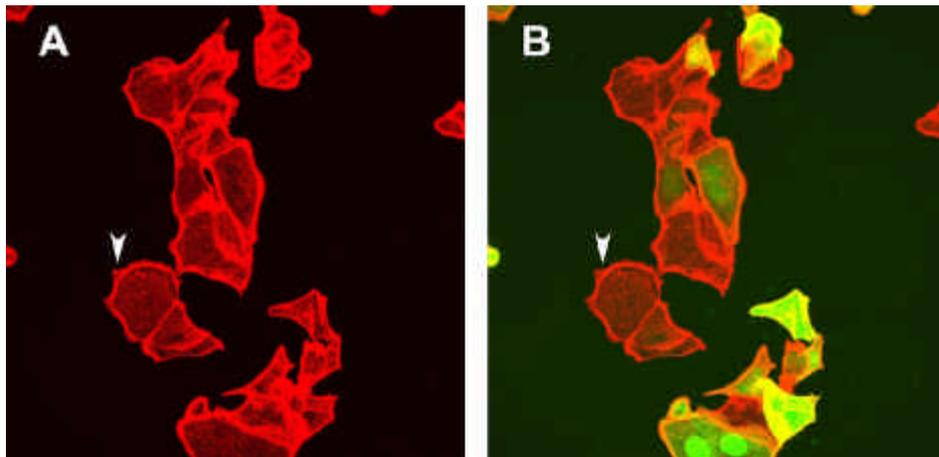


Abb. IV.28: Einfluss transienter GFP-Expression auf das Aktin-Zytoskelett

MDCKII Zellen wurden mit einem GFP-Expressionsplasmiden (grün) transfiziert und 6 h nach Transfektion fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch TRITC-konjugiertes Phalloidin visualisiert (rot, A, B). Die Projektion konfokaler Aufnahmen ist abgebildet. Die Aktin-Färbung (A) sowie die Überlagerung der Färbung (B) sind gezeigt. Die Pfeilspitze deutet die anfängliche Ausbildung von Lamellipodia an.

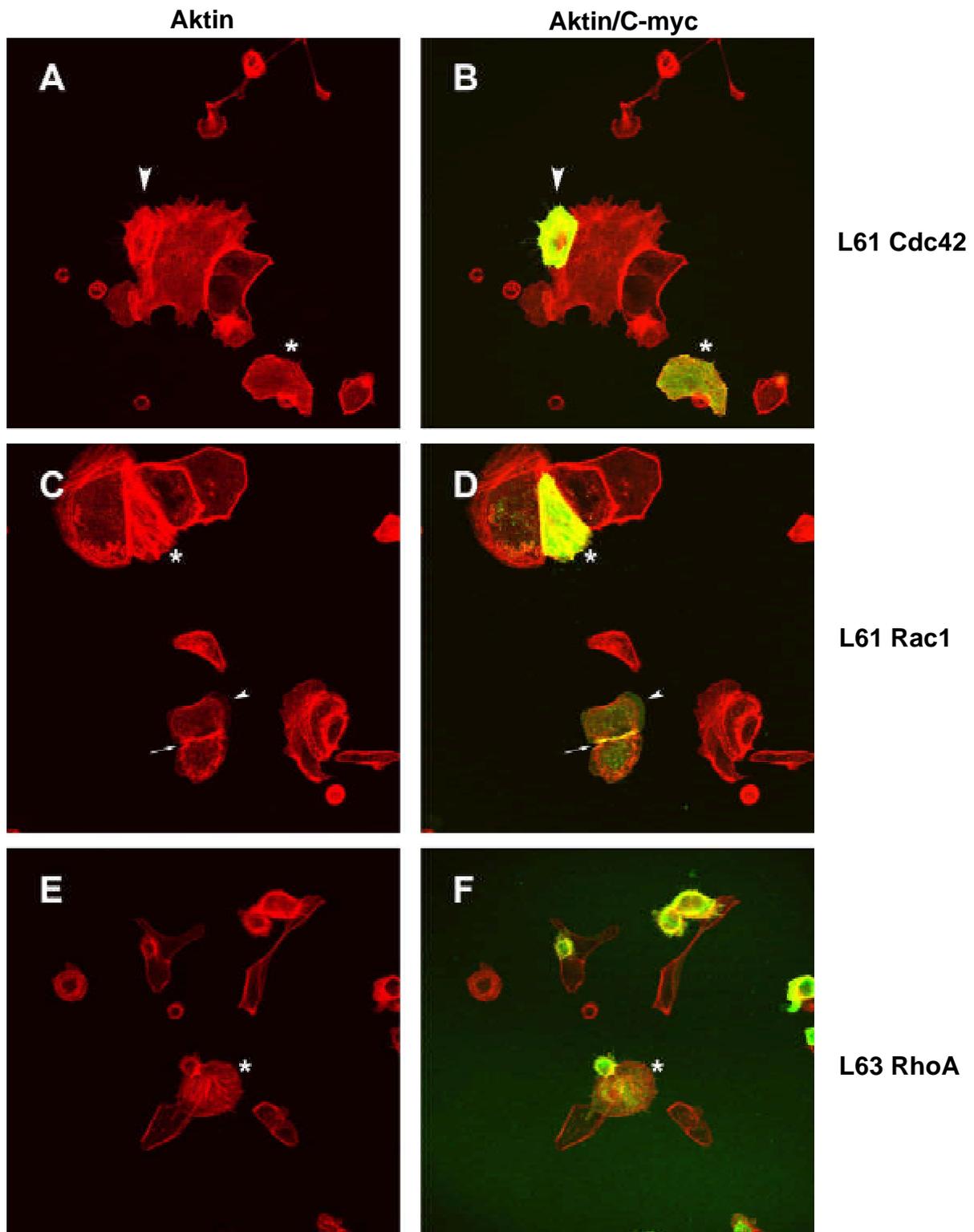


Abb. IV.29: Einfluss transientser Expression von dominant positiven Rho-ähnlichen GTPasen auf das Aktin-Zytoskelett

MDCKII Zellen wurden mit den angegebenen GTPase-Expressionsplasmiden transfiziert und 6 h nach Transfektion fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch TRITC-konjugiertes Phalloidin visualisiert (rot). Die Zellen wurden mit anti-C-myc-Antikörpern (9E10) und mit Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün) gegen die GTPase Isoformen ko-gefärbt. Die Projektion konfokaler Aufnahmen ist abgebildet. Die Aktin-Färbung (A, C, E) sowie die Überlagerung der Färbung (B, D, F) sind gezeigt. Die Transgen-Expression von L61 Cdc42 (A, B), L61 Rac1 (C, D) und L63 RhoA (E, F) ist abgebildet.

Dominant negative Isoformen

N17 Cdc42:

Lange Filopodia und starke Aktin-Stressfibrillen wurden durch die Expression von N17 Cdc42 hervorgerufen (Abb. IV.30, A, B, Pfeilspitze).

N17 Rac1:

MDCKII Zellen, die N17 Rac1 exprimierten, zeichneten sich insbesondere durch eine abgerundete Zellmorphologie aus, die Fähigkeit zur Zellspreizung schien beeinträchtigt (Abb. IV.30, C, D).

N19 RhoA:

Es konnten keine signifikanten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts durch die Expression von N19 RhoA im Vergleich zu GFP-transfizierten oder untransfizierten Zellen beobachtet werden (Abb. IV.30, E, F).

Wildtyp-Isoformen

Cdc42:

Cdc42 Überexpression rief die Ausbildung langer Filopodia und kurzer Stressfibrillen hervor (Abb. IV.31, A, B). Die Zellen hatten häufig eine abgerundete Morphologie.

Rac1:

Ausgebreitete Zellen mit kurzen Filopodia und einer starken Aktin-Cortex entlang der Zell-Zell-Kontakte waren die Folge der Expression von Rac1 (Abb. IV.31, C, D).

RhoA:

Nicht parallele Stressfibrillen-Bildung wurde durch RhoA Expression hervorgerufen (Abb. IV.31, E, F).

Die dominant aktiven GTPase Isoformen zeigten einen dominanten Effekt auf das Aktin-Zytoskelett in der Ausbildung ihrer charakteristischen F-Aktin-Strukturen, wobei zu bemerken ist, dass L61 Cdc42 und L61 Rac1 offensichtlich auch die Ausbildung RhoA spezifischer Stressfibrillen zeigten. Dies legt eine kaskadenartige Aktivierung von RhoA durch L61Cdc42 oder L61 Rac1 nahe, wie sie auch in Fibroblasten beschrieben ist (zur Übersicht Hall, 1998).

Die dominant negativen GTPasen mit der Ausnahme von N17 Cdc42 zeigten nicht mehr die Ausbildung ihrer respektiven charakteristischen F-Aktin-Strukturen, was

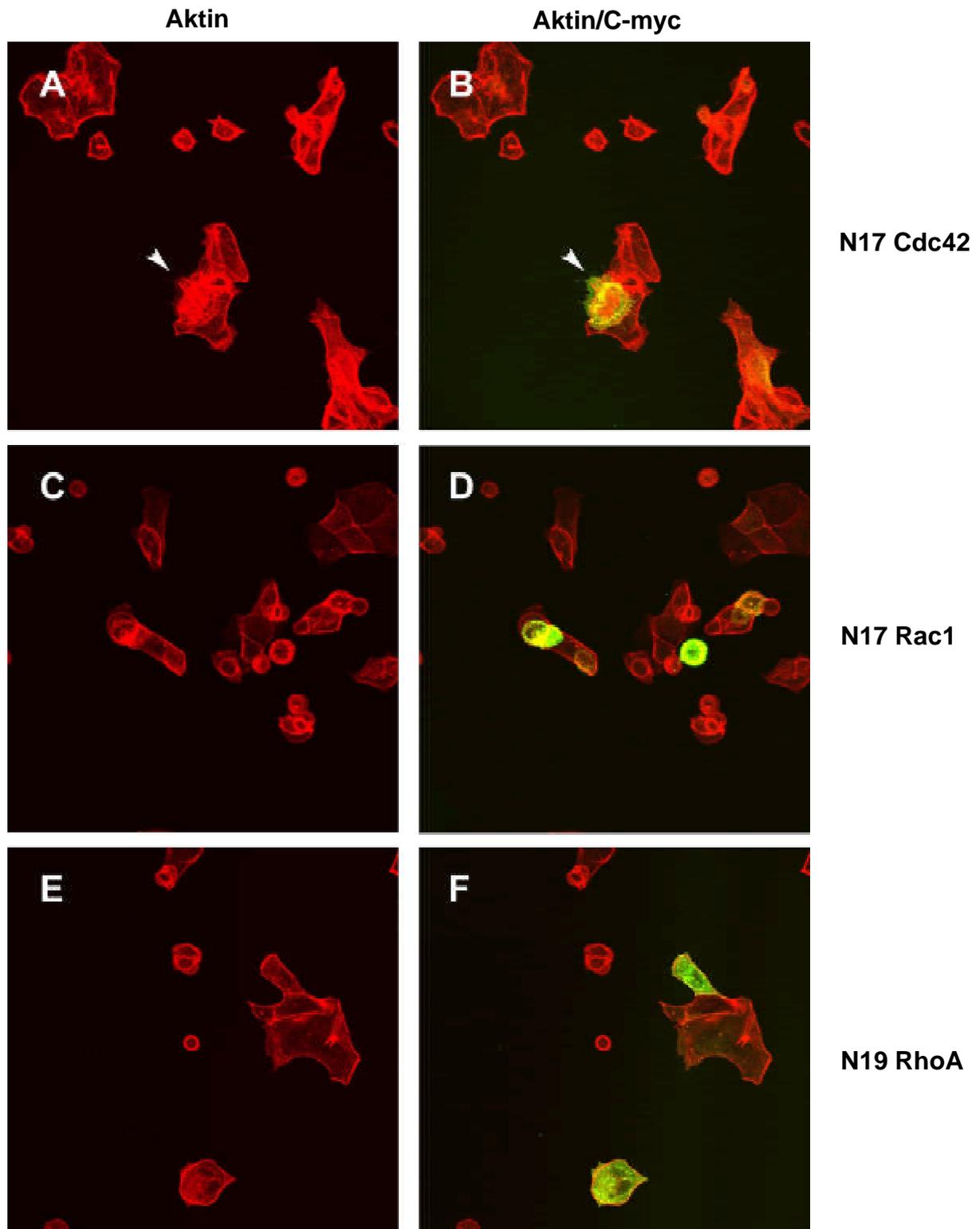


Abb. IV.30: Einfluss transientser Expression von dominant negativen Rho-ähnlichen GTPasen auf das Aktin-Zytoskelett

MDCKII Zellen wurden mit den angegebenen GTPase-Expressionsplasmiden transfiziert und 6 h nach Transfektion fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch TRITC-konjugiertes Phalloidin visualisiert (rot). Die Zellen wurden mit anti-C-myc-Antikörpern (9E10) und mit Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün) gegen die GTPase Isoformen gefärbt. Die Aktin-Färbung (A, C, E) sowie die Überlagerung der Färbung (B, D, F) sind gezeigt. Die Projektion konfokaler Aufnahmen ist abgebildet. Die Transgen-Expression von N17 Cdc42 (A, B), N17 Rac1 (C, D) und N19 RhoA (E, F) ist abgebildet.

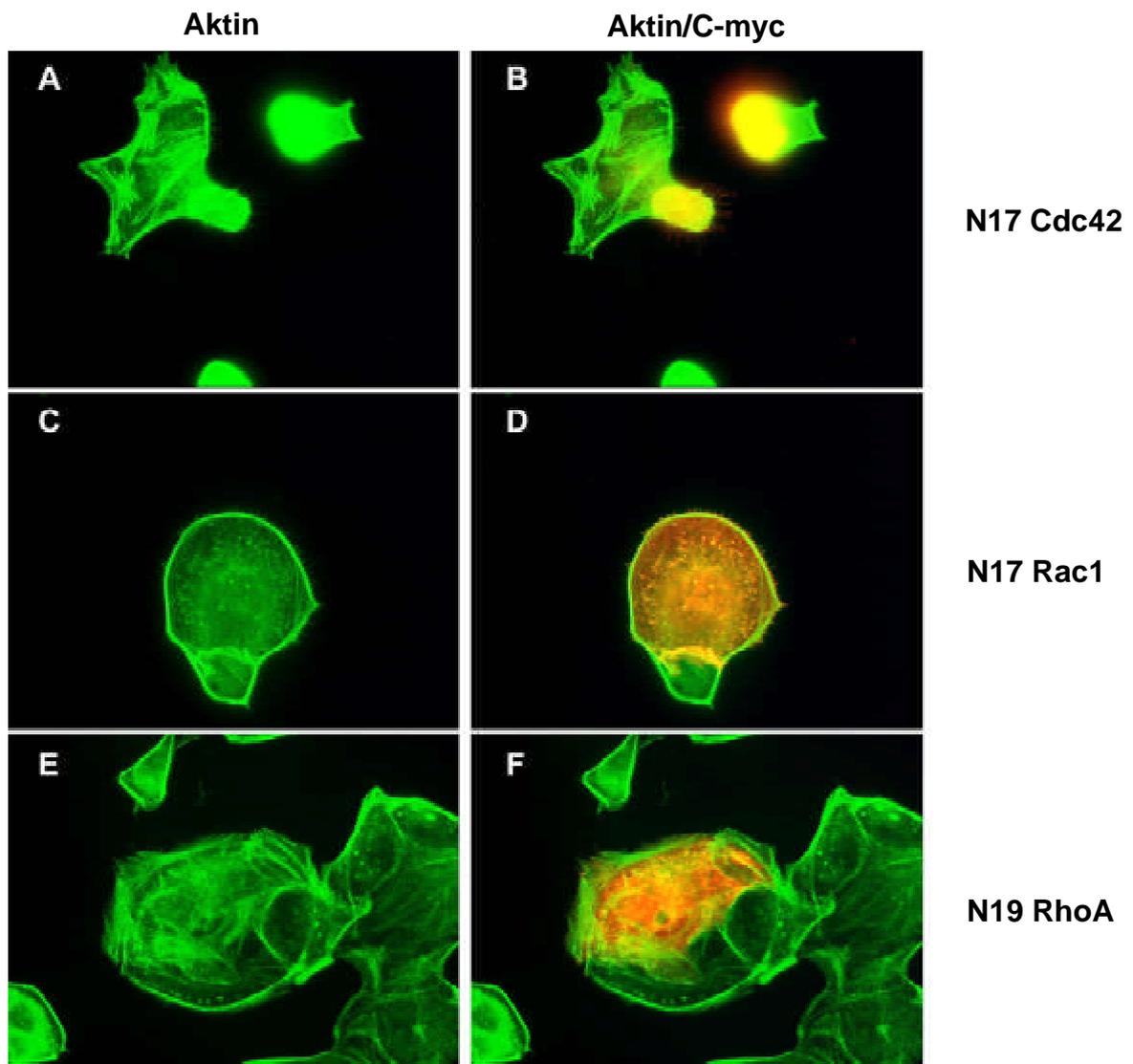


Abb. IV.31: Einfluss transienter Expression von Rho-ähnlichen GTPasen auf das Aktin-Zytoskelett

MDCKII Zellen wurden mit den angegebenen GTPase-Expressionsplasmiden transfiziert und 6 h nach Transfektion fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch FITC-konjugiertes Phalloidin visualisiert (grün). Die Zellen wurden mit anti-C-myc-Antikörpern (9E10) und mit Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (grün) gegen die GTPase Isoformen gefärbt. Die Epifluoreszenz-Aufnahmen der Aktin-Färbung (A, C, E) sowie der Überlagerung der Färbung (B, D, F) sind gezeigt. Transgen-Expression von WT Cdc42 (A, B), WT Rac1 (C, D) und WT RhoA (E, F) ist abgebildet.

den Schluss zulässt, dass tatsächlich ein dominant negativer Effekt ausgeübt wurde. N17 Cdc42 zeigte untypischerweise die Ausbildung von Filopodia, jedoch keine Ausbildung einer migratorischen Polarität.

Die Wildtyp-Isoformen zeigten leicht dominant positive Effekte auf das Aktin-Zytoskelett. Cdc42 oder Rac1 Expression rief keine Stressfibrillen-Bildung hervor, im Gegensatz zu ihren dominant aktiven Isoformen. Dies ließ eine kaskadenartige Aktivierung von RhoA durch die Wildtyp-Isoformen von Cdc42 und RhoA unwahrscheinlich erscheinen.

Exprimiertes Transgen	Effekt auf das Aktin-Zytoskelett	Abbildung
GFP	Ausgebreitete Zellen mit starkem cortikalen Aktin, Ansätze von Lamellipodia-Bildung	Abb. IV.28, A, B
L61 Cdc42	Ausbildung von langen Filopodia und starken Stressfibrillen	Abb. IV.29, A, B
L61 Rac1	a) Ausbildung vieler Stressfibrillen, oder alternativ b) Ausbildung von starkem cortikalen Aktin entlang von Zell-Zell-Kontakten, Lamellipodia	Abb. IV.29, C, D, Pfeilspitze Abb. IV.29, C, D, Pfeil
L63 RhoA	Ungeordnete starke Stressfibrillen-Bildung, teilweise verbunden mit dem Auftreten von Filopodia	Abb. IV.29, E, F, Asterisk
N17 Cdc42	Filopodia und Stressfibrillen-Bildung	Abb. IV.30, A, B
N17 Rac1	Abgerundete Zellen, verhinderte Zellspreizung	Abb. IV.30, C, D
N19 RhoA	Keine signifikanten Veränderungen	Abb. IV.30, E, F
Cdc42	Ausbildung langer Filopodia und kurzer Stressfibrillen, eher runde Zellmorphologie	Abb. IV.31, A, B
Rac1	Kurze Filopodia und starkes cortikales Aktin wurde entlang der Zell-Zell-Kontakte ausgebildet, stark ausgebreite Zellmorphologie	Abb. IV.31, C, D
RhoA	Ungeordnete Stressfibrillen-Bildung	Abb. IV.31, E, F

Tabelle IV.3: Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts vereinzelter MDCKII Zellen durch Rho GTPasen

Einen inhibitorischen Effekt auf die HSV-1 Infektion hatten ausschließlich Isoformen von Cdc42 und Rac1, die dominant die Signaltransduktion des Aktin-Zytoskeletts beeinflussten und dabei eine starke Bildung filamentöser Aktin-Strukturen hervorriefen.

4.4 Einfluss Rho-ähnlicher GTPasen auf die HSV-1 Infektion subkonfluenten MDCKII Zellen

Die beschriebenen Experimente zeigten einen Einfluss der Signaltransduktion von Cdc42 und Rac1 auf die Infektion von HSV-1 in vereinzelt MDCKII Zellen. Diese transfizierten Zellen entsprechen allerdings nur sehr bedingt den Bedingungen der HSV-1 Infektion epithelialer Zellen. Darüber hinaus zeigten die transfizierten Zellen eine Varianz in der Expressionsstärke der dominanten Rho-GTPase Isoformen und folglich auch in deren Effekt auf die Signaltransduktion. Um eine gleichmäßigere Transgen-Expression unter eher epithelialen Bedingungen zu erreichen, ist die Induktion stabiler Transgen-Expression eine Alternative zur Transfektion. Das Labor von James Nelson (Stanford University) erreichte die Klonierung von Zelllinien, in denen dominante Rho-ähnliche GTPase-Isoformen unter der Kontrolle des tetracyclin-reprimierbaren Transaktivators exprimiert werden können (Jou *et al.*, 1998a, 1998b). In diesen MDCKII T23 Zellen wird das Transgen in Abwesenheit von Tetracyclin oder Tetracyclin-Analoga exprimiert und in Anwesenheit von Tetracyclin reprimiert. Da es bei Kultivierung dieser Zelllinien zum Verlust der Transgen-Expression in einem Teil der Zellpopulation kommen kann (James W. Nelson, persönl. Mitteilung), wurden die Zelllinien MDCKII T23 V12 Rac1 und V12 Cdc42 vor Durchführung der Experimente subkloniert. Die besten experimentellen Bedingungen im Hinblick auf eine vollständige Induktion mit möglichst gleichmäßiger Transgen-Expression wurde 48 h nach Entfernen des Tetracyclin-Analogons Doxycyclin aus dem Kulturmedium erreicht.

4.4.1 Infektionsstudien

Subkonfluente MDCKII T23 Zellen der dominanten Isoformen von Cdc42 und Rac1 wurden für die folgenden Infektionsstudien verwendet und in Anwesenheit und Abwesenheit von Doxycyclin für 48 h vor Infektion kultiviert. Zwei Stunden nach Infektion wurden die Zellen gegen ICP0 und Expression des Transgens, das mit dem C-myc-Epitop fusioniert ist, gefärbt.

Dominant positive Isoformen

V12 Cdc42:

V12 Cdc42 ist eine funktionell zu L61 Cdc42 analoge Isoform und stellt die dominant aktive GTPase Isoform dar. Wenn subkonfluente MDCKII T23 V12 Cdc42 Zellen in Anwesenheit von Doxycyclin kultiviert wurden, zeigte sich keine Transgen-Expression (Abb. IV.32, E, G). Die HSV-1 Infektion wurde mit ansteigender Multiplizität durchgeführt und führte hauptsächlich in peripheren Zellen von MDCKII Zell-Inseln zu früher Genexpression (Abb. IV.32, A, E, C, G). In Abwesenheit von Doxycyclin wurde V12 Cdc42 exprimiert (Abb. IV.32, F, H). Im Vergleich zu Zellen, die kein V12 Cdc42 exprimierten, zeigten sich bei gleicher Multiplizität keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß ICP0 exprimierender Zellen. Auch hier wurden bevorzugt die peripheren Zellen von Zell-Inseln infiziert (Abb. IV.32, B, F, D, H).

V12 Rac1:

Alle Infektionsstudien wurden mit je zwei Subklonen der MDCKII T23 V12 Rac1 Zelllinien durchgeführt und zeigten keine signifikanten Unterschiede in bezug auf ihre Infizierbarkeit (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu V12 Cdc42 wurde nach Induktion der Expression von V12 Rac1 und folgender HSV-1 Infektion eine deutliche Reduktion in der Anzahl ICP0 exprimierender Zellen beobachtet (Abb. IV.33, B, F, D, H). Während Zellen in Gegenwart von Doxycyclin keine Transgen-Expression zeigten und hauptsächlich die peripheren Zellen von MDCKII Inseln infiziert wurden (Abb. IV.33, A, E, C, G), konnte sehr frühe virale Genexpression nur gelegentlich in Abwesenheit von Doxycyclin und V12 Rac1 Expression detektiert werden (Abb. IV.33, B, F, D, H). Interessanterweise wurden dabei hauptsächlich Zellen infiziert, die

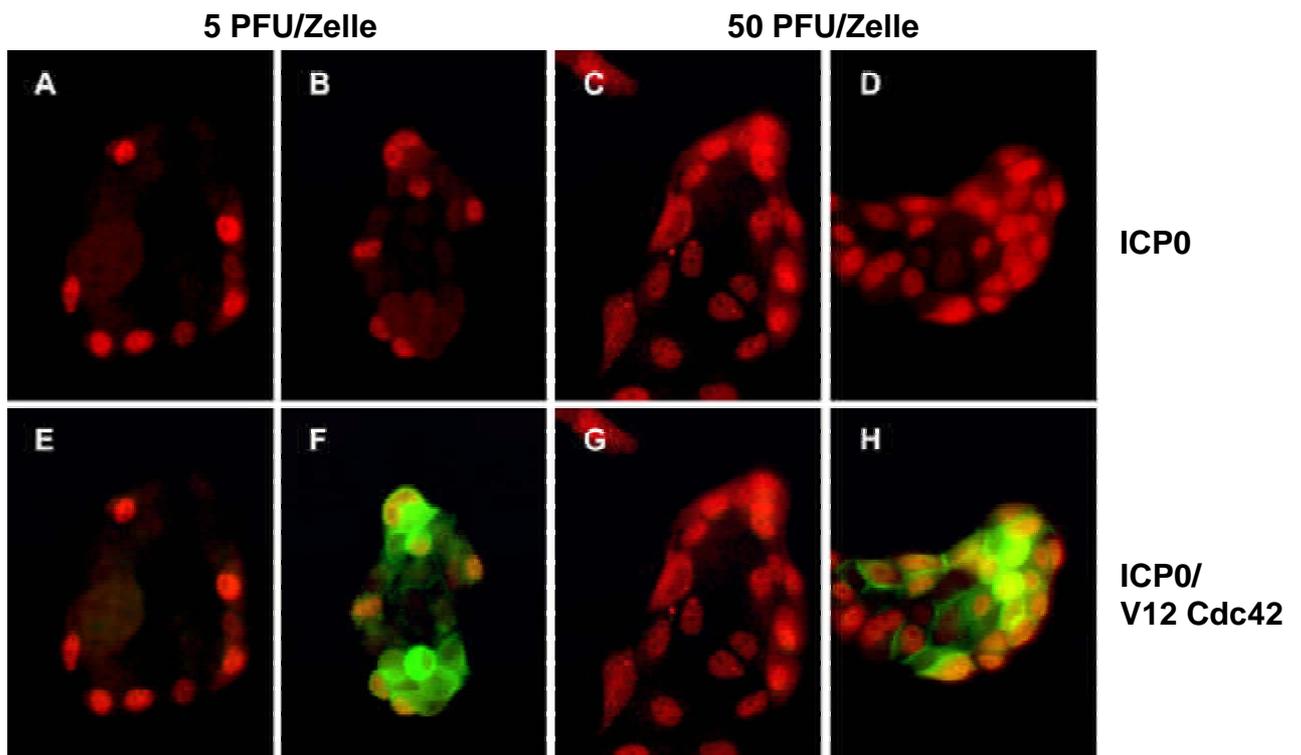


Abb. IV.32: HSV-1 Infektion von MDCKII T23 V12 Cdc42 Zellen

Transgen-Expression wurde in subkonfluenten MDCKII T23 V12 Cdc42 Zellen 48 h vor Infektion induziert (B, F, D, H) oder undinduzierte Zellen wurden infiziert (A, E, C, G). Die HSV-1 Infektion wurde mit einer MOI von 5 PFU/Zelle (A, B, E, F) oder von 50 PFU/Zelle (C, D, G, H) durchgeführt. 2 h p.i. wurden die Zellen fixiert. Die Zellen wurden mit anti-ICP0-Antiserum (r191) und anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gefärbt. Die Färbung wurde mit Alexa Fluor 555-konjugierten anti-Kaninchen IgG (rot, ICP0) und Alexa-Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün, C-myc) visualisiert. Die Epifluoreszenz-Aufnahmen der ICP0 Färbung (A-D) und der Überlagerung der Färbungen (E-H) sind gezeigt.

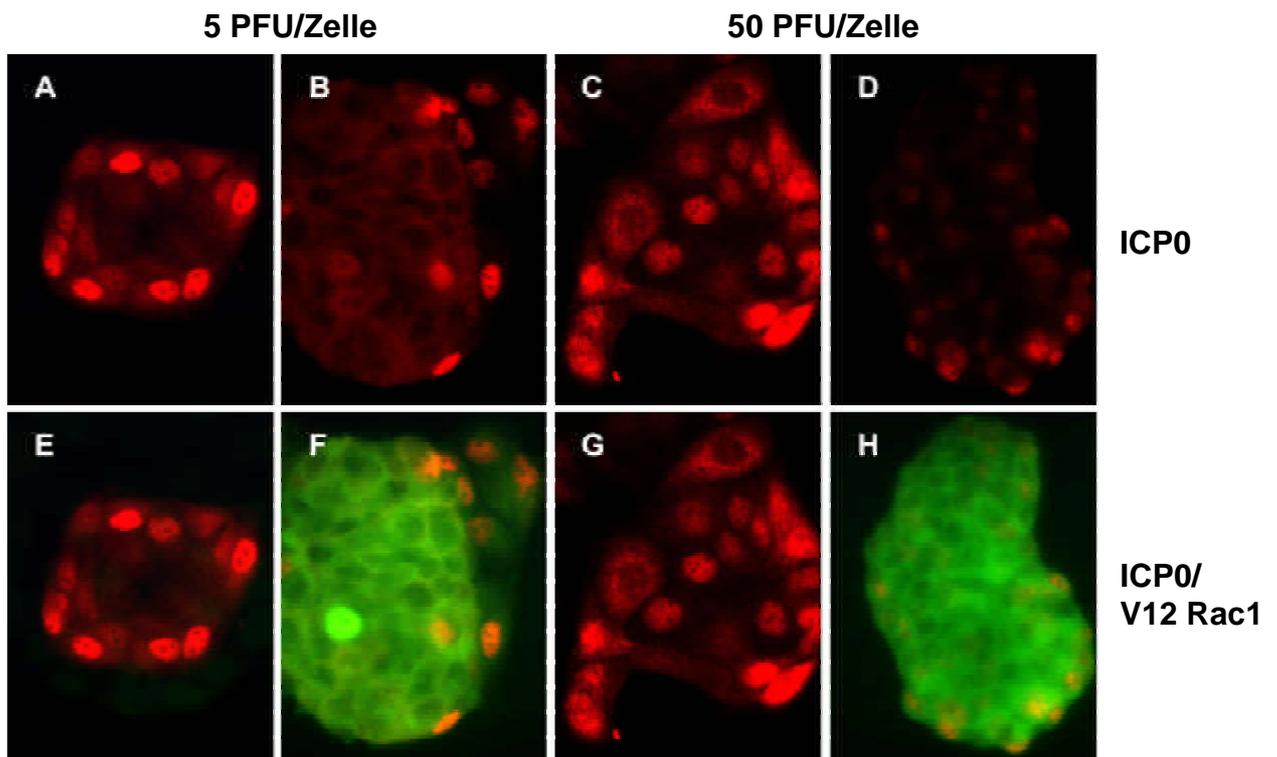


Abb. IV.33: HSV-1 Infektion von MDCKII T23 V12 Rac1 Zellen

Transgen-Expression wurde in subkonfluenten MDCKII T23 V12 Rac1 Zellen 48 h vor Infektion induziert (B, F, D, H) oder undinduzierte Zellen wurden infiziert (A, E, C, G). Die HSV-1 Infektion wurde mit einer MOI von 5 PFU/Zelle (A, B, E, F) oder von 50 PFU/Zelle (C, D, G, H) durchgeführt. 2 h p.i. wurden die Zellen fixiert. Die Zellen wurden mit anti-ICP0-Antiserum (r191) und anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gefärbt. Die Färbung wurde mit Alexa Fluor 555-konjugierten anti-Kaninchen IgG (rot, ICP0) und Alexa-Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün, C-myc) visualisiert. Die Epifluoreszenz-Aufnahmen der ICP0 Färbung (A-D) und der Überlagerung der Färbungen (E-H) sind gezeigt.

ein geringeres Ausmaß an Transgen-Expression zeigten (Abb. IV.33, B, F).

Die langzeitige Expression von V12 Rac1 kann zu zellulärer Transformation führen, die mit erhöhter Proliferation und einem unterschiedlichen Expressionsprofil zellulärer Gene verbunden ist. Um den Einfluss langzeitiger V12 Rac1 Expression auf die HSV-1 Infektion zu untersuchen wurden MDCKII T23 V12 Rac1 Zellen für 21 Tage induziert und anschließend mit HSV-1 infiziert. Färbung gegen ICP0 2 h p.i. zeigte ebenfalls eine reduzierte Anzahl infizierter Zellen im Vergleich V12 Rac1 exprimierender Zellen zu uninduzierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Dominant negative Isoformen

N17 Cdc42:

Wie im Falle der dominant positiven Konstrukte wurde auch bei MDCKII T23 N17 Cdc42 Zellen in Anwesenheit von Doxycyclin kein Transgen exprimiert und hauptsächlich Zellen der Zellperipherie von HSV-1 infiziert (Abb. IV.34, A, E, C, G). Bei Expression von N17 Cdc42 wurde die Anzahl ICP0 exprimierender Zellen unabhängig von der Virus-Dosis drastisch reduziert (Abb. IV.34, B, F, D, H).

N17 Rac1:

Wurden subkonfluente MDCKII T23 N17Rac1 Zellen in Doxycyclin-haltigem Medium kultiviert, konnte keine Expression von N17 Rac1 detektiert werden (Abb. IV.35, E, G). HSV-1 Infektion fand im Wesentlichen in den peripheren Zellen uninduzierter MDCKII T23 N17 Rac1 Zell-Inseln statt, wie durch Lokalisierung von ICP0 nachgewiesen wurde (Abb. IV.35, A, E, C, G). Nach Induktion der Expression von N17 Rac1 in subkonfluenten MDCKII T23 N17 Rac1 Zellen wurde keine signifikante Reduktion ICP0 exprimierender Zellen, weder bei niedriger noch bei hoher MOI beobachtet (Abb. IV.35, B, F, D, H).

Die Ergebnisse der Infektionsstudien von induzierten MDCKII T23 Zellen, die Isoformen der GTPasen Cdc42 und Rac1 exprimierten, sind weitgehend konform mit den Ergebnissen der Infektion von transient exprimierenden MDCKII Zellen. Eine Ausnahme bildete die dominant aktive Isoform von Cdc42, deren Expression im induzierten Experiment gegenüber den transienten Studien keine Reduktion der HSV-1 Infizierbarkeit hervorrief.

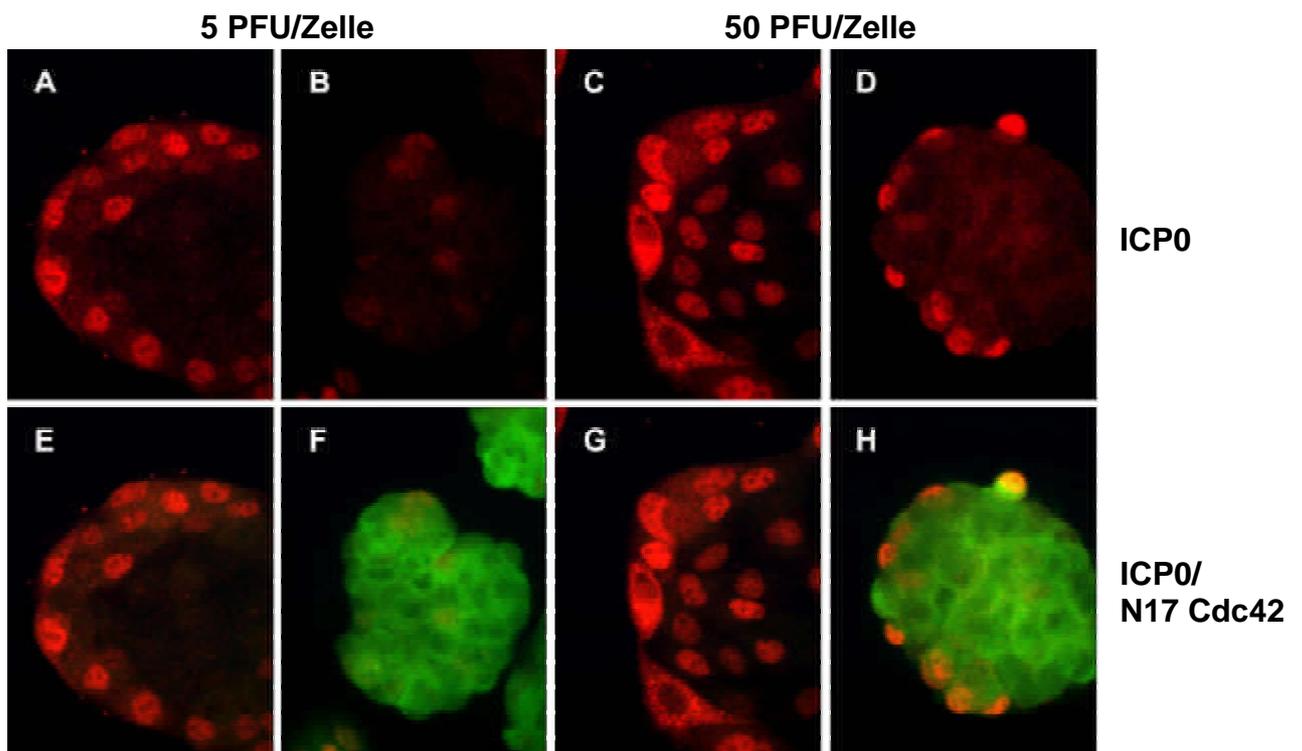


Abb. IV.34: HSV-1 Infektion von MDCKII T23 N17 Cdc42 Zellen

Transgen-Expression wurde in subkonfluenten MDCKII T23 N17 Cdc42 Zellen 48 h vor Infektion induziert (B, F, D, H) oder undinduzierte Zellen wurden infiziert (A, E, C, G). Die HSV-1 Infektion wurde mit einer MOI von 5 PFU/Zelle (A, B, E, F) oder von 50 PFU/Zelle (C, D, G, H) durchgeführt. 2 h p.i. wurden die Zellen fixiert. Die Zellen wurden mit anti-ICP0-Antiserum (r191) und anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gefärbt. Die Färbung wurde mit Alexa Fluor 555-konjugierten anti-Kaninchen IgG (rot, ICP0) und Alexa-Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün, C-myc) visualisiert. Die Epifluoreszenz-Aufnahmen der ICP0 Färbung (A-D) und der Überlagerung der Färbungen (E-H) sind gezeigt.

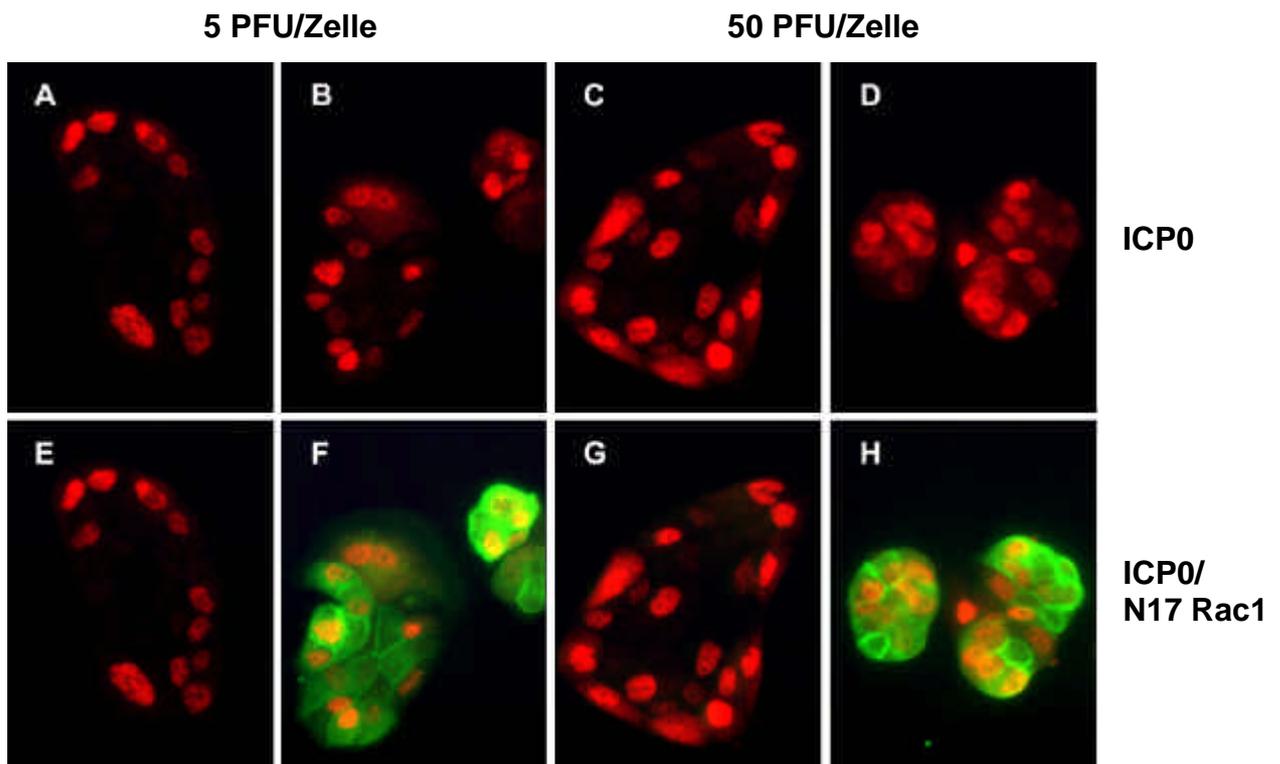


Abb. IV.35: HSV-1 Infektion von MDCKII T23 N17 Rac1 Zellen

Transgen-Expression wurde in subkonfluenten MDCKII T23 N17 Rac1 Zellen 48 h vor Infektion induziert (B, F, D, H) oder undinduzierte Zellen wurden infiziert (A, E, C, G). Die HSV-1 Infektion wurde mit einer MOI von 5 PFU/Zelle (A, B, E, F) oder von 50 PFU/Zelle (C, D, G, H) durchgeführt. 2 h p.i. wurden die Zellen fixiert. Die Zellen wurden mit anti-ICP0-Antiserum (r191) und anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gefärbt. Die Färbung wurde mit Alexa Fluor 555-konjugierten anti-Kaninchen IgG (rot, ICP0) und Alexa-Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün, C-myc) visualisiert. Die Epifluoreszenz-Aufnahmen der ICP0 Färbung (A-D) und der Überlagerung der Färbungen (E-H) sind gezeigt.

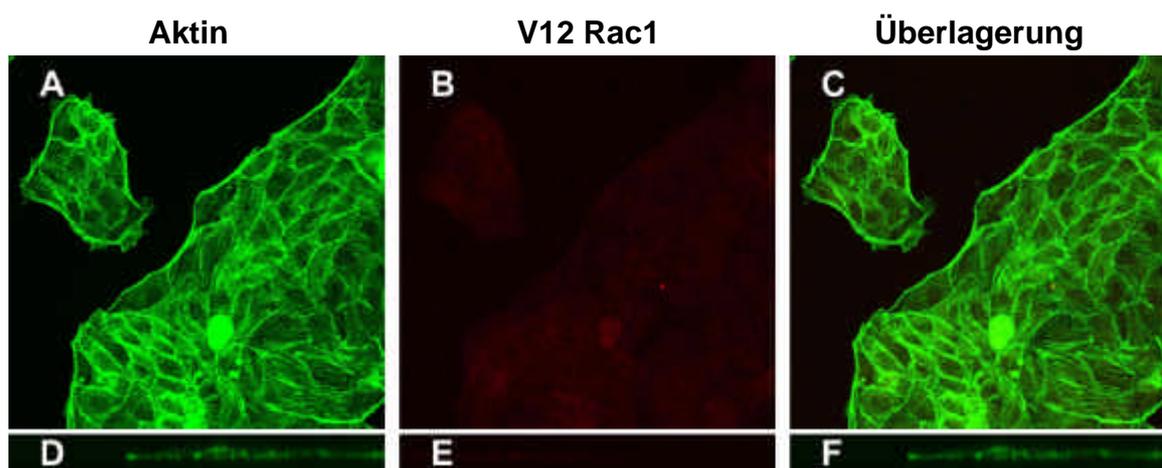


Abb. IV.36: Organisation des Aktin-Zytoskeletts von uninduzierten MDCKII T23 V12 Rac1 Zellen

Uninduzierte MDCKII T23 V12 Rac1 Zellen wurden fixiert und mit anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gefärbt. Die Färbung wurde mit Alexa Fluor 555-konjugierten anti-Maus IgG (rot) visualisiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) ko-gefärbt. Die konfokalen Projektionen der Aktin-Färbung (A), der C-myc-Färbung (B) und der Überlagerung der Färbungen (C) sind gezeigt. Zusätzlich sind konfokale Aufnahmen der lateralen Ebene der Aktin-Färbung (D), der C-myc-Färbung (E) und der Überlagerung der Färbungen (F) abgebildet.

4.4.2 Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts subkonfluenter MDCKII Zellen durch Rho-ähnliche GTPasen

Um die Funktionalität und den Effekt auf das Aktin-Zytoskelett der Rho-ähnlichen GTPasen nach der Induktion in subkonfluenten MDCKII zu untersuchen, wurden die oben verwendeten Zelllinien in Abwesenheit und Gegenwart von Doxycyclin 48 h kultiviert. Die Zellen wurden fixiert, mit einem Antikörper gegen C-myc gefärbt und mit Fluorochrom-gekoppelten Phalloidin das Aktin-Zytoskelett ko-gefärbt.

In Gegenwart von Doxycyclin wurde kein Transgen exprimiert und die Zellen bildeten Zell-Inseln unterschiedlicher Größe aus, die eine flache Zellmorphologie zeigten (Abb. IV.36, A-F). Die exemplarisch gezeigten MDCKII T23 V12 Rac1 Zellen bildeten teilweise Lamellipodia sowie Stressfibrillen aus. Entlang der Begrenzung peripherer Zellen von Zell-Inseln war ein starkes cortikales Bündel von F-Aktin zu erkennen (Abb. IV.36, A, C). Diese Darstellung ist auch für die anderen verwendeten Zelllinien in Gegenwart von Doxycyclin repräsentativ (Daten nicht gezeigt). Morphologie und Aktin-Zytoskelett von MDCKII T23 Zellen zeigten sich also konsistent mit MDCKII Zellen.

Dominant positive Isoformen

V12 Cdc42:

Wie die konfokale Analyse zeigte, lokalisierte V12 Cdc42 nach der Induktion hauptsächlich entlang der Zell-Zell-Kontakte (Abb. IV.37, E, F) und apikal in Punctae, die Microvilli repräsentierten (Abb. IV.37, H, I). Basal wurde keine Lokalisierung von V12 Cdc42 beobachtet (Abb. 37, B, C). Die Lokalisierung von V12 Cdc42 ging einher mit vermehrter Aktin-Polymerisierung entlang der Zell-Zell-Kontakte und vermehrter Mikrovilli-Bildung (Abb. IV.37, D-I). In Zellen mit V12 Cdc42 Expression wurde keine Stressfibrillen-Bildung detektiert (Abb. IV.37, A, C, D, F, G, I).

V12 Rac1:

V21 Rac1 lokalisierte ebenfalls hauptsächlich entlang der Zell-Zell-Kontakte (Abb. IV.38, B, E, H, I, K), wodurch die Ausbildung einer starken Aktin-Cortex beobachtet wurde (Abb. IV.38, A, C, D, F, G, H, I, J, L). Interessanterweise wurde in Zellen mit V12 Rac1 Lokalisierung im Gegensatz zur transienten Expression keine Bildung von

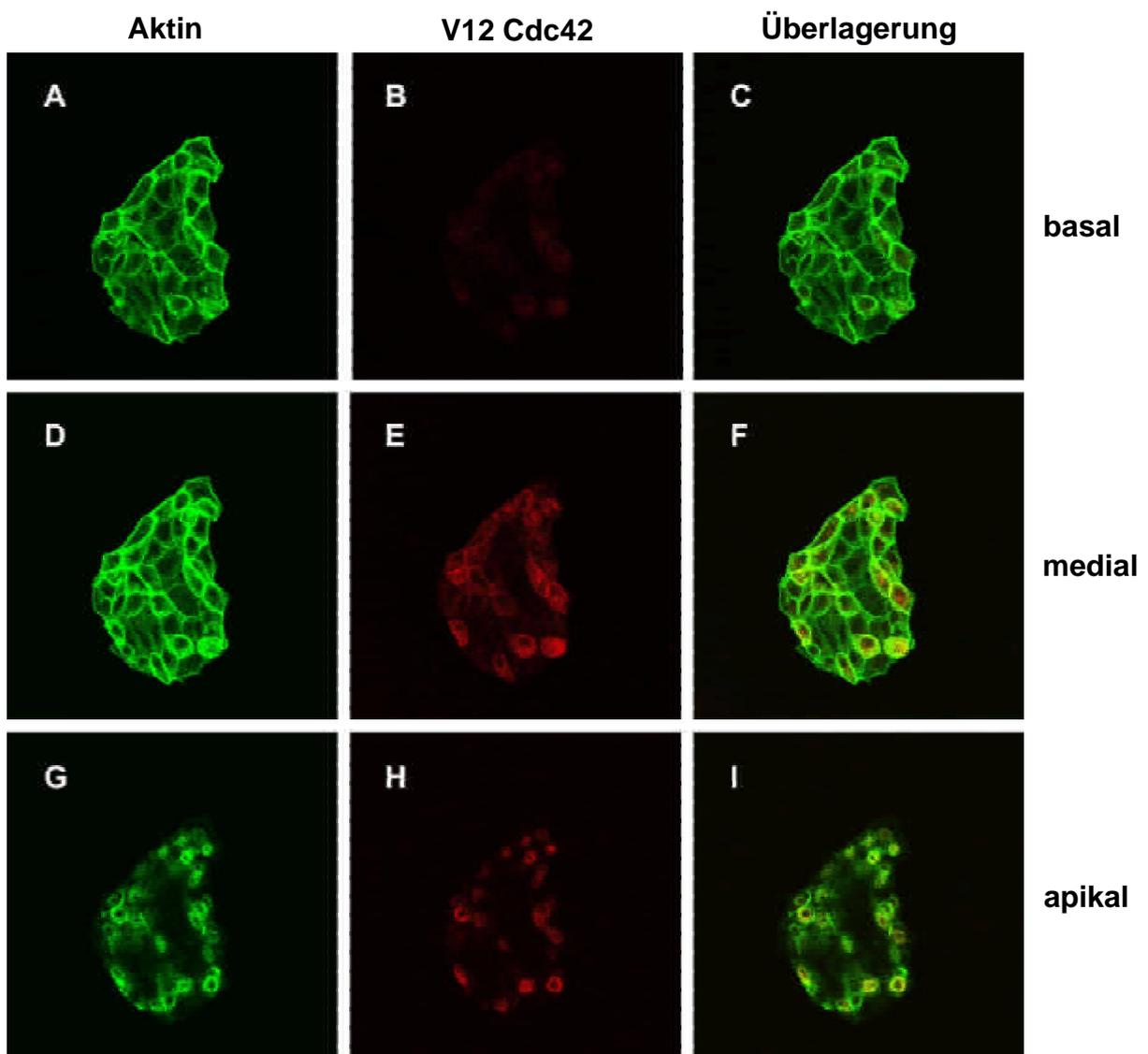


Abb. IV.37: Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts nach Induktion von MDCKII T23 V12 Cdc42 Zellen

Die Transgen-Expression in MDCKII T23 V12 Cdc42 Zellen wurde 48 h lang induziert und anschliessend wurden die Zellen fixiert. V12 Cdc42 wurde mit anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gefärbt. Die Färbung wurde mit Alexa Fluor 555-konjugierten anti-Maus IgG (rot) visualisiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) ko-gefärbt. Die konfokalen Aufnahmen der Aktin-Färbung (A, D, G), der C-myc-Färbung (B, E, H) und der Überlagerung der Färbungen (C, F, I) sind gezeigt. Die konfokalen Aufnahmen der basalen Ebene (A-C), der medialen Ebene (D-F) und der apikalen Ebene (G-I) sind abgebildet.

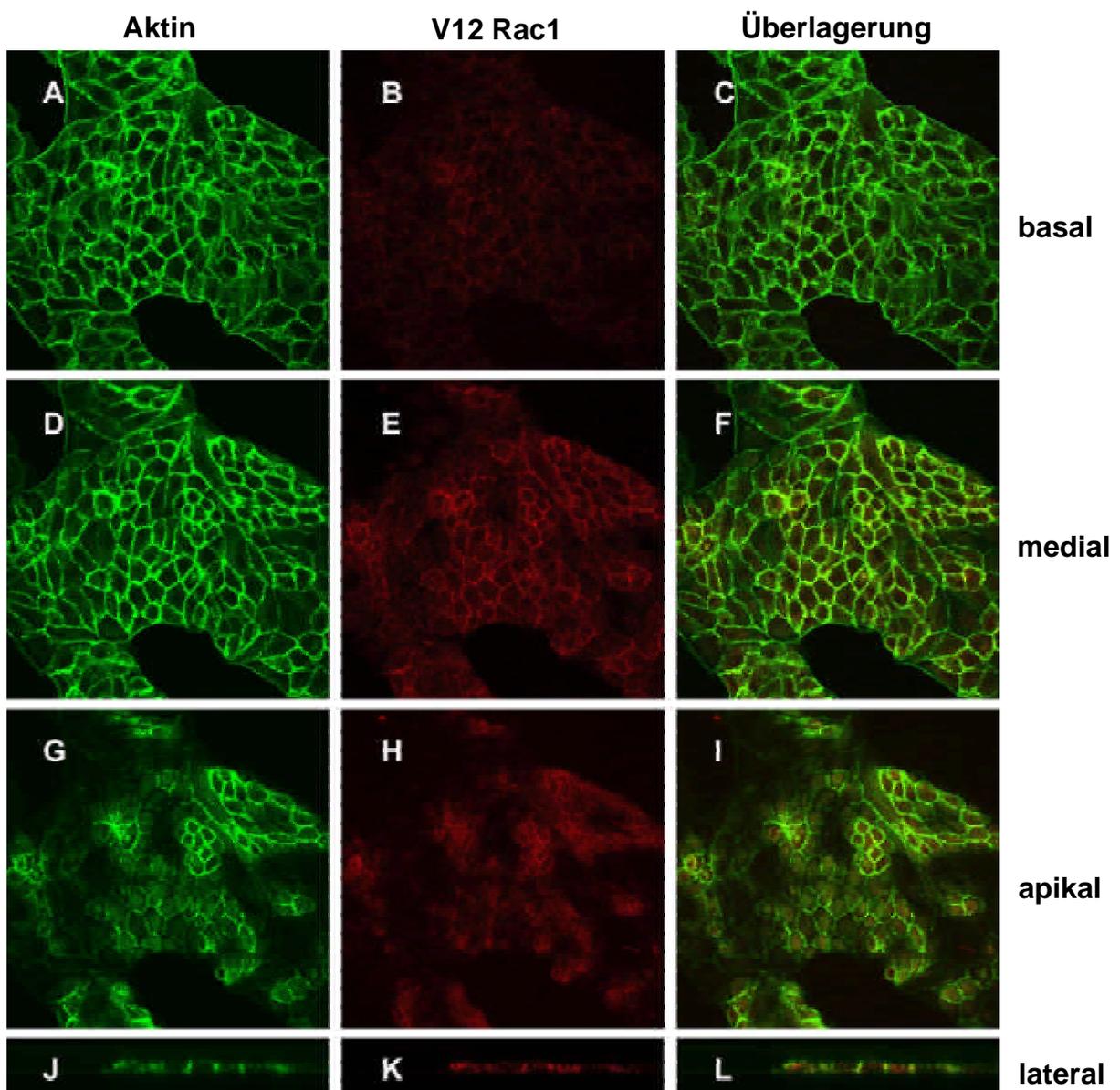


Abb. IV.38: Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts nach Induktion von MDCKII T23 V12 Rac1 Zellen

Die Transgen-Expression in MDCKII T23 V12 Rac1 Zellen wurde 48 lang induziert und anschliessend wurden die Zellen fixiert. V12 Rac1 wurde mit anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gefärbt. Die Färbung wurde mit Alexa Fluor 555-konjugierten anti-Maus IgG (rot) visualisiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) ko-gefärbt. Die konfokalen Aufnahmen der Aktin-Färbung (A, D, G, J), der C-myc-Färbung (B, E, H, K) und der Überlagerung der Färbungen (C, F, I, L) sind gezeigt. Die konfokalen Aufnahmen der basalen Ebene (A-C), der medialen Ebene (D-F), der apikalen Ebene (G-I) und der lateralen Ebene (J-L) sind abgebildet.

Stressfibrillen beobachtet (Abb. IV.38, A, C). Es wurde keine Bildung zusätzlicher Mikrovilli im Vergleich zu uninduzierten Zellen wie im Falle von V12 Cdc42 detektiert (Abb. IV.38, G, I).

Dominant negative Isoformen

N17 Cdc42:

Die Zellmorphologie N17 Cdc42 exprimierender Zellen erschien kompakter und in ihrer Höhe stärker ausgeprägt als bei Gegenwart von Doxycyclin (Abb. IV.39, J-L). Während N17 Cdc42 zum Teil diffus im Zytoplasma und zum Teil assoziiert mit den Zell-Zell-Kontakten lokalisierte (Abb. IV.39, B, E, H, K), wurde die Ausbildung vieler Stressfibrillen (Abb. IV.39, A, C), einer starken Aktin-Cortex (Abb. IV.39, D, F) und zahlreicher Microvilli beobachtet (Abb. IV.39, G, I).

N17 Rac1:

Die Zell-Inseln, die bei der Expression von N17 Rac1 ausgebildet wurden, waren in der Regel klein und bestanden aus wenig Zellen (Abb. IV.40, A-I). N17 Rac1 lokalisierte hauptsächlich diffus im Zytoplasma (Abb. IV.40, B, E, H). Dabei konnte keine Stressfibrillen-Bildung beobachtet werden (Abb. IV.40, A, C). Die Ausbildung der Aktin-Cortex und Microvilli war nicht dominant beeinflusst (Abb. IV.40, D, F, G, I).

Induziertes Transgen	Effekt auf das Aktin-Zytoskelett	Abbildung
uninduziert in Gegenwart von Doxycyclin	flache Zellmorphologie, wenig Lamellipodia, Stressfibrillen, Microvilli	Abb. IV.36
V12 Cdc42	Ausbildung einer stärkeren Aktin-Cortex entlang von Zell-Zell-Kontakten, zahlreiche Microvilli, keine Stressfibrillen	Abb. IV.37
V12 Rac1	Ausbildung einer starken Aktin-Cortex entlang von Zell-Zell-Kontakten, wenig Microvilli, keine Stressfibrillen	Abb. IV.38
N17 Cdc42	kompakte Zellmorphologie, Ausbildung einer stärkeren Aktin-Cortex entlang von Zell-Zell-Kontakten, zahlreiches Microvilli, viele Stressfibrillen	Abb. IV.39
N17 Rac1	kompakte Zellmorphologie, kleine Zell-Inseln, keine Stressfibrillen	Abb. IV.40

Tabelle IV.5: Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts subkonfluenter MDCKII Zellen durch Rho-GTPasen

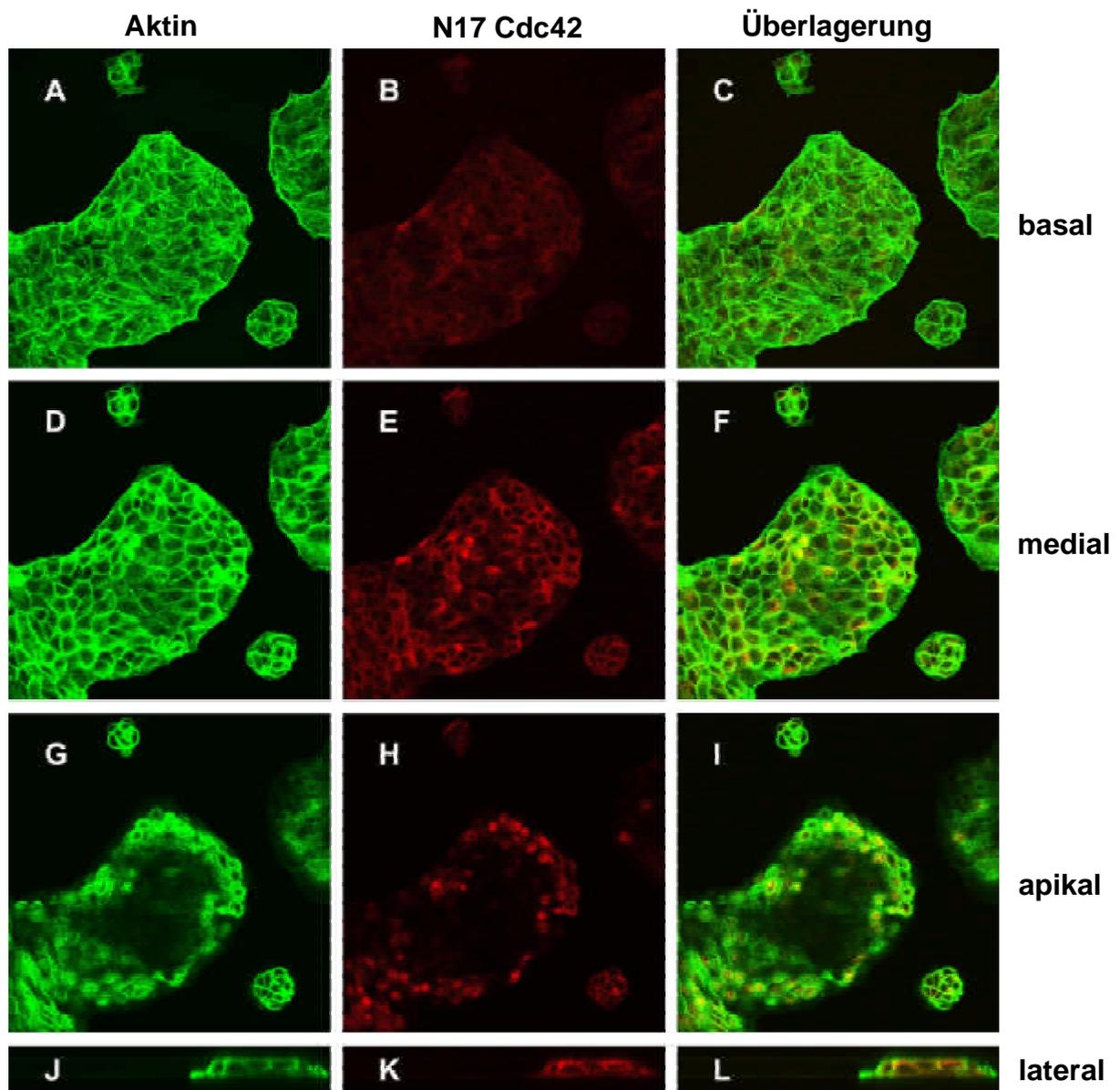


Abb. IV.39: Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts nach Induktion von MDCKII T23 N17 Cdc42 Zellen

Die Transgen-Expression in MDCKII T23 N17 Cdc42 Zellen wurde 48 lang induziert und anschliessend wurden die Zellen fixiert. N17 Cdc42 wurde mit anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gefärbt. Die Färbung wurde mit Alexa Fluor 555-konjugierten anti-Maus IgG (rot) visualisiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) ko-gefärbt. Die konfokalen Aufnahmen der Aktin-Färbung (A, D, G, J), der C-myc-Färbung (B, E, H, K) und der Überlagerung der Färbungen (C, F, I, L) sind gezeigt. Die konfokalen Aufnahmen der basalen Ebene (A-C), der medialen Ebene (D-F), der apikalen Ebene (G-I) und der lateralen Ebene (J-L) sind abgebildet.

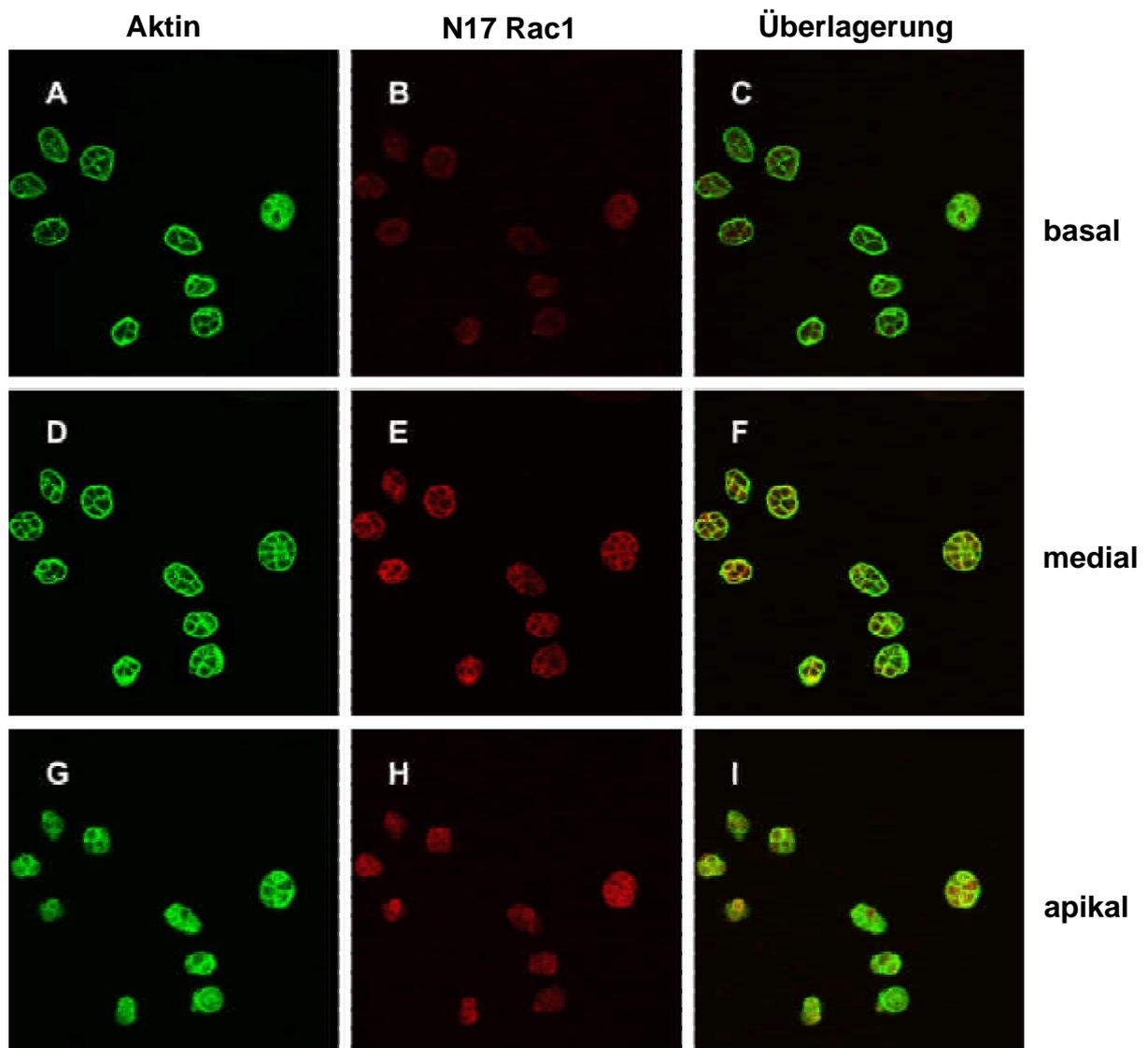


Abb. IV.40: Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts nach Induktion von MDCKII T23 N17 Rac1 Zellen

Die Transgen-Expression in MDCKII T23 N17 Rac1 Zellen wurde 48 lang induziert und anschliessend wurden die Zellen fixiert. N17 Rac1 wurde mit anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gefärbt. Die Färbung wurde mit Alexa Fluor 555-konjugierten anti-Maus IgG (rot) visualisiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin (grün) ko-gefärbt. Die konfokalen Aufnahmen der Aktin-Färbung (A, D, G, J), der C-myc-Färbung (B, E, H, K) und der Überlagerung der Färbungen (C, F, I, L) sind gezeigt. Die konfokalen Aufnahmen der basalen Ebene (A-C), der medialen Ebene (D-F) und der apikalen Ebene (G-I) sind abgebildet.

Die beobachteten Veränderungen im Aktin-Zytoskelett stimmen mit den bereits beschriebenen Rollen für Cdc42 und Rac1 in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts überein: Beide regulieren die cortikale Aktin-Polymerisierung, und während Cdc42 zusätzlich die Zellpolarität und die Extensions-Bildung reguliert, dominiert Rac1 die Zell-Zell-Kontakt Ausbildung und die Lamellipodia Formation (zur Übersicht Hall, 1998, Jou *et al.*, 1998a). Interessanterweise schienen auch hier dominant aktives und inaktives Cdc42 ähnliche Effekte auf das Aktin-Zytoskelett von MDCKII Zellen zu haben und zwar unabhängig davon, ob MDCKII Zellen die Transgene transient in vereinzelt Zellen oder induziert in eher epithelialen Zellverbänden exprimierten. Bemerkenswert war auch der Unterschied der Stressfibrillen Ausbildung durch dominant aktive Cdc42 und Rac1 Isoformen im Vergleich der transienten und induzierten Experimente. Während transient starke Stressfibrillen ausgebildet wurden, fehlten diese völlig im induzierten Experiment. Dies lässt auf eine unterschiedliche Kaskadenaktivierung der Rho-ähnlichen GTPasen in den beiden experimentellen Systemen schließen. Während RhoA in transienten Expressionstudien vermutlich aktiviert wurde, scheint eine Aktivierung von RhoA nach Induktion dieser GTPasen nicht zu erfolgen.

Die Induktion einer Transgen-Expression von dominant inaktivem Cdc42 und dominant aktivem Rac1 führte in subkonfluenten MDCKII Zellen zu einer Reduktion der Infizierbarkeit mit HSV-1, wie dies auch in Infektionsstudien von MDCKII Zellen beobachtet wurde, die diese Isoformen transient exprimierten. Dominant aktives Cdc42 zeigte hingegen in Induktions-Studien keinen Einfluss auf die Infizierbarkeit von MDCKII Zellen mit HSV-1. Die Ausprägung charakteristischer Strukturen des Aktin-Zytoskeletts zeigte, dass die exprimierten Isoformen aktiv waren. Darüber hinaus legten die Veränderungen der Aktin-Dynamik nach Induktion nahe, dass im Vergleich zur transienten Expression unterschiedliche Aktivierungskaskaden der Rho GTPasen auftraten.

4.5 Einfluss von Effektoren der Cdc42/Rac1 Signaltransduktionswege auf die HSV-1 Infektion

Die Signaltransduktion von Cdc42 und Rac1 hat einen potentiellen Einfluss auf den Eintritt von HSV-1. Eine potentielle Beeinflussung der Penetration des HSV-1 Kapsids durch die Aktin-Cortex ist zu vermuten. Untersuchungen zum Einfluss von Effektoren der Cdc42/Rac1 Signaltransduktionswege auf die HSV-1 Infektion könnte das Verständnis verbessern, welche zellulären Prozesse der Cdc42/Rac1 Signaltransduktion tatsächlich die Infizierbarkeit von MDCKII Zellen mit HSV-1 beeinflussen. Dazu wurden im Folgenden Experimente unternommen, die den Einfluss bekannter Effektoren von Cdc42 und Rac1 in transienter Expression auf den HSV-1 Eintritt untersuchen.

4.5.1 Einfluss der Rac1-Effektorenbindung auf die HSV-1 Infektion

Ein erster Schritt und experimenteller Ansatz zur Untersuchung beteiligter Signaltransduktionswege ist die Feststellung der Effektorenbindungsstelle von Rac1 oder Cdc42. Effektoren binden diese Rho-ähnlichen GTPasen häufig über die PAK-Binde-Domäne (PBD) (Lamarche *et al.*, 1996). Zur Untersuchung der Regulation von Aktin-beeinflussenden Prozessen wurden hierzu in Fibroblasten doppelt mutierte Isoformen von Rac1 verwendet. Diese tragen die L61 Mutation, die Rac1 konstitutiv aktiv verändert, und zusätzlich entweder eine A37 oder C40 Mutation. Dabei zeigt L61 Rac1 C40 keine Bindung zu und Aktivierung von Effektoren mit PBD; L61 Rac1 A37 kann Rho-Kinase (auch ROCK, engl. rho coiled-coiled motif containing kinase) nicht aktivieren, bindet und aktiviert aber Effektoren mit PBD (Lamarche *et al.*, 1996). In Infektionsstudien wurden diese beiden Isoformen transient in MDCKII Zellen exprimiert, anschließend mit HSV-1 infiziert und 2 h p.i. mit einem Antikörper gegen ICP0 und mit einem anti-c-myc-Antikörper gegen die Transgene gefärbt. Die Anzahl infizierter Zellen pro Transgen-exprimierender Zellen wurde gezählt und als Mittelwert der durchgeführten Experimente in Prozent angegeben (Abb. IV.41). Wurde GFP als Kontrolle exprimiert, zeigten durchschnittlich 82 % aller GFP-exprimierenden Zellen ICP0 Expression (Abb. IV.41, 1.Balken). Eine deutliche

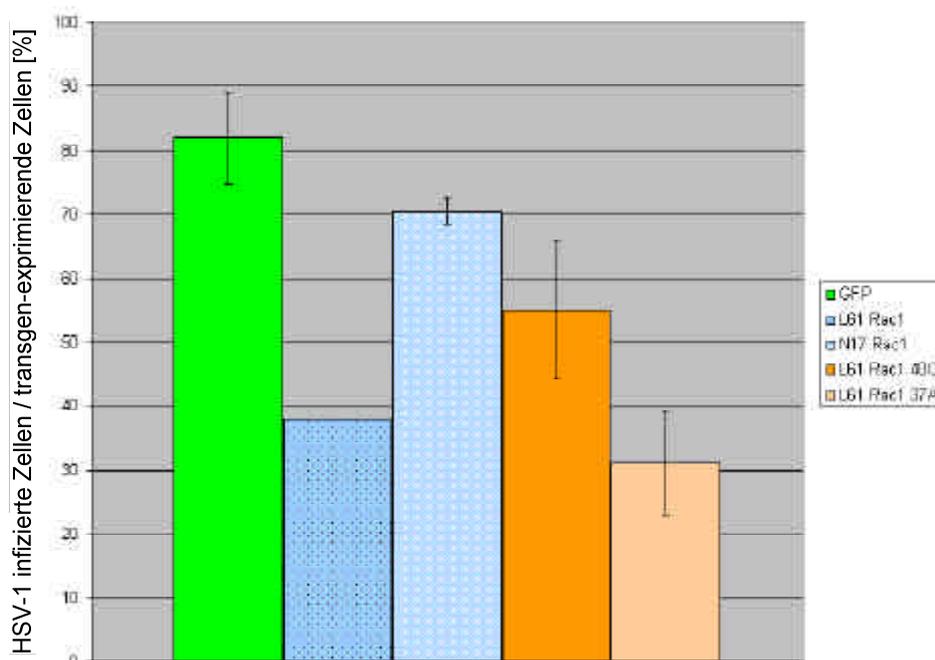


Abb. IV.41: Einfluss Rac1-Effektorenbindung auf die HSV-1 Infektion

MDCKII Zellen wurden mit verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert und 6 h nach Transfektion mit HSV-1 (50 PFU/Zelle) infiziert. 2 h p.i. wurden die Zellen fixiert und mit anti-ICP0-Antiserum (r191) und anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gegen das Transgen gefärbt. Die Anzahl ICP0-exprimierender (infizierter) Zellen pro Transgen-exprimierender Zellen wurde bestimmt und als Durchschnitt von zwei oder drei unabhängigen Experimenten in Prozent für das jeweilige Transgen angegeben (Y-Achse). Die Standardabweichung der Experimente ist als Fehlerbalken angegeben. Die Daten der einzelnen Experimente sind im Anhang angefügt. Die exprimierten Transgene sind rechts angegeben.

Reduktion der Anzahl ICP0 exprimierender Zellen wurde beobachtet, wenn L61 Rac1 anstatt von GFP exprimiert wurde (Abb. IV.41, 2. Balken). Expression von N17 Rac1 beeinflusste die Anzahl infizierter Zellen nicht signifikant (Abb. IV.41, 3. Balken). Wurde L61 Rac1 C40 in MDCKII Zellen vor der Infektion exprimiert war nur eine leichte Reduktion infizierter Zellen auf 55 % erkennbar (Abb. IV.41, 4. Balken). L61 Rac1 A37 zeigte eine vergleichbare Inhibierung der Infektion zu L61 Rac1 (Abb. IV.41, 2. und 5. Balken). Da Effektoren L61 Rac1 A37 über ihre PBD binden können, aber ROCK nicht binden kann, scheint ein Einfluss von ROCK auf die HSV-1 Infektion unwahrscheinlich. Die Expression von L61 Rac1 C40 zeigte hingegen im Vergleich zu L61 Rac1 keinen so starken inhibitorischen Einfluss auf den HSV-1 Eintritt. Da Effektoren mit PBD L61 Rac1 C40 nicht binden und nicht aktiviert werden können, ist eine Beteiligung von Effektoren mit PBD an der Vermittlung der Rac1 Signaltransduktion wahrscheinlich, die zur Inhibierung der HSV-1 Infizierbarkeit führte.

Um einen Vergleich zu den dominanten GTPase Isoformen in ihrem Effekt auf das Aktin-Zytoskelett zu erzielen, wurden MDCKII Zellen, die transient die verwendeten doppelmutierten Isoformen exprimierten, fixiert und mit einem anti-c-myc-Antikörper gegen Transgen-Expression gefärbt. Zusätzlich wurde F-Aktin mit Fluorochromgekoppeltem Phalloidin ko-gefärbt.

L61 Rac1 A37:

L61 Rac1 A37 exprimierende Zellen zeigten entweder die Ausbildung von Filopodia und zum Teil von Stressfibrillen bei stark abgeflachter, ausgespreizter Zellmorphologie (Abb. IV.42, A, B) oder die Ausbildung von Filopodia und eines starken kortikalen Aktin-Signals entlang der Zell-Zell-Kontakte (Abb. IV.42, A, B). Die Expression dieser Isoform erzeugte einen ähnlichen Effekt auf das Aktin-Zytoskelett wie die Expression von L61 Rac1 (zum Vgl. Abb. IV.42, E, F).

L61 Rac1 C40:

Die Expression von L61 Rac1 C40 führte zu Zellen mit abgerundeter Zellmorphologie, die keine Zellspreizung zeigten (Abb. IV.42, C, D).

L61 Rac1 A37 exprimierende Zellen zeigten einen zu L61 Rac1 vergleichbaren Effekt auf das Aktin-Zytoskelett, während L61 Rac1 C40 Defizite in der Zellspreizung

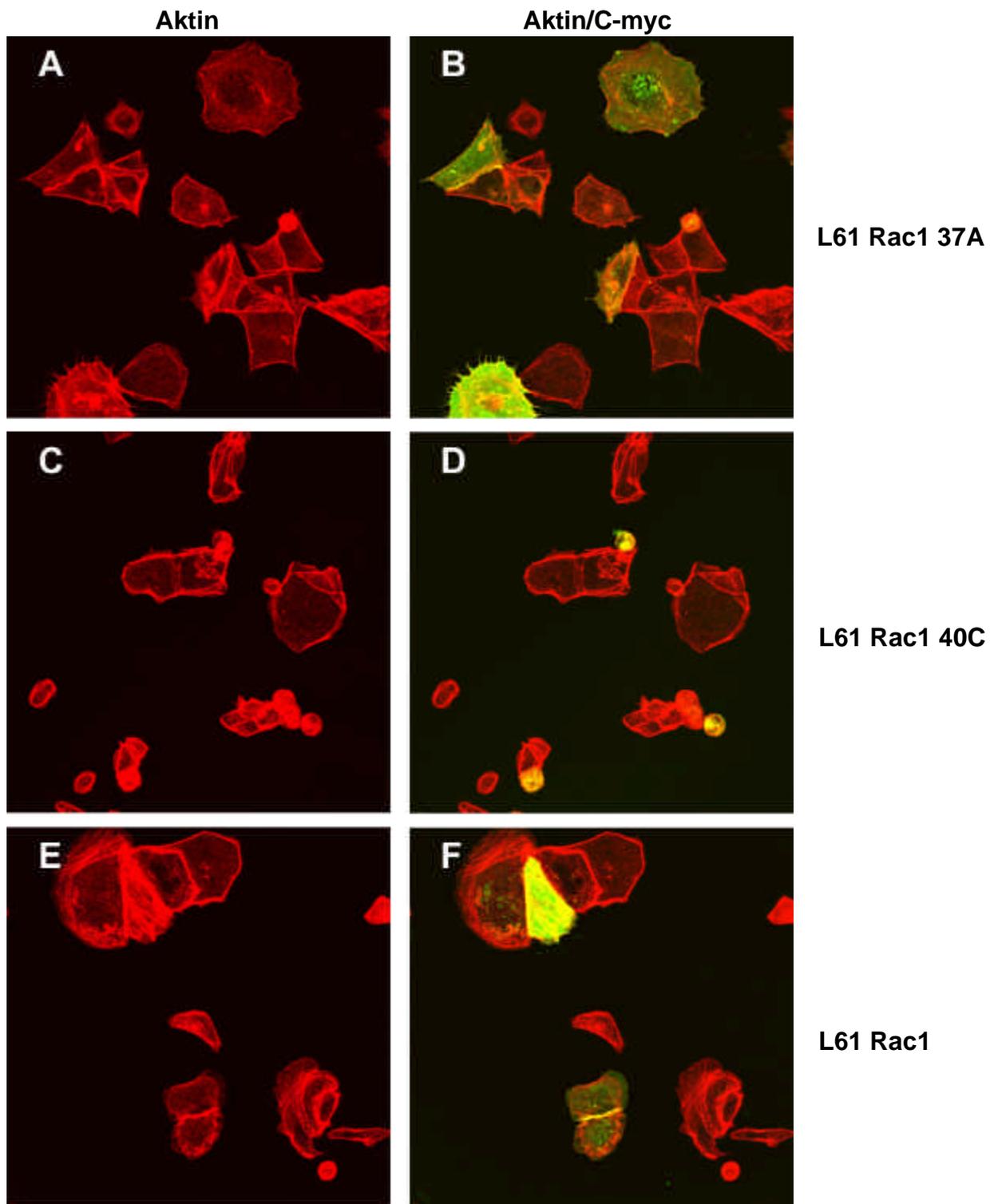


Abb. IV.42: Einfluss transienter Expression von Rac1 Isoformen auf das Aktin-Zytoskelett

MDCKII Zellen wurden mit den angegebenen GTPase-Expressionsplasmiden transfiziert und 6 h nach Transfektion fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch TRITC-konjugiertes Phalloidin visualisiert (rot). Die Zellen wurden mit anti-C-myc-Antikörpern (9E10) und mit Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün) gegen die GTPase Isoformen gefärbt. Die Projektion konfokaler Aufnahmen ist abgebildet. Die Aktin-Färbung (A, C, E) sowie die Überlagerung der Färbung (B, D, F) sind gezeigt. Die Transgenexpression von L61 Rac1 37A (A, B), L61 Rac1 40C (C, D) und L61 Rac1 (E, F) ist abgebildet.

zeigten. Diese Veränderungen werden ebenfalls in Fibroblasten beobachtet und deuten auf eine ähnliche Funktionalität der Doppelmutanten auch in MDCKII Zellen hin (Lamarche *et al.*, 1996).

4.5.2 Einfluss von PAK-1 auf die HSV-1 Infektion

Eine Reihe von Effektoren binden aktiviertes Rac1 und Cdc42 über die PBD, darunter die p21-aktivierten Kinasen (PAK). Dieser Prozess ist besonders gut untersucht für PAK-1, einem der sechs Mitglieder der humanen PAK Familie. Bei Bindung erfolgt eine Konformationsänderung von PAK, die zu Autophosphorylierung führt und zur folgenden Aktivierung von PAK-1 Effektoren führt (Manser *et al.*, 1997). Die dominant aktive Isoform von PAK-1 (L107F) zeigt bei Expression in HeLa Zellen und Fibroblasten einen phänotypisch ähnlichen Effekt auf das Aktin-Zytoskelett zu aktivierten Cdc42 und Rac1 GTPasen (Manser *et al.*, 1997). Um eine Beteiligung von PAK-1 an der Signaltransduktion von Cdc42 und Rac1, die den HSV-1 Eintritt beeinflusst, zu untersuchen, wurden dominante und Wildtyp-Isoformen von PAK-1 im Vergleich zu Rac1 Isoformen transient in MDCKII Zellen exprimiert, die nachfolgend infiziert wurden. Der Nachweis von HSV-1 Eintritt erfolgte durch Färbung gegen ICP0. Die Anzahl infizierter Zellen pro Transgen exprimierender Zellen wurde als Mittelwert der durchgeführten Experimente in Prozent angegeben.

In Kontrollexperimenten zeigten GFP bzw. N17 Rac1 exprimierende Zellen zu 67 % bzw. 75% ICP0 Expression; bei Expression von L61 Rac1 wurden nur noch 20 % der Transgen-exprimierenden Zellen infiziert (Abb. IV.43, 1.-3. Balken). Weder Expression von L107F PAK-1 (dominant aktiv), K299R PAK-1 (dominant negativ) noch der Wildtyp Isoform von PAK-1 führten zu einer signifikanten Reduktion der HSV-1 Infizierbarkeit (Abb. IV.43, 4-6. Balken). Die transiente Expression der PAK Isoformen ergab daher keinen Hinweis auf eine Beteiligung von PAK an dem durch Cdc42/Rac1 ausgelösten inhibitorischen Effekt auf die HSV-1 Infizierbarkeit.

Es konnten keine signifikanten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts durch transiente Expression von L107F PAK-1, K299R PAK-1 oder der Wildtyp-Isoform in MDCKII Zellen beobachtet werden (Abb. IV.44, A-F). Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Implikation von PAK-1 in Aktin-dynamischen Prozessen von

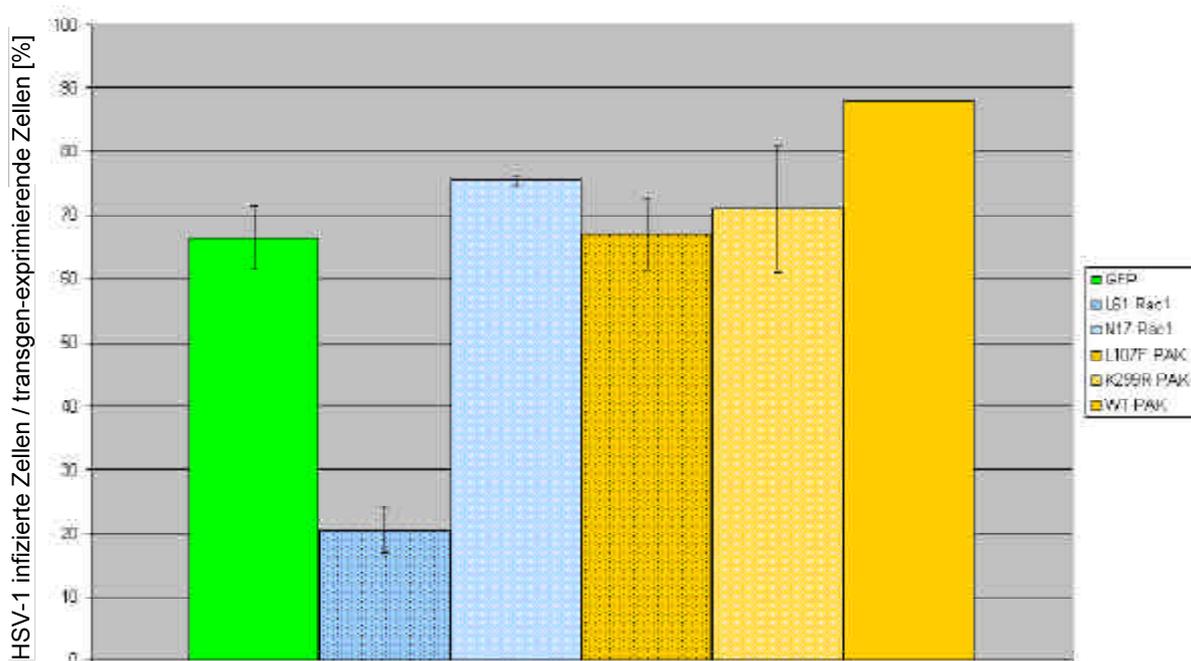


Abb. IV.43: Einfluss von PAK-1 auf die HSV-1 Infektion

MDCKII Zellen wurden mit verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert und 6 h nach Transfektion mit HSV-1 (50 PFU/Zelle) infiziert. 2 h p.i. wurden die Zellen fixiert und mit anti-ICP0-Antiserum (r191) und anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gegen das Transgen gefärbt. Die Anzahl ICP0-exprimierender (infizierter) Zellen pro Transgen-exprimierender Zellen wurde bestimmt und als Durchschnitt von zwei unabhängigen Experimenten in Prozent für das jeweilige Transgen angegeben (Y-Achse). Die Standardabweichung der Experimente ist als Fehlerbalken angegeben. Die Daten der einzelnen Experimente sind im Anhang angefügt. Die exprimierten Transgene sind rechts angegeben.

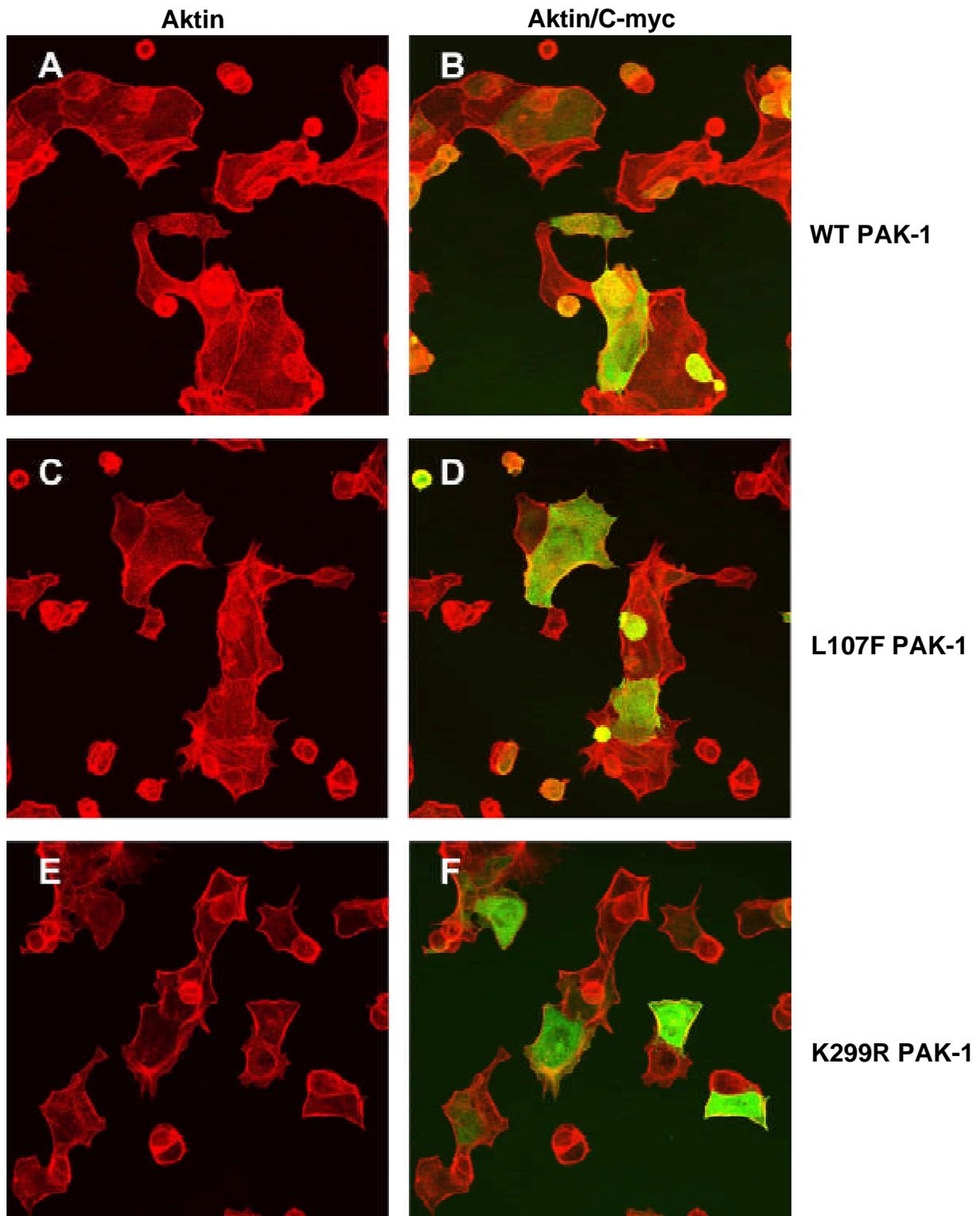


Abb. IV.44: Einfluss transienter Expression von PAK-1 Isoformen auf das Aktin-Zytoskelett
 MDCKII Zellen wurden mit den angegebenen PAK-1-Expressionsplasmiden transfiziert und 6 h nach Transfektion fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch TRITC-konjugiertes Phalloidin visualisiert (rot). Die Zellen wurden mit anti-C-myc-Antikörpern (9E10) und mit Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün) gegen die PAK-1 Isoformen gefärbt. Die Projektion konfokaler Aufnahmen ist abgebildet. Die Aktin-Färbung (A, C, E) sowie die Überlagerung der Färbung (B, D, F) sind gezeigt. Die Transgen-Expression von WT PAK-1 (A, B), L107F PAK-1 (C, D) und K299R PAK-1 (E, F) ist abgebildet.

MDCKII Zellen, wie dies auch in einer neueren Studie nahegelegt wird (Zegers *et al.*, 2003)

4.5.3 Einfluss von N-WASP auf die HSV-1 Infektion

Ein Effektor von Cdc42 ist das neuronale Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein (N-WASP), das Aktin-Polymerisierung über den Arp2/3-Komplex als Aktivator beeinflusst (zur Übersicht Carlier *et al.*, 2003). Um die Aktivierung von N-WASP und anderen Effektoren zu inhibieren, die Cdc42 über die PBD binden, kann die Bindedomäne von N-WASP überexprimiert werden, die kompetitiv aktiviertes Cdc42 bindet und dadurch einen dominant negativen Effekt auf die Cdc42 Signaltransduktion ausübt.

In MDCKII Zellen wurde dementsprechend das N-WASP Fragment (AA 201-321) transient überexprimiert, mit HSV-1 infiziert und der Viruseintritt durch Färbung von ICP0 2 h p.i. sichtbar gemacht. Die Anzahl infizierter Zellen pro Transgen exprimierender Zellen wurde als Mittelwert der durchgeführten Experimente in Prozent dargestellt.

Wie in früheren Experimenten reduzierte die Expression von L61 Rac1 und L61 Cdc42 die Anzahl infizierter Zellen im Vergleich zu N19 RhoA deutlich (Abb. IV.45, 1.-3. Balken). Die Expression des N-WASP Fragmentes zeigte hingegen keinen Einfluss auf die HSV-1 Infektion, wie der Vergleich mit N19 RhoA zeigte (Abb. IV.45, 3. und 4. Balken). Da die Blockierung der Bindestelle von N-WASP keinen Einfluss auf den HSV-1 Eintritt zeigte, scheint N-WASP nicht an der Inhibition der Infektion beteiligt zu sein. Obwohl N-WASP Fragment Überexpression einen dominant negativen Effekt auf die Cdc42 Signaltransduktion ausüben sollte, zeigte sich interessanterweise kein Effekt auf die Infektion. In Infektionsstudien in Zellen, die dominant-inaktives Cdc42 exprimierten, wurde hingegen ein inhibitorischer Effekt auf die HSV-1 Infizierbarkeit beobachtet.

Die transiente Expression des N-WASP Fragmentes (AA 201-321) zeigte keine signifikanten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts im Vergleich zu GFP exprimierenden Zellen (Abb. IV.46, A, B). N17 Cdc42 im Vergleich hierzu zeigte dominante Effekte wie die Ausbildung von Filopodia und Stressfibrillen (Abb. IV.46,

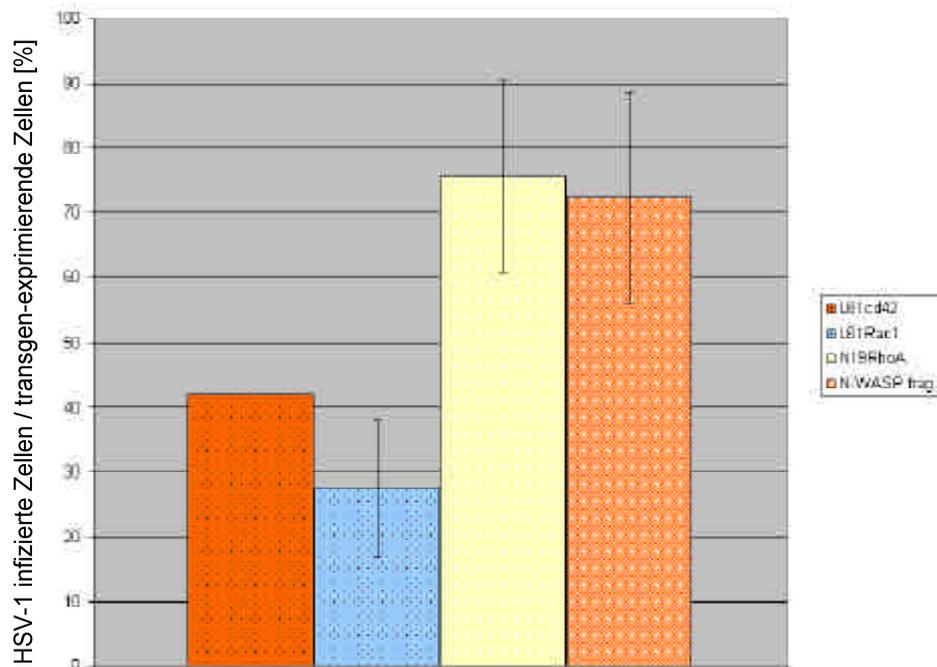


Abb. IV.45: Einfluss der Cdc42 Effektoren Bindung auf die HSV-1 Infektion

MDCKII Zellen wurden mit verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert und 6 h nach Transfektion mit HSV-1 (50 PFU/Zelle) infiziert. 2 h p.i. wurden die Zellen fixiert und mit anti-ICP0-Antiserum (r191) und anti-C-myc-Antikörpern (9E10) gegen das Transgen gefärbt. Die Anzahl ICP0-exprimierender (infizierter) Zellen pro Transgen-exprimierender Zellen wurde bestimmt und als Durchschnitt von bis zu drei unabhängigen Experimenten in Prozent für das jeweilige Transgen angegeben (Y-Achse). Die Standardabweichung der Experimente ist als Fehlerbalken angegeben. Die Daten der einzelnen Experimente sind im Anhang angefügt. Die exprimierten Transgene sind rechts angegeben.

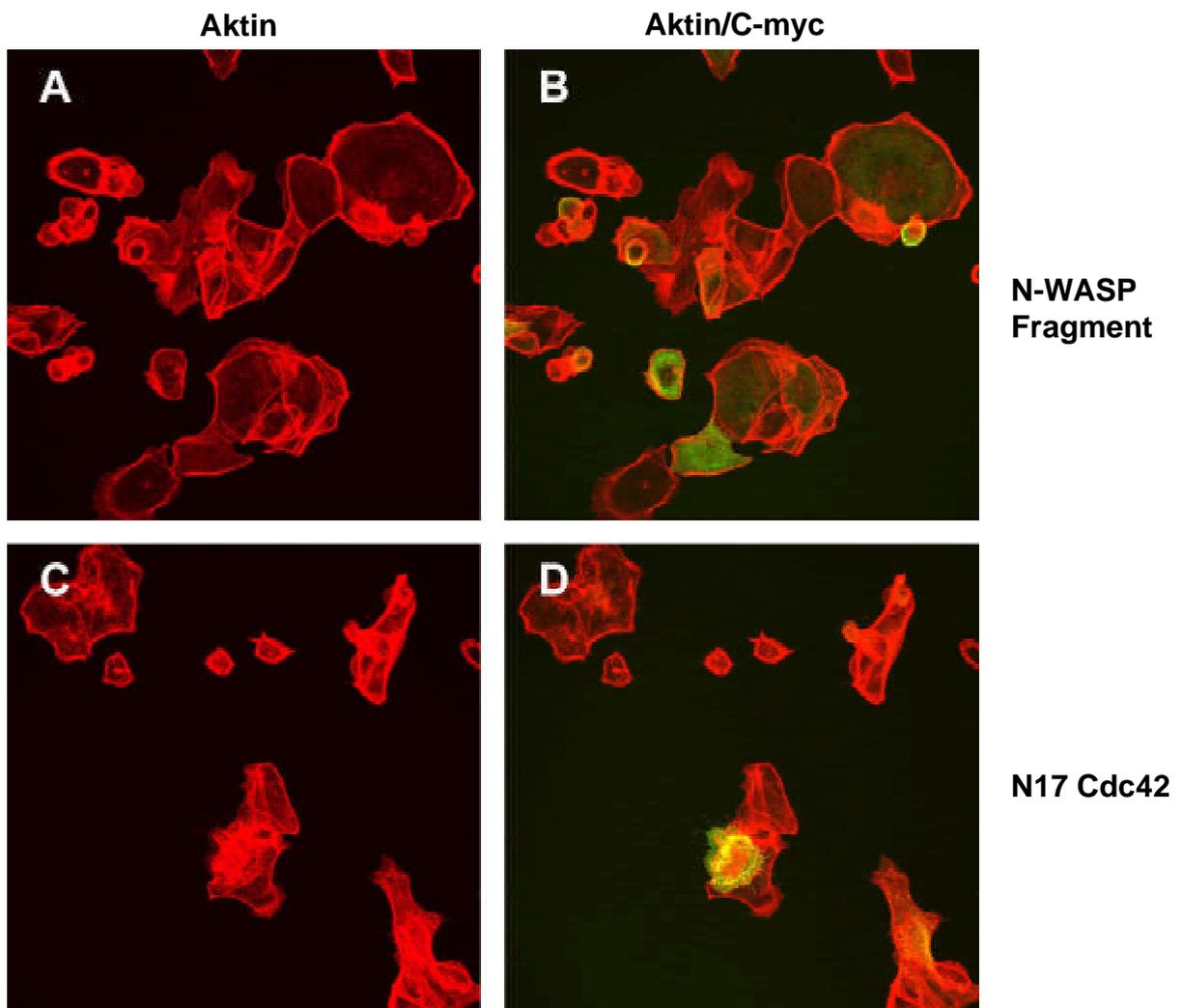


Abb. IV.46: Einfluss transienter Expression des N-WASP Fragmentes (AA 201-321) auf das Aktin-Zytoskelett

MDCKII Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und 6 h nach Transfektion fixiert. Das Aktin-Zytoskelett wurde durch TRITC-konjugiertes Phalloidin visualisiert (rot). Die Zellen wurden mit anti-C-myc-Antikörpern (9E10) und mit Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Maus IgG (grün) gegen die Transgene gefärbt. Die Projektion konfokaler Aufnahmen ist abgebildet. Die Aktin-Färbung (A, C, E) sowie die Überlagerung der Färbung (B, D, F) sind gezeigt. Die Transgen-Expression von N-WASP Fr. (A, B) und N17 Cdc42 (C, D) abgebildet.

C, D). Dies deutete auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Cdc42 Signaltransduktionswege durch die Expression der N17 Cdc42 Isoform und des N-WASP (AA 201-321) Fragmentes hin.

Die Experimente mit den doppelt mutierten Rac1 Isoformen zeigten, dass der inhibitorische Einfluss von aktivem Rac1 auf den HSV-1 Eintritt vermutlich hauptsächlich über Effektoren, die über PBD-Bindung aktiviert werden, vermittelt wurde. PAK-1 und N-WASP scheinen an diesem Prozess nicht beteiligt zu sein.

4.6 HSV-1 induzierte Veränderungen des Zytoskeletts

In der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass HSV-1 basolaterale Membrandomänen zum Eintritt in Epithelzellen nutzt und der Eintritt von HSV-1 durch die Signaltransduktion von Cdc42 und Rac1 beeinflusst wird. Im Gegenzug stellte sich die Frage, ob die HSV-1 Infektion zelluläre Polarität und die Signaltransduktion von Cdc42 und Rac1, die wiederum regulatorisch auf zelluläre Polarität und Aktin-Dynamik einwirkt, beeinflusst.

4.6.1 Veränderungen der ZO-1 Lokalisierung im Verlauf der HSV-1 Infektion

Die Polarität von einfachen Epithelien wird durch Ausbildung der Zonula occludens (engl. tight junction) markiert. In der vorliegenden Arbeit wurde bereits die Lokalisierung von ZO-1 als Marker für die Ausbildung der Zonula occludens in MDCKII Zellen verwendet. Im Folgenden wurde die Lokalisierung und Expression von ZO-1 in subkonfluenten MDCKII Zellen im Infektionsverlauf untersucht, um einen Einfluss der HSV-1 Infektion auf die Zonula occludens zu bestimmen. Als Marker der Infektion wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen ICP0 gefärbt.

In uninfizierten MDCKII Zellen lokalisierte ZO-1 wie ein Band zwischen Zell-Grenzen, ICP0 Signale waren nicht erkennbar (Abb. IV.47, A, vgl. auch Abb. IV.4, A). Bis zu 4 h p.i. lokalisierte ZO-1 in vergleichbarer Intensität ebenfalls apikal zwischen Zell-Zell-Grenzen, wobei ICP0 hauptsächlich zytoplasmatisch in peripheren Zellen von

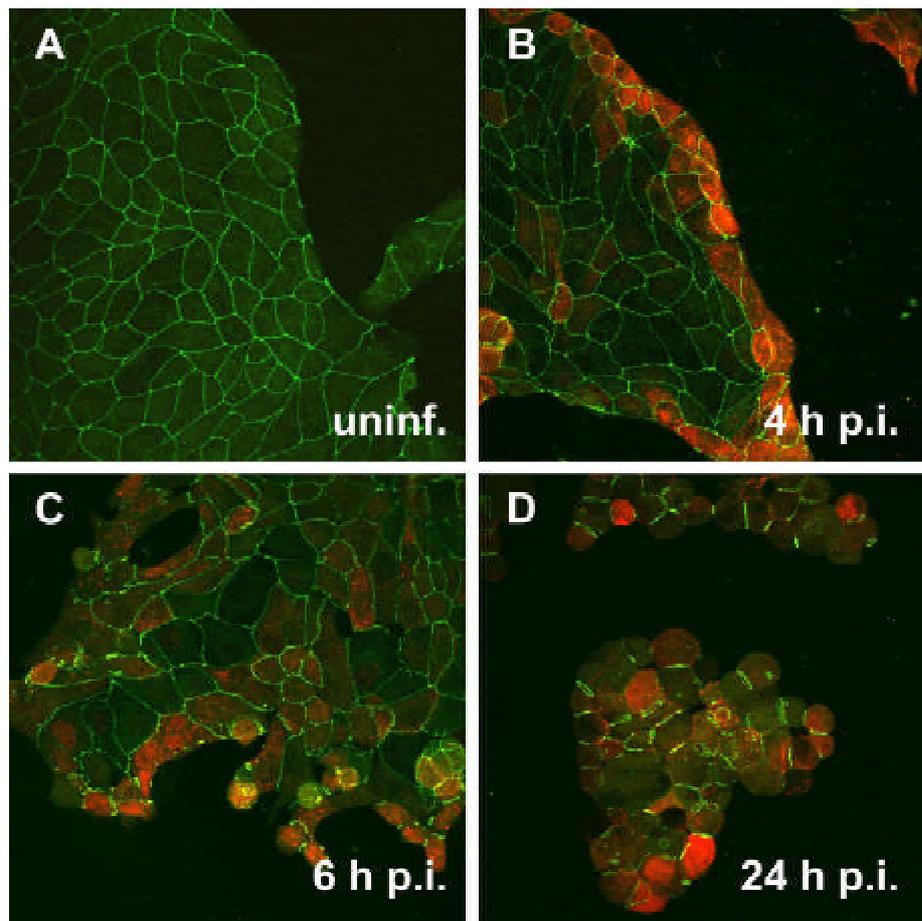


Abb. IV.47: ZO-1 Lokalisierung im HSV-1 Infektionsverlauf

Subkonfluente MDCKII Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen mit HSV-1 infiziert (5 PFU/Zelle, B-D) oder mock infiziert (A). Entweder 4 h p.i. (B), 6 h p.i. (C) oder 24 h p.i. (D) wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. ICP0 Färbung wurde mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab 11060) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot) durchgeführt. ZO-1 Färbung wurde mit anti-ZO-1-Antikörpern (Mab 1520) und Alexa Fluor 488-konjugierten anti-Ratte IgG (grün) durchgeführt. Konfokale Projektionen der Überlagerung der Färbungen sind gezeigt.

MDCKII Zell-Inseln zu detektieren war (Abb. IV.47, B). Einhergehend mit einer Abrundung der Zellen, konnte ZO-1 6 h p.i. in einigen ICP0 exprimierenden Zellen in zytoplasmatischen Punctae und punktierten Strukturen entlang der Zell-Zell-Grenzen detektiert werden (Abb. IV.47, C). Bei der Ausbildung des CPE 24 h p.i. wurde ZO-1 in ringförmigen Strukturen zwischen abgerundeten Zellen beobachtet (Abb. IV.47, D). Eine signifikante Veränderung von ZO-1 und damit der Zonula occludens konnte damit frühestens 6 h p.i. beobachtet werden.

4.6.2 Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts im Verlauf der HSV-1 Infektion

Der Einfluss von Signaltransduktionseignissen Rho-ähnlicher GTPasen zeigt sich am deutlichsten phänotypisch in ihrem Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett. Um einen Eindruck der Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts im Verlauf der HSV-1 Infektion zu erhalten, die auf eine Regulation durch Rho-ähnliche GTPasen hindeuten könnten, wurden subkonfluente MDCKII Zellen mit HSV-1 infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion fixiert und das Aktin-Zytoskelett sowie verschiedene Marker der Infektion angefärbt.

Uninfizierte Zellen zeigten keine virale Genexpression, es waren dabei häufig Stressfibrillen sowie eine starke cortikale Aktinbegrenzung der peripheren Zellen zu erkennen (Abb. IV.48, A-C). Zusätzlich konnten gelegentlich Lamellipodia in peripheren Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Virale Kapside wurden 1 h p.i. häufig eintretend an Stellen von hervorgeschobenen Membranen oder Lamellipodia beobachtet (Abb. IV.48, D-F, Pfeilspitze). Die Anzahl von Lamellipodia-artigen Membrankräuselungen war leicht erhöht, ansonsten konnten keine signifikanten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts beobachtet werden. In Zellen mit sehr früher viraler Genexpression, die also ICP0 2 h p.i. nukleär lokalisiert zeigten, wurde nur noch selten die Ausbildung von Stressfibrillen beobachtet (Abb. IV.48, G-I). Lokalisierte ICP0 4 h p.i. im Zytoplasma, wurde eine starke Ausbildung kurzer zum Teil ungeordneter Stressfibrillen und Filopodia detektiert (Abb. IV.48, J-L). Dieser Effekt verstärkte sich 6 h p.i. und führte zusätzlich zur Abrundung von Zellen, wobei die Präsenz viraler Kapside im Nukleus zu erkennen war (Abb. IV.48, M-O). Ein vollständiger CPE war 24 h p.i. zu erkennen, der bei Präsenz von viralen Kapsiden in

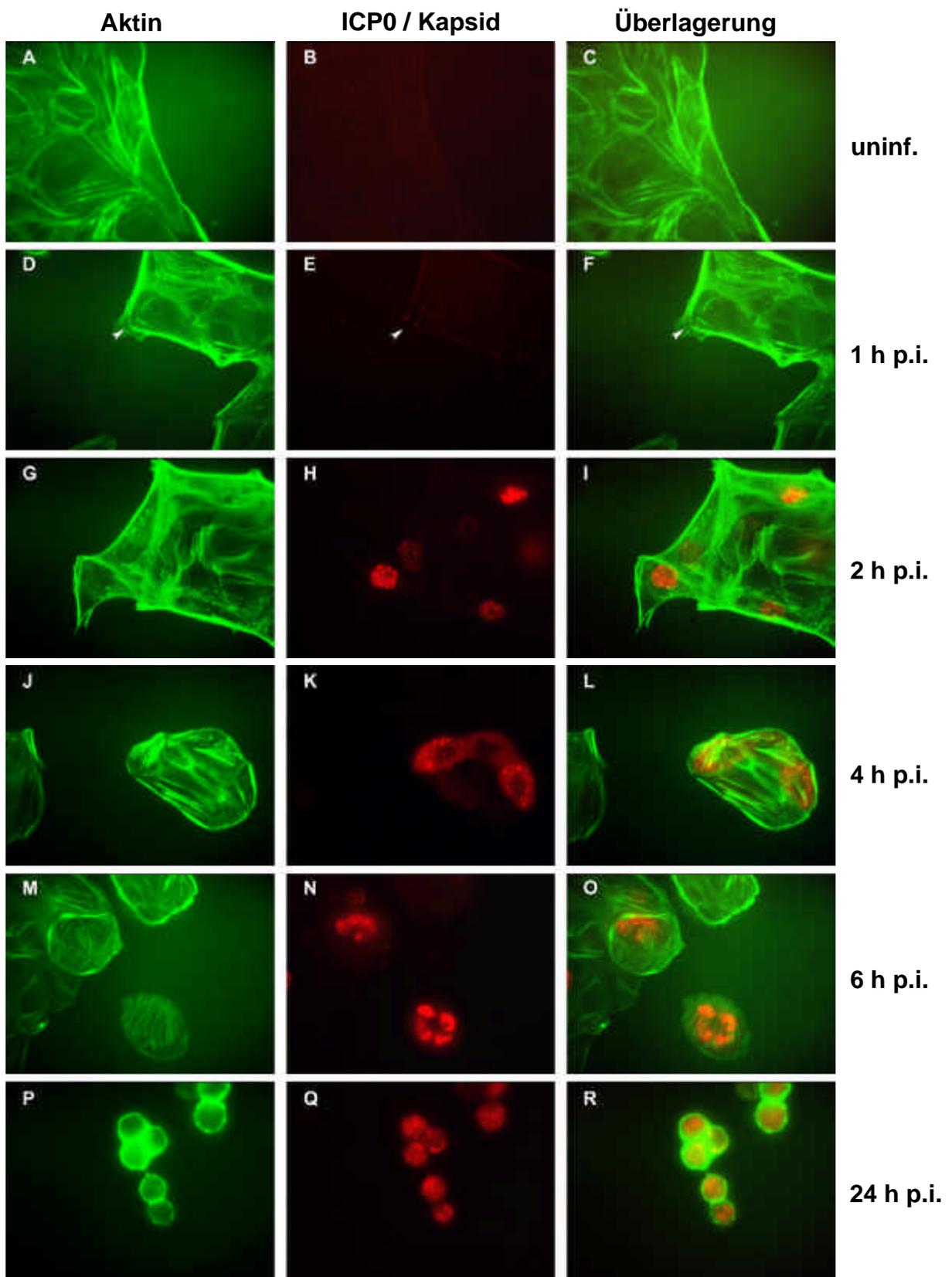


Abb. IV.48: Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts im HSV-1 (S17) Infektionsverlauf

Abb. IV.48: Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts im HSV-1 (S17) Infektionsverlauf (S. 152)

Subkonfluente MDCKII Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen mit HSV-1 (S17) infiziert (2-5 PFU/Zelle, D-R) oder mock infiziert (A-C). Entweder 1 h p.i. (D-F), 2 h p.i. (G-I), 4 h p.i. (J-L), 6 h p.i. (M-O) oder 24 h p.i. (P-R) wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. ICP0 Färbung wurde mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab 11060) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot, A-C, G-L) durchgeführt. HSV-1 Kapsid-Färbung wurde mit anti-Kapsid-Antikörpern (DM165) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot, D-F, M-R) durchgeführt. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin angefärbt (grün). Epifluoreszenz-Aufnahmen der Aktin-Färbung (A, D, G, J, M, P), der ICP0 Färbung (B, H, K), der HSV-1 Kapsid-Färbung (E, N, Q) und der Überlagerung der Färbungen (C, F, I, L, O, R) sind gezeigt.

den Zellen zu Abrundung und einer igelartigen Ausprägung kurzer Filopodia oder Microvilli auf der Oberfläche führte (Abb. IV.48, P-R).

Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts traten also insbesondere ab 2-4 h p.i. auf. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob es sich bei diesen Veränderungen bereits um einen einsetzenden CPE handelte, wurden MDCKII Zellen mit HSV-1 Stamm ANG path infiziert. HSV-1 (ANG path) bildet im Gegensatz zu HSV-1 (S17), der ansonsten in allen Infektionsstudien dieser Arbeit verwendet wurde, einen unterschiedlichen CPE aus. Während die Infektion mit HSV-1 (S17) zur Abrundung der Zellen führt, kann bei der Infektion mit HSV-1 ANG path eine Fusion von Zellen zu multinukleären Riesenzellen beobachtet werden (Heeg *et al.*, 1986).

Subkonfluente MDCKII Zellen wurden demnach mit HSV-1 (ANG path) infiziert und in Zeitkurven-Experimenten gegen virale Marker und das Aktin-Zytoskelett angefärbt. Häufig wurden in uninfizierten MDCKII Zellen Stressfibrillen, eine starke cortikale Aktinbegrenzung der peripheren Zellen sowie gelegentlich Lamellipodia beobachtet. Virale Marker zeigten keine Signale (Abb. IV.49, A-C). Eintretende HSV-1 Kapside wurden 1 h p.i. vornehmlich in Lamellipodia ausbildenden Zellen beobachtet (Abb. IV.49, D-F). Bei sehr früher Genexpression 2 h p.i., markiert durch nukleäre Lokalisierung von ICP0, wurden etwas weniger Stressfibrillen detektiert (Abb. IV.49, G-I). Lokalisierte ICP0 im Zytoplasma 4 h p.i., zeigten infizierte MDCKII Zellen die Ausbildung von ungeordneten Stressfibrillen und kurzen Filopodia, während in Zellen nukleärer ICP0 Lokalisierung keine Stressfibrillen zu erkennen waren (Abb. IV.49, J-L). Die Ausbildung von Stressfibrillen wurde 6 h.p.i. deutlicher, wenn HSV-1 Kapside nukleär lokalisiert detektiert werden konnten (Abb. IV.49, M-O). Die Bildung von

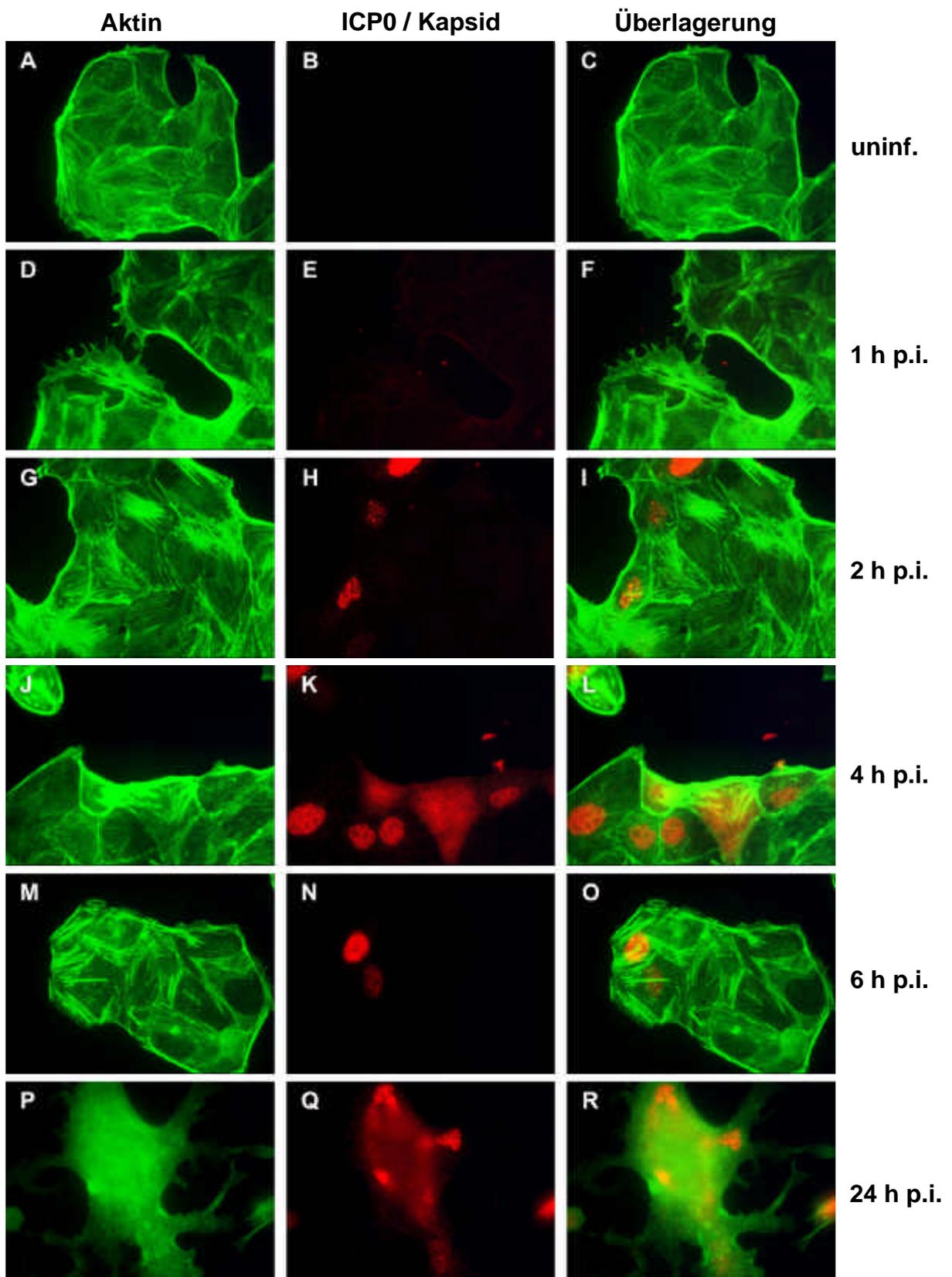


Abb. IV. 49: Aktin-Zytoskelett im HSV-1 (ANG path) Infektionsverlauf

Abb. IV.49: Aktin-Zytoskelett im HSV-1 (ANG path) Infektionsverlauf (S. 154)

Subkonfluente MDCKII Zellen wurden 16 h nach dem Aussähen mit HSV-1 (ANG path) infiziert (2-5 PFU/Zelle, D-R) oder mock infiziert (A-C). Entweder 1 h p.i. (D-F), 2 h p.i. (G-I), 4 h p.i. (J-L), 6 h p.i. (M-O) oder 24 h p.i. (P-R) wurden die Zellen in 2 % Paraformaldehyd fixiert. ICP0 Färbung wurde mit anti-ICP0-Antikörpern (Mab 11060) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot, A-C, G-L) durchgeführt. HSV-1 Kapsid-Färbung wurde mit anti-Kapsid-Antikörpern (DM165) und Cy3-konjugierten anti-Maus IgG (rot, D-F, M-R) durchgeführt. Das Aktin-Zytoskelett wurde mit FITC-konjugiertem Phalloidin ko-färbt (grün). Epifluoreszenz-Aufnahmen der Aktin-Färbung (A, D, G, J, M, P), der ICP0 Färbung (B, H, K), der HSV-1 Kapsid-Färbung (E, N, Q) und der Überlagerung der Färbungen (C, F, I, L, O, R) sind gezeigt.

fusionierten Riesenzellen 24 h p.i. zeigte die Ausbildung des CPE an (Abb. IV.49, P-R).

Die Veränderungen des Zytoskeletts im Verlauf der HSV-1 Infektion sind in der Tabelle IV.7 zusammenfassend dargestellt.

Das Fehlen von Stressfibrillen 2 h p.i. sowie die Ausbildung von Filopodia und kurzen ungeordneten Stressfibrillen 4 und 6 h p.i. traten bei Infektion mit beiden verwendeten Virusstämmen auf, die einen unterschiedlichen CPE ausbildeten. Vermutlich sind dies Veränderungen, die auf die Expression eines viralen Proteins zurückgehen und nicht auf einem zellulären Zusammenbruch zurückzuführen sind. Diese Prozesse könnten durch Rho-ähnliche GTPase Signaltransduktion oder analoge Mechanismen reguliert werden.

Ein potentieller Kandidat für ein HSV Protein, das entsprechende Veränderungen auslösen könnte ist Us3, eine Ser/Thr Kinase, die signifikante Homologien zur PAK aufweist (Mururata *et al.*, 2000). Zur Untersuchung des Effektes von Us3 auf das Aktin-Zytoskelett in MDCKII Zellen, wurde Us3 transient in MDCKII Zellen exprimiert. Dazu wurde zunächst mittels PCR die Sequenz des Us3-ORF (engl. open reading frame) von genomischer HSV-1 (S17) DNA amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert. Transiente Expression des Us3-myc-Fusionsproteins für 24 h in MDCKII Zellen führte zu einer Abrundung von Zellen. Eine Bildung vieler Stressfibrillen und Filopodia wie 4-6 h p.i. im HSV-1 Infektionsverlauf wurde dabei nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Effekte transients Expression eines Us3-myc-Fusionsproteins zeigten keine Ähnlichkeiten mit HSV-1 induzierten Veränderungen während des Infektionsverlaufs.

Zeitpunkt nach HSV-1 Infektion	Effekt auf das Aktin-Zytoskelett	Abbildung
uninfiziert	Periphere Zellen mit starkem cortikalen Aktin, häufig Stressfibrillen, Ansätze von Lamellipodia-Bildung	Abb. IV.48 und 49, A-C
1 h p.i. (Marker HSV-1 Kapsid)	a) Eintretende Kapside häufig in Lamellipodia ausbildenden Zellen, leicht vermehrte Lamellipodia-Bildung (HSV-1 (S17)) b) Eintretende Kapside häufig in Lamellipodia ausbildenden Zellen, (HSV-1 (ANG path))	Abb. IV.48, D-F Abb. IV.49, D-F
2 h p.i. (Marker ICP0, nukleär)	a) Häufig keine Stressfibrillen (HSV-1 (S17)) b) Weniger Stressfibrillen (HSV-1 (ANG path))	Abb. IV.48, G-I Abb. IV.49, G-I
4 h p.i. (Marker ICP0, zytoplasmatisch)	a) Kurze häufig ungeordnete Stressfibrillen-Bildung, kurze Filopodia (HSV-1 (S17)) b) Kurze Stressfibrillen-Ausbildung, kurze Filopodia (HSV-1 (ANG path))	Abb. IV.48, J-L Abb. IV.49, J-L
6 h p.i. (Marker HSV-1 Kapsid)	a) Vermehrte Stressfibrillen-Bildung, Abrundung (HSV-1 (S17)) b) Vermehrte Stressfibrillen-Bildung, Abrundung (HSV-1 (ANG path))	Abb. IV.48, M-O Abb. IV.49, M-O
24 h p.i. (Marker HSV-1 Kapsid)	a) Abrundung der Zellen (CPE), igelartige kurze Filopodia oder Microvilli (HSV-1 (S17)) b) Zellfusion, Ausbildung von Riesenzellen (HSV-1 (ANG path))	Abb. IV.48, P-R Abb. IV.49, P-R

Tabelle IV.7: Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts im Verlauf der HSV-1 Infektion

Daher ergaben sich keine Hinweise auf eine potentielle Beteiligung von Us3 an den beobachteten Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts im Infektionsverlauf.

V. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Studien zu Eintrittsmechanismen von HSV-1 in Epithelien durchgeführt. Dazu wurde zunächst der initiale Ort des Eintritts von HSV-1 in polare Epithelmodelle untersucht. In Studien über potentielle, molekulare Determinanten des HSV-1 Eintritts wurde anschließend die Lokalisierung eines Virus-Rezeptors, die Beteiligung des viralen Glykoproteins D sowie der Einfluss zellulärer Aktin-Dynamik und ihrer respektiven Signaltransduktion untersucht.

1 Polarität des HSV-1 Eintritts

Für das bessere Verständnis der molekularen Determinanten des HSV-1 Eintritts in polare Epithelien wurden in dieser Arbeit zunächst Eintrittsstudien durchgeführt, die Hinweise für eine Polarität des bevorzugten Viruseintritts lieferten. Dazu wurden Untersuchungen in einfachen und komplexen Epithelmodellen durchgeführt.

1.1 Basolaterale Membrandomänen fungieren als primärer HSV-1 Eintrittsort in einfachen Epithelien

Die Polarität einfacher Epithelien unterscheidet apikale und basolaterale Membrandomänen von Epithelzellen, die durch Ausbildung einer Zonula occludens zustande kommt (zur Übersicht Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2000).

Untersuchungen zur Infektion individueller MDCKII Zellen lieferten Hinweise zur Nutzung basolateraler Membrandomänen für den HSV-1 Eintritt. Selbst bei höherer MOI wurde nur selten Viruseintritt über die apikale Oberfläche konfluenter MDCKII Zellen beobachtet. Hatte HSV-1 Zugang zu basolateralen Membrandomänen in verwundeten konfluenten Kulturen, wurde effizienter Viruseintritt beobachtet. HSV-1 Eintrittsstudien in konfluenten MDCKII Zellen, die auf Filtern wuchsen, zeigten ebenfalls kaum Eintritt über apikale Membrandomänen. Die Effizienz erfolgreichen Eintritts war leicht erhöht, wenn basolaterale Membrandomänen dem Virus durch Membranporen zugänglich waren. Frühere HSV-1 Infektionsstudien wurden in MDCK Zellen, die auf Filtern wuchsen, durchgeführt (Sears *et al.*, 1991, Hayashi,

1995; Topp *et al.*, 1997; Tran *et al.*, 2000). Diese Studien liefern zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Erfolgreicher HSV-1 Eintritt wird entweder über alle Zelloberflächen (Sears *et al.*, 1991, Tran *et al.*, 2000) oder mit einer Präferenz über die basolateralen Membrandomänen (Hayashi, 1995, Topp *et al.*, 1997) beobachtet. Im Falle basolateraler Infektion ist es für Untersuchungen wichtig, dass das Virus die Filterporen ungehindert passieren kann. Für HSV-1 resultieren diese experimentellen Bedingungen im Verlust von 99 % des eingesetzten Virus (Topp *et al.*, 1997) oder mehr (Daten nicht gezeigt). Es war daher nicht möglich, Infektionen via basolateraler oder apikaler Membrandomänen von Zellen auf Filtermembranen mit vergleichbaren Multiplizitäten durchzuführen. Daher wurde die Infektion von subkonfluenten MDCKII Zellen, die auf Glasoberflächen wuchsen, als bevorzugtes Modellsystem gewählt. Auch in diesem Modellsystem zeigten Zellen Eigenschaften zellulärer Polarisierung und eine homogene Verteilung zytoskelett-assoziiierter Proteine. Effizienter Eintritt von HSV-1 wurde in subkonfluenten MDCKII Zellen beobachtet, sofern die basolateralen Membrandomänen der peripheren Zellen von Zell-Inseln zugänglich waren. Vergleichende Eintrittsstudien von HSV-1 und AcMNPV in subkonfluenten MDCKII Zellen deuteten darauf hin, dass die Aufnahme von HSV-1 Partikeln in periphere Zellen spezifisch für HSV-1 war. Der Eintritt von AcMNPV wurde hingegen in den gesamten Zellen der Zell-Inseln beobachtet. Wenn die Zell-Zell-Verbindungen durch Cytochalasin D-Behandlung aufgelöst wurden, war die Infizierbarkeit nicht mehr auf die peripheren Zellen beschränkt, sondern es wurde eine Infektion aller Zellen beobachtet. Diese Daten stimmen mit neueren Ergebnissen überein, die eine effiziente Infektion von MDCKII Zellen zeigen, wenn Zell-Zell-Kontakte durch Verminderung des Kalziumgehaltes im Medium beeinflusst werden (Yoon und Spear, 2002).

Die Exposition basolateraler Membranen scheint somit eine Voraussetzung für effizienten HSV-1 Eintritt in MDCKII Zellen zu sein.

Untersuchungen zur HSV-1 Infektion subkonfluenter MDCKII Zellen zeigten bei höherer Virusdosis gelegentlich infizierte Zellen innerhalb von Zell-Inseln. Im Gegensatz zur zytoplasmatischen Verteilung von ICP0 in peripheren Zellen, wurde eine nukleäre Lokalisierung von ICP0 in Zellen innerhalb der Zell-Inseln beobachtet. Da ICP0 im Infektionsverlauf zunächst im Nukleus lokalisiert und später eine

Relokalisierung ins Zytoplasma zeigt, lässt sich auf eine verzögerte Infektion von Zellen mit polaren Eigenschaften innerhalb von MDCKII Zell-Inseln schließen. Diese verzögerte Infektion ist möglicherweise das Resultat von Virusvermehrung und -ausbreitung peripherer Zellen. Die Voraussetzung dafür wäre, dass virale DNA Replikation in den peripheren Zellen stattfindet. Durch Zugabe des Thymidinanalogs 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) zum Zellkulturmedium visualisierte Matthias Jansen (2003) virale DNA-Replikation in infizierten subkonfluenten MDCKII Zellen. Diese Studien weisen darauf hin, dass virale Replikation in peripheren Zellen innerhalb von 2 h p.i. möglich ist, so dass es zur Virusausbreitung in das Innere der Zell-Inseln kommen könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Infektion peripherer Zellen weiteren HSV-1 Partikeln den Zugang zu Zellen innerhalb der Zell-Inseln durch Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte ermöglicht. Erste Untersuchungen zur Lokalisierung von ZO-1 bis zu 4 h p.i. ergaben keine experimentellen Hinweise für diese Möglichkeit.

Ob die Polarität des HSV-1 Eintritts in canine MDCKII Zellkulturen den Eintrittsmechanismus in einfache humane Epithelien reflektiert, wurde durch Eintrittsstudien in primäre Keratinozyten-Kulturen untersucht. Im allgemeinen werden humane Keratinozyten effizient durch HSV-1 infiziert (Huber *et al.*, 2001). Einschichtkulturen primärer Keratinozyten zeigten Bereiche infizierter und uninfizierter Zellen. In intakter Epidermis sind Keratinozyten eng gepackt und zeigen voll ausgebildete Zell-Zell-Kontakte. In Einschichtkulturen primärer Keratinozyten, die unter verminderten Kalziumbedingungen wachsen, können dagegen größere Unterschiede in Zelldichte und Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten auftreten. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Effizienz des HSV-1 Eintritts in primäre Keratinozyten-Einschichtkulturen invers proportional zur Zelldichte und Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten war. Wenn eng gepackte Keratinozyten verwundet wurden, wurde Viruseintritt in Keratinozyten entlang der Wunde beobachtet. Diese Ergebnisse sind analog zu den Beobachtungen der Infektionsstudien in verwundeten konfluenten MDCKII Zellen, so dass die Exposition basolateraler Membrandomänen auch in Keratinozyten-Kulturen eine Voraussetzung für effizienten HSV-1 Eintritt darstellen könnte.

1.2 Limitierende Barriere-Funktion apikaler Oberflächen für den HSV-1 Eintritt in komplexe humane Epithelien

Die Ergebnisse in Einschicht-Epithelien führten zu der Frage, ob der beobachtete Tropismus für basolaterale Membranen auch bei dem Virus-Eintritt in komplexe Epithelien des natürlichen Wirts eine Rolle spielt. Infektionsstudien in humaner Vorhautepidermis und stratifizierenden Keratinozyten-Kulturen wiesen auf einen ähnlichen polaren Eintrittsmechanismus hin.

HSV-1 Eintritt in humane Epidermis wurde ausschließlich über die basalen Oberflächen von *ex vivo* Kulturen beobachtet. Die apikale Oberfläche hingegen bildete eine limitierende Barriere für die HSV-1 Infektion. Die apikale Oberfläche humaner Epidermis besteht aus dem Stratum corneum, das hauptsächlich aus abgestorbenen Keratinozyten und Fetten aufgebaut ist und daher virale Replikation nicht unterstützen kann (zur Übersicht Kalinin *et al.*, 2002). Dies könnte als hinreichende Erklärung dafür dienen, dass HSV-1 in humane Epidermis nur über basale Oberflächen eintritt. Allerdings zeigten Eintrittsstudien in stratifizierende Vorhaut-Keratinozyten, die kein Stratum corneum ausbildeten, dass der HSV-1 Eintritt nur in basalen Keratinozyten erfolgte. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Barriere-Funktion des Stratum corneums wahrscheinlich nicht die einzige Erklärung für den fehlenden Virus-Eintritt über apikale Oberflächen der Epidermis ist.

In den Infektionsstudien von humanen Epidermis-Explant-Kulturen mit höherer Virus-Dosis wurde eine ICP0 Färbung auch in suprabasalen Zellschichten beobachtet. Diese könnte auf Virus-Ausbreitung von basalen zu suprabasalen Zellen zurückzuführen sein. Alternativ könnten HSV-1 Virionen bei hoher Konzentration zu suprabasalen Zellschichten durchdringen. Im Hinblick auf die HSV-1 Partikel-Größe einerseits und die ausgebildeten intakten Zell-Zell-Kontakte andererseits gibt es für diese Annahme bisher keine experimentelle Evidenz.

Frühere Studien untersuchten die Infektion von stratifizierenden Kulturen von immortalisierten oder primären Keratinozyten in einem organotypischen Kultursystem *in vitro* (Syrjänen *et al.*, 1996; Visalli *et al.*, 1997, Hukkanen *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der Infektionsstudien humaner Vorhautepidermis und stratifizierender

Keratinocyten-Kulturen der vorliegenden Arbeit unterscheiden sich zum Teil von denen, die in organotypischen, stratifizierenden Kulturen *in vitro* erzielt worden sind (Syrjänen *et al.*, 1996; Hukkanen *et al.*, 1999). Diese berichten über eine Infektion aller Epidermis-Schichten. In der vorliegenden Arbeit wurde in Verwundungsstudien stratifizierender Keratinocyten-Kulturen gezeigt, dass eine Infektion apikaler differenzierter Keratinocyten auftreten kann und dass diese begleitet wurde von einer Auflockerung der Zell-Zell-Kontakte. Diese Auflockerung erlaubte möglicherweise eine Diffusion von Virus-Partikeln in den interzellulären Raum und den Zugang von HSV-1 Partikeln zu basalen Oberflächen apikaler Keratinocyten. Da die Integrität der Zell-Zell-Kontakte in den genannten Studien nicht im Detail untersucht wurde, ist nicht auszuschließen, dass HSV-1 Zugang zu basalen Oberflächen hatte. Organotypische, stratifizierende Kulturen *in vitro* repräsentieren zudem nicht die volle Barriere-Funktion von Epidermis *in vivo* (Nolte *et al.*, 1993).

In verschiedenen Modellsystemen einschließlich humaner Epidermis-Explant-Kulturen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Epithelzellen mit deutlich höherer Effizienz infiziert wurden, sobald ihre basolateralen Membranen zugänglich waren. Zusätzlich legen die Ergebnisse der Infektionsstudien von *ex vivo* Epidermis-Kulturen nahe, dass HSV-1 *in vivo* eine intakte Epidermis-Barriere nicht penetrieren kann und die Exposition basaler Keratinocyten zur erfolgreichen Infektion benötigt. Diese Schlussfolgerung unterstützt die Annahme, dass HSV-1 Wunden oder Microlesionen in Epithelien zur primären Infektion nutzt.

2 Potentielle Determinanten des HSV-1 Eintritts in Epithelzellen

2.1 Rolle des HSV-1 Korezeptors Nectin-1 für den polaren HSV-1 Eintritt in Epithelien

Zugang von HSV-1 zu zellulären Rezeptoren ist eine Voraussetzung für den rezeptor-vermittelten Eintritt in die Wirtszelle. Die Lokalisierung des HSV-1 Korezeptors Nectin-1 wurde im Hinblick auf die Frage untersucht, ob polarer Eintritt und Rezeptor-Lokalisierung und damit -Zugänglichkeit korrelieren. Nectin-1 ist ein

ubiquitär exprimiertes Zell-Zell-Adhäsionsmolekül (Takai und Nakanishi, 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Immunfluoreszenz-Studien Nectin-1 in MDCKII Zellen nicht nachgewiesen werden. Katata *et al.* (2003) beschreiben zwar die Expression von Nectin-1, die Lokalisierung von Nectin-1 in der Zonula adhaerens von MDCK Zellen wurde allerdings durch Überexpression von Nectin-1 sichtbar gemacht (Takahashi *et al.*, 1999, Katata *et al.*, 2003). MDCK Zellen, die Nectin-1 überexprimieren, zeigen eine effiziente HSV-1 Infektion erst, wenn Zell-Zell-Kontakte durch Verminderung des Kalziumgehaltes aufgelöst werden (Yoon und Spear, 2002). Sollte endogenes Nectin-1 in MDCKII Zellen in basolateralen Membrandomänen sowie in der Plasmamembran unpolarisierter, randständiger Zellen lokalisieren, wie die Lokalisierungsstudien des überexprimierten Proteins andeuten, würden die Nectin-1-Lokalisierung und der Tropismus für den polaren HSV-1 Eintritt in MDCKII Zellen korrelieren. Da in der vorliegenden Arbeit keine für MDCKII Zellen spezifischen Nectin-1-Antikörper verfügbar waren, blieb die Rolle für Nectin-1 in der Polarität des HSV-1 Eintritts in MDCKII Zellen spekulativ.

Im Gegensatz zu MDCKII Zellen erkannte ein monoklonaler Antikörper Nectin-1 in primären Keratinozyten-Kulturen, so dass Lokalisierungsexperimente möglich waren. Immunfluoreszenzstudien zeigten eine Nectin-1-Lokalisierung in der Plasmamembran insbesondere entlang der interzellulären Zell-Zell-Verbindungen. Während Nectin-1 eine besonders prominente Färbung in dichten Bereichen von Einschichtkulturen zeigte, war im Gegensatz dazu Nectin-1 praktisch nicht in der Plasmamembran von Zellen entlang einer Verwundung detektierbar. Apikale Zellen stratifizierender Kulturen zeigten eine deutlich stärkere Nectin-1-Färbung als basale Zellen, in denen nur gelegentlich Nectin-1 detektiert werden konnte. Da Zellen mit erhöhter HSV-1 Infizierbarkeit ein geringeres Ausmaß an Nectin-1 Lokalisierung in der Plasmamembran zeigten, ist es unwahrscheinlich, dass Nectin-1 für die Polarität des HSV-1 Eintritts in Keratinozyten-Kulturen bestimmend ist. Huber *et al.* (2001) beobachteten darüber hinaus eine uneffiziente Blockierung des HSV-1 Eintritts in Keratinozyten durch anti-Nectin-1 Antikörper. Zusammengenommen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist daher eine Rolle von Nectin-1 als exklusivem HSV-1 Korezeptor für den primären Eintritt in Keratinozyten fragwürdig. Eine Rolle von Nectin-1 in der Ausbreitung von HSV-1 über Zell-Zell-Kontakte in Keratinozyten

ist jedoch möglich.

Einschichtkulturen von Keratinozyten gelten im allgemeinen als Modellsystem für das Stratum basale. Während in Einschichtkulturen eine starke Nectin-1 Färbung beobachtet wurde, wurde Nectin-1 hingegen nur gelegentlich in basalen Zellen von stratifizierenden Keratinozyten beobachtet. Die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen der beiden Epithelmodelle könnten hierfür die Ursache sein. E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion ist im Gegensatz zu Nectin-1 kalziumabhängig, so dass unter verminderten Kalzium-Bedingungen vermehrte Nectin-1 Adäsion eine verminderte E-Cadherin-Adhäsion substituieren kann (zur Übersicht Takai und Nakanishi, 2003). Daher könnte die unterschiedliche Stärke der Nectin-1 Färbung auf die verminderten Kalzium-Bedingungen der Einschicht-Kultivierung zurückzuführen sein.

2.2 Beteiligung des HSV-1 Glykoproteins D am Eintritt in Epithelzellen

Die Bindung eines der spezifischen Zell-Oberflächen-Rezeptoren durch HSV-1 gD ist ein essentieller Schritt im Prozess des viralen Eintritts in unpolare Zellen (zur Übersicht Spear, 1993, Campadelli-Fiume *et al.*, 2000). Im Zusammenhang des Eintritts in polare Epithelien wurden Studien durchgeführt, die eine Beteiligung von gD am Eintritt über neutralisierende Antikörper-Bindung untersuchten. Sowohl in MDCKII Zellen wie auch in primären Keratinozyten-Kulturen konnte der Eintritt von HSV-1 in dosis-abhängiger Weise spezifisch durch neutralisierende anti-gD-Antikörper (DL11) blockiert werden. Dies legt eine Beteiligung von gD am Eintritt in Epithelzellen nahe.

Die punktierte Färbung auf Zelloberflächen durch anti-gD-Antikörper deutet darauf hin, dass eine Bindung von HSV-1 Virionen an die Oberfläche von MDCKII Zellen und Keratinozyten in den Blockierungsexperimenten nicht verhindert wurde. Die Adsorption von HSV-1 an Zelloberflächen wird durch die Interaktion HSV-1 gC oder gB mit Heparansulfat Proteoglycan vermittelt und geht der Rekrutierung des HSV-1 Korezeptors voraus (Herold *et al.*, 1991, Johnson *et al.*, 1990). Die beobachtete Bindung von HSV-1 an MDCKII- und Keratinozyten-Oberflächen könnte also dem spezifischen Adsorptionsprozeß entsprechen oder alternativ die unspezifische

Bindung von Virus-Partikeln an Zelloberflächen darstellen. Dabei fand interessanterweise eine Bindung von HSV-1 an alle Oberflächen von MDCKII Zellen und stratifizierenden Keratinozyten statt, im Gegensatz zum beobachteten Tropismus des HSV-1 Eintritts über basolaterale Membranen oder basale Zellen. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass die molekulare Determinante des polaren Eintritts nicht in der Bindung an die HSV-1 Oberfläche sondern in den folgenden Schritten der Rezeptorbindung, Penetration und des Transportes zu suchen ist.

2.3 Hinweise auf die mechanistischen Grundlagen zur Penetration der Plasmamembran

Die neueren Untersuchungen zu molekularen Determinanten des HSV-1 Eintritts beschränken sich hauptsächlich auf die Rezeptor-Ligand-Interaktionen zur Penetration der Plasmamembran (zur Übersicht Spear und Longnecker, 2003). Darüber hinaus existieren einige Hinweise auf den Mechanismus, der der Penetration der Plasmamembran zugrunde liegt. HSV-1 Partikel, deren Hüllmembran mit der Plasmamembran fusioniert, werden in zahlreichen elektronenmikroskopischen Studien zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion beobachtet (Fuller *et al.*, 1989; Fuller und Spear, 1987, zur Übersicht Roizman und Whitley, 1996). Zusätzlich werden Virionen in intrazellulären Vesikeln beobachtet (Fuller und Spear, 1987, zur Übersicht Roizman und Sears, 1996). Diese werden jedoch nicht infektiösem Eintritt zugeschrieben (Fuller *et al.*, 1989; Fuller und Spear, 1987). Vielmehr wird von den Autoren angenommen, dass diese HSV-1 Partikel degradiert werden. In einer neueren Studie wurde jedoch gezeigt, dass HSV-1 Zelltyp-spezifisch entweder über Endozytose oder über Fusion in die respektive Wirtszelle eintritt (Nicola *et al.*, 2003). So wird in HeLa Zellen vor allem eine endozytotische Aufnahme beobachtet, während in Vero Zellen pH-unabhängige Fusion der viralen Hüllmembran mit der Plasmamembran der hauptsächlich Mechanismus zur Penetration ins Zytoplasma zu sein scheint.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Anlehnung an die Arbeit von Nicola *et al.* (2003) der nachfolgende Schritt eines potentiellen HSV-1 Eintritts über Endozytose inhibiert: Die Freisetzung infektiöser Partikel ins Zytoplasma über durch Acidifizierung

ausgelöste Lyse von Endosomen. Der verwendete Inhibitor Monensin ist ein carboxylisches Ionophor, das endosomale Acidifizierung blockiert (Brock und Smith, 1982; Fliesler und Basinger, 1987). HSV-1 Eintritt in MDCKII Zellen wurde nicht durch die Behandlung mit Monensin beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigten HeLa Zellen eine Dosis-abhängige Inhibierung des HSV-1 Eintritts durch Monensin-Gabe vor Infektion, wie dies auch von Nicola *et al.* (2003) beschrieben wurde. Dies deutet auf einen Eintrittsmechanismus von HSV-1 in MDCKII Zellen hin, der pH-unabhängig ist und nicht auf der Acidifizierung von Endosomen beruht. Wahrscheinlich nutzt HSV-1 pH-unabhängige Fusion zur Penetration der Plasmamembran von MDCKII Zellen. Aufgrund der limitierten Daten der vorliegenden Arbeit kann jedoch ein endozytotischer Eintrittsmechanismus von HSV-1 in MDCKII Zellen nicht ausgeschlossen werden, der auf pH-unabhängiger Freisetzung der Virionen aus Endosomen beruht, wie dies auch für Epstein-Barr Virus, einem weiteren Herpesvirus, gezeigt wurde (Miller und Hutt-Fletcher, 1992).

3 Wechselseitige Beeinflussung von Aktin-Dynamik und HSV-1 Infektion

Neben der Penetration der Plasmamembran müssen Viren zum erfolgreichen Eintritt in die Wirtszelle das unter der Plasmamembran liegende Netzwerk der Aktin-Cortex überwinden. Einige Viren nutzen dazu den zellulären Prozess der Endozytose, um anschließend aus endosomalen Vesikeln ins Zytoplasma freigesetzt zu werden. Bei einem Eintrittsmechanismus von Viren über Fusion ihrer Hüllmembran mit der Plasmamembran ist die Penetration der Aktin-Cortex bisher wenig verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Studien unternommen, die den Einfluss des Aktin-Zytoskeletts und der aktin-regulierenden Signaltransduktion auf die HSV-1 Infektion und *vice versa* untersuchten.

3.1 Hemmung der HSV-1 Infizierbarkeit von Epithelzellen durch Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts

Der Einfluss von dynamischen Aktin-Prozessen auf den HSV-1 Eintritt in MDCKII Zellen wurde zunächst durch Inhibitor-Studien untersucht. Inhibitor-Studien eignen sich, um erste Hinweise auf beteiligte Komponenten eines Prozesses zu sammeln. Bei Hinweisen auf beteiligte Komponenten sind weitere Studien aufgrund der häufig auftretenden Sekundäreffekte von Inhibitoren angebracht.

Die Inhibierung der Aktin-Polymerisierung und die anschließende Depolymerisierung durch Cytochalasin D (CD) führten zum Verlust von Zell-Zell-Kontakten subkonfluenter MDCKII Zellen. Durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten hatte HSV-1 Zugang zu basolateralen Membrandomänen, so dass auch Zellen innerhalb von MDCKII Zell-Inseln infiziert wurden. Ein Einfluss der Aktin-Depolymerisierung auf die HSV-1 Infizierbarkeit individueller Zellen wurde hingegen nicht beobachtet. Im Gegensatz dazu beobachtete Rosenthal *et al.* (1985) eine Inhibierung des HSV-1 Eintritts durch CD in HEp-2 Zellen. Diese beobachtete Inhibierung des Eintritts tritt allerdings nur bei CD-Konzentrationen größer 1 μM auf (Rosenthal *et al.*, 1985). In der vorliegenden Arbeit wurden geringere Konzentrationen von CD eingesetzt, da höhere Konzentrationen der Zellviabilität abträglich waren und signifikante Effekte auf das Aktin-Zytoskelett bereits bei geringeren Konzentrationen beobachtet wurden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lieferten erste Hinweise, dass die durch CD gehemmte Aktin-Polymerisierung für einen effizienten Eintritt von HSV-1 in MDCKII Zellen nicht benötigt wird.

Desweiteren wurde in HSV-1 Eintrittsstudien Jasplakinolide vor und während der Infektion dem Wachstumsmedium beigelegt. Jasplakinolide führt zur Stabilisierung von F-Aktin und anschließend zu Aktin-Polymerisierung (Bubb *et al.*, 1994). In diesen Studien wurde eine Dosis-abhängige Hemmung der HSV-1 Infizierbarkeit durch Jasplakinolide beobachtet. Diese Ergebnisse lieferten experimentelle Hinweise, dass stabile F-Aktin Strukturen eine potentielle Barriere für die HSV-1 Infizierbarkeit darstellen.

3.3 Einfluss der Signaltransduktion von Rac1 / Cdc42 auf die HSV-1 Infizierbarkeit von Epithelzellen

Schlüssel-Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts sind die Rho-ähnlichen GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA, die über Signaltransduktionsprozesse die Ausbildung spezifischer Aktin-Strukturen regulieren (zur Übersicht Hall, 1998). Der Einfluss der Signaltransduktion von Cdc42, Rac1 und RhoA auf den HSV-1 Eintritt wurde durch Inhibitorstudien und Expression dominanter Isoformen von Rho GTPasen untersucht. In Inhibitorstudien wurde durch Toxin B Behandlung von MDCKII Zellen und stratifizierenden Keratinozyten-Kulturen die Signaltransduktion des endogenen Cdc42 und Rac1 gehemmt. Dies resultierte in verminderter Aktin-Polymerisierung der Aktin-Cortex in einem Teil der Zellen. In diesen Zellen wurde teilweise eine Reduktion infizierter Zellen beobachtet. Die Inhibitorstudien wiesen also auf einen potentiellen Einfluss der Signaltransduktion von Rac1 und Cdc42 auf die HSV-1 Infizierbarkeit von Epithelzellen hin.

Um diese ersten Hinweise auf eine potentielle Rolle von Rho GTPasen in der HSV-1 Infizierbarkeit von Epithelzellen zu spezifizieren, wurden mutierte Isoformen von Rho GTPasen transient in MDCKII Zellen exprimiert und anschließend mit HSV-1 infiziert. Bei Expression der dominant aktiven (L61) und inaktiven (N17) Cdc42 Isoformen sowie der dominant aktiven (L61) Rac1 Isoform zeigte sich eine signifikante Reduktion der HSV-1 Infizierbarkeit. Weder die Expression dominanter Isoformen von RhoA noch die Expression der Wildtyp-Isoformen zeigte einen signifikanten Effekt auf die HSV-1 Infizierbarkeit.

Die Hemmung der HSV-1 Infektion durch die Expression von dominant-aktivem sowie -inaktivem Cdc42 kann bedeuten, dass eine zyklische Aktivierung und Inaktivierung von Cdc42, also kontinuierliche GTP Hydrolyse, für eine effiziente HSV-1 Infektion benötigt wird. Ähnliche Prozesse werden bei Rac1-reguliertem Neuritenwachstum in *Drosophila* (Luo *et al.*, 1994) oder bei der Funktionalität der Zonula adhaerens in MDCKII Zellen (Jou *et al.*, 1998) beobachtet. Alternativ könnte ein minimaler Level an Cdc42-GTP zur Infektion benötigt werden, ein sehr hoher Level von Cdc42-GTP könnte hingegen hemmend wirken. Ein Beispiel für einen solchen Prozess ist die rho-vermittelte Bildung von Actomyosin-Fibrillen, die zur

Migration von Zellen benötigt wird. Werden zu viele dieser Fibrillen durch hohe Level an Rho-GTP gebildet, kontrahiert die Zelle und es findet keine Migration statt. Zellmigration wird so entweder durch Expression der dominant-aktiven sowie -inaktiven Isoform verhindert (zur Übersicht Symons und Settleman, 2000). Die dominant-aktive nicht aber die dominant-inaktive Isoform von Rac1 inhibierte ebenfalls den HSV-1 Eintritt. Diese Beobachtung legt nahe, dass HSV-1 eine Inaktivierung von Rac1 zur erfolgreichen Infektion benötigt.

Die transiente Expression dominanter Rho GTPase Isoformen in MDCKII Zellen führte zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts, die spezifisch für die jeweilige Isoform der einzelnen Rho GTPase waren. Die Expression von L61 Rac1 führte zur Zellspreizung, zu Lamellipodia-Bildung und zu Aktin-Akkumulierung an Zell-Zell-Kontakten. Zellen mit N17 Rac1 Expression zeigten hingegen eine abgerundete Morphologie und waren beeinträchtigt in der Zellspreizung. Diese Veränderungen entsprechen dem regulatorischen Einfluss von Rac1 auf Prozesse der Plasmamembran-Protusion (Ridley *et al.*, 1992, zur Übersicht Hall, 1998). Erwartungsgemäß führte die Expression von L63 RhoA zur Bildung vieler Stressfibrillen, während in N19 RhoA exprimierenden Zellen keine Stressfibrillen beobachtet wurden (Ridley und Hall, 1992, zur Übersicht Hall 1998). Die Expression sowohl von L61 Cdc42 als auch N17 Cdc42 Isoformen führte in MDCKII Zellen zu Filopodia-Bildung, einem durch Cdc42 kontrollierten Prozess (Nobes und Hall, 1995, zur Übersicht Hall, 1998).

L61 Cdc42 und L61 Rac1 Expression führte darüber hinaus zu Stressfibrillen-Bildung, einem durch RhoA kontrollierten Prozess. Dies deutete auf eine Aktivierung endogenen RhoAs durch L61 Cdc42 und L61 Rac1 hin, wie dies auch in Fibroblasten beobachtet wird (Nobes und Hall, 1995, Ridley *et al.*, 1992). In Epithelzellen führt die Aktivierung von Cdc42 und Rac1 jedoch meist zu Stressfibrillen-Abbau (Zondag *et al.*, 2000). Vermutlich ist die Aktivierung von RhoA durch L61 Cdc42 und L61 Rac1 auf die Vereinzelung der MDCKII Zellen durch die Transfektionsbedingungen zurückzuführen, die einen eher mesenchymalen denn epithelialen Charakter der Zellen bedingt (zur Übersicht Schmitz *et al.*, 2000). dass ein Einfluss auf die HSV-1 Infizierbarkeit durch die potentielle Aktivierung endogenen RhoAs durch L61 Rac1 und L61 Cdc42 vermittelt wird, ist jedoch unwahrscheinlich,

da L63 RhoA keinen signifikanten Einfluss auf die HSV-1 Infektion hatte.

Interessanterweise führte die transiente Expression von N17 Cdc42 in MDCKII Zellen ebenfalls zu Stressfibrillen-Bildung, die vermutlich auf eine Aktivierung endogenen RhoAs zurückzuführen war. Dieser Prozess wird in Epithelzellen beobachtet, in denen die Signaltransduktionswege von Cdc42 und Rac1 denen von RhoA gegenübergestellt ist (Zondag *et al.*, 2000). Warum L61 Cdc42 und N17 Cdc42 unter den gleichen experimentellen Bedingungen ähnliche Prozesse kontrollieren, bleibt unklar.

Bemerkenswert ist, dass die transiente Expression von L61 Cdc42, L61 Rac1 und N17 Cdc42 eine extensive Aktin-Polymerisierung cortical und basal auslöste. In Analogie zu den JAS-Inhibitorstudien könnte dies auf eine Barriere-Funktion des polymerisierten F-Aktins hindeuten, das durch die Überexpression der dominanten Isoformen ausgelöst wurde.

Cdc42, Rac1 und RhoA können zusätzlich zu den Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts auch die Expression zellulärer Proteine beeinflussen (zur Übersicht Schmitz *et al.*, 2000). Effizienter HSV-1 Eintritt wurde über Nachweis der ICP0 Lokalisierung, einem Produkt sehr früher viraler Genexpression, nachgewiesen. Um einen Einfluss der Expression dominanter GTPase Isoformen auf die Expression von ICP0 auszuschließen, wurden Ko-Transfektionsexperimente durchgeführt. Dabei wurde ein Plasmid, das die Sequenz für ein ICP0-CFP Fusionsprotein unter der Kontrolle des ICP0 Promotors enthielt, mit je einem GTPase-Konstrukt ko-transfiziert. In MDCKII Zellen, die L61 Cdc42 exprimierten, wurde ein vergleichbarer Anteil an ICP0 exprimierenden Zellen beobachtet wie in Zellen, die N19 RhoA exprimierten. Im Gegensatz dazu wurde in Infektionsstudien von L61 Cdc42 exprimierenden MDCKII Zellen eine signifikante Reduktion des Anteils infizierter Zellen im Vergleich zu N19 RhoA exprimierenden Zellen beobachtet. Daher ist zu vermuten, dass die Expression des ICP0-Promotors durch die Expression GTPase Isoformen nicht beeinflusst wurde.

Bei den beschriebenen Transfektionsexperimenten lagen die MDCKII Zellen vereinzelt vor, bildeten gerade Adhärenz aus und zeigten Zellausbreitung. Eine epitheliale Morphologie war noch nicht zu erkennen. Um primären HSV-1 Eintritt im Zusammenhang mit der Signaltransduktion von Cdc42/Rac1 unter epithelialen

Bedingungen zu untersuchen, wurde daher der Einfluss der Cdc42/Rac1 Isoformen in induzierbaren Zelllinien untersucht. Die jeweilige Isoform stand unter der Kontrolle des tetracyclin-reprimierbaren Transaktivators und war in das Genom von MDCKII Zellen integriert. Die Expression von dominant-aktiven Rac1 in subkonfluenten MDCKII Zellen inhibierte ebenso viralen Eintritt wie die Expression von dominant-inaktivem Cdc42. Die Expression von dominant-aktivem Cdc42 hingegen hatte wie dominant-inaktives Rac1 keinen Einfluss auf die Infektion. Diese Ergebnisse sind weitgehend konform mit denen, die in transienten Expressionsstudien erzielt wurden. Eine Ausnahme bildet dominant-aktives Cdc42, das keinen Einfluss auf den HSV-1 Eintritt hatte.

Im Gegensatz zur transienten Expression der Isoformen von Cdc42 und Rac1 wurde ein unterschiedlicher Effekt durch die Induktion dieser Isoformen auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts beobachtet. Dominant-aktive Cdc42/Rac1 Isoformen zeigten nach transientser Expression die Ausbildung von starken Stressfibrillen, während nach induzierter Expression Stressfibrillen völlig abwesend waren. Nach transientser Expression ist eine hierarchische Aktivierung von RhoA wahrscheinlich, die zu Stressfibrillen-Bildung führt. In Epithelzellen sind die Signaltransduktionswege von Cdc42 / Rac1 denen von RhoA gegenübergestellt. Cdc42/Rac1 Aktivierung führt zu RhoA Inaktivierung (Zondag *et al.*, 2000). Dies war bei der Induktion von V12 Cdc42 und V12 Rac1 Expression in MDCKII Zellen der Fall, wie die Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts andeuteten. Dafür spricht auch die Anwesenheit vieler Stressfibrillen bei Induktion der Expression dominant-inaktiven Cdc42. Eine serielle Aktivierung der Rho GTPasen durch Induktion der Transgenexpression scheint nicht vorzuliegen. Die serielle Aktivierung von RhoA durch Cdc42 in Fibroblasten wird durch Aktivierung von Rac1 vermittelt (Nobes und Hall, 1995, Ridley *et al.*, 1992, zur Übersicht Hall, 1998). So ist zu vermuten, dass in transientser Expression Rac1 neben RhoA durch L61Cdc42 Expression aktiviert wird. Im Gegenzug ergaben sich keine experimentellen Hinweise auf eine serielle Aktivierung von Rac1 durch Induktion der V12 Cdc42 Expression. Diese Unterschiede könnten darauf hindeuten, dass Rac1 Aktivierung durch L61 Cdc42 in transientser Expression den Effekt auf die HSV-1 Infizierbarkeit vermittelt. Bei Induktion der V12 Cdc42 Infektion würde kein Effekt auf die HSV-1 Infektion auftreten, da Rac1 vermutlich nicht durch V12 Cdc42

aktiviert wurde. Diese ersten Hinweise deuten auf eine potentiell exklusive Rolle der Rac1 Aktivierung bei der Hemmung des HSV-1 Eintritts hin.

In zwei verschiedenen experimentellen Systemen wurde erstmals gezeigt, dass Rac1 und Cdc42 Signaltransduktion eine Rolle im Prozess des HSV-1 Eintritts ausüben. Die Expression dominanter Cdc42 und Rac1 Isoformen hatte das Potential den HSV-1 Eintritt zu hemmen. Die Expression der inhibierenden Isoformen wurde begleitet von verstärkter cortikaler Aktin-Polymerisierung, die eine Rolle der Aktin-Dynamik im Prozess des Eintritts nahelegt.

3.4 Einfluss von Effektoren der Cdc42/Rac1 Signaltransduktionswege auf die HSV-1 Infizierbarkeit von MDCKII Zellen

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Aktin-Dynamik und die Signaltransduktion von Cdc42 und Rac1 potentiell den HSV-1 Eintritt in Epithelzellen beeinflussen können. Um einen Einblick in die Signaltransduktionswege zu erhalten, die den inhibitorischen Effekt der Cdc42 und Rac1 Signaltransduktion auf die HSV-1 Infizierbarkeit vermitteln, wurde der Einfluss von zwei wichtigen Effektoren der Cdc42/Rac1 Signaltransduktion auf die HSV-1 Infektion untersucht.

In einem ersten Schritt zur Untersuchung beteiligter Signaltransduktionskomponenten wurde die Effektorenbindestelle von Rac1 analysiert.

In transienten Expressionstudien konnte gezeigt werden, dass dominant aktives Rac1, das Effektoren nicht mehr über die PBD binden kann, den HSV-1 Eintritt weniger inhibiert als dominant aktives Rac1, das alle Effektoren binden kann. Dominant aktives Rac1 hingegen, das keine Interaktion mit ROCK zeigen kann, minimierte die Zahl ICP0 exprimierender Zellen. Dies deutet auf die Vermittlung der Inhibierung der HSV-1 Infizierbarkeit aktivierten Rac1 durch Bindung von Effektoren über die PBD hin.

Eine Reihe von Effektoren sind beschrieben, die über PBD-Bindung von Rac1 / Cdc42 aktiviert werden (zur Übersicht Schmitz *et al.*, 2000). Besonders gut charakterisiert ist die Aktivierung der p21-aktivierten Kinasen (PAK). Sowohl Cdc42 als auch Rac1 können PAK-1 aktivieren (Manser *et al.*, 1994).

Zur Untersuchung des Einflusses von PAK-1 auf die HSV-1 Infektion wurden die dominant-aktive wie -inaktive und die Wildtyp-Isoform transient exprimiert. Da kein signifikanter Effekt auf die HSV-1 Infizierbarkeit durch die Expression dieser Isoformen beobachtet wurde, ergab sich kein Hinweis auf eine Beteiligung von PAK-1 an dem durch Cdc42/Rac1 ausgelösten inhibitorischen Effekt auf die HSV-1 Infizierbarkeit. Phänotypisch ruft die Expression der dominant-aktiven Isoform von PAK-1 Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts in HeLa Zellen und in Fibroblasten hervor, die den Veränderungen durch aktiviertes Cdc42 bzw. Rac1 entsprechen (Manser *et al.*, 1997). Bei Überexpression der PAK-1 Isoformen in MDCKII Zellen zeigte sich jedoch kein Effekt auf das Aktin-Zytoskelett. In einer neueren Studie konnte dazu gezeigt werden, dass PAK-1 Isoformen in MDCKII Zellen weder die Wundheilung noch die damit verbundenen Aktin-Prozesse beeinflusst, sondern die Kontaktinhibition der Zellen nach dem Schließen der Wunde beeinflusst (Zegers *et al.*, 2003). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Veränderungen der Aktin-Dynamik, die durch dominant-aktives Rac1 in MDCKII Zellen ausgelöst wurden, im Gegensatz zu Fibroblasten durch andere Effektoren vermittelt wird. Dabei ist nicht auszuschließen, dass es sich dabei um ein weiteres Mitglied der PAK-Familie handelt. Dass bei Expression der dominant-aktiven Isoform von PAK-1 keine stärkere Aktin-Polymerisierung und gleichzeitig keine Inhibierung viralen Eintritts beobachtet wurde, ist ein weiterer Hinweis, dass die Modulation der Aktin-Dynamik, die zu polymerem F-Aktin führt, der potentielle Prozess für die Inhibierung des erfolgreichen viralen Eintritts ist.

Der Arp2/3-Komplex ist für die Aktin-Polymerisierung verantwortlich, die dem Vorschieben von Membranen in Richtung der Migration zugrunde liegt. Ein spezifischer Effektor von Cdc42 fungiert dabei als Aktivator, das neuronale Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein (N-WASP) (zur Übersicht Carlier *et al.*, 2003). Die Überexpression der Bindedomäne von N-WASP (AA 201-321), die zur Hemmung der Effektoren-Bindung an endogen aktiviertes Cdc42 führt, zeigte keinen Einfluss auf die HSV-1 Infizierbarkeit. Das bedeutet, dass die durch dominant aktives Cdc42 (L61 Cdc42) ausgelöste Hemmung des Virus-Eintritts wahrscheinlich nicht auf der Aktivierung von N-WASP beruht. Da die Bindung der N-WASP Domäne an aktiviertes Cdc42 auch zu einer Blockierung weiterer Effektoren führte und damit zur

Inaktivierung von Cdc42 führen kann, legt das Ergebnis nahe, dass die Inaktivierung von endogenem Cdc42 nicht zur Hemmung des Viruseintritts führt. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Infektionsstudien N17 Cdc42 exprimierender Zellen. Die Gegenwart von dominant-inaktivem Cdc42 führte zu einer Reduktion HSV-1 infizierter Zellen. Eine mögliche Erklärung dieses Widerspruchs wäre, wenn das exprimierte N-WASP Fragment nur geringe Affinität zu Cdc42-GTP zeigen würde und damit nicht zur Inaktivierung von Cdc42 führen würde. Da die Funktionalität des N-WASP Fragments hingegen in Bindungsstudien zu Cdc42-GTP bestätigt wurde (Braga, pers. Mitteilung), ist diese Möglichkeit unwahrscheinlich. Das N-WASP Fragment und dominant-inaktives Cdc42 zeigen funktionell unterschiedliche Effekte in der Inhibierung der Cdc42 Signaltransduktion. Wird das N-WASP Fragment exprimiert, kann endogenes Cdc42 zwar aktiviert werden, es findet jedoch keine Folgeaktivierung von Effektoren statt. Dominant-inaktives Cdc42 hingegen bindet kompetitiv GEF-Proteine (engl. guanine nucleotide exchange factors), die den aktiven GTP-gebundenen Zustand von Rho GTPasen fördern (zur Übersicht Böttner und Van Aelst, 1999, Feig, 1999, Bishop und Hall, 2000). Dabei kann N17 Cdc42 selbst nicht aktiviert werden. Die Folge ist, dass endogenes Cdc42 nicht mehr durch die titrierten GEF Proteine aktiviert werden kann. Dabei sind einige GEF Proteine in der Lage mehrere Rho GTPasen zu aktivieren, so dass gegebenenfalls nicht nur die Aktivierung von Cdc42 betroffen wäre. Im Vergleich des Effektes der Überexpression des N-WASP Fragments und des dominant-inaktiven Cdc42 auf das Aktin-Zytoskelett zeigte sich ein deutlicher Unterschied, der darauf hinweist, dass die Signaltransduktion zum Aktin-Zytoskelett unterschiedlich beeinflusst wird. Dies könnte bedeuten, dass möglicherweise die Inhibierung der Signaltransduktion von Cdc42 selbst keinen Effekt auf die Infizierbarkeit von MDCKII Zellen durch HSV-1 hat. Die durch N17 Cdc42 Expression ausgelöste Inhibierung der HSV-1 Infizierbarkeit wäre dann auf die Beeinflussung weiterer Rho GTPasen durch N17 Cdc42 zurückzuführen. Diese theoretischen Überlegungen setzen jedoch voraus, dass das N-WASP Fragment und N17 Cdc42 im untersuchten experimentellen System die publizierten Effekte ausübten.

An diesem Beispiel wird die experimentelle Limitierung der verwendeten dominanten Isoformen von Signaltransduktionskomponenten deutlich. Dominant inaktive GTPase

Isoformen üben ihren Effekt über eine Inaktivierung von GEFs aus. Dabei wird unter anderem die mögliche Aktivierung endogener GTPasen über GEF-unabhängige Mechanismen vernachlässigt. Zusätzlich könnten durch eine N17 GTPase Isoform weitere GTPasen inaktiviert werden, die von GEF Proteinen mit breiterer Spezifität aktiviert werden. Im Gegenzug könnten dominant aktive Isoformen bestimmte Prozesse durch starke oder lokal nicht begrenzte Aktivierung hemmen, wie dies bei der Zell-Migration beobachtet wird (zur Übersicht Symons und Settleman, 2000). Es existieren mindestens 21 Mitglieder der Rho GTPase-Familie, die zum Teil redundante Funktionen ausüben. Eine potentielle Rolle der meisten dieser Rho GTPasen wurde vernachlässigt. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf Untersuchungen zur Rolle von Cdc42, Rac1 und RhoA, da die Funktionen dieser Proteine am besten charakterisiert sind.

3.5 HSV-1 induzierte Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts

Die vorliegende Arbeit ergab erste Hinweise auf eine Beeinflussung des HSV-1 Eintritts in MDCKII Zellen durch Aktin-Dynamik und die Cdc42/Rac1 Signaltransduktion. Im Gegenzug wurde die Frage untersucht, ob HSV-1 während seines Infektionszyklus Aktin-dynamische Prozesse beeinflusst. Veränderungen, die durch Proteine des Virions hervorgerufen werden, treten dabei häufig biphasisch auf: Während des viralen Eintritts und bei der Expression dieser viralen Proteine im Infektionszyklus.

In Zeitkurven-Experimenten mit zwei verschiedenen HSV-1 Subtypen konnte gezeigt werden, dass signifikante Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts während der HSV-1 Infektion vermutlich unabhängig von den morphologischen Veränderungen des CPE auftraten: In peripheren MDCKII Zellen von Zell-Inseln wurde häufig ein dickes Aktin-Bündel der Cortex an der Zell-Matrix-Grenze beobachtet. Eintretende HSV-1 Kapside hingegen wurden 1 h p.i. häufiger in Lamellipodia und lokalen Membran-kräuselungen beobachtet, deren vermehrtes Auftreten mit der Infektion korrelierte. Lamellipodia sind Bereiche erhöhter Aktin-Dynamik der Cortex, die durch Aktin-Polymerisierung ein Verschieben der Plasmamembran in Migrationsrichtung bewirken (zur Übersicht Stossel, 1993). Die neu polymerisierten Aktin-Filamente

werden anschließend in das Zellinnere transportiert, wo ein Abbau stattfindet (Theriot und Mitchison, 1991). Dieser Rücktransport und nachfolgende Abbau von F-Aktin könnte den Durchtritt von Virionen durch die Cortex erleichtern.

Im Infektionsverlauf waren zytoplasmatische ICPO Lokalisierung und die Ansammlung von neu gebildeten Kapsiden im Zellkern begleitet von Filopodia-Bildung und dem vermehrten Auftreten von ungeordneten, kurzen Stressfibrillen. Aktin-Polymerisierung übt in Keratinozyten bei der Bildung von Zell-Zell-Verbindungen durch Filopodia eine entscheidende, initiale Rolle bei der ersten Verankerung von E-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Verbindungen der Zonula adhaerens aus (Vasioukhin *et al.*, 2000). Der Prozess der Zell-Zell-Verbindungsbildung durch Filopodia in Keratinozyten ist begleitet von einer Rekrutierung von Mena/VASP-Proteinen zu diesen sog. Adhäsions-Reißverschlüssen (Vasioukhin *et al.*, 2000). Im Infektionsverlauf der HSV-1 Infektion in MDCKII Zellen wurde ebenfalls eine Relokalisierung von Mena und VASP sowie eine Dephosphorylierung von VASP zu diesem Zeitpunkt der Infektion beobachtet (Jansen, 2003). Dies könnte darauf hindeuten, dass ein analoger Prozess der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten ebenfalls in MDCKII Zellen durch virale Faktoren der HSV-1 Infektion vermittelt wird. Die Filopodia-Bildung könnte demnach initial dem Erhalt oder der Verstärkung von Zell-Zell-Verbindungen dienen. Dieser Erhalt von Zell-Zell-Verbindungen könnte die Ausbreitung von HSV-1 (S17) über interzelluläre Zell-Zwischenräume fördern. Im Falle von HSV-1 (ANG path), das sich über Zellfusion ausbreitet, könnte ein engerer Abstand der Plasmamembranen benachbarter Zellen den Fusionsprozeß erleichtern. Zusätzlich trat eine vermehrte Stressfibrillen-Bildung auf, die eine Kontraktion der Zelle und vermehrte Zell-Matrix-Adhäsion zur Folge hat (zur Übersicht Burrridge *et al.*, 1988). Dabei zeigten diese Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts im Infektionsverlauf deutliche Ähnlichkeiten zu den Effekten, die dominant-aktives Cdc42/Rac1 respektive dominant-inaktives Cdc42 auf vereinzelte MDCKII Zellen ausübten. Diese Veränderungen könnten daher durch Rho-ähnliche GTPase Signaltransduktion oder analoge Mechanismen reguliert werden.

Die beschriebenen Aktin-Veränderungen während des HSV-1 Infektionszyklus liefern erste Hinweise auf mögliche Funktionen des Aktin-Zytoskeletts bei dem Eintritt und

der Ausbreitung von HSV-1 in MDCKII Zellen. Diese Veränderungen sind möglicherweise auf die Gegenwart eines viralen Proteins zurückzuführen und könnten durch Rho-ähnliche GTPase Signaltransduktion oder analoge Mechanismen reguliert werden. Dabei könnte ein spät im Infektionszyklus exprimiertes Protein als Bestandteil des Virions gleichzeitig eine Funktion während des Eintritts und der Ausbreitung von HSV-1 ausüben.

3.6 Implikationen der Cdc42/Rac1 Signaltransduktionsprozesse in der HSV-1 Infektion

Die vorliegende Arbeit ergab Hinweise auf eine Rolle der Signaltransduktion von Cdc42 und Rac1 im Prozess des zellulären HSV-1 Eintritts. Da die Expression von ICP0 als Marker für effizienten HSV-1 Eintritt genutzt wurde, könnte prinzipiell jeder einzelne oder gleich mehrere Schritte des HSV-1 Eintritts beeinflusst werden. Daher beeinflusst die Cdc42/Rac1 Signaltransduktion möglicherweise HSV-1 Partikel in der Bindung an die Zelloberfläche, in der Penetration der Plasmamembran, im viralen Transport durch das Zytoplasma bis hin zu der Freisetzung des viralen Genoms in den Zellkern. Die Korrelation von spezifischen F-Aktin-Strukturen der Infizierbarkeit von MDCKII Zellen bei der Expression dominanter GTPase Isoformen deutet indirekt auf eine Rolle von Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts in diesem Prozess hin. Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der Hemmung der HSV-1 Infizierbarkeit durch die Expression dominanter Isoformen von Cdc42/Rac1, der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und einem spezifischen Schritts des HSV-1 Eintritts konnte bisher nicht gezeigt werden.

Da die Vermittlung viralen Eintritts durch Signaltransduktionsprozesse ein neueres Forschungsfeld ist, liegen bisher wenige Erkenntnisse zum Einfluss von Signaltransduktionsprozessen auf den Eintritt oder die Infektion von Herpesviren vor. Der Einfluss zellulärer Signaltransduktion auf den Eintritt des humanen Herpesvirus 8 (HHV-8) ist dabei am Besten charakterisiert. HHV-8 kann Integrine als zelluläre Rezeptoren zum Eintritt in die Wirtszelle über Endozytose nutzen (Akula *et al.*, 2002, Akula *et al.*, 2003). Dabei bindet das HHV-8 Glykoprotein B (gB) über ein RGD-Motiv das Integrinpaar $\alpha 3/\beta 1$ (Wang *et al.*, 2003a). HHV-8 Infektion führt ab 5 min p.i. zur

Integrin-abhängigen Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-Kinase) und der Protein-Kinase C ζ (PKC ζ). Darauf folgt die Aktivierung der MEK/ERK1/2 Signaltransduktionswege sowie der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) (Naranatt *et al.*, 2003). Diese Aktivierungskaskade geht einher mit einer Reorganisation des Zytoskeletts (Naranatt *et al.*, 2003). Inhibierung dieser Signaltransduktionskomponenten reduzierte die HHV-8 Infizierbarkeit von Zellen. Dabei scheint die Aktivierung der PI 3-Kinase direkt am Eintrittsprozess beteiligt zu sein. Dies zeigen Untersuchungen zum Eintritt viraler DNA in den Nukleus. Dagegen besitzen die PKC ζ und die MEK-ERK1/2 Signaltransduktionswege eher eine nachfolgende Rolle (Naranatt *et al.*, 2003). Studien zum Einfluss zellulärer Signaltransduktion auf die HSV Infektion beschränken sich weitgehend auf Mechanismen zur Vermeidung zellulärer Apoptose. Zwei HSV Proteine stehen dabei im Fokus: ICP10 und Us3. HSV-2 ICP10, eine Protein-Kinase, kann über Ras Aktivierung den MEK/MAPK Signaltransduktionsweg stimulieren (Smith *et al.*, 2000). Die folgende MEK/MAPK Signaltransduktionskaskade induziert die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bag-1, so dass ICP10 anti-apoptotisch wirkt (Perkins *et al.*, 2002, Perkins *et al.*, 2003). Us3, eine Ser/Thr-Kinase mit Homologien zu PAK, wirkt ebenfalls anti-apoptotisch, vermutlich über die Inaktivierung von Bad, einem pro-apoptotischen Regulationsprotein (Hagglund *et al.*, 2002b, Cartier *et al.*, 2003). Daneben beschreibt eine Studie, dass die HSV-1 Translation durch Inhibierung der Ras Signaltransduktionswege gehemmt werden kann (Farassati *et al.*, 2001). Diese Studien deuten darauf hin, dass Signaltransduktionsprozesse bei Herpesvirus Infektionen eine essentielle Rolle in einer Reihe von Prozessen, so unter anderem beim viralem Eintritt, einnehmen können. Es wird angenommen, dass HHV-8 die zellulären Prozesse der Integrin-vermittelten Endozytose einerseits zum Eintritt nutzt und andererseits durch Modulation der Integrin Signalkaskaden ein geeignetes intrazelluläres Umfeld für die Infektion erzeugt (Naranatt *et al.*, 2003). Möglicherweise könnte diese potentiell duale Rolle von Signaltransduktionsprozessen bei der HHV-8 Infektion ebenfalls bei dem Eintritt von HSV-1 in Epithelzellen eine Bedeutung besitzen.

4 Modell des HSV-1 Eintritts in Epithelzellen

Wie stellt sich nun der Eintritt von HSV-1 in Epithelien *in vivo* im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dar ?

Da HSV-1 einen Tropismus für basale / basolaterale Oberflächen von Epithelien zeigte, lässt sich effizienter, primärer HSV-1 Eintritt über Zugang zu basalen Oberflächen erklären. Dabei ist die Nutzung von Mikrolesionen und Verwundungen der Haut bzw. Schleimhäute der einzige Weg einen erfolgreichen primären Eintritt zu gewährleisten, da in intakten Epithelien die Barriere-Funktion des Stratum corneums oder enge Zell-Zell-Verbindungen den Eintritt von HSV-1 limitierten. Ob HSV-1 dabei auf die Nutzung ausschließlich basal / basolateral exprimierter Oberflächenrezeptoren angewiesen ist bleibt zunächst unklar. Es bliebe zu klären, welcher der Rezeptoren, die HSV-1 zum Eintritt in Zellkulturen nutzen kann, tatsächlich *in vivo* verwendet wird oder ob weitere potentielle Rezeptormoleküle existieren wie z.B. Integrine oder der EGF Rezeptor, die für den zellulären Eintritt von HHV-8 und CMV genutzt werden können (Akula *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2003a).

Wenn HSV-1 Zugang zu basalen Oberflächen oder unpolarierten Zellen hatte, war der Eintritt effektiv. Diese Effektivität wurde herabgesetzt, wenn verschiedene Prozesse der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst wurden.

Wurde F-Aktin stabilisiert oder zusätzlich polymerisiert, wurde eine deutliche Reduktion der HSV-1 Infizierbarkeit beobachtet. Im Gegenzug, wurde F-Aktin depolymerisiert, war der Eintritt in individuelle Zellen nicht beeinflusst. In Epithelzellen zeigt die apikal lokalisierte Aktin-Cortex eine vergleichsweise stabile Organisation und bildet ein besonders dichtes und dickes Netz an corticalen Filamenten aus (Hirokawa und Heuser, 1981). In diesen Zellen wurde nur selten Eintritt beobachtet. In Epithelzellen, die migratorische Aktivität zeigten und die ein hoch dynamisches Aktin-Zytoskelett besitzen, war der HSV-1 Eintritt effizient. Unter der Annahme, dass HSV-1 in Epithelzellen hauptsächlich über Fusion der Hüllmembran mit der Plasmamembran der Wirtszelle Zugang zur Zelle erhält, muss das virale Kapsid die Aktin-Cortex penetrieren, um durch das Zytoplasma zum Zellkern transportiert werden zu können. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das dichte Netzwerk der Aktin-Cortex eine natürliche Barriere für den Zugang von

HSV-1 zum Zytoplasma bildet.

Wie könnte das Kapsid nun eine erhöhte Aktin-Dynamik insbesondere Lamellipodia-ausbildender Zellen für den Eintritt in Epithelzellen nutzen? Theriot und Mitchinson berichteten bereits 1991, dass ein rückwärts gerichteter Fluss von polymerisiertem Aktin an Lamellen stattfindet. Sie postulierten Modelle für diesen Prozess, in denen polymeres Aktin in den Zellkörper zurücktransportiert wird, wo ein Abbau desselben stattfindet. Dabei könnten Kapside, die im dichten F-Aktin der Lamellen festsitzen, mit diesem polymeren F-Aktin in den Zellkörper transportiert und dort freigesetzt werden (Abb. V.1). Aktin-Stabilisierung und vermehrte Aktin-Polymerisierung, die durch Jasplakinolide bzw. durch die Expression von dominant-aktivem Cdc42/Rac1 ausgelöst wurde, würden mit diesem Prozess interferieren. In dieser Arbeit konnte nicht geklärt werden, ob HSV-1 selbst lokale Aktin-Depolymerisierung und/oder Aktivierung von Aktin-Dynamik beeinflusst, um so den Eintritt zu erzwingen. Da HSV-1 Infektionsstudien zeigten, dass die Signaltransduktion der Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 die Infizierbarkeit von MDCKII Zellen beeinflussten, ist eine Beteiligung der entsprechenden Signaltransduktionswege an diesem Prozess potentiell von Bedeutung.

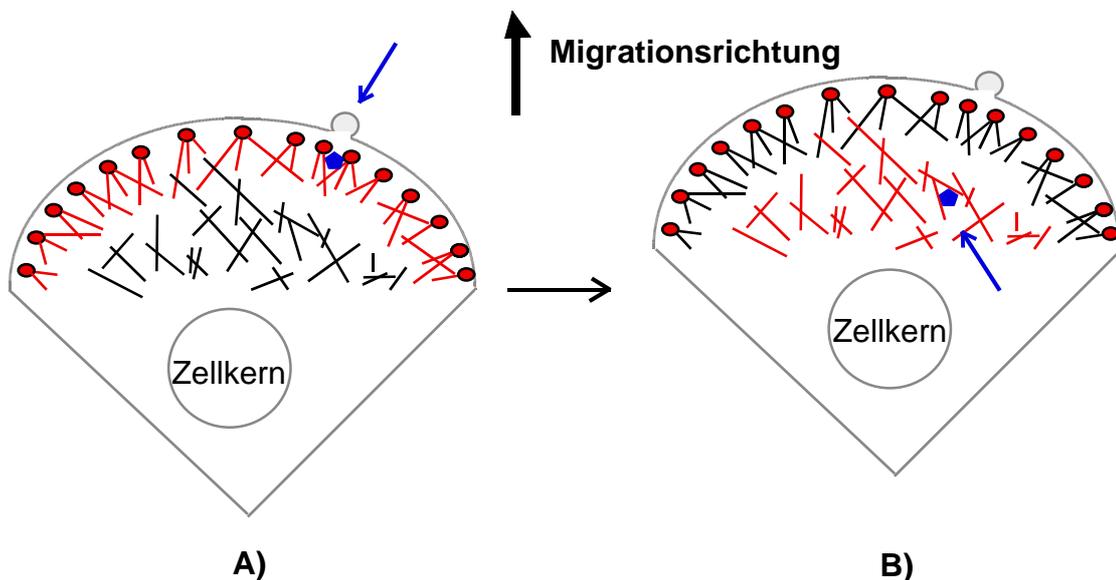


Abb. V.1: Modell des HSV-1 Eintritts in migrierenden Epithelzellen

A) Nach Penetration der Plasmamembran befinden sich HSV-1 Partikel (blau, siehe Pfeil) im dichten Aktin-Netzwerk des corticalen Lamellipodiums (rot). B) Bei Rücktransport des polymeren Aktins werden HSV-1 Partikel (blau, siehe Pfeil) in das Zellinnere transportiert, wo ein Abbau des polymeren Aktins (rot) stattfindet und dadurch eine Freisetzung der HSV-1 Partikel stattfinden.

5 Ausblick

Diese Arbeit beschreibt den polaren Eintritt von HSV-1 in Epithelzellen. Darüber hinaus wurden die Implikation des Aktin-Zytoskeletts und der damit verbundenen Signaltransduktion für den Eintritt in eine polare epitheliale Zelllinie beschrieben. Erste Hinweise deuten auf eine Hemmung der HSV-1 Infizierbarkeit durch Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts hin. Die Signaltransduktion der Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 hatte das Potential mit dem Eintritt zu interferieren. Dabei bleibt der kausale Zusammenhang zwischen der Hemmung der HSV-1 Infizierbarkeit durch die Cdc42/Rac1 Signaltransduktion und dem Aktin-Zytoskelett zu klären.

5.1 Wird die Aktivität von Cdc42 / Rac1 während des Eintritts von HSV-1 beeinflusst ?

Die negative Beeinflussung des viralen Eintritts durch z.B. dominant-aktives Rac1 könnte auf eine Inaktivierung von Rac1 durch HSV-1 für effektiven viralen Eintritt hindeuten. Alternativ könnte die Aktivierung von Rac1 über die Dynamik von Lamellipodia den Durchtritt von HSV-1 durch die Aktin-Cortex erleichtern. Um zu überprüfen, ob der Eintritt von HSV-1 die Aktivität von Rac1 oder Cdc42 beeinflusst, sind weitere Studien notwendig. Eine Möglichkeit die Aktivierung von Rho-ähnlichen GTPasen nachzuweisen, liegt in der Affinität GTP-gebundenen Cdc42/Rac1 zu ihren Effektoren über die PBD. In sog. PBD-pull-down Experimenten können aus Zellextrakten selektiv die aktivierten GTPasen über immobilisierte PBD-Moleküle isoliert werden und im HSV-1 Infektionsverlauf quantitativ im Vergleich zur Gesamtmenge dieser GTPasen über Western-Blotting bestimmt werden.

5.2 Sind Cdc42 oder Rac1 Signaltransduktionsprozesse am Eintritt von HSV-1 beteiligt ?

Erste Hinweise auf ein einzelnes, bestimmendes Zielmolekül der Rho GTPasen in bezug auf die HSV-1 Infizierbarkeit könnten in den oben genannten Aktivierungsstudien aus einer potentiell selektiven Aktivierung bzw. Inaktivierung

einer GTPase erhalten werden. Weitere Hinweise könnten durch die kombinatorische Expression verschiedener dominanter Isoformen Rho-ähnlicher GTPasen gefolgt von HSV-1 Infektion erhalten werden. Würde gleichzeitig dominant-aktives Cdc42 und dominant-inaktives Rac1 exprimiert, würde der Effekt einer hierarchischen Aktivierung endogenen Rac1 durch Expression des dominant-inaktiven Rac1 minimiert. So könnten Hinweise darüber erhalten werden, ob Cdc42 Aktivierung ohne nachfolgende Aktivierung von Rac1 einen Effekt auf die HSV-1 Infizierbarkeit ausüben würde. Mehrere Kombinationen der Ko-Expression dominanter Isoformen zur Untersuchung der wechselseitigen Beziehungen von Rho GTPasen sind denkbar.

5.3 Welche frühen Ereignisse der HSV-1 Infektion werden durch die Cdc42/Rac1 Signaltransduktion beeinflusst ?

Da die Cdc42/Rac1 Signaltransduktion am wahrscheinlichsten mit einem der Schritte des HSV-1 Eintritt in die Wirtszelle interferiert, könnte mittels strukturellen Proteinen, die mit autofluoreszierenden Polypeptiden markiert sind, der Verbleib des Virions sichtbar gemacht werden. Es existieren bereits eine Reihe rekombinanter Viren, bei denen HSV-1 Glykoproteine (Potel *et al.*, 2003), Tegument-Proteine (Donnelly und Elliott, 2001) oder das Kapsid (Desai und Person, 1998) markiert wurden. Bei HSV-1 Infektion der induzierbaren MDCKII T23 V12 Rac1 Zellen kann bei Kofärbung des Aktin-Zytoskeletts der Verbleib der entsprechenden strukturellen Komponenten bestimmt werden.

5.4 Sind Integrine am HSV-1 Eintritt als Rezeptoren beteiligt ?

Der Einfluss des Aktin-Zytoskeletts und der respektiven Signaltransduktion auf den HSV-1 Eintritt könnte auf Integrine oder den EGF Rezeptor als virale Rezeptoren hindeuten, die bei Ligand-Rezeptor-Bindung bekanntermaßen Aktin-Dynamik über transduzierte Signale modulieren (zur Übersicht Webb *et al.*, 2002, Boulougouris und Elder, 2001). Weitere Herpesviren wie HHV-8 (Integrine) oder CMV (EGF Rezeptor) können diese als virale Rezeptoren nutzen (Akula *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2003b).

Eine potentielle Nutzung dieser Moleküle als HSV-1 Korezeptoren wurde bisher nicht untersucht. Erste Hinweise auf die Nutzung von Integrinen als HSV-1 Rezeptoren in den verwendeten Epithelmodellen könnte über Infektion von MDCKII Zellen auf verschiedenen Matrix-Oberflächen wie z.B. Laminin erhalten werden, bei denen die Expression nur bestimmter Integrine angeregt und weiterer Integrine minimiert wird. Weitere Hinweise könnten über Antikörper-Blockierungs-Experimente erhalten werden, in denen der EGF Rezeptor blockiert wird oder die verschiedenen Integrine separat oder gemeinsam blockiert werden.

VI. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse über Eintrittsmechanismen von HSV-1 in Epithelzellen zu erhalten. Dabei stellen Keratinozyten die primären Wirtszellen der HSV-1 Infektion *in vivo* dar. Es wurde zunächst der initiale Ort des Eintritts in individuelle Zellen der polaren, epithelialen MDCKII Zelllinie und primärer, humaner Keratinozyten-Kulturen untersucht. Der erfolgreiche Viruseintritt wurde hauptsächlich durch den Nachweis der ICP0 Expression, eines sehr frühen viralen Gens, in Immunfluoreszenzstudien sichtbar gemacht.

Nach Infektion konfluenter MDCKII Zellen wurde ICP0 Expression auch bei höherer Virusdosis nur selten beobachtet. Nach Verwundung konfluenter MDCKII Zellen war hingegen ICP0 Expression in Zellen entlang der Verwundungsgrenze sichtbar, deren basolaterale Membrandomänen für HSV-1 Partikel zugänglich waren. Subkonfluente MDCKII Zellen sind in Zell-Inseln organisiert. Nach HSV-1 Infektion wurden virale Kapside und ICP0 Expression vorrangig in peripheren Zellen der Zell-Inseln beobachtet. Diese Beobachtungen legten die Penetration des Virus über basolaterale Membrandomänen nahe. In Infektionsstudien primärer Keratinozyten-Einschicht-Kulturen wurde nach Verwundung ICP0 Expression hauptsächlich in Zellen entlang der Verwundung detektiert. Wenn stratifizierende Keratinozyten-Kulturen infiziert wurden, war die Expression von ICP0 limitiert auf die peripheren Zellen der basalen Zellschicht. Infektion humaner Vorhaut-Epidermis-Explant-Kulturen führte zu HSV-1 Eintritt ausschließlich in die basalen Zellschichten. Diese Ergebnisse deuteten auf einen HSV-1 Eintrittsmechanismus hin, der auf der Zugänglichkeit basaler Oberflächen von humaner Hautepidermis und basolateraler Membranen von MDCKII Zellen und von primären Keratinozyten beruht.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden potentielle, molekulare Determinanten des HSV-1 Eintritts in Epithelzellen untersucht. Neben Heparan Sulfat wird Nectin-1 als Korezeptor für den HSV-1 Eintritt in Zellkultur beschrieben. Lokalisierungsstudien in primären Keratinozyten zeigten keine Korrelation der Rezeptorlokalisierung und des HSV-1 Tropismus, so dass es weiterhin keine Evidenz für Nectin-1 als Virusrezeptor in Keratinozyten gibt. Die Beteiligung des HSV-1 Glykoproteins D am Viruseintritt wurde durch Blockierungsexperimente bestätigt. Das carboxylische Ionophor

Monensin inhibierte effizienten HSV-1 Eintritt in HeLa Zellen in Dosis-abhängiger Weise, während HSV-1 Eintritt in MDCKII Zellen nicht beeinflusst wurde. Dieser erster Hinweis deutete auf einen HSV-1 Eintrittsmechanismus in MDCKII Zellen über pH-unabhängige Fusion hin.

HSV-1 Eintritt wurde bevorzugt in MDCKII Zellen und Keratinozyten mit erhöhter migratorischer Aktivität beobachtet, die durch Aktin-dynamische Prozesse vermittelt wird. F-Aktin-Stabilisierung in subkonfluenten MDCKII Zellen durch Jasplakinolide führte zu einer Dosis-abhängigen Reduktion infizierter Zellen, während Aktin-Depolymerisierung durch Cytochalasin D keinen Einfluss auf die Infizierbarkeit individueller Zellen hatte. Hierdurch wurde ein erster, experimenteller Hinweis auf eine potentielle Barriere-Funktion des Aktin-Zytoskeletts für die HSV-1 Infektion erhalten.

Signaltransduktionsprozesse der Rho-ähnlichen GTPasen, Cdc42, Rac1 und RhoA regulieren die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts bei zellulärer Migration. Transiente Expression dominanter GTPase Isoformen in vereinzelt MDCKII Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der HSV-1 Infizierbarkeit, falls dominant-aktive Isoformen von Rac1 und Cdc42 sowie die dominant-inaktive Isoform von Cdc42 exprimiert wurden. Transiente Ko-Expressionsexperimente zeigten weiterhin, dass die Hemmung der Infizierbarkeit nicht auf eine negative Regulierung des ICP0 Promotors zurückzuführen war. Die Expression weiterer dominanter sowie der Wildtyp-Isoformen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Infizierbarkeit. Der potentielle Einfluss der Signaltransduktion von Cdc42 und Rac1 auf die HSV-1 Infizierbarkeit wurde anschließend in stabil transfizierten MDCKII Zellen überprüft, die dominante Rac1 und Cdc42 Isoformen induzierbar exprimierten. Die Expression von dominant aktivem Rac1 und dominant inaktivem Cdc42 führte zu einer signifikanten Reduktion der HSV-1 Infizierbarkeit, während dominant aktives Cdc42 keinen Einfluss auf den HSV-1 Eintritt ausübte. Die unterschiedliche Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts nach Expression dominanter GTPase Isoformen deutete an, dass die Aktivierungskaskaden der Rho GTPasen nach transienter Expression und in stabil transfizierten Zellen unterschiedlich verlaufen. Diese Unterschiede können für die hemmende Wirkung von dominant aktivem Cdc42 nach transienter Expression einerseits und dem fehlenden Effekt auf die Infizierbarkeit in stabil

transfizierten Zellen verantwortlich sein. Untersuchungen zum Einfluss der Cdc42/Rac1 Signaltransduktionswege auf die HSV-1 Infizierbarkeit ergaben keine Hinweise auf eine direkte Beteiligung von PAK-1 oder N-WASP in diesem Prozess.

Im Gegenzug wurde der Einfluss der HSV-1 Infektion auf Aktin-dynamische Prozesse im Infektionsverlauf untersucht. Im Verlauf der HSV-1 Infektion wurden Veränderungen der Organisation des Aktin-Zytoskeletts unabhängig von den morphologischen Veränderungen des zytopathischen Effekts beobachtet, die möglicherweise eine Rolle in der Ausbreitung des Virus besitzen könnten.

Die Studien der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals einen Einfluss epithelialer Polarität humaner Epidermis-Modelle auf den HSV-1 Eintritt. Darüber hinaus ergaben sich erstmals Hinweise auf eine Implikation der Signaltransduktionsprozesse von Rac1 und Cdc42 der damit verbundenen Dynamik des Aktin-Zytoskeletts im Prozess des zellulären HSV-1 Eintritts. Sie eröffnen damit ein neues Arbeitsfeld zur Erforschung von HSV-1 Eintrittsmechanismen: Die Bedeutung der zellulären Signaltransduktion des Aktin-Zytoskeletts.

VII. Literaturverzeichnis

Akula, S.M., Pramod, N.P. Wang, F.Z. und B. Chandran (2002):

Integrin alpha3/beta1 (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) entry into the target cells. *Cell* **108**, 407-419.

Akula, S.M., Naranatt, P.P., Walia, N.S., Wang, F.Z., Fegley, B. und B. Chandran (2002):

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) infection of human fibroblast cells occurs through endocytosis. *J. Virol.* **77**, 7978-7990

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y. und K. Kaibuchi (1996):

Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* **271**, 20246–20249.

Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O., und P. Caroni (1998):

Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM kinase. *Nature* **393**, 805–809.

Bear, J.E., Krause, M. und F.B. Gertler (2001):

Regulating cellular actin assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 158-166.

Bearer, E.L., Breakefield, X.O., Schuback, D., Reese, T.S. und J.H. LaVail (2000):

Retrograde axonal transport of herpes simplex virus: evidence for a single mechanism and a role for tegument. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2777-2785.

Bell, E., Ehrlich, H.O., Buttle, D.J. und T. Nakatsuji (1981):

A living tissue formed in vitro and accepted as full thickness skin equivalent. *Science* **211**, 1274-1278.

Bishop, A. L. und A. Hall (2000):

Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348**, 241–255.

Böttner, B. und L. Van Aelst (1999):

Rac and Cdc42 effectors. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **22**, 136–158.

Bomsel, M. und A. Alfsen (2003):

Entry of viruses through the epithelial barrier: Pathogenic trickery.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **4**, 57-68.

Boulougouris, P. und J. Elder (2001):

Epidermal growth factor receptor structure, regulation, mitogenic signalling and effects of activation. *Anticancer research* **21**, 2769-2775.

Boutell, C., Sadis, S. und R.D. Everett (2002):

Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *J. Virol.* **75**: 841-850.

Boyce, F.M. und N.L.R. Bucher (1996):

Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 2348-2352.

Bretscher, A. (1991):

Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton.
Annu. Rev. Cell Biol. **7**, 337-374.

Brock, T.A. und J.B. Smith (1982):

Reversible stimulation of the Na⁺/K⁺ pump by monensin in cultures of vascular smooth muscle. *Life Sci.* **31**, 1043-1050.

Bubb, M.R., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Duncan, K.L. und E.D. Korn (1994):

Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14869-14871.

Burridge, K., Fath, K. Kelly, T., Nuckolls, G. und C. Turner (1988):

Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 487-525.

Campadelli-Fiume, G., Cocchi, F., Menotti, L. und M. Lopez (2000):

The novel receptors that mediate entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev. Med. Virol.* **10**, 305-319.

Carlier, M.F. (1991):

Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* **266**, 1-4.

Carlier, M.F., Le Clainche, C., Wiesner, S. und D. Pantaloni (2003):

Actin-based motility: from molecules to movement. *Bioessays* **25**, 336-345.

Cartier, A., Komai, T. und M.G. Masucci (2003):

The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad. *Exp. Cell Res.* **15**, 242-250.

Cocchi, F., Menotti, L., Mirandola, P., Lopez, M. und G. Campadelli-Fiume (1998):

The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin superfamily related to the poliovirus receptor has the attributes of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. *J. Virol.* **72**, 9992-10002.

Desai, P. und S. Person (1998):

Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J. Virol.* **72**, 7563-7568.

Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T. and R. Snyderman (1989):

Rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.* **264**, 16378-16382.

Döhner, K., Wolfstein, A., Prank, U., Echeverri, C., Dujardin, D., Vallee, R. und B. Sodeik (2002):

Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol. Biol. Cell* **13**:2795-2809.

Donnelly, M. und G. Elliot (2001):

Fluorescent tagging of herpes simplex virus tegument protein VP13/14 in virus infection. *J. Virol.* **75**, 2575-83.

Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M. und G. N. Gill (1999):

Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeleton dynamics. *Nat. Cell Biol.* **1**, 253–259.

Farassati, F., Yang, A.D. und P.W.K. Lee (2001):

Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. *Nat. Cell Biol.* **3**, 745-750.

Feig, L. A. (1999):

Tools of the trade: Use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat. Cell Biol.* **1**, E25–E27.

Fliesler, S.J. und S.F. Basinger (1987):

Monensin stimulates glycerolipid incorporation into rod outer segment membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 17516-17523.

Fristrom, D. (1988):

The cellular basis of epithelial morphogenesis. A review. *Tissue Cell* **20**, 645-690.

Fuchs, E. und S. Raghavan (2002):

Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat. Rev. Genetics* **3**, 199-209.

Fukata, Y., Oshiro, N., Kinoshita, N., Kawano, Y., Matsuoka, Y., Bennett, V., Matsuura, Y. und K. Kaibuchi (1999):

Phosphorylation of adducin by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *J. Cell Biol.* **145**, 347–361.

Fuller, A. O., Santos, R.E. und P. G. Spear (1989):

Neutralizing antibodies specific for glycoprotein H of herpes simplex virus permit viral attachment to cells but prevent penetration. *J. Virol.* **63**, 3435–3443.

Fuller, A. O. und P. G. Spear (1987):

Anti-glycoprotein D antibodies that permit adsorption but block infection by herpes simplex virus 1 prevent virion-cell fusion at the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 5454–5458.

Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. und P.G. Spear (1998):

Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**, 1618–1620.

Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J. und P. Soriano (1996):

Mena, a relative of VASP and *Drosophila* enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* **87**, 227-239.

Gonzalez-Mariscal, I., Chavez de Ramirez, B., Lazaro, A. und M. Cereijido (1985):

Tight junction formation in cultured epithelial cells (MDCK). *J. Membr. Biol.* **86**, 113-125.

Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A. und A. Avila-Flores (2000):

MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **11**, 315–324.

Gottardi, C. J., Arpin, M., Fanning, A. S. und D. Louvard (1996):

The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell–cell contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10779–10784.

Griffiths, A., Renfrey, S. und T. Minson (1998):

Glycoprotein C-deficient mutants of two strains of herpes simplex virus type 1 exhibit unaltered adsorption characteristics on polarized or non-polarized cells. *J. Gen. Virol.* **79**, 807-812.

Haffner, C., Jarchau, T., Reinhard, M., Hoppe, J., Lohmann, S.M. und U. Walter (1995):

Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *EMBO J.* **14**, 19-27.

Hagglund, R., Van Sant, C., Lopez, P. und B. Roizman (2002):

Herpes simplex virus 1 infected cell protein 0 contains two E3 ubiquitin ligase sites specific for different E2 ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 631-636.

Hagglund, R., Munger, J., Poon, A.P. und B. Roizman (2002b):

U(S)3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks caspase activation induced by the products of U(S)1.5 and U(L)13 genes and modulates expression of the transduced U(S)1.5 open reading frame in a cell type-specific manner. *J. Virol.* **76**, 743-754.

Halbrugge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P. und U. Walter (1990):

Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J. Biol. Chem.* **265**, 3088-3093.

Hall, A. (1998):

Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.

Hanahan, D. (1985):

Techniques for transformation of E. coli. In: DNA Cloning 1 (Glover, D.M., ed.), *Practical Approach Series*, IRL Press.

Harlow, E. und D. Lane (1988):

Antibodies: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.*

Hartwig, J.H. und D.J. Kwiatkowski (1991):

Actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 87-97.

Hayashi, K. (1995):

Role of tight junctions of polarized epithelial MDCK cells in the replication of herpes simplex virus type 1. *J. Med. Virol.* **47**, 323–329.

Heeg, U., Dienes, H.P., Muller, S. und D. Falke (1986):

Involvement of actin-containing microfilaments in HSV-induced cytopathology and the influence of inhibitors of glycosylation. *Arch. Virol.* **91**, 257-70.

Heffner, S., Kovacs, F., Klupp, B.G. und T.C. Mettenleitner (1993):

Glycoprotein gp50-negative pseudorabies virus: a novel approach toward a nonspreading live herpesvirus vaccine. *J. Virol.* **67**, 1529-1537.

Herold, B.C., WuDunn, D., Soltys, D. und P.G. Spear (1991):

Glycoprotein C of Herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J. Virol.* **65**, 1090-1098.

Herold, B.C., Visalli, R.J., Susmarski, N., Brandt, C.R. und P.G. Spear. (1994):

Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* **75**, 1211-1222.

Hill, T.J. (1985):

Herpes simplex virus latency. In: B. Roizman, ed.: The herpesviruses. *New York: Plenum*, 175-240.

Hirokawa, N. und J.E., Heuser (1981):

Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* **91**, 399-409.

Hu, S. und L.F. Reichardt (1999):

From membrane to cytoskeleton: Enabling a Connection. *Neuron.* **22**, 419-422.

Huber, M. T., Wisner, T. W., Hegde, N. R., Goldsmith, K.A., Rauch, D.A., Roller, R.J., Krummenacher, C., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H. und D. Johnson (2001):

Herpes simplex virus with highly reduced gD levels can efficiently enter and spread between human keratinocytes. *J. Virol.* **75**, 10309–10318.

Hukkanen, V., Mikola, H., Nykanen, M. und S.Syrjänen (1999):

Herpes simplex virus type 1 infection has two separate modes of spread in three-dimensional keratinocyte culture. *J. Gen. Virol.* **80**, 2149–2155.

Jansen, M. (2003):

Frühe Ereignisse der Herpes simplex virus Typ 1 Infektion in polarisierten Epithelzellen. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Math.-Naturwiss. Fakultät der Universität zu Köln.

Johnson, D.I. und J.R. Pringle (1990):

Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J. Cell Biol.* **111**, 143-152.

Johnson, D.C., Burke, R.L. und T. Geregory (1990):

Soluble forms of Herpes simplex virus glycoprotein D bind to a limited number of cell surface receptors and inhibit virus entry into cells. *J. Virol.* **64**, 2569-2576.

Jou, T.S., Schneeberger, E.E. und J.W. Nelson (1998a):

Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J. Cell Biol.* **142**, 101-115.

Jou, T.S. und J.W. Nelson (1998b):

Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. *J. Cell Biol.* **142**, 85-100.

Just, I., Hofman, F. und K. Aktories (2000):

Molecular mode of action of the large clostridial cytotoxins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **250**, 55-83.

Kalinin, A.E., Kajava, A.V. und P.M. Steinert (2002):

Epithelial barrier function: assembly and structural fetures of the cornified cell envelope. *Bioessays* **24**, 789-800.

Katata, T., Irie, K. Fukuhara, A., Kawakatsu, T., Yamada, A., Shimizu, K. und Y. Takai (2003):

Involvement of nectin in the localization of IQGAP1 at the cell-cell adhesion sites through the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Oncogene* **22**, 2097-2109.

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and K. Kaibuchi (1996):

Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-248.

Kolluri, R., Tolias, K. F., Carpenter, C. L., Rosen, F. S. und T. Kirchhausen (1996):

Direct interaction of the Wiskott–Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5615–5618.

Krause, M., Bear, J.E., Loureiro, J.J. und F.B. Gertler (2002):

The Ena/VASP enigma. *J. Cell Sci.* **115**: 4721-4726.

Kuroda, S., Fukata, M., Kobayashi, K., Nakafuku, M., Nomura, N., Iwamatsu, A., und K. Kaibuchi (1996):

Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J. Biol. Chem.* **271**, 23363–23367.

Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Oobuko, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S. und K. Kaibuchi, (1998):

Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell–cell adhesion. *Science* **281**, 832–835.

Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P.D., Aspenström, P., Bridges, T., Chant, J. und A. Hall (1996):

Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65 PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* **87**, 519-529.

Latchman, D.S. (2001):

Gene delivery and gene therapy with herpes simplex virus-based vectors. *Gene* **264**, 1-9.

Leung, T., Chen, X. Q., Tan, I., Manser, E. und L. Lim (1998):

Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 130–140.

Louvard, D. (1980):

Apical membrane amino-peptidase appears at sites of cell-cell-contact in cultured epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4132-36.

Luo, L., Liao, Y.L., Jan, L.Y. und Y.N. Jan (1994):

Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast function. *Genes Dev.* **8**, 1787-1802.

Madaule, P. und R. Axel (1985):

A novel ras-related gene family. *Cell* **81**, 31-40.

Madin, S.H. und N.B. Darby (1958):

Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **98**, 574-576.

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. und S. Narumiya (1999):

Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895–898.

Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. S. und L. Lim (1994):

A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**, 40–46.

Manser, E. Huang, H.Y., Loo, T.H., Chen, X.Q., Dong, J.M., Leung, T und L. Lim (1997):

Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol. Cell Biol.* **17**, 1129-1143.

Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., Tsukita, S. und S. Tsukita (1998):

Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J. Cell Biol.* **140**, 647–657.

McGeoch, D.J. et al. (1985):

Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Mol. Biol.* **181**, 1-13.

McGeoch, D.J., Dalrymple, M.A., Davison, A.J., Dolan, A., Frame, M.C., McNab, D., Perry, L.J., Scott, J.E. und P. Taylor (1988):

The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **69**, 1531-1574.

Meyers, C. und L.A. Laimins (1994):

In vitro systems for the study and propagation of human papillomaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **187**, 199-215.

Miki, H., Miura, K. und T. Takenawa (1996):

N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 5326–5335.

Miller, N. und L. M. Hutt-Fletcher (1992):

Epstein-Barr virus enters B cells and epithelial cells by different routes. *J. Virol.* **66**, 3409–3414.

Mulder, W., Pol, J. Kimman, T., Kok, G., Priem, J. und B. Peeters (1996):

Glycoprotein D-negative pseudorabies virus can spread transneuronally via direct neuron-to-neuron-transmission in its natural host, the pig, but not after additional inactivation of gE and gl. *J. Virol.* **70**, 2191-2200.

Mullins, R.D., Heuser, J.A. und T.D. Pollard (1998):

The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high-affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 6181-6186.

Mururata, T., Goshima, F., Daikoku, T., Takakuwa, H. und Y. Nishiyama (2000):

Expression of herpes simplex virus type 2 Us3 affects the Cdc42/Rac1 pathway and attenuates c-Jun N-terminal kinase activation. *Genes to Cells* **5**, 1017-1027.

Naranatt, P.P., Akula, S.M., Zien, C.A., Krishnan, H.H. und B. Chandran (2003):

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC-zeta-MEK-ERK signalling pathway in target cells early after infection: implications for infectivity. *J. Virol.* **77**, 1524-1539.

Nicola, A.V., McEvoy, A.M. und S. Strauss (2003):

Roles for endocytosis and low pH in Herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese Hamster Ovary cells. *J. Virol.* **77**, 5324-5332.

Nobes, C.D. und A. Hall (1995):

Rho, rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. *Cell* **91**, 53-62.

Nolte, C. J., Oleson, M. A., Bilbo, P. R. und N.L. Parenteau (1993):

Development of a stratum corneum and barrier function in an organotypic skin culture. *Arch. Dermatol. Res.* **285**, 466–474.

Perkins, D. Pereira, E.F., Gober, M., Yarowsky, P.J. und L. Aurelian (2002):

The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP0 PK) functions blocks apoptosis in hippocampal neurons, involving activation of the MEK/MAPK survival pathway. *J. Virol.* **77**, 1292-1305.

Perkins, D. Pereira, E.F. und L. Aurelian (2003):

The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP0 PK) functions as a dominant regulator of apoptosis in hippocampal neurons involving activation of the ERK survival pathway and upregulation of the antiapoptotic protein Bag-1. *J. Virol.* **77**, 1292-1305.

Pollard, T.D. (2003):

The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature.* **422**, 741-745.

Potel, C., Kaelin, K., Danglot, L., Triller, A., Vannier, C und F. Rozenberg (2003):

Herpes simplex virus type 1 glycoprotein B sorting in hippocampal neurons. *J. Gen. Virol.* **84**, 2613-2624.

Powell, K.L. und D.H. Watson (1975):

Some structural antigens of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **29** , 167-178.

Reinhard, M., Halbrugge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B.M. und U. Walter (1992):

The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J.* **11**, 2063-2070.

Reinhard, M., Jarchau, T. und U. Walter (2001):

Actin-based motility: Stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem.Sci.* **26**, 243-249.

Ridley, A.J. und A. Hall (1992):

The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibres in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.

Ridley, A.J., Paterson, H.F. Johnston, C.L., Diekmann, D. und A. Hall (1992):

The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410.

Robbins, J.R., Barth A.I., Marquis H., de Hostos E.L., Nelson W.J. und J.A. Theriot (1999):

Listeria monocytogenes exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. *J. Cell Biol.* 1999 **146**,1333-50.

Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., und M.W. Kirschner (1999):

The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221–231.

Roizman, B. und A.E. Sears (1996):

Herpes simplex viruses and their replication. In: Fields, B.N.; Knipe, D.N., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B. und S.E. Straus, ed.: *Fields Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven*, 2231-2295.

Rojas, R., Ruiz, W.G., Leung, S.-M., Jou, T.-S. und G. Apodaca (2001):

Cdc42-dependent modulation of tight-junctions and membrane traffic in polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2257-2274.

Rosenthal, K.S., Leuther, M.D. und B.G. Barisas (1984):

Herpes simplex virus binding and entry modulate cell surface mobility. *J. Virol.* **49**, 980-983.

Rosenthal, K.S., Perez, R. und C. Hodnichak (1985):

Inhibition of Herpes Simplex Virus Type 1 penetration by Cytochalasins B and D. *J. Gen. Virol.* **66**, 1601-1605.

Rosenthal, K.S., Roess, D. und B.G. Barisas (1988):

Herpes simplex virus type 1 penetration initiates mobilization of cell surface proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **942**, 38-44.

Rottner, K., Behrendt B., Small J.V., und J. Wehland (1999):

VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nature Cell Biol.* **1**, 321-322.

Russel, W.C. et al. (1975): *Nature.* **253**, 461.

Saiki, R.K. et al. (1988):

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und T. Maniatis (1989):

Molecular Cloning - a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Press*, New York.

Sanders, L. C., Matsumara, F., Bokoch, G. M. und P. de Lanerolle (1999):

Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **283**, 2083–2085.

Sanger, F., Nicklen S. und A.R. Coulson (1977):

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

Scherer W.F., Syverton J.T. und G.O. Gey (1953):

Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Medicine* **97**, 695 1953

Schmitz, A.A., Govek, E.E., Bottner, B. und L. Van Aelst (2000):

Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp. Cell Res.* **261**, 1-12.

Schneweiss, K.E. (1962):

Serologische Untersuchungen zur Typendifferenzierung des Herpesvirus hominis. *Z. Immuno-Forsch.* **124**, 24-28.

Schöck, F. und N. Perrimon (2002):

Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 463-493.

Sears, A. E., McGwire, B. S. und B. Roizman (1991):

Infection of polarized MDCK cells with herpes simplex virus 1: two asymmetrically distributed cell receptors interact with different viral proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5087–5091.

Shinjo, K., Koland, J.G., Hart, M.J., Narasimhan, V., Johnson, D.I., Evans, T. und R.A. Cerione (1990):

Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9853-9857.

Smith, C.C., Nelson, J., Aurelian, L., Gober, M. und B.B. Goswami (2000):

Ras-GAP binding and phosphorylation by herpes simplex virus type 2 RR1 PK (ICP10) and activation of the Ras/MEK/MAPK mitogenic pathway are required for timely onset of virus growth. *J. Virol.* **74**, 10417-10429.

Smith, G.A. und L.W. Enquist (2002):

Break ins and break outs: viral interactions with the cytoskeleton of mammalian cells. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 135-161.

Smith, G.A., Gross, S.P. und L.W. Enquist (2001):

Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 3466-3470.

Sodeik, B., Ebersold, M.W. und A. Helenius (1997):

Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J. Cell Biol.* **136**, 1007-1021.

Sodeik, B. (2000):

Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol.* **8**, 465-472.

Spear, P.G. (1993):

Entry of alphaherpesviruses into cells. *Sem. Virol.* **4**, 167-180.

Spear, P.G., Eisenberg, R.J. und G.H. Cohen (2000):

Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology.* **275**, 1-8.

Spear, P.G. und R. Longnecker (2003):

Herpesvirus entry: an update. *J. Virol.* **77**, 10179-10185.

Stevens, J.G. und M.L. Cook (1971):

Latent herpes simplex virus in spinal ganglia. *Science* **173**, 843-???

Stoker, M. und I. MacPherson (1964):

Syrian hamster fibroblast cell line and its derivatives. *Nature.* **203**, 1355-1357.

Stossel, T.P. (1993):

On the crawling of animal cells. *Science* **260**, 1086-1094.

Symons, M. und J. Settleman (2000):

Rho family GTPases: more than simple switches. *trends in Cell Biology* **10**, 415-419.

Syrjänen, S., Mikola, H., Nykanen, M. und V. Hukkanen (1996):

In vitro establishment of lytic and nonproductive infection by herpes simplex virus type 1 in three-dimensional keratinocyte culture. *J. Virol.* **70**, 6524–6528.

Szilágyi, J.F. und C. Cunningham (1991):

Identification and characterization of a novel non-infectious herpes simplex virus-related particle. *J. Gen. Virol.* **72**, 661-667.

Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Nishioka, H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A. und Y. Takai (1999):

Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with afadin, a PDZ domain-containing protein. *J. Cell Biol.* **145**, 539-549.

Takai, Y. und H. Nakanishi (2003):

Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J. Cell. Sci.* **116**, 17–27.

Theriot, J.A. und T.J. Mitchison (1991):

Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* **352**,126-31.

Tjia, S. T., E. B. Carstens, und W. Doerfler (1979):

Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. II. The viral DNA and kinetics of its replication. *Virology* **99**, 399-409.

Tominaga, T., Ishizaki, T., Narumiya, S. und D. L. Barber (1998):

p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *EMBO J.* **17**, 4712–4722.

Topp, K. S., Rothman, A. L. und J. H. Lavail (1997):

Herpes virus infection of RPE and MDCK cells: polarity of infection. *Exp. Eye Res.* **64**, 343-354.

Tran, L. C., Kissner, J. M., Westerman, L. E. und A. E. Sears (2000):

A herpes simplex virus 1 recombinant lacking the glycoprotein G coding sequences is defective in entry through apical surfaces of polarized epithelial cells in culture and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1818–1822.

Tucker, S.P. und R.W. Compans (1993):

Virus infection of polarized epithelial cells. *Advances in virus research* **42**, 187-239.

Vail, P., G. Sutter, D. Jay, und D. Gough (1971):

Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and the alfalfa looper. *J. Invertebr. Pathol.* **17**, 383-388.

Van Aelst, L. und C. D'Souza-Schorey (1997):

Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**, 2295–2322.

Van Meer, G. und K. Simons (1982):

Viruses budding from either the apical or the basolateral plasma membrane domain of MDCK cells have unique phospholipid compositions. *EMBO J.* **1**, 847-852.

Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. und E. Fuchs (2000):

Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**, 209-219.

Vasioukhin, V. und E. Fuchs (2001):

Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 76-84.

Volkman, L.E. und P.A. Goldsmith (1988):

Resistance of the 64K protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus to functional inactivation by proteolysis. *Virology* **166**, 285-289.

Visalli, R. J., Courtney, R. J. und C. Meyers (1997):

Infection and replication of herpes simplex virus type 1 in an organotypic epithelial culture system. *Virology* **230**, 236-243.

Walling, E.A., Krafft, G.A. und B.R. Ware (1988):

Actin assembly activity of cytochalasins and cytochalasin analogs assayed using fluorescence photobleaching recovery. *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 321-332.

Wang, F.Z., Akula, S.M., Sharma-Walia, N., Zeng, L. und B. Chandran (2003a):

Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein B mediates cell adhesion via its RGD sequence. *J. Virol.* **77**, 3131-3147.

Wang, X., Huong, S.H., Chiu, M.L., Raab-Traub, N. und E.S. Huang (2003b):

Epidermal growth factor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**, 456-461.

Watt, F. M. (1998):

Cultivation of human epidermal keratinocytes with a 3T3 feeder layer. In *Cell Biology: a Laboratory Handbook*, pp. 113-118. Edited by J. E. Celis. London: Academic Press.

Webb, D.J., Parsons, J.T. und A.F. Horwitz (2002):

Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells - over and over and over again. *Nat. Cell Biol.* **4**, E97-E100.

Weeds, A. und S. Maciver (1993):

F-actin capping proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 63-69.

Welch, M. D., DePace, A. H., Verma, S., Iwamatsu, A., and T.J. Mitchison (1997):

The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly.

J. Cell Biol. **138**, 375–384.

Wildy, P. (1973)::

Herpes: history and classification. In: Kaplan, A.S., ed.: The herpesviruses.

New York: Academic, 1-25.

Whitley, R.J. (1996):

Herpes simplex viruses. In: Fields, B.N.; Knipe, D.N., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B. und S.E. Straus, ed.: Fields Virology. *Philadelphia: Lippincott-Raven*, 2297-2342.

Whitley, R. J. und B. Roizman (2001):

Herpes simplex virus infections. *Lancet* **357**, 1513-1518.

WuDunn, D. und P. Spear (1989):

Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate.

J. Virol. **63**: 52-58

Yasumura et al. (1963): *Nippon Rhinsho.* 21 :1209.

Yoon, M. und P.G. Spear (2002):

Disruption of adherens junctions liberates nectin-1 to serve as receptor for herpes simplex virus and pseudorabies virus entry. *J. Virol.* **76**, 7203–7208.

Zegers, M.M., Forget, M.A., Chernoff, J., Mostov, K.E., ter Beest, M.B. und S.H. Hansen (2003):

Pak1 and PIX regulate contact inhibition during epithelial wound healing.

EMBO J. **22**, 4155-4165.

Zondag, G.C., Evers, E.E., ten Klooster, J.P. und J.G. Collard (2000):

Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* **149**, 1009-1022

VIII. Kurzzusammenfassung

Primäre Eintrittspforte für die *Herpes simplex* Virus Typ1 (HSV-1) Infektion ist das Schleimhautepithel. Der zelluläre Eintrittsprozeß von HSV-1 bedingt eine Interaktion verschiedener viraler Glykoproteine mit unterschiedlichen Zelloberflächen-Rezeptoren, die gefolgt ist von der Penetration der Plasmamembran und dem Transport zum Zellkern. Das zentrale Interesse der vorliegende Arbeit bestand darin, zum Verständnis des viralen Eintritts *in vivo* beizutragen. Der HSV-1 Eintritt in individuelle Zellen wurde durch Immunfärbung gegen ICP0, einem Produkt sehr früher viraler Genexpression, sichtbar gemacht. Infektionsstudien in der epithelialen MDCKII Zelllinie und in primären Keratinozyten deuten auf einen polaren Eintritt von HSV-1 unter Nutzung basolateraler Membrandomänen hin. Wenn humane Vorhautepidermis infiziert wurde, wurde HSV-1 Eintritt ausschließlich über basale Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass effizienter viraler Eintritt den Zugang zu basolateralen Membrandomänen bedingt.

Zur weiteren Charakterisierung der HSV-1 Eintrittsmechanismen in Epithelzellen wurden potentielle molekulare Determinanten untersucht. Immunfärbung gegen den potentiellen Ko-Rezeptor Nectin-1 zeigte keine Korrelation der Rezeptor-Lokalisierung und den Virus-Eintrittsstellen in Keratinozyten-Kulturen. Die Beteiligung des HSV-1 Glykoproteins D am Viruseintritt wurde durch Blockierungsexperimente bestätigt. Erste pharmakologische Inhibierungsexperimente in MDCKII Zellen ergaben keine Hinweise auf endozytotische Aufnahme verbunden mit pH-abhängiger Membranfusion von HSV-1.

Da infizierte MDCKII Zellen und Keratinozyten Eigenschaften von migrierenden Zellen zeigten, könnten Prozesse der Zellmigration viralen Eintritt fördern. Die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts während der Zellmigration wird durch die Rho-ähnlichen GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA kontrolliert. Nach transienter Expression dominanter GTPase Isoformen in MDCKII Zellen wurde eine signifikante Reduktion der HSV-1 Infizierbarkeit beobachtet, falls die dominant aktiven Isoformen von Cdc42 und Rac1 sowie die dominant inaktive Isoform von Cdc42 exprimiert wurden. Im Gegensatz dazu zeigten weitere Isoformen und die Wildtyp Proteine keinen Effekt auf die Infizierbarkeit. Ko-Expressionsexperimente zeigten, dass dieser inhibierende

Einfluss auf die Infizierbarkeit nicht über Hemmung des ICP0 Promotors vermittelt wird. Zusätzlich wurden Infektionsstudien von stabil transfizierten MDCKII Zellen durchgeführt, die dominante Isoformen von Cdc42 und Rac1 nach Induktion exprimierten. Die Expression von dominant aktivem Rac1 und dominant inaktivem Cdc42 nicht aber von dominant aktivem Cdc42 führte zu einer signifikanten Reduktion der HSV-1 Infizierbarkeit. Ein unterschiedlicher Verlauf der Aktivierungskaskaden von Rho GTPasen in transient und stabil transfizierten MDCKII Zellen könnte für den unterschiedlichen Effekt von dominant aktivem Cdc42 auf die HSV-1 Infizierbarkeit verantwortlich sein. Untersuchungen zum Einfluss der Cdc42/Rac1 Signaltransduktionswege auf die HSV-1 Infizierbarkeit ergaben keine Hinweise auf eine direkte Beteiligung von PAK-1 oder N-WASP in diesem Prozess. Diese Ergebnisse ergaben erste Hinweise auf eine Rolle der Cdc42/Rac1 Signaltransduktionswege und möglicherweise der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts im Prozess des HSV-1 Eintritts.

IX. Abstract

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) initiates infection of the host organism via cells of mucosal epithelial tissues. The cellular entry process of HSV-1 relies on the interaction of several viral glycoproteins with various cell surface receptors followed by penetration of the plasmamembrane and transport to the nucleus. This study aims to understand viral entry into epithelia *in vivo*. HSV-1 entry into individual epithelial cells was visualized by staining of ICP0, a viral immediate early (IE) gene product. Infection studies in the epithelial cell line MDCKII and in primary keratinocytes indicate the polar entry of HSV-1 via basolateral membranes. When human foreskin epithelia were infected HSV-1 entered exclusively via basal cells. These observations indicate, that efficient viral entry relies on the accessibility to basolateral membranes.

In order to elucidate the HSV-1 entry mechanism into epithelial cells potential molecular determinants were studied. Staining of the potential coreceptor Nectin-1 revealed no correlation of receptor localisation and virus entry sites in keratinocytes. The involvement of HSV-1 glycoprotein D in viral entry was confirmed by blocking experiments. First pharmacological inhibition experiments in MDCKII cells yielded no evidence for an entry mechanism that relies on endocytotic uptake and pH-dependent membrane fusion.

Since infected MDCKII cells and keratinocytes exhibited features of migrating cells, processes during migration might contribute to viral entry. Reorganisation of the actin cytoskeleton during cell migration is regulated through signalling pathways controlled by the Rho-like GTPases Cdc42, Rac1 and RhoA. Upon transient expression of dominant isoforms in MDCKII cells, a significant decrease of infectivity was observed, when dominant active isoforms of Cdc42 and Rac1 and a dominant inactive isoform of Cdc42 were expressed. In contrast other isoforms and the wildtype versions of the GTPases had no significant effect on infectivity. Transient co-expression experiments demonstrated that this inhibitory effect on viral infectivity was not mediated through transcriptional repression of the ICP0 promotor. In addition, infection studies of stably transfected MDCKII cells were carried out which expressed dominant isoforms of Cdc42 and Rac1 upon induction. Expression of dominant active Rac1 and dominant inactive Cdc42 led to a significant decrease in viral infectivity, whereas expression of dominant active Cdc42 had no significant effect. Differences in the activational cascades of Rho GTPases might account for the different effect of dominant active Cdc42 upon HSV-1 infectivity in transiently and stably transfected MDCKII cells. Investigations of Cdc42/Rac1 signalling pathways yielded no evidence for a direct involvement of PAK-1 and N-WASP in this process. These results provide first evidence for a potential role of Cdc42/Rac1 signalling pathways and possibly actin dynamics in HSV-1 entry.

X. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig 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 diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung - abgesehen von den unten genannten zur Veröffentlichung eingereichten Teilpublikationen - vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf betreut worden.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgendem Titel zur Veröffentlichung eingereicht:

Schelhaas, M., Jansen, M., Haase, I. and D. Knebel-Moersdorf (2003):

Herpes simplex virus type 1 exhibits a tropism for basal entry in polarized epithelial cells.

Journal of General Virology **84**, 2473–2484

Köln, im Dezember 2004

Mario Schelhaas

XI. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Mario Schelhaas

* 13. März 1973 in Brühl

ledig, keine Kinder

Diplom-Chemiker

Schulischer Werdegang:

1979-1983 Erich-Kästner-Grundschule der Stadt Erftstadt

1983-1992 Ville-Gymnasium der Stadt Erftstadt
Abschluß: Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

Studium und Beruf:

Oktober 1992-
September 1996 Hochschulstudium: Universität zu Köln, Mathematisch-
Naturwissenschaftliche Fakultät, Studiengang: Diplom-Chemie

Oktober 1996-
September 1997 Auslandsstudium: Universität zu Edinburgh, Faculty of Science
and Engineering, Studiengang: Molecular Biology and Genetics

Oktober 1997-
August 1999 Fortsetzung des Hochschulstudiums: Universität zu Köln,
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät,
Studiengang: Diplom-Chemie, Wahlpflichtfach: Genetik,
Diplomarbeit: Biochemische und funktionelle Untersuchungen
von Mitgliedern der *Arabidopsis PIN*-Genfamilie.
Abschluß: Diplom-Chemiker

Oktober 1999-
Dezember 2000 Mitarbeiter im Max-Planck-Institut für neurologische Forschung,
Köln, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. D. Knebel-Mörsdorf

seit Januar 2000 Förderung durch die Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung
der Wissenschaften e.V.

XII. Danksagung

Das Entstehen und Gelingen dieser Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne eine Reihe ganz besonderer Menschen, denen ich an dieser Stelle ein herzliches Dankeschön sagen möchte:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dagmar Knebel-Mörsdorf für die ausgezeichnete Betreuung meiner Doktorarbeit unter hervorragenden Arbeitsbedingungen in ihrer Arbeitsgruppe. Ich danke ihr vor allem für die vielseitige Unterstützung dieser Arbeit und Ihre Diskussionsbereitschaft. Ihre kritischen Anregungen hatten einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Ferner gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Jens Brüning für die Übernahme des Ko-Referats und sein Interesse an dieser Doktorarbeit.

Bei Ingo Haase und Ruth Pofahl bedanke ich mich für die Hilfe bei der Isolierung und Kultivierung der humanen Explant-Kulturen und der primären Keratinozyten.

Carien Niessen danke ich für ihre ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die außerordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Durch sie habe ich fachlich wie menschlich gewonnen: Dr. Stephan Dreschers, Matthias Jansen, Timo Liebig, Dr. Daniela Mainz, Ilja Quadt und Daniel Voß.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Familie: an meinen Vater, der auch nach seinem frühen Tod Ansporn und Ermutigung für mich blieb; an meine Mutter, die durch ihre aufopfernde Unterstützung mir viele Wege geebnet hat; an Barbara, Ingo, Giedre und Michael für ihre stetige, vielseitige Hilfe.

Allen meinen Freunden möchte ich dafür danken, dass sie - auch wenn es ihnen gelegentlich vielleicht schwer fiel - in der Zeit dieser Doktorarbeit blieben, was sie auszeichnet: meine Freunde. Ich danke Sandra Kampmann, Guido Sonsmann, Andreas Mihalyi, Inés und Michael Hoffmann, Barbara Müller, Eva Götz, Valerie Schnaithmann, Bernadette und Pia Schröder, Anja Solbach, Matthias Kemmerling, Angie Rump, Olaf Tietz und so vielen anderen Ungenannten!

XIII. Anhang

Im Folgenden sind die den transienten Expressionsexperimenten zu Grunde gelegten Daten angefügt.

Daten zu Abb. IV.25:

Transgen	Transgen positive Zellen	davon ICP0 positiv	Transfektionseffizienz
GFP	119	98 (82 %)	84,0 %
	90	70 (78 %)	71,0 %
	50	44 (88 %)	68,0 %
	32	30 (94 %)	89,0 %
L61 Cdc42	68	10 (20 %)	50,0 %
	63	17 (27 %)	63,0 %
	25	6 (24 %)	29,0 %
L61 Rac1	49	10 (20 %)	44,0 %
	43	11 (26 %)	31,0 %
	35	7 (20 %)	57,0 %
L63 RhoA	50	33 (68 %)	28,0 %
	124	78 (68 %)	35,0 %
	74	42 (57 %)	38,0 %
N17 Cdc42	91	24 (26 %)	29,0 %
	56	18 (36 %)	36,0 %
	19	3 (16 %)	28,0 %
N17 Rac1	55	49 (89 %)	38,0 %
	34	29 (74 %)	39,0 %
	16	14 (88 %)	17,0 %
N19 RhoA	49	43 (88 %)	32,0 %
	37	32 (86 %)	32,0 %
	15	14 (93 %)	19,0 %

Daten zu Abb. IV.26:

Transgen	Transgen positive Zellen	davon ICP0 positiv	Transfektionseffizienz
GFP	67	54 (81 %)	73,0 %
	51	44 (86 %)	66,0 %
	59	45 (76 %)	57,0 %
WT Cdc42	96	62 (65 %)	51,0 %
	48	37 (77 %)	25,0 %
	46	31 (67 %)	20,0 %
WT Rac1	75	48 (64 %)	42,0 %
	67	46 (69 %)	41,0 %
	77	47 (61 %)	27,0 %

Daten zu Abb. IV.27:

Transgen	Transgen positive Zellen	davon ICP0 positiv	Transfektionseffizienz
keins	126	14 (11 %)	11,0 %
	99	12 (12 %)	12,0 %
	{354}	{12 (3 %)}	3,0 %
L61 Cdc42	107	17 (16 %)	
	144	45 (31 %)	
	{229}	{16 (7%)}	
N19 RhoA	98	23 (23 %)	
	68	17 (25 %)	
	{185}	{ 15 (8%)}	

Daten zu Abb. IV.41:

Transgen	Transgen positive Zellen	davon ICP0 positiv	Transfektionseffizienz
GFP	66	49 (74 %)	46,0 %
	78	64 (84 %)	56,0 %
	86	76 (88 %)	50,0 %
L61 Rac1	65	62 (65 %)	51,0 %
N17 Rac1	57	41 (72 %)	20,0 %
	36	25 (69 %)	15,0 %
L61 Rac1 40C	67	29 (43 %)	23,0 %
	77	49 (64 %)	37,0 %
	72	42 (58 %)	33,0 %
L61 Rac1 37A	80	20 (25 %)	19,0 %
	77	31 (40%)	33,0 %
	39	11 (28 %)	22,0 %

Daten zu Abb. IV.43:

Transgen	Transgen positive Zellen	davon ICP0 positiv	Transfektionseffizienz
GFP	63	44 (70 %)	66,0 %
	82	51 (53 %)	50,0 %
K299R PAK-1	65	51 (78 %)	37,0 %
	75	48 (54 %)	56,0 %
L107F PAK-1	81	51 (63 %)	45,0 %
	63	45 (71 %)	33,0 %
WT PAK-1	90	79 (88 %)	44,0 %
L61Rac1	56	10 (18 %)	36,0 %
	53	12 (23 %)	29,0 %
N17 Rac1	41	31 (76 %)	28,0 %
	36	27 (75 %)	34,0 %

Daten zu Abb. IV.45:

Transgen	Transgen positive Zellen	davon ICP0 positiv	Transfektionseffizienz
L61 Cdc42	38	16 (42 %)	36,0 %
L61 Rac1	73	26 (35 %)	25,0 %
	38	9 (20 %)	13,0 %
N19 RhoA	44	38 (86 %)	32,0 %
	64	42 (66 %)	23,0 %
	42	32 (76 %)	24,0 %
N-WASP fr.	91	78 (86 %)	57,0 %
	105	66 (63 %)	43,0 %
	53	36 (68 %)	35,0 %