

# **Untersuchungen zu Eintrittsmechanismen des Herpes simplex Virus Typ 1 in Keratinozyten und Epidermis**

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

vorgelegt von  
**Philipp Petermann**  
aus Remscheid

Köln 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am Zentrum für Biochemie  
(Medizinische Fakultät) der Universität zu Köln angefertigt.

Berichterstatter:

Professor Dr. Dagmar Mörsdorf

Professor Dr. Günter Plickert

Tag der mündlichen Prüfung:

20. Januar 2011

ALLES WISSEN UND ALLES VERMEHREN UNSERES WISSENS ENDET NICHT MIT  
EINEM SCHLUSSPUNKT, SONDERN MIT EINEM FRAGEZEICHEN

*Hermann Hesse (1877-1962)*

MEINER FAMILIE

## Zusammenfassung

Keratinocyten der Mukosa, Haut und Kornea stellen die primäre Eintrittspforte für Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) in den Wirtsorganismus dar. Das zentrale Interesse dieser Arbeit bestand darin, zu verstehen, wie HSV-1 die Barrierefunktion der Epithelien überkommt und welche molekularen Mechanismen dem Viruseintritt zugrunde liegen, um die Infektion in Keratinocyten erfolgreich zu etablieren.

Zunächst wurde die Initiation der HSV-1 Infektion in Keratinocyten untersucht. Ausgehend von der Hypothese, dass die Dynamik der Zellbeweglichkeit und Adhäsion den Viruseintritt beeinflussen können, wurde die Rolle der Rac1-/Cdc42-Signaltransduktion analysiert. Die Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 sind zentrale Regulatoren der Aktin-Dynamik. Es zeigte sich, dass die frühe HSV-1 Infektion in der Keratinocyten-Zelllinie HaCaT zu einer temporären Veränderung der Aktivitätszustände von endogenem Rac1 und Cdc42 führte. Wenn konstitutiv aktives Rac1 oder Cdc42 vor der Infektion transient überexprimiert wurde, reduzierte sich die Anzahl infizierter Zellen, wohingegen dominant negatives Rac1 keinen Effekt hatte. Die Abhängigkeit der HSV-1 Infektion von endogenem Rac1 und Cdc42 sollte daher durch RNA Interferenz-Analysen überprüft werden. Nach Reduktion von endogenem Rac1 und/oder Cdc42 wurde sowohl in HaCaT-Zellen als auch in humanen primären Keratinocyten kein Effekt auf die Initiation der viralen Genexpression beobachtet. Zur weiteren Analyse wurde murine Epidermis, deren Keratinocyten kein endogenes Rac1 exprimierten, *ex vivo* infiziert. Ähnlich wie in den Kontroll-Tieren wurden auch in der Abwesenheit von Rac1 die basalen Keratinocyten in der Epidermis infiziert. Daher kann der Schluss gezogen werden, dass die Initiation der HSV-1 Infektion von Keratinocyten nicht von der Rac1-/Cdc42-Signaltransduktion abhängig ist und konstitutiv aktives Rac1 und Cdc42 das Potential haben mit der frühen HSV-1 Infektion zu interferieren. Zur weiteren Charakterisierung des Eintrittsmechanismus von HSV-1 in Keratinocyten wurde zuerst die Internalisierung der Viruspartikel elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei wurden sowohl Kapside im Zytoplasma als auch umhüllte Viruspartikel in Vesikeln beobachtet. Interessanterweise waren in den humanen primären Keratinocyten im Gegensatz zu den HaCaT-Zellen mehr umhüllte Viruspartikel in Vesikeln als Kapside im Zytoplasma zu finden. Diese Ergebnisse weisen auf eine Internalisierung durch Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran und auf eine endozytotische Aufnahme hin. Wenn die GTPase-Aktivität von Dynamin2 durch den Inhibitor Dynasore gehemmt wurde, konnten beide Internalisierungswege nicht mehr beobachtet werden. EM-Aufnahmen zeigten stattdessen Viruspartikel an invaginierten Stellen der Plasmamembran. Die Behandlung mit Dynasore führte nicht nur in Keratinocyten zu einer Inhibition der Infektion, sondern hemmte auch die *ex vivo* Infektion muriner Epidermis. Diese Daten legen erstmals eine Beteiligung von Dynamin an der Internalisierung von HSV-1 in Keratinocyten nahe. Um der Bedeutung einer endozytotischen Virusaufnahme nachzugehen, wurden Inhibitor- und Kolokalisierungsstudien durchgeführt. Die Hemmung der Endosomen-Ansäuerung durch Ammoniumchlorid ergab eine konzentrationsabhängige Reduktion von infizierten Zellen. Weiterhin wurde die Kolokalisierung von Viruspartikeln mit frühen Endosomen, nicht aber mit Lysosomen, beobachtet. Diese ersten Ergebnisse deuten die Beteiligung eines endozytotischen Aufnahmeweges an.



Um die Barrierefunktion des Epithels zu verstehen, wurden *ex vivo* Infektionsstudien in Haut- und Epidermisstücken durchgeführt. Das Ziel war es zunächst den initialen Eintrittsweg in das Gewebe zu charakterisieren. Wenn murine Haut in Virussuspension inkubierte, wurden keine infizierten Zellen beobachtet. Erst nach Trennung der Epidermis von der Dermis mit Hilfe von Dispasell wurden infizierte basale Keratinozyten gefunden. Wenn die Epidermis durch EDTA-Behandlung abgetrennt wurde, war allerdings keine Infektion nachweisbar. Das *ex vivo* Infektionsmodell wurde auch für humane orale Schleimhaut etabliert. Ähnlich zu dem murinen Gewebe wurden basale Keratinozyten in isolierter Epidermis infiziert, nicht aber komplette Schleimhautstücke. Wenn die Schleimhautstücke vor Infektion mechanisch verwundet wurden, konnten infizierte Zellen entlang der Verwundungslinie beobachtet werden. Die Anzahl der infizierten Zellen erhöhte sich, wenn die verwundeten Schleimhautstücke vor Infektion in Keratinozyten-Medium inkubiert wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass basale Keratinozyten infiziert werden können, sobald diese durch Dispasell-Behandlung für das Virus zugänglich waren. Erste Verwundungsstudien deuten an, dass der Eintritt von HSV-1 in die humane Schleimhaut von der Zugänglichkeit zu nicht-differenzierten bzw. sich in der Differenzierung befindlichen Keratinozyten abhängt.

## Abstract

Mucosal, epidermal and corneal keratinocytes represent the primary entry portal for herpes simplex virus type 1 (HSV-1) during infection of its human host. The longterm goal is to understand how HSV-1 overcomes the barrier function of the epithelia and on which molecular mechanisms virus entry depends to establish successful infection in keratinocytes.

Firstly, putative determinants that contribute to HSV-1 infection were analysed. Based on the hypothesis that cell dynamics and adhesion affect the virus entry, the role of Rac1/Cdc42 signalling was examined. The Rho GTPases Rac1 and Cdc42 are key regulators of actin dynamics. Measurement of endogenous Rac1 and Cdc42 in the human keratinocyte cell line HaCaT demonstrated temporary changes in activity levels of Rac1/Cdc42 upon HSV-1 infection. Overexpression of Rac1/Cdc42 mutants in HaCaT cells showed that constitutively active Rac1 and Cdc42 mutants decreased infectivity while dominant negative Rac1 had no effect. Accordingly, RNA interference experiments were performed to explore whether HSV-1 infection was dependent on endogenous Rac1 and Cdc42. Silencing of endogenous Rac1 and/or Cdc42 in HaCaT cells and human primary keratinocytes had no effect on the number of infected cells. To further investigate the role of Rho GTPases, *ex vivo* infection studies were performed in murine epidermis lacking Rac1. Similar to the control littermates, the lack of Rac1 led also to infection of basal keratinocytes. These results indicate that the initiation of HSV-1 infection in keratinocytes is not dependent on Rac1/Cdc42 signalling and that the constitutively active Rac1 and Cdc42 mutants have the potential to interfere with infectivity.

To further characterise the entry mechanism of HSV-1 in keratinocytes, the internalisation of virus particles were examined by electron microscopy. The studies demonstrated both capsids underneath the plasma membrane and virus particles in vesicles. Interestingly, more virus particles in vesicles were observed in human primary keratinocytes as compared to HaCaT cells than capsids in the cytoplasm. The results suggest internalisation of HSV-1 by fusion with the plasma membrane as well as by endocytic vesicles. When the activity of Dynamin2 was inhibited by Dynasore both internalisation pathways were blocked. EM studies demonstrated virus particles at invagination sites of the plasma membrane. Furthermore, the treatment with Dynasore also blocked the *ex vivo* infection of murine epidermis. This is the first report indicating the involvement of Dynamin in HSV-1 internalisation into keratinocytes. To elucidate the importance of the endocytic pathway, inhibitor and co-localisation studies were performed. The inhibition of the acidification of endosomes by ammonium chloride demonstrated a concentration dependent reduction of infected cells. Furthermore, co-localisation of incoming viruses with early endosomes, but not with lysosomes was observed. These initial results point to an endocytic pathway.

To understand the barrier function of the epithelia, *ex vivo* infection studies in skin/epidermis samples were performed. Here, we initiated studies to characterise the initial entry site into the epithelia. No infected cells were observed in intact murine skin. In contrast, murine epidermis that was separated from the dermis by dispasell treatment demonstrated infected basal keratinocytes. Interestingly, no infected cells were visible after the separation of the epidermis with EDTA. The *ex vivo* infection assay was also established for human oral mucosa. Similar to murine skin, basal keratinocytes were only

infected after separation of the epidermis from the dermis by dispasell. Mechanical wounding of mucosa prior to infection resulted in infected keratinocytes near the lesion. Interestingly, incubation of wounded mucosa in keratinocyte-specific medium prior to infection increased the number of infected cells. The experiments indicate that HSV-1 initiates infection in basal keratinocytes once they are accessible by dispasell treatment. Initial wounding experiments suggest that the entry of HSV-1 into human mucosa is dependent on the accessibility of non-differentiated and/or more-differentiated keratinocytes.

<b>I. Einleitung</b>	1
<b>1. Der Eintritt von HSV-1 in die Zelle</b>	1
1.1 Herpes simplex Typ 1 (HSV-1)	1
1.2 Die Internalisierung von HSV-1 in die Zelle	2
1.3 Der Transport des Kapsids, die Einschleusung der DNA in den Zellkern und die beginnende virale Genexpression von HSV-1	3
<b>2. Der virale Eintritt in die Zelle und die Modulation der zellulären Signaltransduktion</b>	4
2.1 Der endozytotische Eintrittsmechanismus von Viren	4
2.1.1 Dynamin-abhängige Endozytose	5
Dynamin	5
Clathrin-vermittelte Endozytose	6
Caveolae-vermittelte Endozytose	6
2.1.2 Dynamin-unabhängige Endozytose	7
Makropinozytose	7
Clathrin- und Caveolae-unabhängigen Endozytose	7
2.1.3 Zusammenfassung	7
2.2 Modulation der zellulären Signaltransduktionswege während der viralen Infektion	8
2.2.1 Die Rho GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA	8
2.2.2 Modulation der Rho GTPasen durch Viren	9
2.2.3 Rho GTPasen in der Epidermis	11
<b>3. Viraler Eintritt in Gewebe</b>	11
3.1 Aufbau der Haut	11
3.1.1 Die Epidermis	12
3.1.1.1 Der Haarfollikel und die Talgdrüse	13
3.1.1.2 Keratinozyten	13
3.1.2 Die Basalmembran	13
3.1.3 Die Barrierefunktion der Epidermis	14
3.2 HSV-1 Infektion im Tiermodell	14
3.3 Eintritt von HSV-1 – einschichtige und mehrschichtige Zellkultursysteme	15
<b>II. Material und Methoden</b>	17
<b>1. Material</b>	17
1.1 Chemikalien	17
1.2 Puffer, Lösungen und Medien	18
1.2.1 Puffer und Lösungen	18
1.2.2 Medien	20
1.2.2.1 Zelllinien	20
1.2.2.2 Isolierte primäre Zellen	20
1.2.2.3 Gewebe	21
1.2.2.4 Transfektionen	21
1.3 Plasmide, Transfektionsreagenzien und siRNAs	21
1.3.1 Plasmide	21
1.3.2 Transfektionsreagenzien	22
1.3.3 siRNAs	22
1.4 Antikörper, Antiseren und Proteinstandards	22
1.4.1 Primäre Antikörper und Antiseren	22
1.4.2 Sekundäre Antikörper	24
1.4.3 Proteinstandard	25
1.5 Bakterien, Zelllinien, Gewebe und Viren	25
1.5.1 Bakterien	25
1.5.2 Zelllinien	26
1.5.3 Gewebe	26
1.5.3.1 Humanes Gewebe	26
1.5.3.2 Murines Gewebe	26
1.5.4 Viren	26
1.6 Geräte, Material, Computer und Software	27

1.6.1 Geräte und Material	27
1.6.2 Computer und Software	28
<b>2. Methoden</b>	29
2.1 Arbeiten mit Zelllinien, isolierten primären Zellen und Geweben <i>ex vivo</i>	29
2.1.1 Zelllinien	29
2.1.1.1 Kultivierung der Zelllinie HaCaT	29
2.1.1.2 Kultivierung der Zelllinie Vero-B4	29
2.1.1.3 Kultivierung der Zelllinie BHK21	29
2.1.1.4 Kultivierung der Zelllinie MDCKII	29
2.1.1.5 Kultivierung der Zelllinie NIH3T3	29
2.1.2 Isolierte primäre Zellen	29
2.1.2.1 Isolierung von humanen primären Keratinozyten aus der Vorhaut juveniler Spender	29
2.1.2.2 Kultivierung von humanen primären Keratinozyten	30
2.1.2.3 Kultivierung von murinen primären Keratinozyten	30
2.1.3 Lagerung der Zelllinien und isolierter primärer Zellen	30
2.1.4 Überprüfung auf Mykoplasmen-Kontaminationen	30
2.1.5 Bestimmung der Zellzahl	30
2.2 Arbeiten mit Herpes simplex Virus Typ 1	30
2.2.1 Virusvermehrung und -aufreinigung	30
2.2.1.1 HSV-1 Wildtyp (verbessertes Protokoll)	30
2.2.2 Plaque-Test	31
2.2.3 HSV-1 Infektion von Zelllinien und isolierten primären Zellen	31
2.2.4 HSV-1 Infektion von murinem/humanem Geweben	31
2.3 Präparation, Färbung und Mikroskopie	32
2.3.1 Zellen	32
2.3.2 Gewebe	32
2.3.2.1 Immunfluoreszenzfärbung von Cyro-Schnitten	32
2.3.2.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE Färbung) von Cryo-Schnitten	32
2.3.2.3 Whole mout-Verfahren	33
2.3.3 Fluoreszenzmikroskopie	34
2.3.3.1 Epifluoreszenz-Mikroskopie	34
2.3.3.2 Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie	34
2.3.4 Transport von Geweben	34
2.4 Arbeiten mit DNA	34
2.4.1 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.4.2 Transformation von DNA in kompetente Bakterien	34
2.4.3 Präparation von DNA	34
2.5 Arbeiten mit Proteinen	34
2.5.1 Präparation von Zell- und Epidermis-Extrakten	34
2.5.1.1 Präparation von Zell-Extrakten (RIPA-Methode)	34
2.5.1.2 Präparation von Gesamt-Zellextrakten	35
2.5.1.3 Präparation von Epidermis-Extrakten	35
2.5.2 Isolierung von aktivierten Rho-GTPasen ('Pierce EZ-Detect Rac1/Cdc42 activation kit')	35
2.5.3 Nachweis von Proteinen mit Hilfe der BCA-Methode	35
2.5.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)	35
2.5.5 Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen mit anschließendem immunchemischen Nachweis von Proteinen durch Antikörper (Western-Blot-Analyse)	36
2.6 Transfektionsmethoden	36
2.6.1 Elektroporation (Nucleofectormethode)	36
2.6.2 Liposomen-Transfektionsmethoden	36
2.6.2.1 Lipofectamine LTX (Invitrogen)	36
2.6.2.2 Hiperfect (Qiagen)	36

2.7 Inhibitorstudien	36
2.8 Temperaturversuch	37
2.9 Hungerversuch	37
2.10 Herstellung elektronenmikroskopischer Präparate	37
<b>III. Zielsetzung</b>	<b>38</b>
<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>39</b>
<b>1. Die Bedeutung von Rac1 und Cdc42 für die frühe HSV-1 Infektion in Keratinozyten</b>	<b>39</b>
1.1 Die frühe HSV-1 Infektion in Keratinozyten	39
1.2 Einfluss der frühen HSV-1 Infektion auf die Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42	39
1.2.1 Untersuchung der Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 während der frühen HSV-1 Infektion in nicht-gehungenerten HaCaT-Zellen	39
1.2.2 Untersuchung der Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 während der frühen HSV-1 Infektion in gehungenerten HaCaT-Zellen	41
1.3 Einfluss von Rac1- und Cdc42-Mutanten auf die frühe HSV-1 Infektion	41
1.4 Einfluss der Reduktion von Rac1, Cdc42 und RhoA auf die frühe HSV-1 Infektion	42
1.4.1 Einfluss der Reduktion von Rac1, Cdc42 und RhoA auf die frühe virale Genexpression und die Virusproduktion in HaCaT-Zellen	43
1.4.2 Einfluss der Reduktion von Rac1, Cdc42 und RhoA auf die frühe virale Genexpression in humanen primären Keratinozyten	43
1.4.3 Einfluss der Reduktion von Rac1, Cdc42 und RhoA auf die frühe virale Genexpression in MDCKII-Zellen	45
1.5 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in der Rac1 konditionalen transgenen Maus (Rac1 E-KO)	46
1.5.1 Infektionsstudien in muriner Gesamthaut und Epidermis	46
1.5.2 Einfluss der Rac1-defizienten Epidermis der Rac1 konditionalen transgenen Maus auf die frühe virale Genexpression von HSV-1	49
1.6 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in der L61Rac1 konditionalen transgenen Maus	51
1.6.1 Einfluss der L61Rac1-exprimierenden Epidermis der L61Rac1 konditionalen transgenen Maus auf die frühe HSV-1 Infektion	51
1.6.2 Einfluss von L61Rac1-exprimierenden murinen primären Keratinozyten auf die frühe HSV-1 Infektion	52
1.7 Einfluss der transienten Überexpression von Rac1-Mutanten auf die Immunantwort von MDCKII-Zellen	53
<b>2. Die Charakterisierung der HSV-1 Internalisierung in humane Keratinozyten</b>	<b>54</b>
2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung	54
2.1.1 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in HaCaT-Zellen	55
2.1.2 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in humane primäre Keratinozyten	58
2.1.3 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in gehungerte humane primäre Keratinozyten	58
2.1.4 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in HaCaT-Zellen und humane primäre Keratinozyten bei verschiedenen Umgebungstemperaturen	58
2.2 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in humane primäre Keratinozyten und HaCaT-Zellen durch Inhibitorstudien	60
2.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung nach Dynasore-Behandlung	60
2.2.1.1 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in humane primäre Keratinozyten und HaCaT-Zellen nach Dynasore-Behandlung	62
2.2.1.2 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in Dynasore-behandelter muriner Epidermis	64
2.2.2 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in HaCaT-Zellen nach Einwirkung von Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl) und Dextrose	64
2.2.2.1 Der Einfluss von Ammoniumchlorid auf die frühe HSV-1 Infektion	65

2.2.2.1.1 Untersuchung von Ammoniumchlorid-behandelter HaCaT-Zellen auf potentielle Sekundäreffekte	65
2.2.2.1.2 Der Einfluss des pH-Werts auf die Internalisierung von HSV-1 in HaCaT-Zellen	67
2.2.2.2 Der Einfluss von Dextrose auf die frühe HSV-1 Infektion	67
2.3 Kolokalisierungsstudien von Viruspartikeln mit Markern zellulärer Organellen in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinozyten während der frühen HSV-1 Infektion	69
2.3.1 Kolokalisierungsstudien der VP26-RFP HSV-1 Rekombinante mit frühen Endosomen und Lysosomen in HaCaT-Zellen	69
2.3.2 Kolokalisierungsstudien der VP26-RFP HSV-1 Rekombinante mit frühen Endosomen in humanen primären Keratinozyten	71
<b>3. Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in Gewebe</b>	71
3.1 Einfluss der Separierungsreagenzien Dispasell und EDTA auf die frühe HSV-1 Infektion in murinem Gewebe	71
3.1.1 Vergleich der Separierungsreagenzien Dispasell und EDTA	73
3.1.2 Untersuchung der Basalmembran nach unterschiedlicher Separierungsmethode	75
3.1.3 Untersuchung des inhibierenden Effekts von EDTA in muriner Epidermis	75
3.1.4 Untersuchung des inhibierenden Effekts von EDTA in HaCaT-Zellen	76
3.2 Einfluss der Necl2-Überexpression in der Epidermis der Necl2 konditionalen transgenen Maus auf die frühe virale Genexpression von HSV-1	77
3.2.1 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in der Epidermis der Necl2 konditionalen transgenen Maus	77
3.3 Etablierung eines HSV-1 Infektionsmodell in humaner oraler Schleimhaut	79
3.3.1 Untersuchung der frühen viralen HSV-1 Infektion in epidermaler Mukosa	79
3.3.2 Untersuchung der frühen viralen HSV-1 Infektion in intakter Mukosa	82
3.3.3 Untersuchung der frühen viralen HSV-1 Infektion in verletzter Mukosa	82
<b>V. Diskussion</b>	85
1. Die Bedeutung von Rac1 und Cdc42 für die frühe HSV-1 Infektion in Keratinozyten	85
2. Die Charakterisierung der HSV-1 Internalisierung in humanen Keratinozyten	88
3. Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in Gewebe	91
4. Ausblick	94
4.1	94
4.2	95
4.3	95
<b>VI. Literaturverzeichnis</b>	97
<b>VII. Danksagung</b>	104
Erklärung	

---

Abb.1	Aufbau von HSV-1	1
Abb.2	Internalisierungswege von Viren	4
Abb.3	Abschnürung eines Vesikels	5
Abb.4	Rho GTPasen – Schlüsselregulatoren des Aktin-Zytoskeletts	9
Abb.5	Die Epidermis	12
Abb.6	Darstellung der whole mount-Präparation	33
Abb.7	Veränderung der endogenen Rac1- und Cdc42-Aktivitätszustände von nicht-gehungenerten und gehungenerten HaCaT-Zellen während der frühen HSV-1 Infektion	40
Abb.8	Einfluss der transienten Überexpression von Rac1- und Cdc42-Mutanten (Myc-Tag) auf die frühe HSV-1 Infektion	42
Abb.9	Einfluss der Reduktion von Rac1, Cdc42 und RhoA in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinozyten während der frühen HSV-1 Infektion	44
Abb.10	Einfluss der Reduktion von Rac1 und Cdc42 in MDCKII-Zellen während der frühen HSV-1 Infektion	46
Abb.11	HSV-1 Infektion von muriner Epidermis	47
Abb.12	Whole mount-Präparate HSV-1 infizierter muriner Epidermis	48
Abb.13	HSV-1 Infektion der Epidermis von Rac1 konditionalen transgenen Mäusen (Rac1 E-KO)	50
Abb.14	Lokalisierung HSV-1 infizierter Zellen der Epidermis von Rac1 konditionalen transgenen Mäusen (Rac1 E-KO)	51
Abb.15	Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in L61Rac1-exprimierenden murinen Keratinozyten	52
Abb.16	Einfluss der transienten Überexpression von Rac1-Mutanten (Myc-Tag) auf eine potentielle Immunisierung und von IRF-3-Mutanten (HA-Tag) auf die frühe HSV-1 Infektion von MDCKII-Zellen	54
Abb.17	Kontrolle der HSV-1 Infektionseffizienz für EM-Präparate in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinozyten	55
Abb.18	Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in HaCaT-Zellen	56
Abb.19	Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in humane primäre Keratinozyten	57
Abb.20	Auswirkung der Umgebungstemperatur auf die HSV-1 Internalisierung in humane primäre Keratinozyten (Elektronenmikroskopie) und auf die frühe virale Genexpression in HaCaT-Zellen (konfokale Mikroskopie)	59
Abb.21	Kontrolle des inhibierenden Dynasore-Effekts und der HSV-1 Infektionseffizienz für EM-Präparate in humanen primären Keratinozyten	60
Abb.22	Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in Dynasore-behandelte humane primäre Keratinozyten	61
Abb.23	Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in Dynasore-behandelte HaCaT-Zellen	63



Abb.24	Einfluss von Dynasore auf die frühe HSV-1 Infektion in muriner Epidermis (whole mount)	64
Abb.25	Einfluss von Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl) auf die frühe virale Genexpression von HSV-1	66
Abb.26	Einfluss von Dextrose auf die frühe virale Genexpression von HSV-1	68
Abb.27	Kolokalisierungsstudien von eintretenden Viren mit zellulären Organellenmarkern	70
Abb.28	Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion nach Separierung der Epidermis durch Dispasell oder EDTA	72
Abb.29	Untersuchung von Basalmembran-Markern nach Separierung der Epidermis durch Dispasell oder EDTA	74
Abb.30	Liste eingesetzter Basalmembran-Marker nach Separierung der Epidermis durch Dispasell oder EDTA	76
Abb.31	Untersuchung der HSV-1 Infektion in der Epidermis der Necl2 konditionalen transgenen Maus	78
Abb.32	Untersuchung der HSV-1 Infektion in humaner epidermaler Mukosa	81
Abb.33	Untersuchung der HSV-1 Infektion in humaner verletzter oder unverletzter Mukosa	83

Abb.	Abbildung
BCA	bicinchoninic acid (Bicinchonininsäure)
BHK21	baby hamster kidney 21 (Säugerzelllinie)
BSA	bovine serumalbumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CAV	cell-associated virus (intrazelluläres Virus)
CRV	cell-released-virus (extrazelluläres Virus)
d.h.	das heisst
D-MEM	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/RNA	(Deoxy)ribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure/Ribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie/elektronenmikroskopisch
et al.	und andere
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
g	Gramm
G	Zentrifugalkraft, ausgedrückt als x-faches der Erdbeschleunigung
GFP	green fluorescent protein (Grün-fluoreszierendes Protein)
h	Stunde(n)
HaCaT	human adult calcium temperature (Säugerzelllinie)
HHV	Humanes Herpesvirus
HSV-1/-2	Herpes simplex Virus Typ 1/2
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
MDCK	Madin Darby canine kidney (Säugerzelllinie)
µg	Mikrogramm
min	Minute(n)
min.	mindestens
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromol
mM	Millimolar
MOI	multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion)
ng	Nanogramm
NGS	normal goat serum (Ziegenserum)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
p.i.	post infection (nach Infektion)
p.t.	post transfection (nach Transfektion)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PBS-T	PBS mit Tween-20
PFU	plaque forming unit (Plaque formende Einheit)
pH	pH-Wert
RFP	red fluorescent protein (Rot-fluoreszierendes Protein)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)

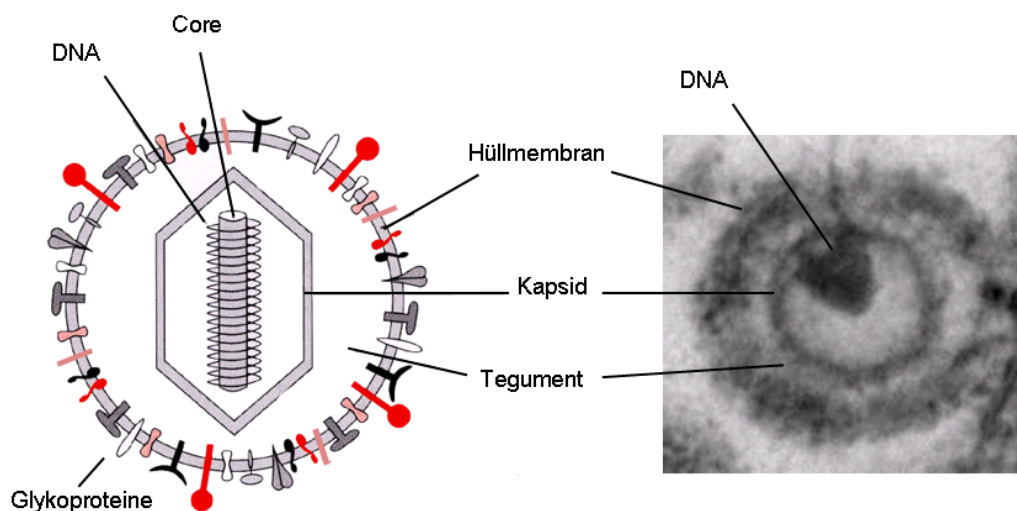
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheiten)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## I. Einleitung

### 1. Der Eintritt von HSV-1 in die Zelle

#### 1.1 Herpes simplex Typ 1 (HSV-1)

Die Infektion mit humanpathogenen Herpes simplex Viren (HSV) kann neben meist harmlosen Erkrankungen ernsthafte und lebensbedrohliche Komplikationen verursachen. Beispiele sind die HSV-Enzephalitis und HSV als weltweit häufigste Ursache einer infektionsbedingten Erblindung. Während HSV-1 vorwiegend Infektionen im orofazialen Bereich verursacht, ist HSV-2 für Infektionen im Genitalbereich verantwortlich. Die primäre Eintrittspforte für HSV in den Wirtsorganismus bilden dabei Keratinozyten der Haut- und Schleimhautepithelien, in denen sich das Virus produktiv vermehrt. Es wird angenommen, dass Mikroläsionen der Haut/Schleimhäute das Eindringen der Viren in das Epithel erleichtern. Nach Infektion des Epithels erreicht das Virus das periphere Nervensystem und führt zu einer lebenslangen latenten Infektion neuronaler Zellen der dorsalen Nervenganglien. Allgemein ist die Entwicklung einer HSV Infektion vom Immunstatus des Wirts abhängig. Verschiedene Stimuli wie beispielsweise UV-Licht, psychische Einflüsse oder andere Infektionen können hierbei zur Reaktivierung des Virus führen. Diese so genannte Sekundärinfektion führt dann meist zu vesikulärer Eruption (Herpes labialis, Fieberbläschen). Die humanpathogenen Herpes simplex Viren bilden zusammen mit dem Varicella-Zoster Virus (VZV) eine Unterfamilie der Herpesviren. Charakteristische Merkmale sind hierbei ein kurzer Replikationszyklus und eine schnelle Zell-Zell-Ausbreitung. Das Herpes simplex Virus gehört zu den doppelsträngigen DNA-Viren und ist von pleomorpher, annähernd runder Form (zirka 200nm im Durchmesser). Die Virushülle besteht aus einer Lipidmembran, in der verschiedene Glykoproteine integriert sind. Einige dieser Proteine spielen bei der Adsorption des Virus an die Wirtszelle und bei der Aufnahme in die Zelle eine entscheidende Rolle. Das Viruskapsid ist von ikosaedraler Symmetrie und besteht aus 162 Kapsomer-Untereinheiten, deren Bauelemente fünf verschiedene virale Strukturproteine bilden (VP5, VP19C, VP23, VP26 und UL6).



**Abb.1 Aufbau von HSV-1**

Dargestellt ist der Aufbau von HSV-1 mit seinen einzelnen Strukturelementen (links; aus Modrow et al., 1997, modifiziert) und eine elektronenmikroskopische Aufnahme (rechts).

Im Bereich zwischen Virushülle und Kapsid ist das amorphe Tegument (proteinhaltige Matrix) angeordnet, das aus mindestens 20 verschiedenen viralen Proteinen aufgebaut ist. Im Inneren des Viruskapsids befindet sich das lineare, doppelsträngige DNA-Genom (152kb) (Abb.1; zur Übersicht Roizman et al., 2007).

## 1.2 Die Internalisierung von HSV-1 in die Zelle

Unter Laborbedingungen kann das humanpathogene HSV-1 eine Vielzahl verschiedener Säugerzelllinien infizieren. Zum Eintritt von HSV-1 gehören mehrere Schritte, wie die Bindung des Virus an die Plasmamembran mit nachfolgender Penetration (Internalisierung), der Transport zum Zellkern, die Ausrichtung des Kapsids an der Kernpore und die Einschleusung der DNA ins Kernplasma.

Die Internalisierung von HSV-1 in die Zelle ist wiederum ein Mehrschrittmechanismus und hängt von der Interaktion viraler Glykoproteine mit verschiedenen zellulären Oberflächenrezeptoren ab. Der erste Schritt der Internalisierung ist die initiale Adsorption von HSV-1 an die Wirtszelle, welche reversibel ist und durch die Bindung der viralen Glykoproteine gC und gB an zelluläre Glykosaminoglykan-Seitenketten, bevorzugt an Heparansulfat, erfolgt. Glykosaminoglykan-Seitenketten bilden zusammen mit einem Core-Protein die Heparansulfatproteoglykane (HSPGs), bei denen Syndekan-1 und -2, die bei Epithel-Zellen vorkommen, viel versprechende Kandidaten der initialen Adsorption sind (Cheshenko et al., 2007; zur Übersicht Bartlett und Park, 2010). Interessanterweise ist die Interaktion von gC nicht essentiell für die HSV-1 Infektion in Zellkultur, erhöht aber bei Anwesenheit die Effizienz der viralen Bindung (zur Übersicht O'Donnell und Shukla, 2008). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Heparansulfat außer zur Virusbindung auch eine Funktion bei dem 'Surfing' von HSV-1 entlang der Filopodien hat (Oh et al., 2010).

Der zweite Schritt der Internalisierung ist die Penetration der Plasmamembran. Hierzu ist die Bindung des viralen Glykoproteins gD an einen Ko-Rezeptor entscheidend. Zusätzlich sind die Glykoproteine gB und gH/gL für eine irreversible Bindung notwendig. Für das Glykoprotein gD sind bis heute 3 Gruppen von Ko-Rezeptoren charakterisiert. Die erste Gruppe bildet das HVEM ('herpesvirus entry mediator'), das ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie ('tumor necrosis factor') darstellt (Montgomery et al., 1996). Die zweite Gruppe beinhaltet unter anderem die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie Nektin-1 und Nektin-2 (Cocchi et al., 1998; Geraghty et al., 1998). Bei der letzten Gruppe handelt es sich um eine spezielle Form von Heparansulfat (3-O-S-HS), welches nach Modifikation durch 3-O-Sulfotransferasen gebildet wird (Shukla et al., 1999). Erst kürzlich ist ein weiterer Ko-Rezeptor identifiziert worden, der so genannte 'Immunoglobulin-like type 2 receptor  $\alpha$ ' (PILR $\alpha$ ), der mit dem Glykoprotein gB assoziiert ist (Satoh et al., 2008).

Durch die Manipulation des Glykoproteins gD kann beispielsweise die Bindung zu den natürlichen Ko-Rezeptoren verhindert und die Bindung zu einem Wachstumsfaktor-Rezeptor ('human epidermal growth factor receptor 2' (HER2)), der in gewissen Tumorarten überexprimiert ist, vermittelt werden. In Zellkultur lassen sich dadurch gezielt Tumorzellen infizieren und zerstören (Menotti et al., 2008).

Nektin-1 ist der am besten untersuchte Ko-Rezeptor, der zu einer Familie Calcium-unabhängiger Zell-Adhäsionsmoleküle gehört, und als Dimer über Trans-Interaktion mit anderen Nektin-Dimeren Zell-Adhäsion vermitteln kann. Weiter spielt Nektin-1 auch eine wichtige Rolle bei zellulären Aktivitäten wie

Zell-Polarität, Differenzierung, Bewegung, Migration, Proliferation und dem Überleben der Zelle (zur Übersicht Takai et al., 2008a, b). Interessanterweise sind viele Rezeptoren, welche von Viren genutzt werden, Zell-Adhäsionsmoleküle, die sich innerhalb des Gewebes befinden (zu Übersicht Baranowski et al., 2001). Die Funktion dieser Rezeptoren scheint daher eher für die Ausbreitung des Virus von Zelle zu Zelle verantwortlich zu sein und nicht für den initialen Eintritt. In Zellkultur dagegen zeigt sich, dass Nektin-1 sowohl in den initialen Eintritt, als auch in die Virusausbreitung von Zelle zu Zelle involviert ist (Cocchi et al., 2000; Krumpal et al., 2003). In der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT beispielsweise ist die Expression von Nektin-1 relativ hoch und kann den Eintritt von HSV-1 in die Zelle vermitteln (Huber et al., 2001).

Die Aufnahme von HSV-1 in die Zelle kann sowohl durch Fusion mit der Plasmamembran (Abb.2A; Fuller und Spear, 1987; Fuller et al., 1989; Wittels und Spear, 1991; Fuller und Lee, 1992) als auch über endozytotische Wege erfolgen (Abb.2B; Nicola et al., 2003, 2005; Gianni et al., 2004; Nicola und Straus, 2004; Milne et al., 2005). Der Prozess der direkten Fusion von viraler Hüllmembran mit der Plasmamembran der Zelle ist unter anderem für Vero-B4-Zellen und Neurone gezeigt. Die endozytotische Aufnahme gliedert sich wiederum in einen pH-Wert-abhängigen und einen pH-Wert-unabhängigen (gD Rezeptor-abhängigen) Aufnahmeprozess. Die pH-Wert-abhängige endozytotische Aufnahme wurde bei Infektion von HeLa-Zellen, humanen Keratinozyten, Nektin-1-exprimierenden CHO-Zellen und CF-Zellen beobachtet, wohingegen die pH-Wert-unabhängige endozytotische Aufnahme in Nektin-1-exprimierenden C10-Zellen beschrieben ist. Interessanterweise hat die endozytotische Aufnahme von HSV-1 in Nektin-1-exprimierenden CHO-Zellen und CF-Zellen viele Eigenschaften mit einer phagozytotischen Aufnahme gemein (Clement et al., 2006). Der verwendete Mechanismus der HSV-1 Internalisierung in die Zelle ist möglicherweise von zellulären Rezeptoren abhängig. Wird anstatt Nektin-1 der Ko-Rezeptor PILR $\alpha$  in CHO-Zellen exprimiert, verläuft die HSV-1 Internalisierung anstatt über eine pH-Wert-abhängige Endozytose über direkte Fusion (Arii et al., 2009). Der gleiche Ko-Rezeptor kann aber auch je nach verwendeter Zelllinie zu einem unterschiedlichen Internalisierungsweg führen (Gianni et al., 2004).

Wie die Untersuchung der Internalisierung in verschiedenen Zelllinien zeigt, hat HSV das Potential verschiedene Mechanismen für den Eintritt in die Zelle zu nutzen. Da humane Keratinozyten der Haut/Schleimhaut die primäre Eintrittspforte von HSV-1 in den Wirtsorganismus darstellen, ist es wichtig, den Viruseintritt in diesen Zellen zu charakterisieren. Eine erste Studie weist hierbei auf einen endozytotischen Eintrittsmechanismus hin (Nicola et al., 2005).

### **1.3 Der Transport des Kapsids, die Einschleusung der DNA in den Zellkern und die beginnende virale Genexpression von HSV-1**

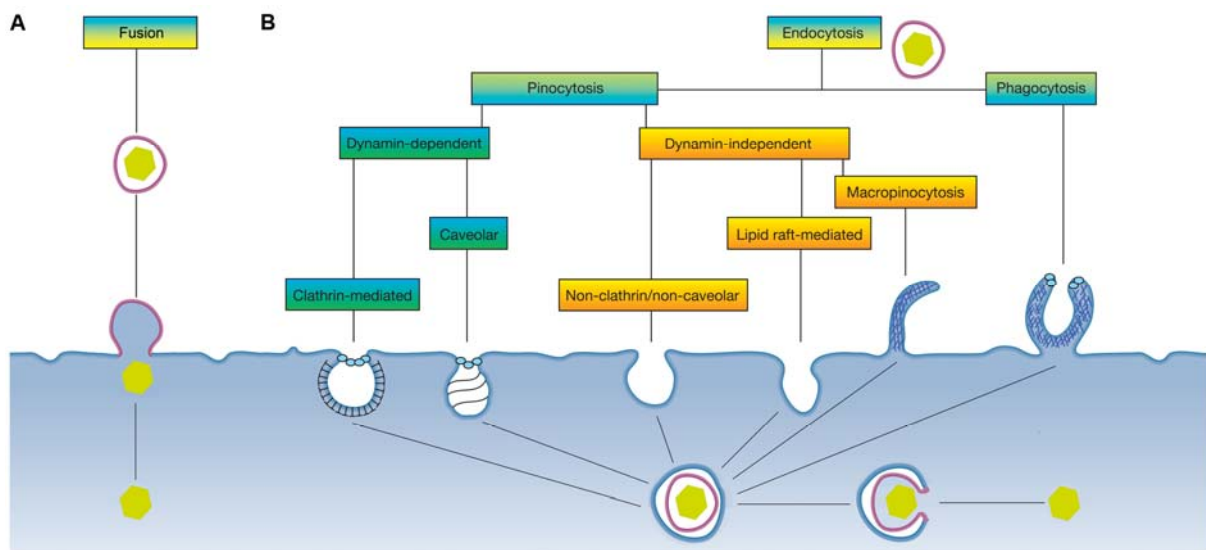
Zum viralen Eintritt gehören neben der Internalisierung auch der Transport des Kapsids entlang von Mikrotubuli zum Zellkern und die Einschleusung der viralen DNA über die Kernporen ins Kernplasma. Im Kern angekommen schließt sich die lineare DNA zu einem Ring zusammen und eine kaskadenartige zeitlich-regulierte Genexpression beginnt. Zunächst bildet das Tegumentprotein VP16 mit den beiden zellulären Komponenten Octamer-1 (Oct-1) und HCF ('host-cell-factor') einen Komplex aus, der an die Promotoren der sehr frühen viralen Gene bindet und die Transkription durch die RNA-Polymerase II stimuliert. Aus der sehr frühen Genexpression gehen die fünf  $\alpha$ -Proteine ICP0, ICP4,

ICP22, ICP27 und ICP47 ('infected cell protein' 0, 4, 22, 27 und 47) hervor, die wiederum als wichtige Regulatoren der Promotoren der frühen Gene fungieren. Das gut charakterisierte  $\alpha$ -Genprodukt ICP0 erfüllt neben seiner Rolle als Aktivator der  $\beta$ -Gene auch eine Reihe weiterer Funktionen, die sich vom Abbau der ND10('nuclear domain 10')-Strukturen im Kern (Everett und Maul, 1994; Maul und Everett 1994) bis zur vermuteten Internalisierung von Rezeptoren an der Plasmamembran erstrecken (Liang et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde ICP0 als Marker für eine erfolgreiche HSV-1 Infektion in Zellen und Geweben verwendet (Schelhaas et al., 2003). Die Genprodukte der  $\beta$ -Gene dienen in erster Linie der Vervielfältigung des viralen Genoms, während zeitgleich mit der viralen Replikation die späten Gene exprimiert werden. Die  $\gamma$ -Genprodukte sind hauptsächlich Strukturproteine (Tegument-Proteine und Glykoproteine der Hüllmembran) und Regulatoren, die an dem Zusammenbau der Kapside und der Verpackung des Genoms beteiligt sind (zur Übersicht Roizman et al., 2007).

## 2. Der virale Eintritt in die Zelle und die Modulation der zellulären Signaltransduktion

### 2.1 Der endozytotische Eintrittsmechanismus von Viren

Für die Aufnahme von HSV-1 in humane Keratinozyten gibt es erste Evidenz für einen endozytotischen Eintrittsmechanismus (Nicola et al., 2005). Allgemein sind für Viren eine Reihe von endozytotischen Eintrittsmechanismen bekannt, die eine effiziente Alternative zur direkten Fusion bilden (Abb.2; zur Übersicht Mercer et al., 2010). Zusätzlich können Viren auch im Verlauf der Infektion endozytotische Prozesse manipulieren. So ist gezeigt, dass das frühe virale Protein ICP0 von HSV-1 zur endozytotischen Internalisierung von membranständigen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGF) führen kann (Liang et al., 2005).



**Abb.2 Internalisierungswege von Viren**

(A) Direkte Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran. (B) Endozytotische Aufnahmemöglichkeiten von Viren (aus Mercer und Helenius, 2009, modifiziert).

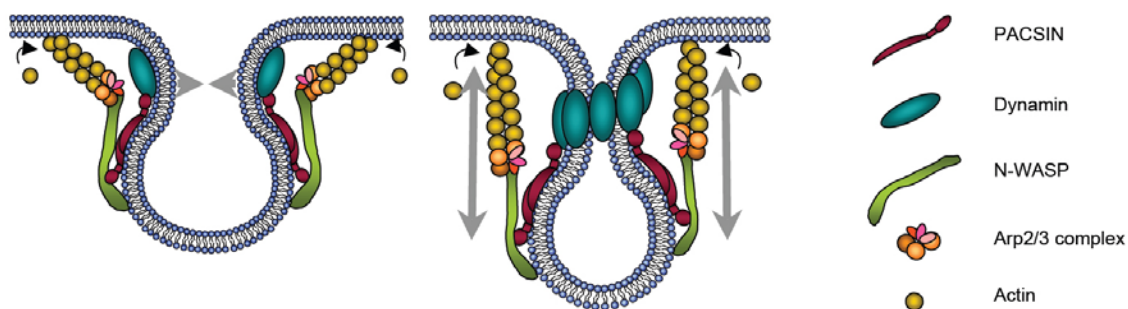
Allgemein versteht man unter Endozytose die aktive Aufnahme von extrazellulärem Material in Membran-umschlossene Vesikel. Neben der Aufnahme und Verteilung essentieller Nähr- und Signalstoffe vermittelt die Endozytose auch die geregelte Wechselwirkung mit der Außenwelt. Des Weiteren spielt die Endozytose in vielen Prozessen, etwa in der Rezeptor-Regulation, der Entfernung

apoptotischer Zellen, der Hypertension oder in der synaptischen Übertragung, eine wichtige Rolle. Die Endozytose kann nach funktionalem Gesichtspunkt in Phagozytose und Pinozytose unterteilt werden. Während die Phagozytose meist in spezialisierten Zellen stattfindet und ein Mechanismus ist, um Partikel ins Zytoplasma zu schleusen, führt die Pinozytose zur Aufnahme von Flüssigkeiten und darin gelöster Substanzen. Die Pinozytose wird von allen Zellen ausgeübt und kann wiederum in die Clathrin-vermittelte Endozytose, die Caveolae-vermittelte Endozytose, die Makropinozytose und in die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose untergliedert werden. Eine Einteilung kann auch nach Dynamin-Abhängigkeit getroffen werden. Prominente Vertreter der Dynamin-abhängigen Endozytose sind die Clathrin- und Caveolae-vermittelte Endozytose. Dynamin-unabhängig sind die Makropinozytose und die Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose (zur Übersicht Doherty und McMahon, 2009).

### 2.1.1 Dynamin-abhängige Endozytose

#### Dynamin

Dynamin ist eine Multidomänen-GTPase und spielt eine entscheidende Rolle bei der Abschnürung der membrangebundenen Vesikel ins Zellinnere ('membrane fission'). Während der Clathrin-vermittelten Endozytose oligomerisiert Dynamin helikal an den Vesikelhälsen und führt nach der Hydrolyse des gebundenen GTPs zu einer Spaltung des Vesikeltubulus (Abb.3; zur Übersicht Mettlen et al., 2009). Im Gegensatz zu vielen anderen GTPasen zeichnet sich Dynamin durch eine ungewöhnlich hohe basale GTPase-Aktivität und eine vergleichsweise geringe Affinität für GTP und GDP aus. Dynamin in Verbindung mit Aktin-bindenden Proteinen hat aber auch Funktionen bei der Regulierung und Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (zur Übersicht Kruchten und McNiven, 2006). In Säugetieren wurden bislang drei Dynamin-Isoformen mit unterschiedlicher Gewebespezifität nachgewiesen (Dynamin1 – 3). Dynamin1 ist auf Nervenzellen beschränkt, Dynamin2 kommt ubiquitär vor und Dynamin3 wird in Lunge, Herz, Gehirn und Testes exprimiert. Zusätzlich gibt es verschiedene Spleißvarianten, die distinkte Aufgaben in der Zelle erfüllen (zur Übersicht McNiven et al., 2000).



**Abb.3 Abschnürung eines Vesikels**

Dargestellt ist die Dynamin-abhängige Abspaltung eines Vesikels ins Zellinnere (aus Aspenström, 2009)



### **Clathrin-vermittelte Endozytose**

Die Clathrin-vermittelte Endozytose wird unter anderem von Transferrin und LDL ('low density lipoprotein') zur Internalisierung genutzt. Hierbei kommt es zunächst zur Bindung eines Moleküls an einen spezifischen Transmembran-Rezeptor. Als Folge der Selbstanordnung des Rezeptor-Molekül-Komplexes und verschiedener Proteine werden Clathrin-bedeckte Einstülpungen ('Clathrin-coated pits') gebildet. Nach Abschnürung des Clathrin-umhüllten Vesikels durch Dynamin wird der Rezeptor-Molekül-Komplex ins Zellinnere transportiert, bevor die Clathrin-Monomere wieder abgelöst und zur Plasmamembran zurück transportiert werden. Die Gesamtdauer für einen einzelnen Zyklus wird auf weniger als eine Minute vermutet (zur Übersicht Doherty und McMahon, 2009). Die Bildung der Clathrin-umhüllten Vesikel ist sehr komplex, da hierbei mehrere Proteinkomponenten beteiligt sind. Als Voraussetzung gilt die Rekrutierung von AP2-Komplexen an die Donormembran, bei der Eps15 beteiligt zu sein scheint (Benmerah et al., 1999).

Der Eintritt über Clathrin-vermittelte Endozytose ist bereits für mehrere Viren wie beispielsweise das Semliki Forest Virus (SFV), das Influenzavirus, das Adenovirus (Serotyp 2 und 5) und das hämorrhagische Krim-Kongo-Fiebertoxin (CCHFV) beschrieben. Der Nachweis erfolgte dabei meist mittels transients Überexpression dominant negativer Mutanten, RNA Interferenz-Analysen oder Kollokalisierungsstudien der beteiligten Proteine. Die transiente Überexpression der dominant negativen Eps15-Mutante beispielsweise zeigt, dass das Arenavirus eine Clathrin-Abhängigkeit aufweist (zur Übersicht Mercer und Helenius, 2009). Die Größe der Vesikel der Clathrin-vermittelten Endozytose beläuft sich auf 120nm. Interessanterweise können auch größere Partikel wie das VSV ('vesicular stomatitis virus') internalisiert werden (Curetton et al., 2009).

### **Caveolae-vermittelte Endozytose**

Caveolae sind klassischerweise flaschenförmige Einschnürungen der Plasmamembran, in denen das integrale Membranprotein Caveolin1 den Hauptbestandteil ausmacht. Aufgrund des hohen Gehalts an Cholesterol und GPI-Proteinen sind diese Membranbereiche schwer löslich und werden als 'Detergent resistant Membran' (DRM) bezeichnet. Diese Eigenschaft wird zur Untersuchung der auf Caveolae-basierenden Prozesse verwendet. Caveolae stellen eine Sonderform dynamischer Cluster in der Plasmamembran dar. Die Cluster, die meist aus Sphingolipiden und Cholesterol aufgebaut sind, werden auch als Lipidflöße ('lipid rafts') bezeichnet (zur Übersicht Simons und Ikonen, 1997). Die Sonderform dieser Lipidflöße enthalten wenigstens ein Protein der drei Caveolin-Proteine (Caveolin1 – 3). Während die Clathrin-vermittelte Endozytose über frühe und späte Endosomen zu lysosomaler Degradation führen kann, sind über Caveolae-internalisierte Vesikel (Caveosomen) in der Lage, diese abbauenden zellulären Kompartimente zu umgehen. Die Caveosomen sind mit einer Größe von 60 – 100nm angegeben, bilden damit sehr kleine Vesikel aus und internalisieren deutlich langsamer als Clathrin-umhüllte Vesikel (>20min) (zur Übersicht Doherty und McMahon, 2009).

Studien zum Eintritt von Papillomavirus Typ31 (HPV31) zeigen, dass erst die Behandlung mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD), das zur Spaltung von Cholesterol und DRM führt, die zelluläre Aufnahme von HPV31 inhibieren kann (Smith et al., 2007). Interessanterweise verwendet auch das Cholera Toxin B diesen Aufnahmeprozess (zur Übersicht Lencer et al., 1999). Neben HPV31 ist auch für das Ebolavirus ein auf Caveolae-basierender Aufnahmeprozess unter Verwendung von M $\beta$ CD

nachgewiesen worden (Empig et al., 2002). Zusätzlich verwenden Polyomaviren wie SV40 ('Simian Virus 40') und Echovirus sowie das Picornavirus EV-1 die Caveolae-vermittelte Endozytose (zur Übersicht Kalia und Jameel, 2009).

### **2.1.2 Dynamin-unabhängige Endozytose**

#### **Makropinozytose**

Bei der Makropinozytose werden größere Mengen an extrazellulärer Flüssigkeit und darin gelöster Stoffe und Makromoleküle durch Ausstülpung der Plasmamembran internalisiert. Die Makropinozytose beruht auf einer Umlagerung des Aktin-Zytoskeletts, welche auch bei der Phagozytose eine große Rolle spielt. Die gebildeten Vesikel (Makropinosomen) haben eine Größe von bis zu 1µm (zur Übersicht Doherty und McMahon, 2009).

Es ist gezeigt, dass das Vacciniavirus über die Aktivierung der p21-aktivierenden Kinase (PAK1) sowie das Adenovirus über Integrin-abhängige Bindung an die Zelle die Makropinozytose stimulieren können. Weiter liefert die Studie von Nicola et al. (2005) eine erste Evidenz für eine makropinozytische Aufnahme von HSV-1 in humane Keratinozyten (zur Übersicht Mercer und Helenius, 2009).

#### **Clathrin- und Caveolae-unabhängigen Endozytose**

Die Clathrin- und Caveolae-unabhängigen Endozytoseprozesse sind noch wenig verstanden und wurden durch die Untersuchung der Dynamin-abhängigen Interleukin-2 (IL-2) Rezeptor-Aufnahme entdeckt. Neben der Dynamin-abhängigen Aufnahme, ist auch eine Dynamin-unabhängige Aufnahme postuliert. Für beide Wege wird eine Cholesterol-Abhängigkeit angenommen. Der Cholesterol-abhängige Aufnahmeweg wird für das Echo Virus 1 postuliert (zur Übersicht Marsh und Helenius, 2006). Sowohl der Mechanismus als auch der Zusammenbau der Vesikel sind bislang noch unbekannt. Vermutlich stellen die Clathrin- und Caveolae-unabhängigen Endozytoseprozesse eine weitere evolutionäre Stufe der Endozytose dar, die es Zellen ermöglicht, komplexere zellbiologische Funktionen zu erfüllen (zur Übersicht Conner und Schmid, 2003)

### **2.1.3 Zusammenfassung**

In diesem Kapitel ist eine kleine Auswahl an endozytotischen Aufnahmewegen für Viren in die Zelle beschrieben. Hierbei sind nicht alle Möglichkeiten der endozytotischen Mechanismen der Zelle aufgezeigt, da teilweise Aufnahmeprozesse noch nicht gut charakterisiert sind oder noch keine Viren gefunden wurden, die diese Wege nutzen, wie beispielsweise die Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose des Interleukin-2 Rezeptors (zur Übersicht Mercer et al., 2010). Es ist wichtig, zu beachten, dass Studien über den endozytotischen Aufnahmeweg in Zelllinien nicht unbedingt auch den Aufnahmeprozess *in vivo* reflektieren, da sowohl die Dichte der Zellen, die Zell-Adhäsion, als auch die Polarisierung der Zelle ein Regulator der Endozytose sein können (Llorente et al., 2000; zur Übersicht Del Pozo und Schwartz, 2007).

Des Weiteren fällt die Klassifizierung der verschiedenen endozytotischen Mechanismen schwer. Diese Schwierigkeit kann anhand des Polyomavirus SV40 gut demonstriert werden. Hierbei ist beschrieben, dass SV40 den Caveolae-vermittelten Eintritt in die Zelle verwendet (Pelkmans et al., 2002),

andererseits lassen sich Caveolin-1-defiziente murine primäre Fibroblasten gut mit SV40 infizieren (Damm et al., 2005). An diesem Beispiel wird schnell deutlich, dass sich die Klassifizierung eines Virus zu einem bestimmten Aufnahmeprozess nicht immer eindeutig fassen lässt und auch von der verwendeten Zelllinie und von den experimentellen Bedingungen abhängt. Ein anderes Beispiel, welches die Bedeutung der verwendeten Zelllinie herausstellt, ist die Infektion des Gruppe B Coxsackievirus (CVB), welches zur Familie der Picornaviren gehört und sechs Serotypen hat (CVB1 bis CVB6). Hier ist gezeigt, dass sich der Eintritt von CBV3 in nicht-polarisierten HeLa-Zellen von dem Eintritt in polarisierten CaCo-2-Zellen signifikant unterscheidet (Patel et al., 2009). Ein anderes Beispiel, welches aufzeigt, wie spezialisiert der Viruseintritt sein kann, ist das Denguevirus (DENV) der Flaviviren. Es sind vier Serotypen von DENV bekannt: DENV-1 bis DENV-4. In Vero-B4-Zellen gelangt DENV-1 über die Clathrin-vermittelte Endozytose in die Zelle, während der Eintritt von DENV-2 Clathrin-unabhängig ist (Acosta et al., 2009).

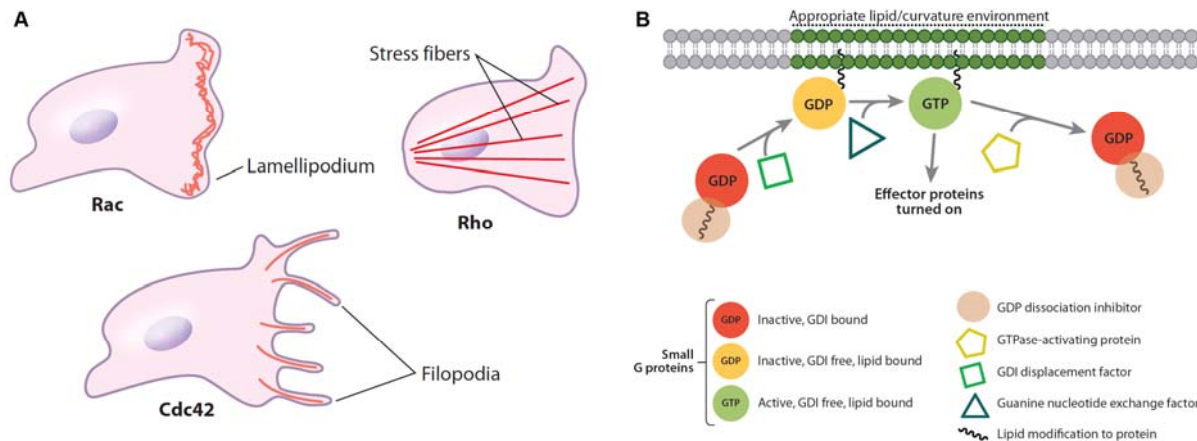
Der virale Eintrittsmechanismus in die Zelle ist daher nicht als stringente Gliederung zu sehen, sondern vielmehr als Anhaltspunkt in einer bestimmten Zelllinie unter bestimmten experimentellen Bedingungen. Gleichzeitig zur Internalisierung verändern Viren auch die Signaltransduktion der Zelle, die entweder den Viruseintritt begünstigt oder die Zelle in Alarmbereitschaft versetzt. Die Internalisierung von Viren und die Wechselwirkung mit der Zelle ist hoch-komplex und kann nicht verallgemeinert werden. Daher war es von großem Interesse den Eintritt von HSV-1 speziell in humanen Keratinozyten, die die Eintrittspforte in den Wirtsorganismus darstellen, zu charakterisieren und den Einfluss des Virus auf die zelluläre Signaltransduktion zu überprüfen.

## **2.2 Modulation der zellulären Signaltransduktionswege während der viralen Infektion**

### **2.2.1 Die Rho GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA**

Viren sind sehr gut an ihren Wirt angepasst und besitzen die Fähigkeit verschiedene Signaltransduktionswege der Wirtszelle zu adaptieren, zu hemmen oder zu modulieren. Bei der Modulation der zellulären Signaltransduktion werden meist zentrale Schlüsselregulatoren, die am Zellstatus beteiligt sind und deren veränderte Regulation zur Optimierung des Infektionszyklus beitragen können, beeinflusst (zur Übersicht Münter et al., 2006). Ein Vertreter dieser zentralen Regulatoren ist die Familie der Rho GTPasen, die eine wichtige Rolle in einem breiten Spektrum an biologischen Prozessen wie Zell-Morphologie, Zell-Adhäsion, Polarität, Proliferation, Differenzierung, sowie Apoptose, Endozytose und Immunität spielen (Abb.4A).

Die Rho GTPasen, zu denen Rac1, Cdc42 und RhoA gehören, fungieren als molekulare Schalter und können als aktive (GTP gebunden) und als inaktive Form (GDP gebunden) vorkommen (Abb.4B). In der Zelle liegen sie allerdings meist in der inaktiven Form vor. Des Weiteren besitzen sie eine Reihe von Effektoren, die entsprechend der Rho GTPase unterschiedliche Antworten weiterleiten können. Die Aktivierung der ubiquitär vorkommenden Rho GTPasen kann beispielsweise zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts führen, die sich in Lamellipodia-, Filopodia- oder Stressfibrillen-Formierung äußern (Abb.4A; zur Übersicht Heasman und Ridley, 2008). Die Überprüfung dieser zellulären Funktionen der Rho GTPasen sind meist durch transiente Überexpression von dominanten Mutanten entweder von Rac1, Cdc42 oder RhoA erbracht worden (zur Übersicht Feig, 1999).



**Abb.4 Rho GTPasen – Schlüsselregulatoren des Aktin-Zytoskeletts**

(A) Darstellung der Aktin-abhängigen Strukturen, die von aktivem Rac1 (Lamellipodien), Cdc42 (Filopodien) oder RhoA (Stressfibrillen) induziert werden (aus Münter et al., 2006). (B) Übersicht des Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus der Rho GTPasen (aus Doherty und McMahon, 2009).

Der Austausch einer spezifischen Aminosäure reicht meist aus, um eine Wildtyp-GTPase in eine konstitutiv aktive Mutante oder eine dominant negative Mutante zu verwandeln. Bei diesen Mutanten, die entweder dem aktiven oder inaktiven Zustand der Wildtyp-GTPase entsprechen, äußert sich ihr Einfluss in der Zelle durch eine direkte Bindung ihrer jeweiligen Effektoren (konstitutiv aktiv) oder über kompetitive Bindung an ihre Effektoren (dominant negativ), wodurch diese Effektoren nicht mehr von den endogenen Rho GTPasen aktiviert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden die konstitutiv aktiven Mutanten L61Rac1 und L61Cdc42, die dominant negativen Mutanten N17Rac1 und N17Cdc42 sowie die Wildtyp-Mutanten von Rac1 und Cdc42 verwendet.

### 2.2.2 Modulation der Rho GTPasen durch Viren

Erst seit einigen Jahren gibt es erste Hinweise bei verschiedenen Virusfamilien, welche Rolle die Rho GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA während der Infektion und besonders beim Viruseintritt spielen können. Für HSV ist beschrieben, dass die virale US3-Proteinkinase die Rac1- und Cdc42-Signaltransduktion beeinflussen kann (Murata et al., 2000). Weiterhin ist eine RhoA-Aktivierung im Verlauf der Phagozytose-ähnlichen HSV Aufnahme in Fibroblasten beobachtet worden (Clement et al., 2006). Eine Funktion der Rho GTPasen wird auch in der zellulären Ausbreitung von HSV-1 und PRV (Pseudorabiesvirus) in Neuronen vermutet. So führt die Bindung von gD an Nektin-1 beim Eintritt von PRV in sensorische Neuronen von Schweinen zu einer Cdc42-abhängigen Formierung von synaptischen Boutons, die als Ausschleusepunkte von Herpesviren aus Axonen beschrieben sind. Ein ähnliches Resultat ist mit HSV-1 in Neuronen von Ratten gezeigt (zur Übersicht Favoreel et al., 2007). Auch die Infektion mit KSHV (Kaposi's Sarkoma assoziiertes Virus), das auch zu den Herpesviren gehört, führt zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. KSHV kann über das virale Glykoprotein gB mit Integrinen ( $\alpha3\beta1$ ) an der Wirtszelloberfläche interagieren und ist wahrscheinlich der Hauptrezeptor für den Eintritt in Endothelzellen und Fibroblasten, bei denen ein endozytotischer Eintrittsmechanismus favorisiert wird (Akula et al., 2002). Die Integrin-Interaktion führt zur Phosphorylierung der FAK ('focal adhesion kinase') und Aktivierung weiterer stromabwärts-gelegener Moleküle, die zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts führen und Formierung von Filopodien, Lamellipodien und Stressfibrillen vorantreiben. Die Expression der dominant negativen Mutante von

RhoA vermindert den KSHV Eintritt. Der Grund für die Herabsetzung der Infizierbarkeit könnte mit der endozytotischen Aufnahme des Virus in die Wirtszelle zusammenhängen, da RhoA für die Bildung verschiedener Arten von endozytotischen Vesikeln und ihrem Transport mitverantwortlich ist (Veettil et al., 2006).

Auch andere Virusfamilien zeigen eine Verbindung zu den Rho GTPasen. So ist erst kürzlich in der Endothel-Zelllinie HMEC-1 festgestellt worden, dass das Denguevirus (DENV-2) die Rac1- und Cdc42-Signaltransduktion beeinflusst und damit eine Filopodien-Dynamik induziert (Zamudio-Meza et al., 2009). Studien zum Eintritt von Gruppe B Coxsackieviren zeigen, dass die Rac1-abhängige Aktin-Reorganisation das Virus zu dem in 'Tight Junction' verborgenen Bindungsrezeptor CAR ('coxsackievirus and adenovirus receptor') transportiert. Interessanterweise induziert das Virus über Interaktion mit DAF ('GPI-anchored protein decay-accelerating factor') und anschließender Aktivierung der Abl-Kinase diese Aktin-Reorganisation selbst (Coyne und Bergelson, 2006). Für MLV ('murine leukemia virus') wird auch eine Aktin-abhängige Bewegung vor der Internalisierung in die Zelle beschrieben, welche das Virus nach Bindung an Filopodien zum Zellkörper hin transportiert (Lehmann et al., 2005). Auch das Vacciniavirus verwendet die Rho GTPase Signaltransduktion zur Optimierung der Infektion. Zunächst induziert das Virus beim Eintritt in die Zelle eine Signalkaskade, bei der Rac1 eine wichtige Rolle spielt (Locker et al., 2000). Zum anderen führt das Virus nach etablierter Infektion zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts, zur Bildung von Aktin-Kometen und zur Reorganisation von Mikrotubuli (Cudmore et al., 1995; Ploubidou et al., 2000; Schepis et al., 2006). Des Weiteren kann das Virus die Migration, die Verringerung der Zell-Adhäsion und die Formierung von langen zellulären Ausläufern stimulieren (Sanderson et al., 1998; Sanderson und Smith, 1998).

Neben den zellulären Prozessen, die von der Aktin-Dynamik abhängen, spielen die Rho GTPasen auch bei anderen Mechanismen wie der Verteidigung gegen Pathogene eine entscheidende Rolle. Als Beispiele sind hier die Chemotaxis von Leukozyten, die Phagozytose von Pathogenen, die Aktivierung von Signalwegen bei zellulärem Stress und die Stimulation von NF- $\kappa$ B zu nennen (zur Übersicht Bokoch, 2005). Rac1 beispielsweise kann zur Phosphorylierung von IRF-3 ('interferon regulatory factor 3') in Influenza A infizierten Zellen beitragen und damit den initialen Schritt einer Immunsignalkaskade auslösen. Die Inhibition von Rac1 korreliert hierbei mit einer verstärkten Virusproduktion (Ehrhardt et al., 2004).

Um zu zeigen, ob die Rho GTPasen auch für die HSV-1 Infektion in Epithel-Zellen eine wichtige Rolle spielen, wurden Infektionsstudien in MDCKII-Zellen durchgeführt. Die Untersuchungen in der Epithel-Zelllinie MDCKII zeigen, dass HSV-1 vorübergehend Rac1 und Cdc42 aktiviert. Die Aktivierung ist 15 und 30 Minuten nach Infektion zu beobachten und verschwindet eine Stunde nach Infektion. Die funktionelle Bedeutung dieser Aktivierung zeigen Überexpressionsstudien mit konstitutiv aktivem Rac1 oder Cdc42 bzw. dominant negativem Rac1 oder Cdc42. Interessanterweise hemmen konstitutiv aktives Rac1 und Cdc42 die HSV-1 Infektion, während dominant negatives Rac1 und RhoA keine Auswirkung auf die Infizierbarkeit der MDCKII-Zellen haben (Hoppe et al., 2006). Offen bleibt, welche Rolle die Rho GTPasen bei der HSV-1 Infektion in der Epidermis bzw. den Keratinozyten spielen.

### 2.2.3 Rho GTPasen in der Epidermis

In der murinen Epidermis sind durch den Einsatz von konditionalen transgenen Mäusen viele Studien über die Funktion der Rho GTPasen in der Epidermis veröffentlicht. So führt die Keratinozyten-spezifische Abwesenheit von Rac1 zum Verlust von nahezu allen Haaren innerhalb einiger Wochen nach der Geburt. Der permanente Teil der Haarfollikel und die Talgdrüsen bleiben zwar erhalten, aber ein erneutes Wachstum von Haarfollikeln in voller Größe ist nicht mehr gegeben; es zeigt sich ein Verlust der Expression von Haarfollikel-spezifischen Keratinen, E-Cadherin und  $\alpha 6$ -Integrin. Die Keratinozyten der Rac1-defizienten Epidermis weisen dagegen keine offensichtlichen Defekte *in vivo* auf, da eine normale Differenzierung, Proliferation und Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zu beobachten sind. Experimente mit Rac1-defizienten Keratinozyten *in vitro* belegen Defekte in der Ausbreitung der Zellen und leichte Beeinträchtigung der Zell-Adhäsion (Chrostek et al., 2006).

In der adulten Epidermis der konditionalen Rac1-defizienten Maus ist zu beobachten, dass die Teilung der Stammzellen der Basalzellschicht stimuliert wird. Diese Stimulation führt zu einer terminalen Differenzierung, die nicht mehr den Erhalt von interfollikulärer Epidermis, Haarfollikel und Talgdrüsen fördern (Benitah et al., 2005). Weiter ist gezeigt, dass die Inhibition der Rac1-Funktion (durch die dominant negative Mutante N17Rac1) oder die Abwesenheit von Rac1 in der Epidermis von Mäusen zu einer Herabsetzung der Proliferation und Migration in Verwundungsexperimenten führt (Tschamtko et al., 2007). Außerdem lassen sich die Stammzellen der interfollikulären Epidermis und der Haarfollikel-Stammzellnische in Bezug auf Rac1 unterscheiden (Castilho et al., 2007). Möglicherweise ist der Rac-Aktivitätszustand in der interfollikulären Epidermis mit der Insulin-Rezeptor/IGF-1-Rezeptor ('IR/insulin-like growth factor receptor (IGF-1R') Signaltransduktion verknüpft, wie Experimente mit IR-defizienten, IGF-1R-defizienten oder IR/IGF-1R-defizienten Mäusen zeigen (Stachelscheid et al., 2008). Die Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 spielen in der Epidermis eine essentielle Rolle, so tragen sie wahrscheinlich für ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen der Entwicklung der interfollikulären Epidermis und der Bildung von Haarfollikel bei. Für Untersuchungen der HSV-1 Infektion in der Epidermis im Hinblick auf die Signaltransduktion der Rho GTPasen, war es von entscheidendem Interesse den initialen Eintrittsweg in das Gewebe zu charakterisieren und die Barrierefunktion des Epithels zu verstehen.

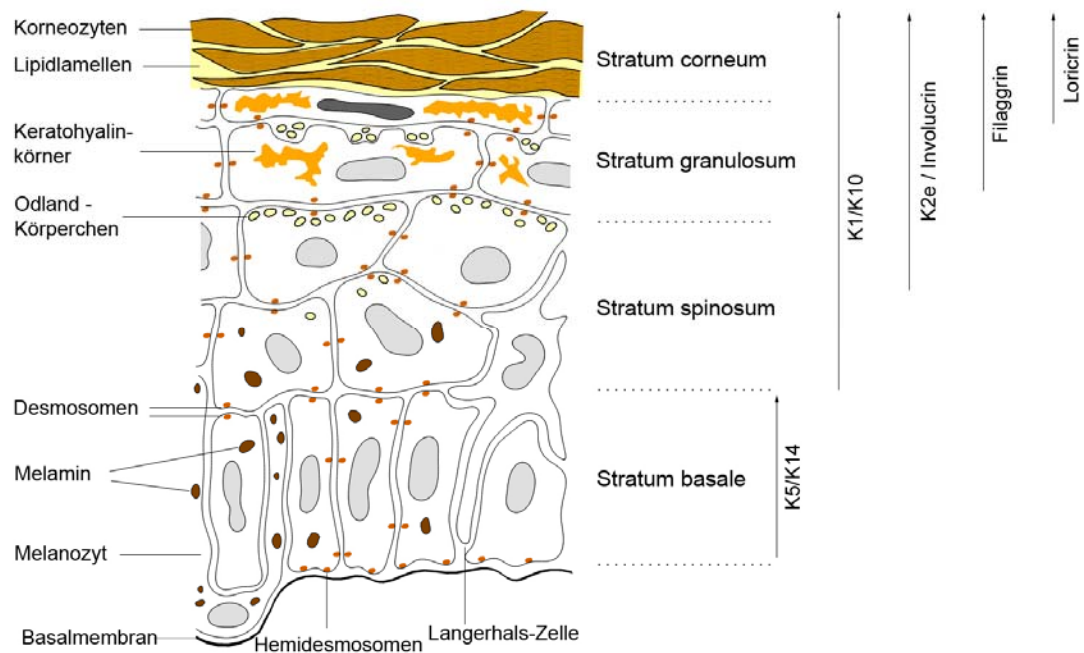
## 3. Viraler Eintritt in Gewebe

### 3.1 Aufbau der Haut

Mehrschichtige Epithelien wie die menschliche Haut sind in der Lage, mehrere unterschiedlich-differenzierte Zellschichten auszubilden. So besteht die Haut aus drei differenzierten Schichten: die interfollikuläre Epidermis (Oberhaut, eigentliches Epithelgewebe) mit ihren Hautanhangsgebilden (Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen), die Dermis (Bindegewebe) und die Hypodermis (fettreiches Bindegewebe). Während die Dermis und die Hypodermis die mechanische Stabilität der Haut unterstützen (durch Bildung der extrazellulären Matrix), bildet die Epidermis das eigentliche polare Epithelgewebe aus. Zusätzlich ist die Epidermis von der Dermis über die Basalmembran abgegrenzt (zur Übersicht Freedberg et al., 2003).

#### 3.1.1 Die Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, das hauptsächlich aus Keratinozyten besteht (Abb.5). Die Hauptaufgabe von differenzierten Keratinozyten ist die Synthese von Intermediärfilament-Proteinen, den Keratinen, die der Epidermis ihre Stärke verleihen. Die basalen Keratinozyten (Stratum basale, Basalzellschicht) sind hierbei teilungsfähige Stammzellen, die mit der Basalmembran verbunden sind. Die Verankerung der untersten Schicht der Keratinozyten mit der Basalmembran wird über Hemidesmosomen (Halb-Desmosomen) gesteuert. Die extrazelluläre Domäne der Integrine (BP180), die für diese Adhäsion verantwortlich ist, bindet an das Protein Laminin in der Basalmembran. Eine interzelluläre Domäne des Intergrins wiederum bindet über das Ankerprotein Plectin an Keratin-Intermediärfilamente und die Verankerung der Epithel-Zelle in der Basalmembran wird ermöglicht. Dem Stratum basale schließt sich das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) an, das mehrere Schichten von größeren Stachelzellen enthält, die durch viele Desmosomen und Zellverbindungen untereinander verknüpft sind. Desmosomen finden sich in allen Zellschichten der Epidermis und bilden einen strukturellen Rahmen für große Zugfestigkeit. Über dem Stratum spinosum liegt das Stratum granulosum (Körnerzellschicht), das aus relativ dünnen und dunkel gefärbten Zellen besteht, die eine Zonula occludens ausbilden können und einen anfänglichen Verlust von Zellorganellen aufweisen. Die so genannten Körnerzellen des Stratum spinosums bilden eine wasserfeste Barriere und markieren die Grenze zwischen den inneren, stoffwechselaktiven Zelllagen und der äußersten Epidermisschicht, dem Stratum corneum (Hornschicht). Das Stratum spinosum und das Stratum granulosum werden als suprabasale Zellschicht bezeichnet. Das Stratum corneum weist tote, schuppenförmige Zellen auf, die weder Zellkern noch Zellorganellen besitzen und mit dicht-gepacktem Keratin gefüllt sind (zur Übersicht Freedberg et al., 2003).



**Abb.5 Die Epidermis**  
Schematischer Aufbau der humanen Epidermis mit differenzierungsspezifischen Markern (V. Melnikov).

### 3.1.1.1 Der Haarfollikel und die Talgdrüse

Der Haarfollikel ist epidermalen Ursprungs und wächst in die Dermis ein, bleibt aber stets durch die Basalmembran von der Dermis separiert. Der Haarfollikel besteht aus einem permanenten und einem zyklischen Teil. Der permanente Teil wird von den Stammzellen in der Stammzellnische (Bulge) gebildet, während der zyklische Teil aus der Matrix, dem Haarschaft und der inneren ('inner root sheath') und äußeren ('outer root sheath') Haarwurzelscheide besteht. Der Haarschaft dient der Ausbildung des Haares. Ein Kondensat aus spezialisierten Fibroblasten am unteren Ende des Haarfollikels, die dermale Papille, gewährleistet einen ständigen Signalaustausch zwischen Mesenchym und Epithel, der sowohl für die Haarfollikelmorphogenese als auch für die zyklische Regeneration des Haarfollikels entscheidend ist. Der Haarfollikel durchläuft eine sich wiederholende zyklische Regeneration, welche in die Wachstumsphase (Anagen), die Regressionsphase (Katagen), die Ruhephase (Telogen) und den Haarabstoß (Eogen) unterteilt ist. Die Talgdrüsen (Glandula sebacea) sind am oberen Teil des Haarfollikels angelegt und werden daher auch als Haarbalgdrüsen bezeichnet. Ihre Aufgabe liegt in der Talgproduktion (Sebumproduktion), welcher über den Haarkanal nach außen transportiert wird und die Barrierefunktion der Haut aufrechterhält (zur Übersicht Alonso und Fuchs, 2006).

### 3.1.1.2 Keratinozyten

Die Zellen der Epidermis bestehen zu zirka 90% aus Keratinozyten. Daneben sind pigmentproduzierende Melanozyten, immunologisch aktive Langerhanszellen sowie Merkel-Zellen, die eine Bedeutung für die Sinneswahrnehmung besitzen, als bedeutende epidermale Zellpopulationen zu nennen. An der Homöostase der Haut sind verschiedene Stammzellpopulationen der Keratinozyten beteiligt. Zum einen befinden sich Stammzellen in der Basalzellschicht, die der Regeneration der interfollikulären Epidermis dienen. Die Regeneration des Haarfollikels geht von einer zweiten Stammzellnische (Bulge) im permanenten Teil des Haarfollikels aus. Die asymmetrische Teilung der Stammzellen führt dazu, dass eine der beiden Tochterzellen zur Differenzierung bestimmt ist, wohingegen die andere Tochterzelle, eine weitere Stammzelle bildet (zur Übersicht Blanpain und Fuchs, 2009). Alle Keratinozyten enthalten in ihrem Zytoplasma Keratine (Intermediärfilament-Proteine) und bilden Desmosomen oder modifizierte desmosomale Verbindungen zu benachbarten Zellen aus. Bisher sind bis zu 30 verschiedene Keratine (Zytokeratine) identifiziert worden, deren Expressionsmuster den Status der Keratinozyten-Differenzierung darlegen (Abb.5). Der Beginn der Differenzierung ist durch den Ersatz des Keratinpaares K5/K14 zu K1/K10 charakterisiert. Die Keratinozyten durchlaufen verschiedene Differenzierungsgrade, die durch eine unterschiedliche Zell-Morphologie und eine charakteristische Keratin-Expression gekennzeichnet sind, bis sie nach etwa 14 Tagen das Stratum corneum erreichen (zur Übersicht Fuchs 1988).

### 3.1.2 Die Basalmembran

Die Basalmembran ist eine spezialisierte Form von extrazellulärer Matrix, die die Epidermis von dem darunter liegenden Bindegewebe (Dermis, Hyodermis) trennt. Die Basalmembran unterteilt sich in (von apikal nach basal): die Lamina lucida (Lamina rara), die Lamina densa und die Lamina fibroreticulare. Die Lamina lucida und die Lamina densa, zu deren Hauptbestandteilen Laminine, Kollagen IV, Nidogen und Perlekan gehören, sind über eine Schicht aus Verankerungsfibrillen und



Verankerungsplaques (Lamina fibroreticulares) mit der Dermis verbunden. Die Hauptbestandteile der Basalmembran sind Kollagen IV und Laminine, die beide voneinander unabhängige, hochmolekulare Netzwerke ausbilden. Die Kollagen IV-Vernetzung sorgt als Grundgerüst für mechanische Stabilität, wohingegen das Laminin-1-Netzwerk einen dynamischen Charakter verleiht. Nidogen-1 verknüpft hierbei, die beiden unabhängigen Netzwerke miteinander. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Basalmembran ist das Proteoglykan Perlekan, das entweder drei Heparansulfat- oder Chondroitinsulfat-Seitenketten trägt. Perlekan trägt durch die Verknüpfung von Heparansulfat-Seitenketten mit den Kollagen IV- und Laminin-1-Netzwerken ebenfalls zur Stabilisierung bei (zur Übersicht Chan, 1997).

### 3.1.3 Die Barrierefunktion der Epidermis

Eine essentielle Aufgabe der Haut ist die Ausbildung einer epidermalen Barrierefunktion, die den transkutanen Transport von Wasser und Elektrolyten steuert. Diese Permeabilitätsbarriere wird vom Stratum corneum gebildet, die eine Art Lamelle aus extrazellulären Lipiden, die durch die Transglutaminase<sup>1</sup> mit verschiedenen Proteinen (Loricrin, Involucrin, Envoplakin und Periplakin) kovalent verknüpft sind, darstellt (Abb.5; Steinert, 2000). Das Stratum corneum ist eine erste Abwehrlinie gegen Pathogene. Dazu produziert die Epidermis eine Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden ('antimicrobial peptides', AMPs), zu denen die humanen Defensine und Cathelicidine gehören. Diese AMPs sind generell kleine, kationische Polypeptide, die das Wachstum von Mikroben inhibieren können und eine entscheidende Rolle im angeborenen Immunsystem spielen. Des Weiteren können sie das adaptive Immunsystem aktivieren und nehmen an Entzündungsreaktionen, Wundheilungsprozessen, Produktion von Zytokinen und Chemokinen teil. AMPs werden in der Regel im Stratum spinosum und Stratum granulosum synthetisiert, ins Stratum corneum transportiert und erlangen dort ihre aktiven Eigenschaften (zur Übersicht Braff und Gallo, 2006). Neben Defensinen und Cathelicidinen zeigen auch andere Moleküle wie Protease-Inhibitoren, Chemokine und Neuropeptide eine antimikrobielle Aktivität. Zusätzlich zu diesen Molekülen bilden die Hauptlipide des Stratum corneums (freie Fettsäuren, Glykosylceramide und Sphingosine) eine antimikrobielle Barriere der Haut (zur Übersicht Lee et al., 2006). Aufgrund der Barrierefunktion der Haut wird für HSV-1 angenommen, dass Mikroläsionen oder Verwundungen der Infektion vorausgehen, damit das Virus Zugang zu stoffwechselaktiven Keratinozyten erhält.

### 3.2 HSV-1 Infektion im Tiermodell

Für die Untersuchung der HSV-1 Infektion in Geweben bestehen verschiedene Möglichkeiten, unter anderem kann die Herpesinfektion in lebenden Versuchstieren analysiert werden. Infektionsstudien sind möglich in Kaninchen und Mäusen, aber auch in Hamstern für Untersuchungen der Latenz (McKendall, et al., 1974; Hill et al., 1975), der Reaktivierung (Anderson et al., 1961; Hurd und Robinson, 1977) oder des Krankheitsbildes (Hill et al., 1975; Scriba und Tatzber, 1981). Hierbei wird das Virus intradermal in die Ohren, in enthaarte Bereiche des Rückens oder in die Fußsohle injiziert. Die infizierten Stellen sind dann durch immer wiederkehrende Hauterkrankungen bzw. Hautrötungen (Erythema) charakterisiert. Es sind auch Hautbiopsien auf Viruspartikel elektronenmikroskopisch analysiert worden (Hill et al., 1975). Für Untersuchungen der HSV Latenz wird meist das 'mouse

ocular model' verwendet, bei dem Mäuse über die Augen infiziert werden (Halford und Schaffer, 2000). Eine neuere Studie berichtet über den Unterschied zwischen intradermaler Infektion und der Infektion durch das vorsichtige Einreiben von Viruslösung in die Haut mit einer Injektionsnadel ('epidermal scarification model'). Dadurch wird das Virus in die Epidermis gebracht und führt in dieser Studie im Gegensatz zu einer intradermalen Infektion zu HSV verursachten Hauterkrankungen (Weeks et al, 2000). Diese Studie ist kontrovers zu den älteren Untersuchungen, die meist intradermal verlaufen sind. Als Begründung nennt Weeks et al. (2000) die Basalmembran, durch die das Virus nicht zu den Keratinozyten und zu den sensorischen Nervendigungen gelangen kann. Untersuchungen mit einer künstlichen Basalmembran und Vero-B4-Zellen verdeutlichen diese These, können jedoch die Kontroverse zu den anderen Studien nicht erklären.

### **3.3 Eintritt von HSV-1 – einschichtige und mehrschichtige Zellkultursysteme**

Eine andere Möglichkeit die HSV-1 Infektion in Geweben zu untersuchen, ist die Verwendung von organotypischen Zellkultur-Modellen. Hierbei werden unpolarisierte, einschichtig-polarisierte oder mehrschichtig-polarisierte Modelle unterschieden. Neben diesen organotypischen Zellkultur-Modellen kann die HSV-1 Infektion auch in Geweben *ex vivo* analysiert werden.

Die Charakterisierung molekularer Determinanten des HSV-1 Eintritts basiert hauptsächlich auf Studien in unpolarisierten Zellkultur-Modellen (zur Übersicht Spear et al., 2000). Weiterhin sind Infektionsstudien in den MDCK- und MDCKII-Zelllinien, die in Zellkultur ein einschichtig-polarisiertes Epithel mit minimaler Stratifizierung ausbilden und deren Rezeptoren asymmetrisch über die Zelle verteilt sind, bekannt. Hayashi (1995) zeigt, dass MDCK-Zellen, die polarisiert sind und eine Zonula occludens besitzen, nur eingeschränkt durch HSV-1 infiziert werden. In MDCKII-Zellen belegt Schelhaas et al. (2003), dass HSV-1 eine Präferenz für einen basolateralen Eintritt zeigt. Die Viren müssen also erst die Epithelschicht durchqueren, um basolateral gelegene Rezeptoren zu erreichen; dieser Mechanismus ist auch von dem VSV ('vesicular stomatitis virus') bekannt (Fuller et al., 1984). In subkonfluenten MDCKII-Zellen kann eine erfolgreiche Infektion nur in peripheren Zellen einer Zellinsel beobachtet werden, wohingegen konfluente Kulturen fast nicht infiziert werden. Erst die Auflösung der Zell-Zell-Kontakte durch Verletzung (Schelhaas et al., 2003; Hayashi, 1995) oder durch Calciumverringern (Topp et al., 1997; Yoon und Spear, 2002) lässt die Infektionsrate ansteigen. In HSV-1 Infektionsstudien in der CaCo-2-Zelllinie, die ebenfalls eine einfache polare Zellschicht ausbildet, ist eine Bevorzugung der apikalen oder basolateralen Membrandomänen nicht gegeben (Griffiths et al., 1998). Diese einschichtig-polarisierten Zellkultur-Modelle geben erste Hinweise darauf, dass die Polarität bzw. die Lokalisierung von bestimmten Wirtszellrezeptoren eine wichtige Rolle bei der Infektion mit HSV-1 spielen. Jedoch muss bei diesen Studien berücksichtigt werden, dass die natürliche Eintrittspforte von HSV-1 in den Wirtsorganismus über Keratinozyten verläuft, die sich in einem mehrschichtigen Epithel wie der Haut oder der Schleimhaut befinden.

HSV-1 Infektionsstudien in organotypischen epithelialen Zellkultur-Modellen (mehrschichtig-polarisierte Modelle), die auf Stratifizierung von Keratinozyten beruhen, sind erstmals 1996 in einer Studie von Syrjänen et al. beschrieben. Das verwendete System, das so genannte Raft-Kultur-System (Bell et al., 1981), wurde bereits in Studien mit anderen Viren eingesetzt (z.B. bei humanen Papillomaviren (HPV); Meyers und Laimins, 1994). Das Raft-Kultur-System soll *in vitro* den *in vivo*

Phänotyp der Epidermis nachempfinden. Bei den so genannten Vollhautmodellen werden Fibroblasten-besiedelte Kollagengele verwendet (ähnlich dem Raft-Kultur-System) auf denen primäre Keratinozyten ausgesät werden. Fibroblasten synthetisieren Kollagenfibrillen und lagern diese im dermalen Kompartiment ein (Bell et al., 1979; Naughton et al., 1989). Die primäre Funktion der Fibroblasten ist jedoch hauptsächlich die Regulation der Keratinozyten-Proliferation (Mackenzie und Fusenig, 1983; Coulomb et al., 1989). Nach der Aussaat wird die epithelial-mesenchymale Ko-Kultur einige Tage zwecks Stimulation der Proliferation mit Medium bedeckt inkubiert, um nachfolgend die entstandene dünne mehrschichtige Lage von Keratinozyten an die Luft-Medium-Grenze zu überführen. Die Exposition der epidermalen Zellen an der Luft ist für die Induktion der Differenzierung und die Bildung eines vielschichtigen Gewebes mit einem kohärenten Stratum corneum notwendig (Asselineau et al., 1985; Regnier et al., 1986; Ponc et al., 1988; Bodde et al., 1990). Unter diesen annähernd physiologischen Konditionen werden die Zellen durch Diffusion von Nährstoffen durch das darunter liegende Substrat versorgt. Syrjänen et al. (1996) verwendet die immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie HaCaT zur Bildung des organotypischen Gewebekultursystems, wohingegen in einer anderen Studie mit primären Keratinozyten entweder von der Vorhaut oder der Ektozervix experimentiert wird (Visalli et al., 1997). Beide Studien unterscheiden sich im Zeitpunkt der Infektion des stratifizierenden Epithels. HSV-1 Infektionsstudien deuten darauf hin, dass entweder das ganze Epithel infiziert ist (Syrjänen et al., 1996) oder eine Beschränkung der produktiven Infektion auf basale Zellen zu beobachten ist (Visalli et al., 1997). Außerdem kann anhand dieses Modellsystems gezeigt werden, dass die Ausbreitung des Virus in oberen Zellschichten hauptsächlich lateral erfolgt (Hukkanen et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit, die organotypischen Zellkultur-Modelle für die HSV-1 Infektion zu nutzen, sind die Untersuchung der viralen Replikation und der Ausbreitung der Infektion innerhalb des Gewebes. So sind erste Versuche mit einer HSV-1 Mutante, deren Hüllmembran ein fluoreszierendes Glykoprotein (gD) besitzt, durchgeführt worden. Nach 24h p.i. zeugen kleine Bereiche in der Epidermis von Infektion, wohingegen 48h p.i. sich das Virus in größeren Teilen der Epidermis ausgebreitet hat (persönliche Mitteilung Dr. M. Jones). Neben diesen organotypischen Modellen können auch Studien an Hautgewebe-Kulturen *ex vivo* durchgeführt werden, die teilweise durch die kurze Lebensdauer des Gewebes limitiert sind. Schelhaas et al. (2003) weist beispielsweise bei der Untersuchung von humaner Vorhaut darauf hin, dass die Exposition von basalen Keratinozyten für eine erfolgreiche HSV-1 Infektion notwendig ist. Der Vorteil von Hautgewebe-Kulturen *ex vivo* liegt in der Möglichkeit Gewebe zu untersuchen, bei denen auch die *in vivo* Infektion stattfindet.

## II. Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe, D
Acrylamid/Bisacrylamid (Gel 30)	Roth, Karlsruhe, D
Adenin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Agarose Sea Plaque GTG	Lonza Rockland, Rockland, USA
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ammoniumthiocyanat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Antibiotische-/Antimykotische-Lösung	Invitrogen, Paisley, UK
BCA-Reagenz	Pierce, Illinois, USA
Betaisodona	Mundipharma, Limburg, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Chelex 100 Resin	Bio-Rad, München, D
Chlorhydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Chlorpromazine	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Citifluor AF 100	Citifluor Ltd., London, UK
Collagen G	Biochrom, Berlin, D
Complete (Proteaseinhibitor)	Roche, Mannheim, D
Dextran	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dextrose	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Biozol, Eching, D
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Dispasell	Roche, Mannheim, D
DPX	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dynasore	Biozol, Eching, D
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Biochrom, Berlin, D
EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Erythrosin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
FCS (Fötale Kälberserum)	Biochrom, Berlin, D
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Fischhautgelatine	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Fixogum	Marabu, Tamm, D
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Carpinteria, CA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Giensa Färbelösung	VWR, Darmstadt, D
Glutaraldehyd (25%ige Stammlösung)	TAAB, Berkshire, UK
Glycerin	Baker Chemicals, Deventer, NL
Glycin	Gerbu Biotechnik, Gaiberg, D
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, D
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethanol-sulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Kalialaun	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D

Kristall-Violett	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Milchpulver (aus Magermilch)	Heirler, Radolfzell, D
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Mowiol	Roth, Karlsruhe, D
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	KMF Laborchemie, Lohmar, D
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	KMF Laborchemie, Lohmar, D
Natriumjodat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
NP-40	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Octenisept	Schuelke-Mayr, Norderstedt, D
Osmiumtetroxid (1%ige Stammlösung)	TAAB, Berkshire, UK
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Paisley, UK
PIPES (Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure))	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Saccharose	VWR, Darmstadt, D
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, D
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Thermolysin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tissue-Tek	Sakura, Staufen, D
Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Trypsin/EDTA 10x	Biochrom AG, Berlin, D
Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Wasser	Millipore
Xylol	Roth, Karlsruhe, D
Ziegenserum (NGS)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

## 1.2 Puffer, Lösungen und Medien

### 1.2.1 Puffer und Lösungen

Ammoniumpersulfat-Lösung (10%)	0,1g/ml in Wasser
BCA-Reagenz (Pierce)	50 Teile Lösung A 1 Teil Lösung B
Blot-Puffer	25mM Tris 192mM Glycin 10% Ethanol
BSA-Lösung (3%)	3g BSA in 100ml PBS
D-MEM Kulturmedium	Invitrogen (Kat.-Nr.41966029)
D-MEM/HAM's F-12 Kulturmedium	Biochrom AG (Kat.-Nr.FG4815)

---

ECL+ Detektionskit für Western-Blots (GE Healthcare, Amersham)	40 Teile Lösung A 1 Teil Lösung B
ECL Detektionskit für Western-Blots (Thermo Scientific)	1Teil Lösung A 1 Teil Lösung B
Eosin-Lösung	10g Erythrosin in 1l Wasser
Ham's F-12	Invitrogen (Kat.-Nr.21765029)
Hämalaun-Lösung	1g Hämatoxylin 0,2g Natriumjodat 50g Kalialaun 50g Chlorhydrat 1g Zitronensäure in 1l Wasser (vor Gebrauch filtern)
Kristall-Violett-Färbelösung	0,1% Kristall-Violett 10% Methanol in PBS
Magermilchpulver-Lösung (5%)	5g/100ml PBS
Opti-MEM I	Invitrogen (Kat.-Nr.31985047)
PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)	140mM NaCl 10mM KCl 8mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in Wasser mit HCl auf pH 7,4 einstellen
PBS-T	PBS mit 0,2% Tween-20
Pbem-Triton-Puffer	60mM PIPES 25mM HEPES 10mM EGTA 2mM MgCl <sub>2</sub> pH auf 6,9 einstellen 0,1% Triton-X-100
„Pulldown“-Puffer (Pierce-Kit)	25mM Tris-HCl pH 7,5 500mM NaCl (erhöht) 5mM MgCl <sub>2</sub> 1% NP-40 1mM DTT 5% Glycerin Complete Protease-Inhibitor
RIPA-Puffer	50mM Tris-HCl (pH 8,0) 100mM NaCl 3mM MgCl <sub>2</sub> 1% NP-40 Complete Protease-Inhibitor 1 mM Na-Orthovanadat in Wasser

Sammelgel-Lösung (5%)	6% Gel 30 375mM Tris (pH 6,8) 0,1% SDS 60% Wasser 0,08% TEMED 0,8% APS
SDS-PAGE Laufpuffer	25mM Tris/HCl 200mM Glycin 0,1% SDS in Wasser
SDS-PAGE Probenpuffer (4x)	200mM Tris HCl (pH 6,8) 20% Glycerin 4% SDS 5% 2-Mercaptoethanol 0,01% Bromphenolblau in Wasser
TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)	150mM NaCl 50mM Tris-HCl (pH 7,4)
Trenngel-Lösung (10%)	33% Gel 30 375mM Tris (pH 8,8) 0,1% SDS 40% Wasser 0,08% TEMED 0,8% APS
Triton-Lösung	0,1% Triton-X-100 in PBS

## 1.2.2 Medien

### 1.2.2.1 Zelllinien

Für die Zelllinien HaCaT, MDCKII, BHK21, Vero-B4 und NIH3T3 wurde D-MEM ('Dulbecco's modified eagle medium') (Invitrogen, Kat.-Nr.41966029) verwendet. Dem Medium wurden 10% FCS (fötales Kälberserum) und 100IU/ml Penicillin/100µg/ml Streptomycin (P/S(1%)) beigemischt.

### 1.2.2.2 Isolierte primäre Zellen

Für die humanen primären Keratinozyten wurde D-MEM (Invitrogen, Kat.-Nr.41966029) verwendet. Dem Medium wurden 22% Ham's F-12 (Invitrogen, Kat.-Nr.21765029), 10% FCS, Penicillin (100IU/ml), Streptomycin (100µg/ml), Adenin ( $1,8 \times 10^{-4}$ M), Hydrocortison (0,5µg/ml), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF, 10ng/ml), Cholera toxin ( $10^{-5}$ M) und Insulin (5µg/ml) beigemischt.

Für die murinen primären Keratinozyten wurde das D-MEM/Ham's F-12 (Biochrom AG, Kat.-Nr.FG4815; 50µM Calcium) verwendet. Dem Medium wurden 10% FCS (Calcium-frei), Penicillin (100IU/ml), Streptomycin (100µg/ml), Adenin ( $1,8 \times 10^{-4}$ M), Hydrocortison (0,5µg/ml), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF, 10ng/ml), Cholera toxin ( $10^{-5}$ M) und Insulin (5µg/ml) beigemischt.

### 1.2.2.3 Gewebe

Für Inkubationszeiten und Infektionen von humaner Haut/Epidermis wurde das humane Keratinozyten-Medium (1.2.2.2) verwendet.

Für Inkubationszeiten und Infektionen von muriner Haut/Epidermis wurde D-MEM (1.2.2.1) verwendet.

### 1.2.2.4 Transfektionen

Für Transfektionen mit Hiperfect (Qiagen) oder Lipofectamine LTX (Invitrogen) wurde das Opti-MEM I Medium (Invitrogen, Kat.-Nr.31985047) verwendet.

## 1.3 Plasmide, Transfektionsreagenzien und siRNAs

### 1.3.1 Plasmide

#### pRK5myc L61Rac1

Geschenk von Vania Braga (Imperial College, London, UK)

#### pRK5myc N17Rac1

Geschenk von Ingo Haase (ZMMK, Universität zu Köln)

#### pRK5myc WT Rac1

Geschenk von Alan Hall (University College, London, UK)

#### pRK5myc L61Cdc42

Geschenk von Vania Braga (Imperial College, London, UK)

#### pRK5myc N17Cdc42

Geschenk von Ingo Haase (ZMMK, Universität zu Köln)

#### pRK5myc WT Cdc42

Geschenk von Alan Hall (University College, London, UK)

#### pEFHA IRF-3 58-427

Geschenk von Friedemann Weber (Universität Freiburg)

#### pEFHA IRF-3

Geschenk von Friedemann Weber (Universität Freiburg)

#### pEGFPC1

Laborsammlung Arbeitsgruppe Mörsdorf

Die als Geschenk erhaltenen Plasmide wurden amplifiziert und z.T. über Ansequenzierung vor der Verwendung überprüft.



### 1.3.2 Transfektionsreagenzien

#### verwendet für siRNA:

- Hiperfect Transfektionsreagenz (Qiagen)

#### verwendet für Plasmide:

- Nucleofector-Lösung (Amaxa):  
Solution V (soc-01026), Solution T (soc-00885) und Test Nucleofector Solution 4657
- Lipofectamine LTX Transfektionsreagenz (Invitrogen) und Plus-Reagenz (Invitrogen)

### 1.3.3 siRNAs

#### Cdc42-siRNA (Eurogentec)

zur Verfügung gestellt von Zhigang Zhang (Zentrum für Biochemie, Universität zu Köln)

5' – GAU AACUCACCACUGUCCATT – 3'

Verwendung: 20nM

#### RhoA-siRNA (Eurogentec)

zur Verfügung gestellt von Zhigang Zhang (Zentrum für Biochemie, Universität zu Köln)

5' – GAAGUCAAGCAUUUCUGUC – 3'

Verwendung: 20nM

#### negative Kontrolle (Eurogentec)

zur Verfügung gestellt von Zhigang Zhang (Zentrum für Biochemie, Universität zu Köln)

5' – AUACUUACGCACGCUCCAATT – 3'

Verwendung: 20nM

#### Rac1-siRNA (HS\_RAC1\_6\_HP\_VALIDATED siRNA, Qiagen)

keine Angaben über die Sequenz möglich

Verwendung: 40nM

#### negative Kontrolle (Qiagen)

Sequenz (Sinn): UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT

Verwendung: 40nM

## 1.4 Antikörper, Antiseren und Proteinstandards

### 1.4.1 Primäre Antikörper und Antiseren

#### Cdc42-Antikörper (Maus)

Der monoklonale Antikörper gegen Cdc42 (BD-610929) wurde von der Firma BD bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:250 im Western-Blot-Verfahren eingesetzt.

Cmyc-Antikörper (Maus)

Der monoklonale Antikörper 9E10 gegen das Cmyc-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.

EEA-1-Antikörper (Maus)

Der monoklonale Antikörper EEA1 gegen frühe Endosomen wurde von der Firma BD bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:50 für indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Heparansulfat-Antikörper (Maus)

Der monoklonale Antikörper 10E4 (IgM Kappa-Kette) wurde von S. Lanvermann, Hautklinik der Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:100 für indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

HSV-1 Kapsid (VP5) Antikörper (Maus)

Der monoklonale Antikörper DM 165 gegen das HSV-1 Kapsid VP5 wurde von F. Rixon, MRC Virology Unit, University of Glasgow (UK), zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:100 (alt) bzw. 1:700 (neu) für indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

ICP0-Antikörper (Maus)

Der monoklonale Antikörper Mab11060 gegen das HSV-1 Protein ICP0 wurde von R. Everett, MRC Virology Unit, University of Glasgow (UK), zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 (alt) bzw. 1:60 (neu) für indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

LAMP1-Antikörper (Maus)

Der monoklonale Antikörper H4A3 gegen humanes LAMP1 wurde von der Arbeitsgruppe Höning, Zentrum für Biochemie, Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:100 für indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Rac1-Antikörper (Maus)

Der monoklonale Antikörper 23A8 gegen humanes Rac1 wurde von der Firma Upstate bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:500 im Western-Blot-Verfahren eingesetzt.

RhoA-Antikörper (Maus)

Der monoklonale Antikörper 26C4 gegen RhoA wurde von der Firma Santa Cruz bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:200 im Western-Blot-Verfahren eingesetzt.

Basalmembran-Antikörper (Kaninchen, Ratte)

Die polyklonalen Antikörper gegen Nidogen-1 (Kaninchen; 1:1000), Perlekan (1030; Kaninchen; 1:600), Laminin  $\gamma$ 2 (Kaninchen; 1:1500), Kollagen IV (Kaninchen; 1:1500) und der monoklonale

Antikörper  $\beta 4$  Integrin (Ratte; 1:200) wurden von R. Nischt, Hautklinik der Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt.

#### ICP0-Antiserum (Kaninchen)

Das polyklonale Antiserum r190 gegen das HSV-1 Protein ICP0 wurde von R. Everett, MRC Virology Unit, University of Glasgow (UK), zur Verfügung gestellt. Das Antiserum wurde in der Verdünnung 1:500 für indirekte Immunfluoreszenz und in der Verdünnung 1:4000 für das Western-Blot-Verfahren eingesetzt.

#### Keratin14-Antikörper (Kanninchen)

Der polyklonale Antikörper gegen Keratin14 (AF64) wurde von der Firma Covance bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 (alt) bzw. 1:100000 (neu) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

#### PDI-Antikörper (Kaninchen)

Der polyklonale Antikörper SPA-980 (Stressgen) gegen die Disulfid Isomerase wurde von M. Plomann, Zentrum für Biochemie, Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:4000 im Western-Blot-Verfahren eingesetzt.

#### VDAC-Antikörper (Kaninchen)

Der polyklonale Antikörper gegen das mitochondriale Porin VDAC wurde von der Firma Rockland (600-401-882) bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:1000 für das Western-Blot-Verfahren 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  $-20^{\circ}\text{C}$ . Es wurde dem Wachstumsmedium der Zellen in einer Konzentration von 0,5% beigemischt.

#### **1.4.2 Sekundäre Antikörper**

Der AF488 gekoppelte anti-Maus spezifische Antikörper des Typs IgG, generiert in Ziegen, wurde von der Firma Molecular Probes, Leide, NL, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 (Stamm-Lösung: 2mg/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, Leide, NL, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 (Stamm-Lösung: 2mg/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, Leide, NL, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:1000 (Stamm-Lösung: 2mg/ml) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Der AF555 gekoppelte anti-Maus spezifische Antikörper des Typs IgG, generiert in Ziegen, wurde von der Firma Molecular Probes, Leide, NL, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 (Stamm-Lösung: 2mg/ml) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Der AF555 gekoppelte anti-Kaninchen spezifische Antikörper des Typs IgG, generiert in Ziegen, wurde von der Firma Molecular Probes, Leide, NL, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 (Stamm-Lösung: 2mg/ml) für die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Der HRP (Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelte anti-Maus spezifische Antikörper des Typs IgG vom Schaf, wurde von der Firma Amersham, Buckinghamshire, GB, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:2000 für Western-Blot-Analysen eingesetzt.

Der HRP (Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelte anti-Kaninchen spezifische Antikörper des Typs IgG vom Schaf, wurde von der Firma Amersham, Buckinghamshire, GB, bezogen. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:4000 für Western-Blot-Analysen eingesetzt.

#### Fluorochrom-gekoppeltes Phalloidin

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

#### Fluorochrom-gekoppeltes Transferrin

AF565-gekoppeltes Transferrin wurde von der Firma Invitrogen, Karlsruhe, bezogen.

#### DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid)

Der zur Markierung von DNA verwendete Fluoreszenzfarbstoff DAPI wurde von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen. Der Farbstoff wurde in der Verdünnung 1:1000 für indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

### **1.4.3 Proteinstandard**

Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, München
Precision Plus Protein All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories, München

## **1.5 Bakterien, Zelllinien, Gewebe und Viren**

### **1.5.1 Bakterien**

*Escherichia coli*

DH10B: F<sup>-</sup>,  $\Phi$ 80d/*lacI*<sup>q</sup>ZDM15,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*), U169, *endA1*, *recA1*, *hsdR17*, (*rk*<sup>-</sup>*mk*<sup>+</sup>), *neoR*, *thi-1*, *supE44*, *l*,  $\lambda$ <sup>-</sup>, *gyrA96*, *relA1*; (Hanahan, 1985)

## 1.5.2 Zelllinien

### Säugerzelllinie HaCaT (Boukamp et al., 1988):

Die HaCaT-Zelllinie wurde von R. Nischt (Hautklinik der Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt

### Säugerzelllinie BHK21 (Stoker und MacPherson, 1964):

Die BHK21-Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA bezogen.

### Säugerzelllinie MDCKII (Louvard, 1980):

Die MDCKII-Zelllinie in der 41.Zellkulturpassage wurde von A. Maisner (Institut für Virologie in Marburg) zur Verfügung gestellt.

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

Die Vero-B4-Zelllinie wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Braunschweig, bezogen.

### Säugerzelllinie NIH3T3 (Todaro und Green, 1962):

Die NIH3T3-Zelllinie wurde von S. Özçelik (Zentrum für Biochemie, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt.

### Humane primäre Keratinozyten (Watt, 1998):

Humane primäre Keratinozyten wurden aus der Vorhaut juveniler Spender gewonnen und kultiviert.

### Murine primäre Keratinozyten:

Murine primäre Keratinozyten wurden von S. Özçelik (Zentrum für Biochemie, Universität zu Köln) oder Ruth Pofahl (ZMMK, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um Keratinozyten von C57BL/6 Mäusen.

## 1.5.3 Gewebe

### 1.5.3.1 Humanes Gewebe

Humane Gewebestücke des Zahnfleischs wurden von der Zahnklinik der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt.

### 1.5.3.2 Murines Gewebe

Zur Etablierung eines HSV-1 Infektionsmodells wurden C57BL/6 und FVB/N Mäuse verwendet.

## 1.5.4 Viren

### HSV-1 Wildtyp

Ein Inokulum des klinischen Wildtyp-Isolates von HSV-1 (S17) wurde von G. Elliott, Marie Curie Research Institute, Surrey, UK, zur Verfügung gestellt

HSV-1 VP26-GFP

Ein Inokulum der HSV-1 VP26-GFP Rekombinante wurde von G. Elliott, Marie Curie Research Institute, Surrey, UK, zur Verfügung gestellt.

HSV-1 VP26-RFP

Ein Inokulum der HSV-1 VP26-RFP Rekombinante wurde von F. Rixon, MRC Virology Unit, Glasgow, UK, zur Verfügung gestellt.

**1.6 Geräte, Material, Computer und Software****1.6.1 Geräte und Material**

Bakterienschüttler (Certomat S)	B. Braun, Melsungen, D
Binokular Stemi 2000-C	Zeiss, Jena, D
Blaukappenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner, Solingen, D
Cryo-Mirkotom CM3050	Leica, Bensheim, D
Cryo-Röhrchen	Greiner, Solingen, D
Deckgläser (20 x 20mm)	Menzel, Braunschweig, D
Deckgläser (rund, Durchmesser 12mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Durchlichtmikroskop (Axiovert)	Zeiss, Jena, D
Elektronenmikroskop JEOL 1200 EX II	Joel, Eching, D
Entwicklermaschine Optimax	Protec, Oberstenfeld, D
Gelkammer (für Polyacrylamidgele)	Hoefer Scientific, San Francisco, USA
Gewebekulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 300cm <sup>2</sup> )	BD, Heidelberg, D
Gewebekulturplatten (6 und 24 Vertiefungen)	Costar, Corning, NY, USA
Hamilton-Spritze	Hamilton, Reno, USA
Handschuhe	Meditrade / N-Dex, Aartselaar, B
Heizblock (Digi-Block)	neoLab, Heidelberg, D
Immunfluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Jena, D
Inkubatoren:	
für Bakterien	Heraeus, Hanau, D
für Säugerzellkulturen	Binder, Tuttlingen, D
Kanülen (20G, 26G)	Becton Dickinson, Drogheda, Irland
KITS:	
ECL Detektions-Kit	Thermo Scientific, Bonn, D
ECL+ Detektions-Kit	GE Healthcare, München, D
Hiperfect	Qiagen, Hilden, D
Lipofectamine LTX/Plus-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, D
Nucleofector Kits	Amaxa, Köln, D
Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen, Hilden, D
Konfokale Immunfluoreszenzmikroskope:	
DM IRBE Mikroskop mit TCS-SP/2-Einheit	Leica, Bensheim, D
DM IRBE Mikroskop mit TCS-SP/5-Einheit	Leica, Bensheim, D
Olympus IX81	Olympus, Hamburg, D
Zeiss LSM 510	Zeiss, Jena, D
Küvetten (1,5ml)	Brand, Wertheim, D
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim, D
Nagellack (zur Versiegelung der Deckgläser)	Jade, Düsseldorf, D
Objektträger (76 x 26mm)	VWR, Langenfeld, D
Parafilm „M“	American Comp., Greenwich, USA
Petrischalen	BD, Heidelberg, D
pH-Meter	WTW, Weilheim, D
Photometer: Novaspec II	Pharmacia Biotech, Cambridge, UK
Pinzetten	Millipore, Eschborn, D

Pipetten (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, D
Power supply EPS 3500	Pharmacia, Freiburg, D
Präparationsbesteck	F.S.T., Heidelberg, D
PVDF-Membran	Amersham, Buckinghamshire, UK
Reaktionsgefäße (1,5ml und 2ml)	Sarstedt, Numbrecht, D
Röntgenfilme	Thermo Scientific, Bonn, D
Skalpelle	Feather, Osaka, Japan
Spritzen	BD, Heidelberg, D
Sterilbank	Nunc, Wiesbaden, D
Sterilfilter-Einmalfilter (0,2 und 0,45µm)	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Vortex	Bender & Hobein, Zürich, CH
Wasserbäder	GFL, Burgwedel, D
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel, D
Wipptisch (Mini Rocking Platform)	Biometra, Göttingen, D
Zählkammern (fast read 102)	Schwarz Pharma, Monheim, D
Zentrifugen:	
2-15	Sigma, Osterode am Harz, D
3K12	Sigma, Osterode am Harz, D
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, D
Hermle Z323K	Hermle, Wehingen, D
J2-HS	Beckman, Kalifornien, USA
Sepatech Medifuge	Heraeus, Hanau, D
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman, Kalifornien, USA
Zellsiebe (70µm)	BD, Heidelberg, D
Zentrifugenröhrchen	Beckman, Kalifornien, USA

### 1.6.2 Computer und Software

#### Computer:

DDS PC-Systeme

Hewlett-Packard, Notebook (HP Pavilion dv7), Intel Core i5 CPU M520 @ 2,4 Ghz

Scanner P3600 A3 Pro (Mustek)

#### Software:

Microsoft Windows XP und 7

Microsoft Office 2003

Adobe Photoshop CS2

Computerprogramme für die konfokalen Mikroskope (Leica, Olympus und Zeiss)

Focus Control 400 (Intas)

Image J (Quantifizierungssoftware)

Autodeblur- und Autovisualize-Software (Media Cybernetics)

## **2. Methoden**

### **2.1 Arbeiten mit Zelllinien, isolierten primären Zellen und Geweben *ex vivo***

#### **2.1.1 Zelllinien**

##### **2.1.1.1 Kultivierung der Zelllinie HaCaT (Boukamp et al., 1988)**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

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

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

##### **2.1.1.3 Kultivierung der Zelllinie BHK21 (Stocker und MacPherson, 1964)**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

##### **2.1.1.4 Kultivierung der Zelllinie MDCKII (Louvard, 1980)**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

##### **2.1.1.5 Kultivierung der Zelllinie NIH3T3 (Todaro und Green, 1962)**

Die Säugerzelllinie NIH3T3 wurde aus dem embryonalen Gewebe der Spezies Maus ('Swiss albino mouse') isoliert. Die NIH3T3 Fibroblasten wachsen in Kultur zu einem dichten Zellrasen. Die Zellen wurden kurz vor Erreichen des konfluenten Zustands einmal mit PBS gewaschen, kurz in 1x Trypsin/EDTA Lösung geschwenkt und nach Abnahme der Lösung für 2min auf RT inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden im Verhältnis 1:8 in frisches Kulturmedium überführt und anschließend alle 2 bis 3 Tage vermehrt.

#### **2.1.2 Isolierte primäre Zellen**

##### **2.1.2.1 Isolierung von humanen primären Keratinozyten aus der Vorhaut juveniler Spender**

Zunächst wurden die Vorhautstücke gut mit PBS gespült, 20min in Antibiotischer-/Antimykotischer-Lösung (1:50 in PBS verdünnt) desinfiziert und möglichst von Binde- und Fettgewebe unter der Sterilbank befreit. Anschließend wurden 1cm x 1cm Stücke mit der dermalen Seite auf eine Dispasell-Lösung gelegt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis getrennt und die Epidermisstücke in 5ml Trypsin (0,25%) in einem 50ml-Falconröhrchen bei 37°C 5min schüttelnd inkubiert (bei 37°C). Anschließend wurden die Zellen durch Zellsiebe (70µm) in ein neues 50ml-Falconröhrchen pipettiert und mit eiskaltem D-MEM mit 10% FCS (10ml) nachgespült. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt (1.000rpm) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5ml Keratinozyten-Medium resuspendiert. Nachfolgend wurde die Zellzahl bestimmt und  $1 \times 10^4$  Zellen pro Quadratzentimeter in einer 10cm-Schale mit Mitomycin C vorbehandelten NIH3T3-Zellen (2h bei 37°C mit 4µg/ml Mitomycin C) in Keratinozyten-Medium ausplattiert (ca.  $6,5 \times 10^5$  Zellen pro 10cm-Schale). Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.



### **2.1.2.2 Kultivierung von humanen primären Keratinozyten (Watt, 1998)**

Humane primäre Keratinozyten wuchsen in Keratinozyten-Medium (siehe 1.2.2.2) mit Mitomycin C vorbehandelten NIH3T3-Zellen (2h bei 37°C mit 4µg/ml Mitomycin C). Bei der Passage der Keratinozyten wurden zunächst die NIH3T3-Zellen durch Inkubation in 0,02%iger EDTA/PBS Lösung (5min bei RT) abgelöst. Nachfolgend wurden die Keratinozyten für zirka 10min bei 37°C mit 1x Trypsin/EDTA Lösung behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 5min bei 1.000rpm (Z323K) zentrifugiert. Die resuspendierten Zellen wurden im Verhältnis 1:2 in Zellkulturflaschen mit Mitomycin C vorbehandelten NIH3T3-Zellen überführt und anschließend alle 3 bis 4 Tage vermehrt.

### **2.1.2.3 Kultivierung von murinen primären Keratinozyten**

Die Kultivierung der murinen primären Keratinozyten erfolgte ähnlich der humanen primären Keratinozyten mit Mitomycin C vorbehandelten NIH3T3-Zellen. Die Unterschiede waren, dass die Zellen auf einer Kollagen-Matrix (Collagen G (Gemisch aus verschiedenen Kollagenen), Beschichtung: 2h bei 37°C mit 30µg/ml Collagen G) bei 32°C anwuchsen und ein anderes Keratinozyten-Medium (siehe 1.2.2.2) verwendet wurde.

### **2.1.3 Lagerung der Zelllinien und isolierter primärer Zellen**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

### **2.1.4 Überprüfung auf Mykoplasmen-Kontaminationen (Russell et al., 1975)**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

### **2.1.5 Bestimmung der Zellzahl**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

## **2.2 Arbeiten mit Herpes simplex Virus Typ 1**

### **2.2.1 Virusvermehrung und -aufreinigung (Powell und Watson, 1975)**

#### **2.2.1.1 HSV-1 Wildtyp (verbessertes Protokoll)**

Zweieinhalb T75-Kulturflaschen (75cm<sup>2</sup> Bodenfläche) mit konfluent gewachsenen BHK21-Zellen wurden nach der Trypsin-Behandlung vollständig in eine T300-Kulturflasche (300cm<sup>2</sup> Bodenfläche) mit 50ml Medium überführt. Nach 24h im Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen auf sechs T300-Kulturflaschen verteilt und nach zirka 48h bei 90 – 100%iger Zellkonfluenz infiziert. Hierzu wurde das Medium verworfen und erneut 50ml Medium mit Wildtypvirus hinzugegeben (Stamm-Inokulum: 0,002 – 0,003 PFU/Zelle). Die T300-Kulturflaschen wurden nachfolgend für 72h bei 37°C inkubiert. 72h p.i. wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und mit dem Medium in ein 50ml-Falconröhrchen überführt. Die sechs Falconröhrchen wurden anschließend für 10min bei 3.000rpm zentrifugiert (Zentrifuge: Hermle Z323K; 4°C). Dies führte zur Trennung der an Zellbestandteile assoziierten Viren (Zellsediment, CAV) und den Zell-freigesetzten Viren (Überstand, CRV). Die Überstände (CRV) wurden vereinigt und in einem 400ml-Zentrifugationsbecher für 2,5h bei 10.000rpm zentrifugiert (Zentrifuge: J2-HS, Rotor: F10B; 4°C). Anschließend wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit 1ml Medium vorsichtig beträufelt und für einen Tag auf Eis in einem 4°C-Raum

resuspendiert. Am nächsten Tag wurde das gelöste Pellet in einem 15ml-Falconröhrchen für 10min bei 3.000rpm zentrifugiert (Zentrifuge: Hermle Z323K; 4°C), der Überstand auf zwei Ficoll-Gradienten (5 – 15%) aufgeteilt und in Ultrazentrifugenröhrchen für 2h bei 12.500rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (Zentrifuge: L7-55, Rotor: TFT41.14; 4°C). Nach diesem Schritt sollten die Röhrchen je eine spezifische Bande (je nach Viruskonzentration) aufweisen, die nun mit einer Injektionsnadel ausgestochen wurden; die Viruslösung wurde in einem Ultrazentrifugenröhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Röhrchen mit zirka 10ml Medium aufgefüllt und erneut in der Ultrazentrifuge L7-55 (90min, 21.000rpm; Zentrifuge: L7-55, Rotor: TFT41.14; 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment über Nacht in 0,5 – 1ml Medium (je Virusmenge) resuspendiert und am nächsten Tag in 50µl Aliquots auf -80°C gelagert.

### 2.2.2 Plaque-Test

Zur Bestimmung des Virustiters wurden etwa  $5 \times 10^5$  Vero-B4 Zellen in 6er-Multiwell-Platten ausgesät und bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die konfluenten Kulturen in Doppelansätzen mit dem präparierten Virusinokulum in einer Verdünnungsreihe (Faktor  $10^3$  –  $10^9$  in Zehnerschritten) infiziert und bei 37°C inkubiert. Nach 1h wurde das Virusinokulum abgenommen und durch Zellkulturmedium ersetzt, welches zusätzlich 0,5%iges HSV-1 reaktives humanes Mischserum enthielt. Dadurch wurde die Ausbreitung von freigesetzten Viren verhindert. Nach 3 – 4 Tagen im Inkubator wurden die Zellen mit Giemsa-Färbelösung fixiert, gefärbt (30 – 60min) und zuletzt vorsichtig unter Leitungswasser ausgewaschen. Nachfolgend wurden die Plaques gezählt und der Virustiter nach folgender Gleichung bestimmt:

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

### 2.2.3 HSV-1 Infektion von Zelllinien und isolierten primären Zellen

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

### 2.2.4 HSV-1 Infektion von murinem/humanem Geweben

#### Gesamthaut:

Zur Infektion von Gesamthaut wurden Gewebestücke 1cm x 1cm in Virus-haltigem Medium (D-MEM für murines Gewebe und Keratinozyten-Medium (human) für humanes Gewebe) getaucht und je nach Infektionszeitpunkt bei 37°C inkubiert (24er-Multiwell-Platten).

#### Epidermis:

Die Infektion der Epidermis (1cm x 1cm) erfolgte auch in Medium (D-MEM für murines Gewebe und Keratinozyten-Medium (human) für humanes Gewebe), jedoch wurde das Medium 3h p.i. gegen frisches Medium ausgetauscht (24er-Multiwell-Platten).

Die Zellzahl der Gewebestücke (1cm x 1cm) bzw. der Zellen, die direkten Kontakt zum Medium hatten, wurden auf  $4 \times 10^5$  Zellen geschätzt. Eine Zellzahlbestimmung war hier nicht möglich, da durch die Mehrschichtigkeit nicht die Anzahl der Zellen einer Schicht bestimmt werden konnten.

## **2.3 Präparation, Färbung und Mikroskopie**

### **2.3.1 Zellen**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

### **2.3.2 Gewebe**

Für Infektionsstudien von muriner Gesamthaut (Rücken (neugeborene Mäuse), Schwanz (adulte Mäuse)) oder humaner Mukosa wurde die Haut vom Fettgewebe getrennt und in Virus-haltigem Medium inkubiert (siehe Abschnitt 2.2.4).

#### Dispasell:

Für Infektionsstudien der Epidermis wurde die Gesamthaut für 30min mit 5mg/ml Dispasell-Lösung bei 37°C behandelt. Die Dispasell-Lösung wurde zuvor steril-filtriert und auf 37°C vorgewärmt. Nach 30-minütiger Inkubation wurde dreimal mit PBS gewaschen und die Epidermis mit Pinzetten von der Dermis gezogen. Anschließend wurde die Epidermis in Serum-haltiges D-MEM überführt und nach 2min konnte die Epidermis für Infektionsstudien genutzt werden (siehe 2.2.4).

#### EDTA:

Alternativ konnte die Epidermis auch mit 5mM EDTA abgelöst werden. Hierzu wurde die Gesamthaut für 4h bei 37°C schüttelnd in EDTA-Lösung inkubiert und nachfolgend ähnlich wie nach Dispasell-Behandlung von der Dermis getrennt.

#### **2.3.2.1 Immunfluoreszenzfärbung von Cryo-Schnitten**

Gewebestücke (Haut/Epidermis (siehe 2.3.2)) wurden in Tissue Tek Lösung eingebettet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die gefrorenen Blöcke mit dem Cryo-Mikrotom CM3050 (Leica) geschnitten (Dicke zwischen 8 – 15µm) und bei -20°C aufbewahrt.

Für die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung wurden die Cryo-Schnitte mit Fixogum umrandet und nach dem Trocknen für 2min mit PBS äquilibriert. Nachfolgend wurden die Schnitte mit 0,5%iger Paraformaldehyd-Lösung (in PBS) für 10min fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit der Blockierungslösung (5% NGS und 0,2% Tween in PBS) für 30min inkubiert und mit dem Primäantikörper (verdünnt in Blockierungslösung) für 1h behandelt. Nachfolgend wurde dreimal mit der Blockierungslösung gewaschen und der Sekundäantikörper (verdünnt in Blockierungslösung) für 45min angewendet. Die Präparate wurden dreimal mit PBS gewaschen, mit DAKO Medium eingebettet, 1h bei RT zum Trocknen aufbewahrt und anschließend bei 4°C gelagert.

#### **2.3.2.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE Färbung) von Cryo-Schnitten**

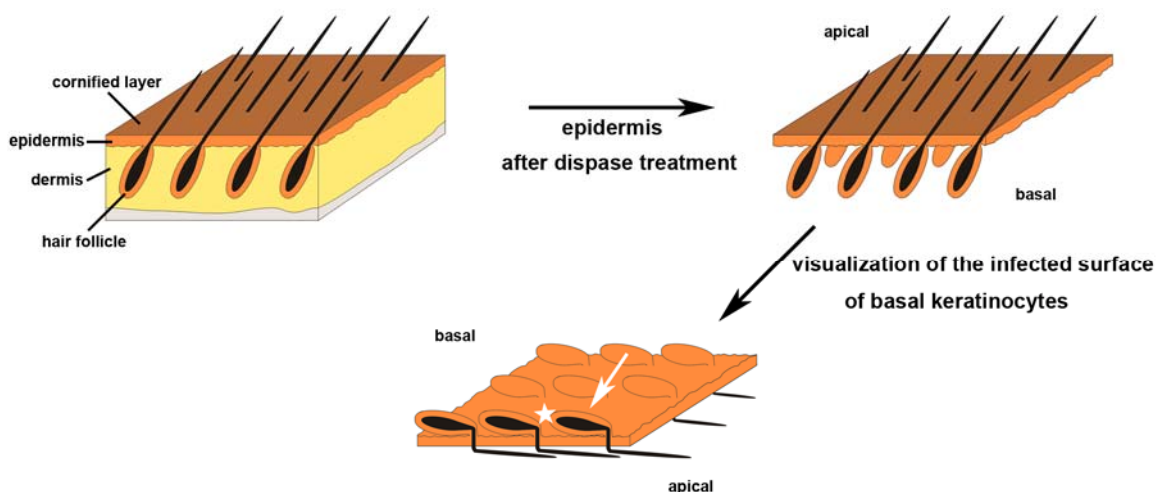
Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der die basophilen Strukturen der Zelle, insbesondere den Zellkern, blau färbt. Zum Anfärben der Zellplasma-Proteine wird Eosin verwendet. Dies ist ein synthetischer Farbstoff, der die acidophilen Strukturen der Zelle rosa färbt.

Die Objektträger mit Cryo-Schnitten wurden zunächst für 10min fixiert (4%ige Paraformaldehyd-Lösung), mehrmals in PBS gewaschen und für 5min in Wasser (Millipore) äquilibriert. Nachfolgend wurden die Objektträger für 5min in einer Hämalaun-Lösung inkubiert, kurz für 1min in Wasser

(Millipore) gewaschen und für 10s in Salzsäure-haltigem Ethanol inkubiert. Aufgrund des niedrigen pH-Werts der Färbelösung erscheint die Färbung der Zellkerne zu diesem Zeitpunkt rötlich. Durch anschließendes Waschen mit Leitungswasser für 5min erhöht man den pH-Wert (Bläuen) und die Färbung schlägt in ein blauviolett um. Nach Stoppen des Bläuvorgangs mit Wasser (Millipore) wurden die Objektträger für 5min in einer Eosin-Lösung für die Zytoplasma-Anfärbung inkubiert. Zur Entwässerung der Gewebeschnitte wurden diese anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe bestehend aus 75%, 90% und 96% Ethanol kurz eingetaucht und zweimal in 100% Isopropanol für je 5min gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für je 5min mit Xylol geklärt und mit DPX-Eindeckmittel auf dem Objektträger eingebettet. Nach 5-stündigem Trocknen unter der Abzugshaube wurden die Präparate bei RT gelagert.

### 2.3.2.3 Whole mount-Verfahren (Braun et al., 2003)

Nach der Trennung der Epidermis von der Dermis (siehe 2.3.2) wurde die Epidermis in 3,4% Paraformaldehyd-Lösung (in PBS) für 2h bei RT fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen (Lagerung über Nacht möglich, 4°C). Im nächsten Schritt wurde die Epidermis mit der Blockierungslösung (5% Milchpulver, 0,25% Fischhautgelatine, 0,5% Triton X-100 in TBS) für 1h inkubiert und mit dem Primärantikörper (verdünnt in Blockierungslösung; zirka 100µl pro Vertiefung einer 24er-Multiwell-Platte) über Nacht bei RT schüttelnd behandelt. Am nächsten Tag wurde fünfmal je 45min mit der Waschlösung (0,2% Tween in PBS) gewaschen und über Nacht bei RT schüttelnd mit Sekundärantikörper (verdünnt in Blockierungslösung; zirka 100µl pro Vertiefung einer 24er-Multiwell-Platte) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Epidermis erneut fünfmal je 45min mit der Waschlösung gewaschen und anschließend mit DAKO Medium eingebettet. Wichtig war hier, dass die Seite mit den Haaren nach unten auf den Objektträger zeigte. Nach 1-stündigem Trocknen bei RT wurden die Präparate bei 4°C gelagert.



**Abb.6 Darstellung der whole mount-Präparation**

Dargestellt ist die Herstellung von whole mount-Präparaten. Der weiße Stern deutet den Haarbulbus und der Pfeil die äußere Wurzelscheide an (aus Petermann et al., 2009).

### **2.3.3 Fluoreszenzmikroskopie**

#### **2.3.3.1 Epifluoreszenz-Mikroskopie**

Die Präparate wurden an einem Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss (Axiophot) mit einem digitalen Kamerasystem (Nikon Digital Sight, DS-2MV) und der Software NIS Elements (Nikon, Version F3.00) ausgewertet. Dazu wurden 10x, 20x, 40x und 100x Objektive verwendet.

#### **2.3.3.2 Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie**

Die konfokale Analyse wurde entweder mit einem konfokalen Leica-Mikroskop mit TCS-SP/2-Einheit bzw. TCS-SP/5-Einheit, einem Olympus IX81- oder einem Zeiss LSM 510-Mikroskop durchgeführt. Dazu wurden 10x, 20x, 40x, 63x und 100x Objektive verwendet.

### **2.3.4 Transport von Geweben**

Der Transport von abgetrennten Mausschwänzen von Großbritannien (Cambridge) nach Deutschland (Köln) musste innerhalb eines Tages und unter ganz bestimmten Bedingungen (der Mausschwanz durfte nicht einfrieren; d.h. wenige Kühlelemente, Schwänze gut in Papier einwickeln) durchgeführt werden, da sonst keine Infektion mit HSV-1 mehr möglich war.

## **2.4 Arbeiten mit DNA**

### **2.4.1 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung (Kaiser und Hogness, 1960)**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

### **2.4.2 Transformation von DNA in kompetente Bakterien**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

### **2.4.3 Präparation von DNA**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

## **2.5 Arbeiten mit Proteinen**

### **2.5.1 Präparation von Zell- und Epidermis-Extrakten**

#### **2.5.1.1 Präparation von Zell-Extrakten (RIPA-Methode)**

Zellen, die entweder in einer 6cm-Kulturschale oder in einer Vertiefung einer 6er-Multiwellplatte angewachsen waren, wurden einmal mit PBS gewaschen und mit dem Zellschaber abgelöst. Nachfolgend wurden die Zellen für 2min bei 2.000rpm pelletiert (Sepatech Medifuge). Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 100 – 200µl RIPA-Puffer (mit 1x Complete) gelöst und für 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 10min bei 10.000rpm und 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco) und der Überstand abgenommen und mit 5xSDS Probenpuffer versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### **2.5.1.2 Präparation von Gesamtzell-Extrakten**

Die Zellen wurden anfangs wie unter 2.5.1.1 behandelt. Der einzige Unterschied war, dass nach 10-minütiger Inkubation im RIPA-Puffer die Extrakte für dreimal je 2s sonifiziert (Amplitude 21; in einem 15ml-Falconröhrchen) und anschließend bei -80°C gelagert wurden.

### **2.5.1.3 Präparation von Epidermis-Extrakten**

Die Epidermis wurde in einem Mörser bei Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert und das Pulver in einem Douncer mit 300µl RIPA-Puffer (ohne NP40/1x Complete) auf Eis bearbeitet. Nachfolgend wurde die Lösung in ein 15ml-Falconröhrchen gegeben, der RIPA-Puffer mit NP40 und dem Proteaseinhibitorcocktail 1x Complete vervollständigt und für 45min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Extrakte für dreimal je 2s sonifiziert (Amplitude 21; in einem 15ml-Falconröhrchen) und bei -80°C gelagert.

### **2.5.2 Isolierung von aktivierten Rho-GTPasen ('Pierce EZ-Detect Rac1/Cdc42 activation kit')**

Aktivierte GTPasen sind in der Lage an ihre Effektor-Proteine zu binden und dadurch eine Aktivierung dieser Proteine zu veranlassen. Ein gemeinsames Effektor-Protein der beiden Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 ist das Molekül PAK-1 ('p21 activated kinase 1'). Die Bindedomäne von PAK-1, PAK-1 PBD ('p21-binding domain'), welche für die Interaktion von PAK-1 mit aktiviertem Rac1 und Cdc42 verantwortlich ist, lag in diesem Kit als GST (Glutathione S-Transferase)-Fusionsprotein vor. Das GST-PAK1-PBD Protein war nicht an Agarose-Beads gekoppelt und fusionierte erst nach dem Pipettieren im Reaktionsgefäß mit einer gelartigen Scheibe (SwellGel Immobilized Glutathione Disc). Nach Zugabe der Zellysate zu dem Reaktionsgefäß und 1-stündiger Rotation bei 4°C wurden die an den Beads gebundenen GTPasen über eine mitgelieferte Säule aufgereinigt. Anschließend wurden die Bead-Fractionen (Rac1-GTP/Cdc42-GTP) und die vorher separierten Lysat-Fractionen (total Rac1/total Cdc42) auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Durchführung erfolgte wie in dem Protokoll von Pierce angegeben, wobei die Natriumchlorid-Konzentration der mitgelieferten Lysis- und Wasch-Puffer aufgrund von früheren empirischen Beobachtungen von 150mM auf 500mM erhöht wurde. In den Versuchen wurden HaCaT-Zellen entweder in einer Dichte von  $3 \times 10^6$  bzw.  $3,5 \times 10^5$  in 10cm-Schalen ausgesät und nach 24h bzw. 7Tagen (bei 0,5% FCS, gehungert) verwendet.

### **2.5.3 Nachweis von Proteinen mit Hilfe der BCA-Methode (Smith et al., 1985; Wiechelmann et al., 1988)**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

### **2.5.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) (Lämmli, 1970)**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

### **2.5.5 Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen mit anschließendem immunchemischen Nachweis von Proteinen durch Antikörper (Western-Blot-Analyse) (Towbin et al., 1979)**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

## **2.6 Transfektionsmethoden**

### **2.6.1 Elektroporation (Nucleofectormethode)**

→ Petermann, P., Diplomarbeit, 2006.

### **2.6.2 Liposomen-Transfektionsmethoden**

#### **2.6.2.1 Lipofectamine LTX (Invitrogen)**

Für die Infektionsstudien wurden HaCaT-Zellen einen Tag vor Transfektion so auf Deckgläschen einer 24er-Multiwell-Platte ausgesät ( $1,5 \times 10^5$  Zellen), dass sie am Tag der Transfektion eine 60%ige Konfluenz aufwiesen. Vor Transfektion erfolgte die Verdünnung der Plasmid-DNA auf  $1 \mu\text{g}$  in zuvor autoklaviertem Wasser (Millipore). Danach wurde je  $1 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit  $100 \mu\text{l}$  Opti-MEM I und  $1 \mu\text{l}$  Plus-Reagenz in einem Reaktionsgefäß ( $1,5 \text{ml}$ ) vorsichtig gemischt und für 5min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden  $2,5 \mu\text{l}$  Lipofectamine LTX hinzupipettiert und die Lösung nach vorsichtigem Mischen für 30min bei RT stehen gelassen. Währenddessen wurde das Kulturmedium der Zellen auf  $500 \mu\text{l}$  pro Vertiefung reduziert. Die vorbereiteten Ansätze wurden dann tröpfchenweise bei begleitendem leichtem Schütteln auf die Zellen gegeben und diese für 6h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 6h wurden die Zellen dreimal mit einer 0,1%igen Glucose-Lösung (in PBS, autoklaviert) und einmal mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden sie für 16h bei  $37^\circ\text{C}$  in frischem Kulturmedium kultiviert.

#### **2.6.2.2 Hiperfect (Qiagen)**

Einen Tag vor Transfektion wurden  $3 \times 10^4$  Zellen auf 6er-Multiwell-Platten ausgesät. Das Kulturmedium der Zellen wurde kurz vor der Transfektion gegen  $500 \mu\text{l}$  frisches Kulturmedium ausgetauscht. Bei einer gewünschten siRNA-Endkonzentration von 20nM wurden  $1,5 \mu\text{l}$  einer  $20 \mu\text{M}$  siRNA in  $58,5 \mu\text{l}$  Opti-MEM I verdünnt und nachfolgend  $8 \mu\text{l}$  Hiperfect hinzupipettiert. Die Ansätze wurden gut gemischt und für 10min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde jeder Ansatz tröpfchenweise bei begleitendem leichtem Schütteln auf die Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel wurde nach 24h zur Entfernung abgestorbener Zellen vollzogen. 70h p.t. (HaCaT-Zellen oder humane primäre Keratinozyten) oder 46h p.t. (MDCKII-Zellen) wurden die transfizierten Zellen für 2h infiziert und eine indirekte Immunfluoreszenzmarkierung durchgeführt.

## **2.7 Inhibitorstudien**

Gelöstes Dynasore, Ammoniumchlorid oder Dextrose wurde entsprechend den gewünschten Konzentrationen in D-MEM (ohne FCS) weiterverdünnt und 30min vor der Infektion auf die Zellen gegeben. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit der Substanz, in der der Inhibitor gelöst war (DMSO bei Dynasore, Wasser bei Ammoniumchlorid und D-MEM bei Dextrose). Nach 30-minütiger Preinkubation der Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  wurde das Medium gegen Virus-haltiges Medium ausgetauscht. Wichtig war, dass auch die Infektion in Gegenwart des Inhibitors stattfand.

## 2.8 Temperaturversuch

Vor Infektion wurden die Zellen für 1h bei der zu untersuchenden Temperatur preinkubiert.

## 2.9 Hungerversuch

Die Zellen wurden bei 0,5% FCS gehungert.

## 2.10 Herstellung elektronenmikroskopischer Präparate

Zunächst wurden Zellen in den Vertiefungen einer 6er-Multiwell-Platte so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion konfluent waren. Die Zellen in der 6er-Multiwell-Platte wurden dann für 15min auf 4°C gestellt und anschließend für 1h auf Eis infiziert. Wichtig war, dass das Virus-haltige Medium ebenfalls auf 4°C vorgekühlt war. Nach 1-stündiger Bindung der Viren an die Zellen wurde einmal mit vorgewärmtem Medium gewaschen und die Zellen für die gewünschten Zeitpunkte auf 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde das Medium verworfen, eisgekühltes 2,5%iges Glutaraldehyd (in PBS; Stammlösung 25%) hinzugegeben und für mindestens 1h auf Eis inkubiert. Nach der Fixierung wurde zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen in 500µl PBS mit einem Zellschaber gelöst und in ein Reaktionsgefäß (1,5ml) überführt. Anschließend wurden die Zellen für 1min bei 4.000rpm pelletiert (Zentrifuge: Hermle Z323K; 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in 100µl 1%igem Osmiumtetroxid (sehr giftig) gelöst. Nach 1-stündiger Inkubation bei RT wurde das Osmiumtetroxid vorsichtig entfernt (gesonderter Abfallbehälter) und zweimal mit PBS gewaschen (je durch Zentrifugation für 1min bei 4.000rpm). Im nächsten Schritt wurde das Pellet in 2%iger Agarose-Lösung (in PBS (flüssig bei 65°C); Agarose Sea Plaque GTG mit geringem Schmelzpunkt) gelöst und sofort auf RT für 30s bei 4.000rpm zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Reaktionsgefäß um 180° gedreht und erneut 30s bei 4.000rpm zentrifugiert; dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 45min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Spitzen der Reaktionsgefäße mit den Pellets abgetrennt (Rasierklinge), zu kleinen Würfeln geschnitten (~2mm pro Seite) und zur Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe bestehend aus 30%, 50%, 70%, 90% und zweimal nahezu 100%iges Ethanol getaucht. Die nächsten Schritte sind dann von Dr. Frazer Rixon in Glasgow (MRC Virology Unit) durchgeführt worden. Hierzu gehörte, die Proben in Harz einzugießen, mit einer Diamantklinge zu schneiden und nachfolgend die DNA anzufärben. Die Analyse am Elektronenmikroskop wiederum wurde dann mit Anleitung von Dr. Frazer Rixon durch mich ausgeführt.



### III. Zielsetzung

Keratinocyten der Haut und Schleimhäute stellen die primäre Eintrittspforte für HSV-1 in den Wirtsorganismus dar. Ziel dieser Arbeit war es in Keratinocyten die Bedeutung der Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 während der Initiation der HSV-1 Infektion zu untersuchen und die Internalisierung von HSV-1 in die Zelle zu charakterisieren. Weiter sollte die Barrierefunktion der Haut und der Eintrittsweg von HSV-1 in die Epidermis *ex vivo* beleuchtet werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollten die Studien aus meiner Diplomarbeit (Untersuchung der frühen Herpes simplex Virus Typ 1 Infektion in HaCaT-Zellen: Bedeutung von Rac1 und Cdc42) vertieft und ergänzend mit isolierten humanen primären Keratinocyten und der Rac1 konditionalen transgenen Maus (Rac1 E-KO), die kein endogenes Rac1 in der Epidermis exprimiert, durchgeführt werden. Zunächst sollten die Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 innerhalb der frühen HSV-1 Infektion in HaCaT-Zellen ähnlich zu den Studien von Hoppe et al. (2006) untersucht werden. Weiterhin sollte gezeigt werden, ob die Reduktion von endogenem Rac1 und Cdc42 einen Einfluss auf die frühe HSV-1 Infektion in HaCaT-Zellen und primären Keratinocyten hatte. Zusätzlich zu den Reduktionsexperimenten sollte die Epidermis der Rac1 E-KO Maus während der frühen HSV-1 Infektion analysiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die HSV-1 Internalisierung in humanen Keratinocyten charakterisiert werden. Es gibt erste Evidenz für einen pH-Wert-abhängigen endozytotischen Mechanismus (Nicola et al., 2005). Die HSV-1 Internalisierung sollte zu frühen Zeitpunkten in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinocyten sowie nach Inhibition von Dynamin2 durch den Inhibitor Dynasore elektronenmikroskopisch untersucht werden. Um die Bedeutung eines potentiellen endozytotischen Aufnahmemechanismus näher zu charakterisieren, sollten Inhibitorstudien mit Ammoniumchlorid, welches die Ansäuerung von Endosomen verhindert, und mit Dextrose, welche die Clathrin-vermittelte Endozytose blockieren kann, durchgeführt werden. Zusätzlich sollten Kolkalisierungsstudien eindringender Viruspartikel mit zellulären Organellenmarkern unternommen werden.

Das Ziel im dritten Teil der Arbeit war die Untersuchung der Barrierefunktion der Haut und des Eintrittswegs von HSV-1 in humanes und murines Gewebe. Diese Experimente sollten im Gegensatz zu Infektionsstudien in Zellkultur näher an eine *in vivo* Infektion heranführen. Hierzu sollte zunächst ein *ex vivo* Infektionsmodell in murinem Gewebe etabliert werden, um die Barrierefunktion der Haut und den Eintritt von HSV-1 in Keratinocyten der Epidermis zu untersuchen. Anschließend sollte ein *ex vivo* Infektionsmodell in humaner oraler Schleimhaut, die eine *in vivo* Eintrittspforte von HSV-1 in den Wirtsorganismus darstellt, etabliert werden. Ergänzend dazu und mit der Annahme, dass eine Verwundung oder Mikroläsion einer produktiven Infektion vorausgeht, sollten Verwundungsexperimente mit nachfolgender Infektion in der oralen Schleimhaut durchgeführt werden.

## IV. Ergebnisse

### 1. Die Bedeutung von Rac1 und Cdc42 für die frühe HSV-1 Infektion in Keratinozyten

#### 1.1 Die frühe HSV-1 Infektion in Keratinozyten

In MDCKII-Zellen ist gezeigt, dass die frühe HSV-1 Infektion von einer regulierten Rac1 und Cdc42 Signaltransduktion abhängt (Hoppe et al., 2006). Da Keratinozyten der Haut und Schleimhäute die primäre Eintrittspforte für HSV-1 in den Wirtsorganismus darstellen, sollte die Bedeutung von Rac1 und Cdc42 für die frühe HSV-1 Infektion auch in Keratinozyten überprüft werden.

Für die folgenden Infektionsanalysen wurden die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT, die ein Modell für undifferenzierte humane Keratinozyten darstellt (Boukamp et al., 1988), und isolierte primäre Keratinozyten des Menschen und der Maus verwendet. Die frühe HSV-1 Infektion wurde mit dem Antikörper gegen das sehr frühe virale Genprodukt ICP0 visualisiert. Die zelluläre Lokalisierung von ICP0 durchläuft in der frühen Infektion distinkte Phasen. 1h p.i. ist ICP0 in schwachen distinkten Punkten im Zellkern zu beobachten, 2h p.i. ist ICP0 diffus im Zellkern verteilt und 3h p.i. relokalisiert ICP0 ins Zytoplasma (Diplomarbeit, Philipp Petermann, 2006).

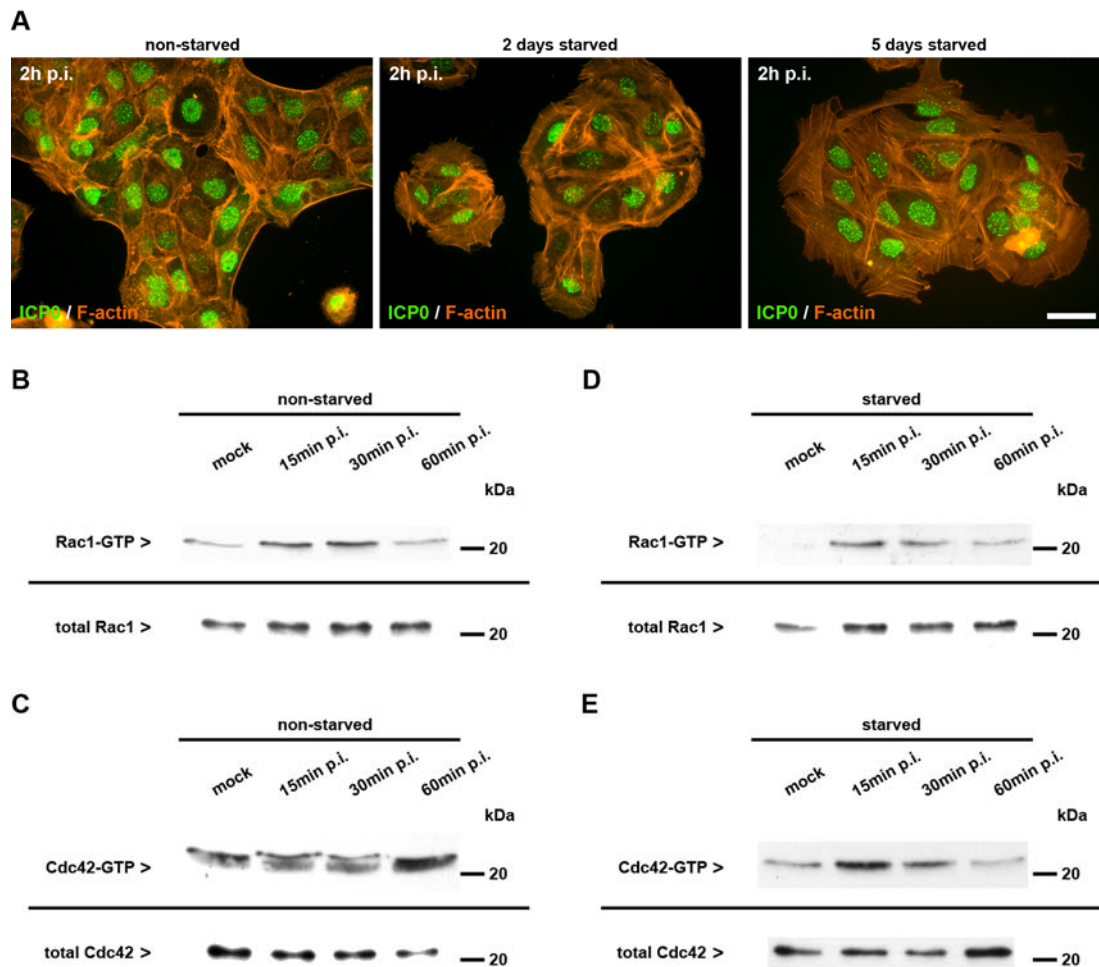
In polarisierten MDCKII-Zellen verläuft der HSV-1 Eintritt über basolaterale Membranen, daher werden hauptsächlich Randzellen einer Zellinsel infiziert (Schelhaas et al., 2003). HaCaT-Zellen weisen keine strikte Polarisierung auf, dennoch kann eine schwache Randzell-Präferenz beobachtet werden. Bei höheren Virusmengen wird diese Präferenz allerdings überwunden (Diplomarbeit, Philipp Petermann, 2006). Bei humanen primären Keratinozyten ist diese Randzell-Präferenz stärker ausgeprägt (Schelhaas et al., 2003) und die Infektionseffizienz im Vergleich zu HaCaT-Zellen geringer. Murine primäre Keratinozyten, die bei geringer Calciumkonzentration (50µM) gehalten werden, weisen wegen den schwachen Calcium-abhängigen Zell-Zell-Kontakten eine hohe Infektionseffizienz auf (Diplomarbeit, Elena Rahn, 2009). Die Infektionseffizienz humaner primärer Keratinozyten kann daher nach Reduktion des Calciumgehalts (von 1,8mM auf 50µM) drastisch gesteigert werden (siehe Kapitel 2).

#### 1.2 Einfluss der frühen HSV-1 Infektion auf die Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42

In der MDCKII-Zelllinie interferiert die frühe HSV-1 Infektion mit den Aktivitätszuständen der Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 (Hoppe et al., 2006). Hierbei kommt es 15 und 30min p.i. zu einem Anstieg der endogenen Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42, die 60min p.i. wieder abfallen und 120min p.i. erneut ansteigen. Diese Experimente lassen den Schluss zu, dass der Mechanismus der frühen HSV-1 Infektion eine temporäre Aktivierung der endogenen Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 nach sich zieht. In diesem Abschnitt sollte der potentielle Einfluss der frühen HSV-1 Infektion auf die Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 in HaCaT-Zellen untersucht werden.

##### 1.2.1 Untersuchung der Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 während der frühen HSV-1 Infektion in nicht-gehungerten HaCaT-Zellen

Um einen potentiellen Einfluss der frühen HSV-1 Infektion auf die Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 in HaCaT-Zellen zu ermitteln, wurden Infektionsstudien zu verschiedenen Zeitpunkten (mock, 15, 30, 60 und 120min p.i.) mit nachfolgendem Pulldown-Verfahren durchgeführt.



**Abb.7 Veränderung der endogenen Rac1- und Cdc42-Aktivitätszustände von nicht-gehungerten und gehungerten HaCaT-Zellen während der frühen HSV-1 Infektion**

(A) Subkonfluente HaCaT-Zellen wurden nicht-gehungert oder 2 und 5 Tage gehungert (0,5% FCS) und anschließend 2h mit HSV-1 infiziert (MOI20). Zum Nachweis von ICP0 wurde der primäre Antikörper mab11060 und der sekundäre Antikörper AF488 anti-Maus (grün) verwendet. F-Aktin wurde mittels Phalloidin-gekoppeltem TRITC (rot) visualisiert. Es sind Überlagerungen von Epifluoreszenz-Aufnahmen gezeigt. Der Maßstab beträgt 40 $\mu$ m. Subkonfluente HaCaT-Zellen wurden unter nicht-gehungerten Bedingungen (non-starved) gehalten (B und C) oder für 7 Tage gehungert (starved) (D und E) und anschließend mit HSV-1 infiziert (MOI20). Die Aktivitätszustände von endogenem Rac1 und Cdc42 wurden in mock-infizierten (mock) Zellen oder in Zellen 15, 30 oder 60min p.i. mittels Pulldown-Verfahren bestimmt. Gleiche Proteinmengen der Bead-Fractionen (Rac1-GTP/Cdc42-GTP) und der Lysat-Fractionen (total Rac1/total Cdc42) wurden nachfolgend auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Rac1 und Cdc42 wurden im Western-Blot-Verfahren mit den primären Antikörpern anti-Rac1 (23A8) oder anti-Cdc42 (BD-610929) nachgewiesen.

Bei dieser Pulldown-Methode wird sowohl aktives Rac1 als auch aktives Cdc42 über die PAK-1 Bindedomäne aus den Zelllysaten präzipitiert. Anschließend kann aktives Rac1 und Cdc42 mittels spezifischer Antikörper gegen Rac1 bzw. Cdc42 detektiert werden; zusätzlich werden Gesamtlysate als Ladekontrolle verwendet. Die Rahmenbedingungen des Pulldown-Verfahrens für aktives Rac1 bzw. aktives Cdc42 sind bereits bei Hoppe et al. (2006) für MDCKII-Zellen beschrieben und wurden in dieser Studie für HaCaT-Zellen angewendet. Die HaCaT-Zellen wurden in subkonfluentem Zustand infiziert, um eine optimale Infektionsrate zu erzielen (Abb.7A).

In den ersten Pulldown-Experimenten wurde eine Veränderung des Aktivitätszustands von Rac1 im Vergleich zu mock-infizierten Zellen während der frühen HSV-1 Infektion ermittelt. Im Detail zeigte sich, dass in der Mehrzahl der Versuche der Rac1-Aktivitätszustand 15 und 30min p.i. anstieg und 60min p.i. wieder abfiel (Abb.7B). Der Aktivitätszustand 120min p.i. war in den einzelnen Experimenten zu heterogen und wurde daher nicht mit in die Auswertung einbezogen. Der Aktivitätszustand von Cdc42

hingegen lag zu allen Infektionszeitpunkten auf einem hohen Niveau und zeigte keinen Unterschied zu den mock-infizierten Zellen (Abb.7C). Aus diesem Grund sollten die HaCaT-Zellen einer Hungerperiode ausgesetzt werden, um Stoffwechsel- und Energie-verbrauchende Reaktionen (u.a. die GTP-Beladung von Rho GTPasen) zu verlangsamen.

### **1.2.2 Untersuchung der Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 während der frühen HSV-1 Infektion in gehungerten HaCaT-Zellen**

Zunächst wurde in Vorexperimenten die Auswirkung des Hungerns in HaCaT-Zellen untersucht. Hierzu wurden HaCaT-Zellen für 2, 3 und 5 Tage gehungert (0,5% statt 10% FCS) und anschließend für 2h infiziert. Die HaCaT-Zellen wiesen vermehrte Stressfibrillen nach dem Hungern auf, waren aber im Vergleich zur Kontrolle ähnlich stark infiziert (Abb.7A). Da HaCaT-Zellen auch einen noch längeren Hungerzeitraum überstehen konnten (bis zu 14 Tage getestet; Daten nicht gezeigt), wurde für das Pulldown-Verfahren eine 7-tägige Hungerperiode festgelegt und ein erster Versuch mit nur einem Infektionszeitpunkt (25min p.i.) durchgeführt. Bei diesem Experiment zeigte sich, dass einerseits der Cdc42-Aktivitätszustand in den mock-infizierten Zellen deutlich geringer war als ohne Hungerperiode und andererseits nach Infektion ein deutlicher Anstieg der Aktivitätszustände bei Rac1 und Cdc42 zu verzeichnen war.

Aus diesem Grund wurden erneut Pulldown-Versuche zu verschiedenen Infektionszeitpunkten in gehungerten HaCaT-Zellen unternommen (Abb.7D und E). Im Detail war zu beobachten, dass sich der Aktivitätszustand von Rac1 in der Mehrzahl der Experimente ähnlich zu den Experimenten in nicht-gehungerten Zellen verhielt (Vergleiche Abb.7B und D). Der Aktivitätszustand von Cdc42 wurde durch die Hungerperiode verringert und ermöglichte so eine Analyse der Aktivitäten zu verschiedenen Infektionszeitpunkten. Hierbei konnte ähnlich zu den Rac1-Aktivitätszuständen ein Anstieg 15 bzw. 30min p.i. und ein Abfall 60min p.i. demonstriert werden (Abb.7E). Auch hier wurde bei den Aktivitätszuständen von Rac1 und Cdc42 der Wert 120min p.i. wegen zu hoher Heterogenität nicht berücksichtigt.

Zusammenhängend betrachtet kann geschlussfolgert werden, dass die frühe HSV-1 Infektion mit den Aktivitätszuständen von Rac1 und Cdc42 interferiert, da im Gegensatz zu den mock-infizierten Zellen zunächst ein temporärer Anstieg der Aktivitätszustände zu verzeichnen war. Ein Abfall der Aktivitätszustände war 60min p.i. erreicht und teilweise ließ sich ein erneuter Anstieg 120min p.i. beobachten. Es kann also eine Fluktuation der Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 in der frühen HSV-1 Infektion aufgezeigt werden.

### **1.3 Einfluss von Rac1- und Cdc42-Mutanten auf die frühe HSV-1 Infektion**

Da die frühe HSV-1 Infektion von HaCaT-Zellen zu einer Veränderung der Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 führte, sollte der potentielle Einfluss von Rac1 und Cdc42 durch Überexpression konstitutiv aktiver und dominant negativer Rac1-/Cdc42-Mutanten untersucht werden.

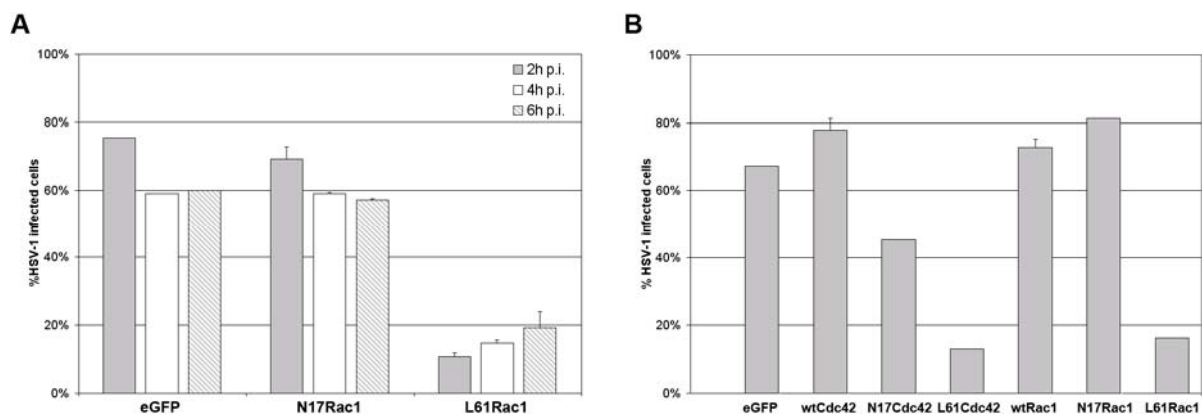
Hierbei wurde beobachtet, dass die transiente Überexpression der dominant aktiven Mutanten von Rac1 (L61Rac1) und Cdc42 (L61Cdc42) sowie der dominant negativen Cdc42-Mutante (N17Cdc42) in HaCaT-Zellen zu einem inhibierenden Effekt auf die frühe HSV-1 Infektion führte. Die dominant negative Rac1-Mutante (N17Rac1) hatte dagegen keinen Einfluss auf die Infektion (Abb.8;

Diplomarbeit, Philipp Petermann, 2006). In MDCKII-Zellen sind ähnliche Resultate gezeigt (Hoppe et al., 2006).

Da diese Studien auf einer Infektionsdauer von 2h beruhen, sollte in HaCaT-Zellen zusätzlich getestet werden, ob der inhibierende Effekt der konstitutiv aktiven Rac1-Mutante auch bei längeren Infektionszeiten anhält. Dazu wurden HaCaT-Zellen entweder mit L61Rac1 oder N17Rac1 transfiziert und anschließend 2, 4 und 6h infiziert; die Überexpression von eGFP diente hierbei als Kontrolle (Abb.8A). Es wurde beobachtet, dass auch 4 und 6h p.i. ein inhibierender Effekt von L61Rac1 auf die HSV-1 Infektion vorherrschte. Die transiente Überexpression von N17Rac1 im Vergleich zur Kontrolle hatte auch bei längerer Infektionsdauer keinen Einfluss auf die Infektion.

Zusätzlich sollte in HaCaT-Zellen untersucht werden, ob die transiente Überexpression der Wildtyp-Mutanten von Rac1 und Cdc42 einen Einfluss auf die frühe HSV-1 Infektion hatte (Abb.8B). In MDCKII-Zellen ist gezeigt, dass die Wildtyp-Mutanten keinen Effekt auf die Infektion haben (Hoppe et al., 2006). Dies konnte auch in HaCaT-Zellen bestätigt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die konstitutiv aktiven Mutanten von Rac1 und Cdc42 sowie die dominant negative Cdc42-Mutante zu einer Reduktion HSV-1 infizierter HaCaT-Zellen führen (Diplomarbeit, Philipp Petermann, 2006). Der inhibierende Effekt von L61Rac1 war hierbei auch nach erhöhter Infektionsdauer stabil.



**Abb.8 Einfluss der transienten Überexpression von Rac1- und Cdc42-Mutanten (Myc-Tag) auf die frühe HSV-1 Infektion** 22h nach transienter Überexpression von eGFP (Kontrolle), N17Rac1 oder L61Rac1 (A) oder von eGFP, wtCdc42 (Wildtyp), N17Cdc42, L61Cdc42, wtRac1 (Wildtyp), N17Rac1 oder L61Rac1 (B) wurden subkonfluente HaCaT-Zellen 2, 4 oder 6h (A) oder 2h (B) mit HSV-1 infiziert (MOI50) und anhand der frühen viralen Genexpression von ICP0 analysiert. Die Anzahl ICP0 exprimierender Zellen pro Transgen exprimierender Zellen wurde bestimmt und graphisch dargestellt. (A) Die Mittelung zweier Experimente bei den Rac1-Mutanten (mit Standardabweichung) und ein Experiment der transienten eGFP-Überexpression (~100 Zellen pro Experiment ausgezählt) oder (B) ein Experiment, bei dem die transiente Überexpression der Wildtyp-Mutanten durch Mittelung zweier Experimente (mit Standardabweichung) erfolgte (~150 Zellen pro Experiment ausgezählt), sind gezeigt.

#### 1.4 Einfluss der Reduktion von Rac1, Cdc42 und RhoA auf die frühe HSV-1 Infektion

Der inhibierende Effekt der dominant negativen Cdc42-Mutante führte zu der Frage, inwieweit sich die Reduktion von endogenem Cdc42 auf die HSV-1 Infektion auswirken könnte. Hierzu wurden Infektionsstudien in HaCaT-Zellen, humanen primären Keratinozyten und MDCKII-Zellen durchgeführt, bei denen mittels RNA Interferenz endogenes Cdc42 sowie Rac1 und RhoA reduziert wurde.

Die Transfektionsmethode (Liposomen-Transfektionsmethode (Hiperfect)) für die RNA Interferenz und die Transfektionen der siRNA-Konstrukte der entsprechenden endogenen Rho GTPase sind bereits in HaCaT-Zellen etabliert worden. Hierbei zeigt sich, dass hohe Reduktionseffizienzen von Rac1 und Cdc42 erzielt werden können (Diplomarbeit, Philipp Petermann, 2006). In den folgenden Abschnitten

(1.4.1 – 1.4.3) wurde die frühe virale Genexpression nach Reduktion der entsprechenden Rho GTPasen in Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht, wobei zu jedem Experiment auch die Reduktionseffizienz über das Western-Blot-Verfahren überprüft wurde.

#### **1.4.1 Einfluss der Reduktion von Rac1, Cdc42 und RhoA auf die frühe virale Genexpression und die Virusproduktion in HaCaT-Zellen**

In HaCaT-Zellen wurden Reduktionen von endogenem Rac1, Cdc42 oder RhoA zwischen 90 – 96% erreicht (Abb.9A). Nach 70h p.t. mit den entsprechenden siRNAs wurden die Zellen für 2h infiziert (MOI20). Hierbei wurde beobachtet, dass sich die Infizierbarkeit der Zellen trotz Reduktion der entsprechenden Rho GTPasen nicht unterschied (Abb.9C und E). Lediglich ein leichter Anstieg der Zahl infizierter Zellen war nach RhoA-Reduktion zu sehen. Dies kann mit einem leichteren Zugang des Virus zu inneren Zellen einer Zellinsel erklärt werden (siehe Abschnitt 1.1). Da ICP0 in allen Ansätzen im Zellkern anzutreffen war, beeinflussten die reduzierten Rho GTPasen wahrscheinlich nicht den Verlauf der Infektion (Abb.9C).

Um sicher zu gehen, dass die Reduktion der Rho GTPasen nicht für die spätere HSV-1 Infektion oder für die Produktion von neuen Viren bedeutsam war, sollte die Virusproduktion untersucht werden. Hierzu wurden Plaque-Test-Analysen mit Rac1- und Cdc42-reduzierten HaCaT-Zellen durchgeführt. Da in HaCaT-Zellen auch schon früher als 72h eine hohe Reduktion von Rac1 oder Cdc42 zu verzeichnen ist (Diplomarbeit, Philipp Petermann, 2006) und die Zellen für die bevorstehende längere Infektionsdauer nicht zu konfluent werden sollten, wurden die Zellen 48h p.t. der Rac1- oder Cdc42-siRNA für 36h oder 60h infiziert. Die Untersuchung von Zell-assoziierten (cell associated virus: CAV) und Zell-freigesetzten (cell released virus: CRV) Viren zeigte hierbei keinen Effekt auf die Virusproduktion nach Reduktion der entsprechenden Rho GTPase (Abb.9F).

#### **1.4.2 Einfluss der Reduktion von Rac1, Cdc42 und RhoA auf die frühe virale Genexpression in humanen primären Keratinozyten**

In HaCaT-Zellen wurde kein Effekt der Reduktion von Rac1 und Cdc42 auf die frühe HSV-1 Infektion festgestellt, daher sollten Reduktionen auch in isolierten humanen primären Keratinozyten durchgeführt werden. Hierbei wurden 72h p.t. der Rac1- oder Cdc42-siRNA ebenfalls hohe Reduktionseffizienzen von 91 – 97% erreicht (Abb.9B). Infektionsstudien zeigten, dass die Reduktion von Rac1 oder Cdc42 auch hier keinen Effekt auf die frühe HSV-1 Infektion hatte. Erwähnenswert ist, dass die Infektionseffizienz der primären Keratinozyten im Vergleich zu HaCaT-Zellen deutlich geringer war (Abb.9D und G; siehe Abschnitt 1.1).

Da die Reduktion von endogenem Rac1, Cdc42 und RhoA nicht mit der frühen HSV-1 Infektion und der Virusproduktion interferierte, kann man schlussfolgern, dass die Signaltransduktionswege von Rac1, Cdc42 und RhoA keine essentielle Rolle für die Initiation der HSV-1 Infektion in humanen Keratinozyten spielen.

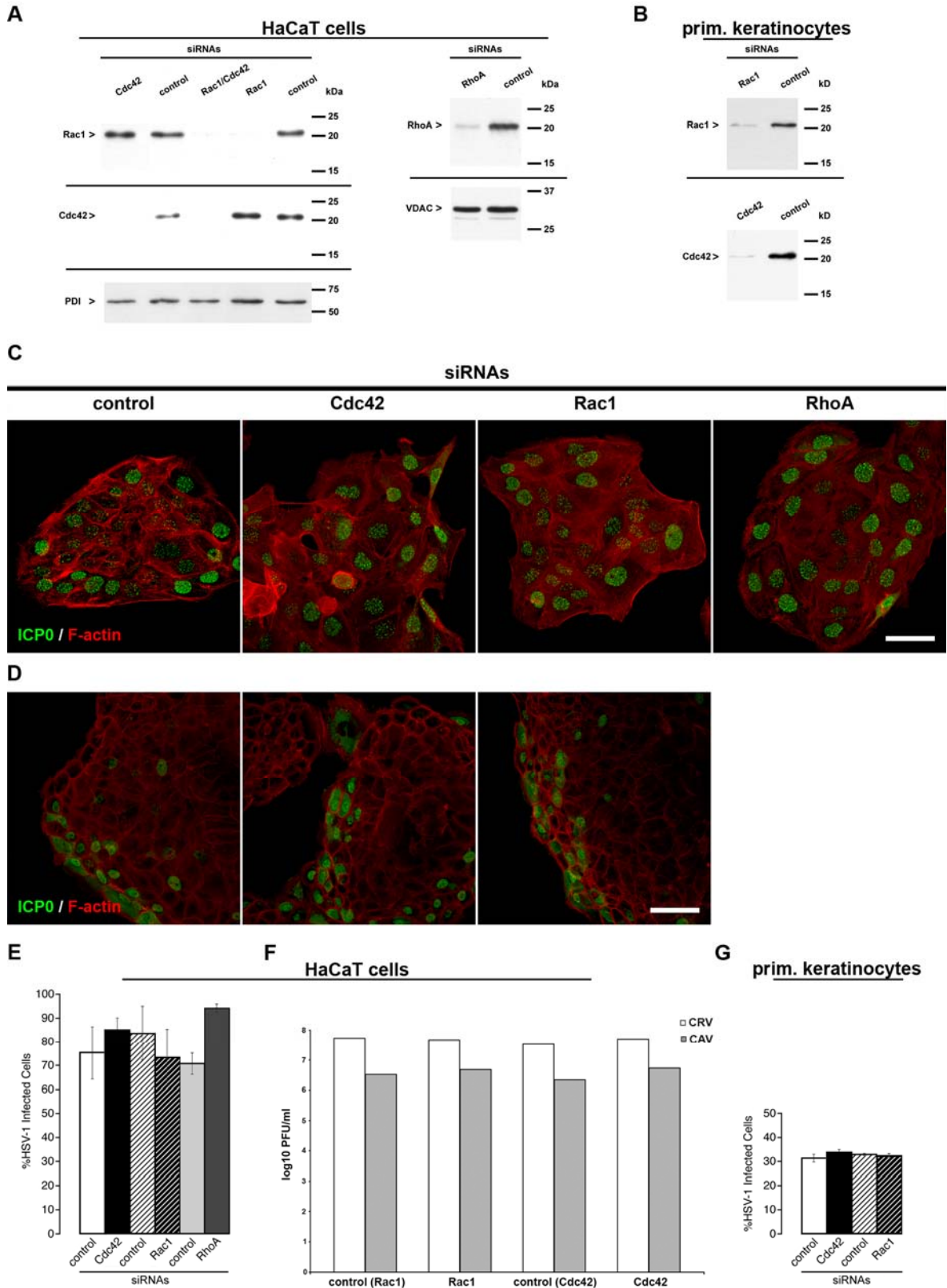


Abb.9 (siehe Seite 45)

**Abb.9 Einfluss der Reduktion von Rac1, Cdc42 und RhoA in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinozyten während der frühen HSV-1 Infektion (Seite 44)**

HaCaT-Zellen und humane primäre Keratinozyten wurden nach Transfektion (70h) mit einer Rac1- (40nM) oder einer Cdc42-siRNA (20nM), bei HaCaT-Zellen ergänzend mit einer RhoA-siRNA (20nM), 2h mit HSV-1 infiziert (MOI20). Zusätzlich wurden auch die entsprechenden Kontroll-siRNAs verwendet. Zell-Extrakte (RIPA-Methode) von HaCaT-Zellen (A) oder primären Keratinozyten (B) wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Expression der Rho GTPasen mittels den monoklonalen Antikörpern (anti-Rac1 (23A8), anti-Cdc42 (BD-610929) oder anti-RhoA (26C4)) überprüft. PDI oder VDAC diente hierbei als Ladekontrolle. 2h p.i. wurden HaCaT-Zellen (C) oder primäre Keratinozyten (D) nach entsprechender Reduktion fixiert und ICP0 über den primären Antikörper mab11060 und den sekundären Antikörper AF488 anti-Maus (grün) angefärbt. F-Aktin wurde mittels Phalloidin-gekoppeltem TRITC (rot) visualisiert. Es sind Überlagerungen konfokaler Projektionen gezeigt. Der Maßstab beträgt 50µm (C) oder 80µm (D). Die Anzahl infizierter Zellen nach entsprechender Reduktion oder nach Transfektion der Kontroll-siRNAs wurde in zwei voneinander unabhängigen Versuchen ermittelt (~600 Zellen (E) oder ~500 Zellen (G) pro Experiment ausgezählt). Das Diagramm der HaCaT-Zellen (E) oder der primären Keratinozyten (G) zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung. (F) 36h p.i. wurde in Rac1- oder Cdc42-reduzierten HaCaT-Zellen der Virustiter im Vergleich zu den Kontroll-siRNAs anhand von Zell-freigesetztem (cell released virus: CRV, weiß) und Zell-assoziiertem (cell associated virus: CAV, grau) Virus überprüft und logarithmisch aufgetragen.

**1.4.3 Einfluss der Reduktion von Rac1, Cdc42 und RhoA auf die frühe virale Genexpression in MDCKII-Zellen**

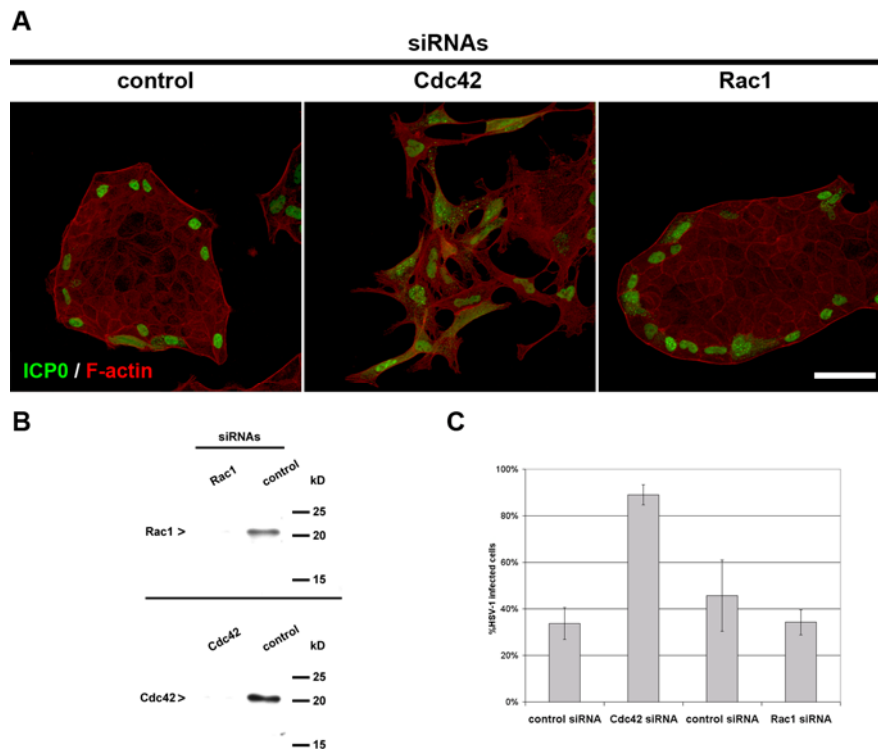
In MDCKII-Zellen ist gezeigt, dass die frühe HSV-1 Infektion von einer regulierten Rac1- und Cdc42-Signaltransduktion abhängt (Hoppe et al., 2006). Aus diesem Grund sollte auch in MDCKII-Zellen die frühe HSV-1 Infektion nach Reduktion von endogenem Rac1, Cdc42 oder RhoA untersucht werden.

Zunächst wurde überprüft, inwieweit die für humane Zellen spezifischen siRNAs von Rac1, Cdc42 und RhoA zu einer effizienten Reduktion in MDCKII-Zellen führten. Der Transfektionszeitraum wurde hierbei im Vergleich zu den HaCaT-Zellen oder den primären Keratinozyten von 72h auf 48h verringert, da aufgrund der schnelleren Teilungsrate auch ein erhöhter Stoffwechsel zu vermuten ist. Während die Transfektion zu effizienten Reduktionen von Rac1 und Cdc42 führte (nahezu 100%; Abb.10B), wurde kein Effekt auf endogenes RhoA beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Reduktion von endogenem Rac1 führte nicht zur Veränderung der Zell-Morphologie der MDCKII-Zellen und verlief daher ähnlich wie bei der Kontroll-siRNA (Abb.10A). Auch die Infektionseffizienz war mit der Kontrolle vergleichbar, wenn auch eine geringe Abnahme zu verzeichnen war (von 45% auf 35%; Abb.10C).

Die Reduktion von endogenem Cdc42 dagegen führte zu einer Veränderung der Zell-Morphologie. Die Zellen verloren ihre Zell-Zell-Kontakte und die Gestalt der Zelle wandelte sich in eine spindelförmige, fibroblastenähnliche Form (Abb.10A). Wahrscheinlich war die Orientierung der Zelle und ihre apikale/basolaterale Polarität gestört, da einerseits die Zell-Zell-Kontakte aufgehoben und andererseits Zellfortsätze in verschiedene Richtungen ausgestreckt wurden. Durch die Auflösung der Zell-Zell-Kontakte nach Cdc42-Reduktion und die daraus resultierende bessere Erreichbarkeit der Zellen durch das Virus wurde eine erhöhte Infektionsrate (von 34% auf 90%) im Vergleich zu der Rac1-Reduktion bzw. der Kontrolle beobachtet (Abb.10C).

Die Rac1-Reduktion hatte keinen Effekt auf die frühe HSV-1 Infektion. Nach der Cdc42-Reduktion dagegen stieg die Infektionseffizienz drastisch an. Dieses Phänomen ging mit der Auflösung von Zell-Zell-Kontakten einher, die dem Virus einen besseren Zugang zu den Zellen verschaffte und daher vermutlich ein Sekundäreffekt ist.





**Abb.10 Einfluss der Reduktion von Rac1 und Cdc42 in MDCKII-Zellen während der frühen HSV-1 Infektion**

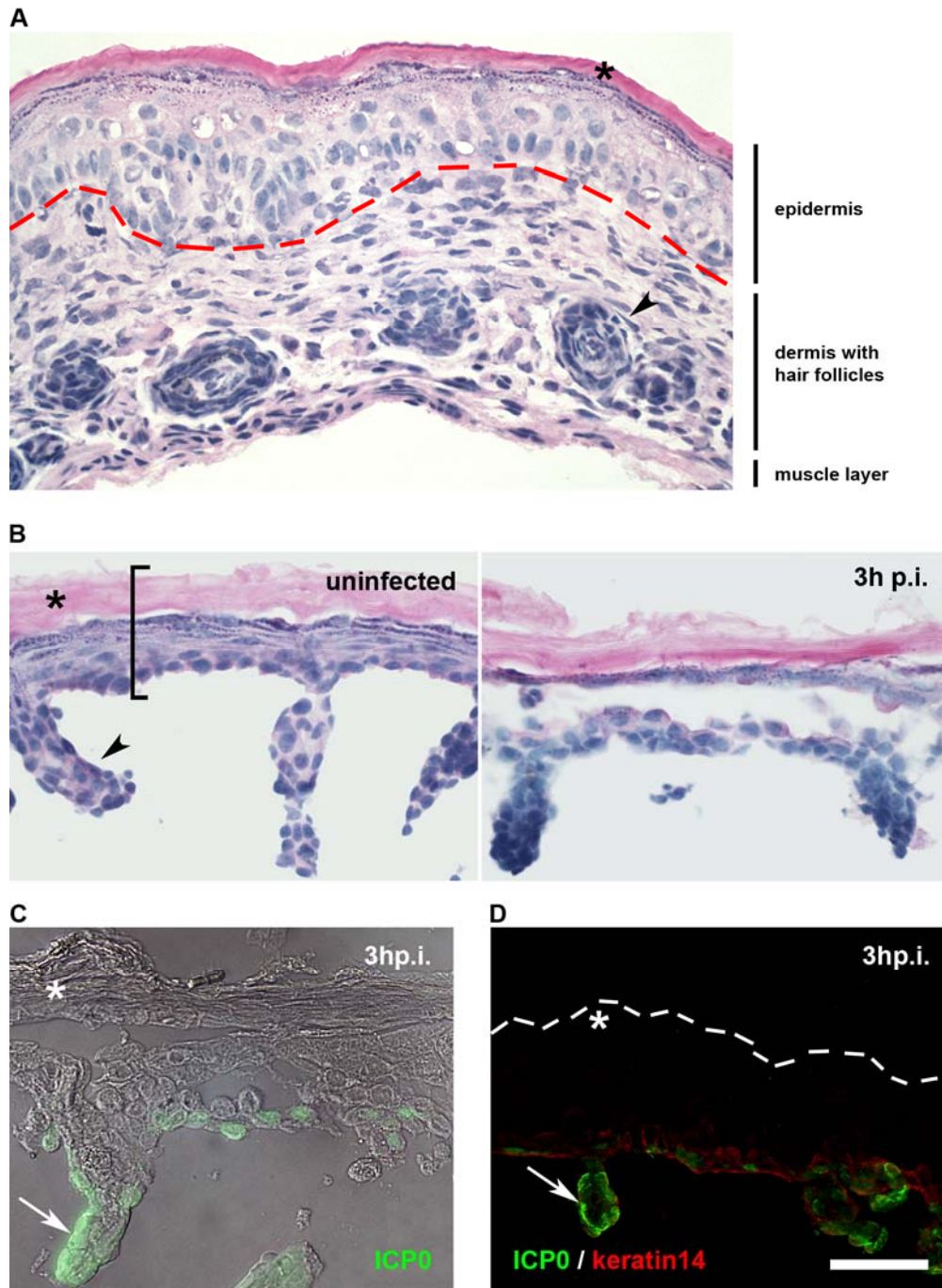
(A) MDCKII-Zellen wurden nach Transfektion (46h) mit einer Rac1- (40nM) oder einer Cdc42-siRNA (20nM) 2h mit HSV-1 infiziert (MOI20). Zusätzlich wurden auch die entsprechenden Kontroll-siRNAs verwendet. Die Visualisierung von ICP0 geschah mit dem primären Antikörper mab11060 und dem sekundären Antikörper AF488 anti-Maus (grün). F-Aktin wurde mittels Phalloidin-gekoppeltem TRITC (rot) angefärbt. Es sind Überlagerungen konfokaler Projektionen gezeigt. Der Maßstab beträgt 50µm. (B) Zell-Extrakte (RIPA-Methode) von Rac1-, Cdc42- oder Kontroll-siRNA behandelten MDCKII-Zellen wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Expression der Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 mittels monoklonalen Antikörpern (anti-Rac1 (23A8) oder anti-Cdc42 (BD-610929)) überprüft. (C) Die Anzahl infizierter Zellen nach entsprechender Reduktion oder nach Transfektion der Kontroll-siRNAs wurde in drei voneinander unabhängigen Versuchen ermittelt (~600 Zellen pro Experiment ausgezählt). Das Diagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung.

## 1.5 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in der Rac1 konditionalen transgenen Maus (Rac1 E-KO)

Die Reduktion von endogenem Rac1 mittels RNA Interferenz in HaCaT-Zellen, humanen primären Keratinozyten und MDCKII-Zellen hatte keinen Einfluss auf die frühe HSV-1 Infektion. Daraus ergab sich die Frage, ob die Abwesenheit von endogenem Rac1 in der Epidermis auch keine Auswirkung auf die HSV-1 Infektion hat. Dazu sollten Infektionsanalysen in einer konditionalen transgenen Maus (Rac1 E-KO) durchgeführt werden, die kein endogenes Rac1 in den Keratinozyten der Epidermis exprimiert. Zur Überprüfung der frühen HSV-1 Infektion in der Rac1 E-KO-Maus wurde zunächst ein *ex vivo* Infektionsmodell in Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) etabliert.

### 1.5.1 Infektionsstudien in muriner Gesamthaut und Epidermis

Für die Etablierung des *ex vivo* Modells wurden C57BL/6 Mäuse verwendet, bei denen kurz nach der Geburt (bis 3 Tage nach der Geburt) die Gesamthaut vorsichtig vom Rücken und Bauch entfernt wurde. Diese Gesamthaut wurde durch Inkubation in HSV-1 haltigem Kulturmedium infiziert. Nach Immunfluoreszenz-Färbung von Cryo-Schnitten wurde keine frühe virale Genexpression festgestellt. Die Gesamthaut von Mäusen ist unterteilt (von Außen nach Innen) in die Epidermis, die Basalmembran, die Dermis und eine dünne Muskelschicht (Abb.11A).



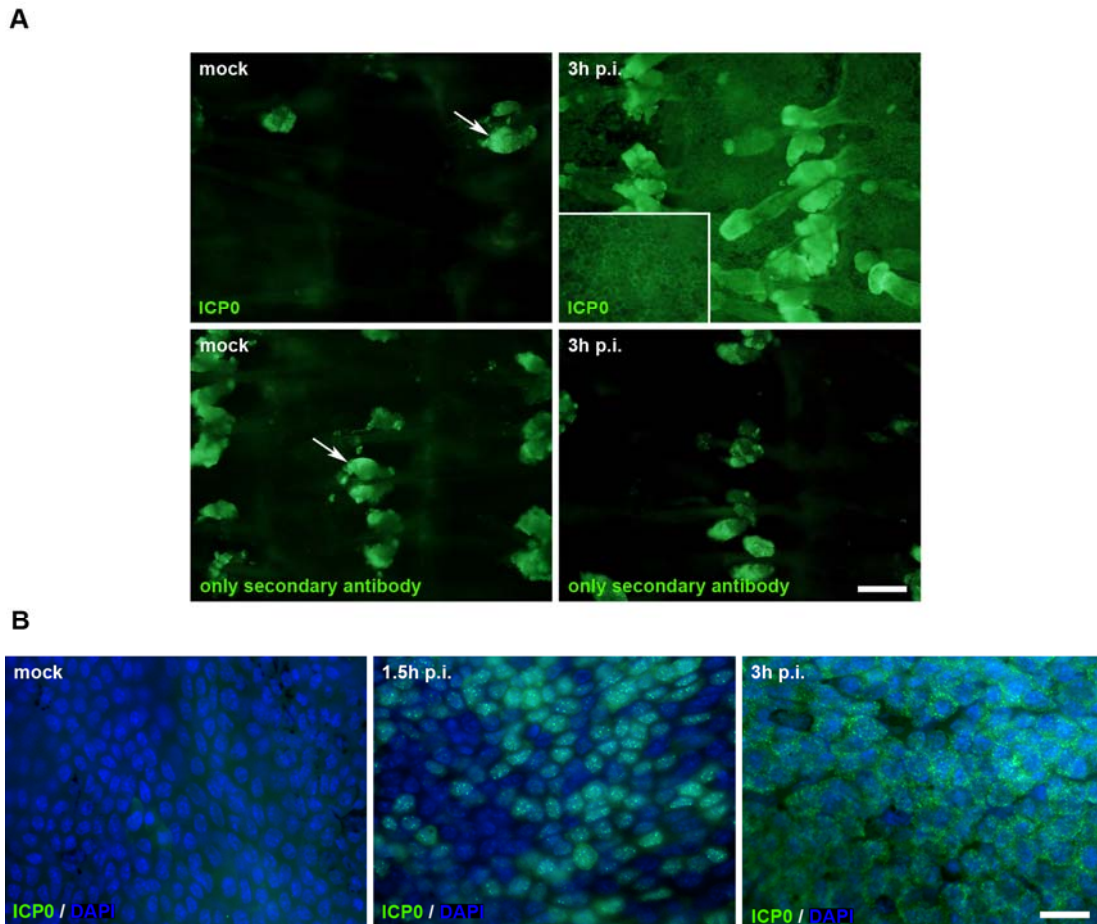
#### Abb.11 HSV-1 Infektion von muriner Epidermis

(A) HE Färbung von Cryo-Hautschnitten einer 3 Tage alten C57BL/6 Maus sind zu sehen. (B) Separierung der Epidermis von der Gesamthaut mittels Dispasell (5mg/ml, 30min bei 37°C) und nachfolgender Inkubation in Medium oder Virus-haltigem Medium für 3h (MOI100). HE Färbungen von Cryo-Schnitten der Epidermis sind gezeigt. (C) 3h p.i. (MOI100) wurde die murine Epidermis fixiert und mit dem monoklonalen anti-ICP0-Antikörper mab11060 und AF488-Maus (grün) angefärbt. Eine Überlagerung einer Epifluoreszenz-Aufnahme mit einer Phasenkontrast-Darstellung ist zu sehen. (D) 3h p.i. (MOI100) ist eine Überlagerung von konfokalen Projektionen mit ICP0 (mab11060, grün) und Keratin14 (AF64, polyklonal, rot) in Cryo-Schnitten gezeigt. Die rote gestrichelte Linie (A) repräsentiert die Basalmembran und die weiße gestrichelte Linie (D) markiert den Abschluss des Stratum corneums. Die Sterne stellen das Stratum corneum, die Pfeilköpfe sich-entwickelnde Haarfollikel, die Pfeile infizierte Zellen der äußeren Wurzelscheide und die Klammer die interfollikuläre Epidermis dar. Der Maßstab beträgt 50µm.

Da sich in einem intakten Gewebestück der Gesamthaut normalerweise kein Zugang für HSV-1 ergibt, wurde für weitere Infektionsexperimente die Epidermis von der Dermis getrennt.

Zur Trennung der Epidermis von der Dermis wurden verschiedene Reagenzien verwendet: Ammoniumthiocyanat, Trypsin, Thermolysin, EDTA und Dispasell (siehe Abschnitt 3.1). Es stellte sich heraus, dass nach Dispasell-Behandlung (5mg/ml, 20-35min bei 37°C) einerseits das Gewebe nicht

zu stark beschädigt war (im Gegensatz zu Thermolysin und Trypsin) und andererseits noch eine Infektion der Keratinozyten möglich war (im Gegensatz zu EDTA und Ammoniumthiocyanat). Wichtig war, dass die Separierung sehr vorsichtig vorgenommen wurde, da durch ein zu starkes Reißen die interfollikuläre Epidermisschicht beschädigt werden konnte. Außerdem bestand die Gefahr, bei adulten Mäusen mit zu starker Beanspruchung Haarfollikel und Talgdrüsen zu verlieren. Die beginnenden epidermalen Haarfollikel von neugeborenen Mäusen dagegen ließen sich durch Dispasell gut von der Dermis abtrennen (Abb.11B links).



**Abb.12 Whole mount-Präparate HSV-1 infizierter muriner Epidermis**

(A) ICP0 und Sekundär-Antikörperkontrollen von whole mount-Präparaten muriner Epidermis. Mock-infizierte oder 3h infizierte (MOI100) Epidermis wurde fixiert und jeweils gegen ICP0 mit dem monoklonalen Antikörper mab11060 und dem sekundären AF488 anti-Maus (grün) oder nur mit dem Sekundärantikörper AF488 anti-Maus gefärbt. Die Pfeile repräsentieren unspezifisch angefarbte Talgdrüsen. Es sind Einzelfärbungen von Epifluoreszenz-Aufnahmen gezeigt. Der Maßstab beträgt 160µm. (B) Zur Charakterisierung der ICP0-Färbung wurde murine Epidermis mock, 1,5 oder 3h mit HSV-1 infiziert, fixiert und gegen ICP0 mit dem monoklonalen Antikörper mab11060 und dem sekundären AF488 anti-Maus (grün) gefärbt. Zusätzlich ist eine Zellkern-Färbung (DAPI, blau) zu sehen. Es sind Überlagerungen von Epifluoreszenz-Aufnahmen gezeigt. Der Maßstab beträgt 40µm.

Die abgezogene Epidermis wurde nach Dispasell-Inkubation mit der basalen Seite auf Virus-haltiges Medium (MOI100) gelegt, da sie aufgrund der hydrophoben Hornschicht nicht untertauchen konnte; 3h p.i. wurde die Epidermis für Cryo-Schnitte eingebettet. Es zeigte sich, dass die Zellen der Epidermis nach 3-stündiger Inkubation im Medium teilweise aufgequollen waren, wodurch Schnittartefakte (Trennung von Keratinozyten) entstehen konnten. Außerdem war nicht auszuschließen, dass sich durch die Infektion ein Abrunden der Zellen einstellte (Abb.11B rechts).

Anhand des ICP0-Signals wurde beobachtet, dass 3h p.i. basale Keratinozyten infiziert waren. Hierbei waren sowohl teilungsfähige Keratinozyten der interfollikulären Epidermis als auch Zellen der sich-entwickelnden Haarfollikel (im Bereich der äußeren Wurzelscheide) infiziert (Abb.11C und D). Zur Markierung der Basalzellschicht der Epidermis wurde ein Antikörper gegen Keratin14 verwendet (Abb.11D).

Zusätzlich zu den Cryo-Schnitten, die ein zweidimensionales Bild der Epidermis aufzeigten (8 – 10µm), sollte das whole mount-Verfahren etabliert werden, durch das eine dreidimensionale Sicht auf die basale Seite der Epidermis ermöglicht wurde (Braun et al., 2003). Hierzu wurde die Schwanzhaut von adulten Mäusen verwendet, da kurze Haarfollikel und weniger Haare im Vergleich zur entsprechenden Rückenhaut anzutreffen waren und daher eine Separierung leichter zu vollziehen war. Die Schwanzepidermis wurde hier ebenfalls mit Dispasell getrennt und nach Infektion fixiert und gefärbt (Abb.12). Es wurde festgestellt, dass sich durch längere Inkubationszeiten der Antikörper im whole mount-Verfahren auch ein höherer unspezifischer Hintergrund ergab. Daher wurden zunächst Tests mit den Sekundäntikörpern oder beiden Antikörpern mit und ohne Infektion durchgeführt. Hierbei war zu beobachten, dass die Talgdrüsen unspezifisch durch den anti-Maus AF488 angefärbt wurden (Abb.12A).

Des Weiteren sollte das ICP0-Signal zu verschiedenen Infektionszeitpunkten (mock, 1,5h und 3h p.i.) charakterisiert werden. Es zeigte sich, dass 1,5h p.i. ein vornehmlich zellkernlastiges und 3h p.i. ein vermehrt zytoplasmatisches ICP0-Signal zu verzeichnen war (Abb.12B). Dies war ein Indiz dafür, dass die Infektion von basalen Keratinozyten sehr effizient ablief. Die Veränderung der Lokalisierung von ICP0 im Zuge der Infektion konnte ähnlich wie in Zellkultur nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 1.1).

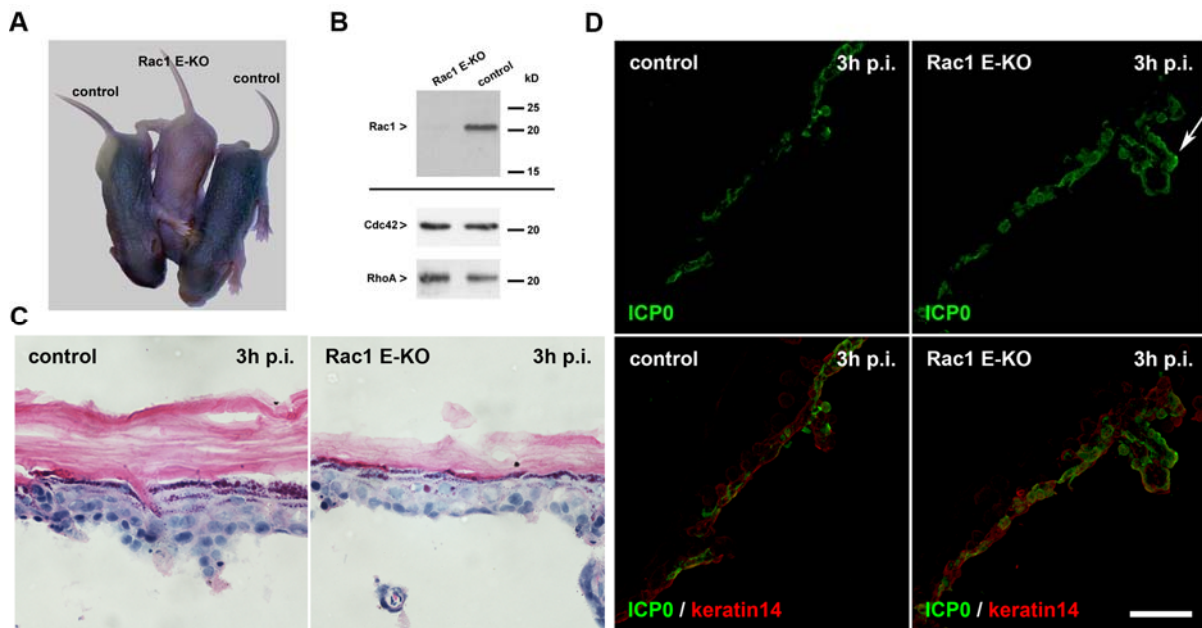
Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die murine Epidermis *ex vivo* effizient mit HSV-1 infizieren lässt, sobald durch Dispasell-Behandlung das Virus Zugang zu den Keratinozyten hatte.

### **1.5.2 Einfluss der Rac1-defizienten Epidermis der Rac1 konditionalen transgenen Maus auf die frühe virale Genexpression von HSV-1**

*Ex vivo* Infektionsstudien in der Epidermis der Rac1 konditionalen transgenen Maus (Rac1 E-KO) sollten zeigen, ob die Abwesenheit von endogenem Rac1 eine Auswirkung auf die Effizienz der frühen HSV-1 Infektion hatte. Die Rac1 E-KO-Mäuse sind durch die Kreuzung von Mäusen mit geflochtenen rac1-Allelen (Chrostek et al., 2006) und Mäusen, die die Cre Rekombinase unter dem Keratin14-Promotor besitzen, entstanden. Zur Kontrolle wurden Mäuse aus dem gleichen Wurf verwendet, die heterozygot für das geflochte rac1-Allel waren.

Zunächst wurde die Epidermis von Neugeborenen (3 Tage nach Geburt; Abb.13A) mittels Western-Blot-Verfahren auf die Abwesenheit von Rac1 hin getestet (Abb.13B). Während eine schwache Bande von Rac1 noch auf eine geringe Expression in der Epidermis von Rac1 E-KO-Mäusen hinwies, war in 10 Tage alter Epidermis kein Rac1 mehr nachweisbar (persönliche Mitteilung PD Dr. I. Haase). Aus diesem Grund wurden Infektionsanalysen sowohl von 3 Tage als auch von 1 Jahr alten Mäusen durchgeführt. Die Rac1 E-KO-Maus hatte im Vergleich zu den Kontroll-Tieren gleiche Konzentrationen an endogenem Cdc42 und RhoA (Abb.13B).





**Abb.13 HSV-1 Infektion der Epidermis von Rac1 konditionalen transgenen Mäusen (Rac1 E-KO)**

(A) Neugeborene Wildtyp- (Kontrolle) und Rac1 E-KO-Mäuse sind gezeigt. (B) Epidermis-Extrakte beider Mäuse (Wildtyp und Rac1 E-KO) wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis von Rac1 erfolgte mit dem monoklonalen anti-Rac1-Antikörper (23A8). Zusätzlich wurde Cdc42 (BD-610929) und RhoA (26C4) detektiert. (C) Eine HE Färbung der Wildtyp- oder Rac1 E-KO-Epidermis 3h p.i. (MOI100) ist veranschaulicht. (D) Überlagerungen konfokaler Projektionen 3h p.i. (MOI100) der Epidermis von Wildtyp- oder Rac1 E-KO-Mäusen (ICP0 (mab11060, grün) und Keratin14 (AF64, polyklonal, rot)) sind dargestellt. Der Pfeil repräsentiert infizierte Zellen der äußeren Wurzelscheide. Der Maßstab beträgt 50µm.

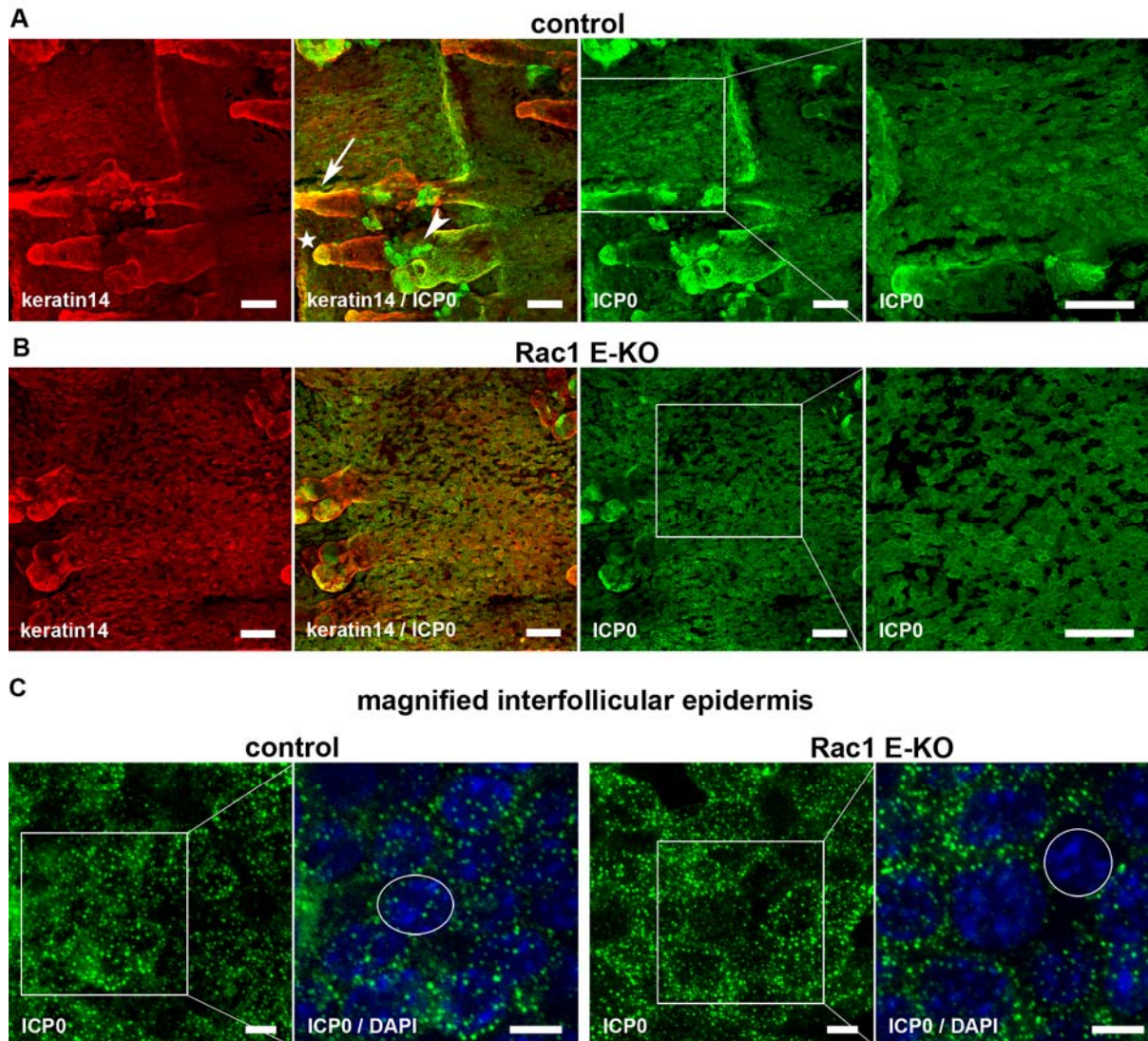
Für die ersten *ex vivo* Infektionsexperimente mit 3 Tage alten Mäusen (zwei Rac1 E-KO-Tiere und zwei Wildtyp-Tiere) wurde die Epidermis der Rückenhaut verwendet, die bei der Rac1 E-KO- und der Kontroll-Maus ähnlich aufgebaut war (Abb.13C). Der Vergleich der frühen HSV-1 Infektion in der Epidermis der 3 Tage alten Rac1 E-KO-Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Tieren 3h p.i. (MOI100) zeigte keine Unterschiede in der Infizierbarkeit der Keratinozyten. Sowohl die interfollikuläre Epidermis als auch die entstehenden Haarfollikel wiesen ein ähnlich starkes ICP0-Signal auf (Abb.13D).

Zusätzlich wurde eine 10 Tage alte Rac1 E-KO-Maus auf ihr Infektionsverhalten getestet, auch hier wurde die Epidermis effizient infiziert.

Um die Verteilung der infizierten Keratinozyten der interfollikulären Epidermis und auch der Haarfollikel besser zu untersuchen, wurden whole mount-Präparate von Rac1 E-KO-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Tieren hergestellt, wobei 1 Jahr alte Tiere verwendet wurden (Abb.14; vier Rac1 E-KO-Mäuse und zwei Wildtyp-Tiere). Es wurde beobachtet, dass sich die Infizierbarkeit der Keratinozyten der Rac1 E-KO-Maus im Vergleich zu den Kontroll-Tieren ähnlich verhielt: große Areale der interfollikulären Epidermis waren infiziert (Abb.14A und B). Weiter zeigte sich, dass sich in den Kontroll-Tieren meist die Talgdrüsen und auch teilweise die Haarfollikel durch die Separierung abgelöst hatten, dennoch waren vorhandene Haarfollikel (im Bereich der äußeren Wurzelscheide, dem Haarbulbus und in der Nähe der Talgdrüsen) infiziert (Abb.14A). Bei den Rac1 E-KO-Tieren war dies aufgrund einer starken Störung in der Haarfollikel-Ausbildung nicht beobachtbar, wenn auch gewisse deformierte Haarfollikel ein ICP0-Signal aufwiesen (Abb.14B).

Zusätzlich sollte auch der Verlauf der Infektion charakterisiert werden. Nach 3h p.i. (MOI100) war ICP0 sowohl in den Rac1 E-KO-Mäusen als auch in den Kontroll-Tieren im Zytoplasma nachweisbar (Abb.14C).

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass die Abwesenheit von Rac1 in *ex vivo* Infektionsstudien der Rac1 E-KO-Maus keinen Einfluss auf die Infizierbarkeit der basalen Keratinozyten hatte.



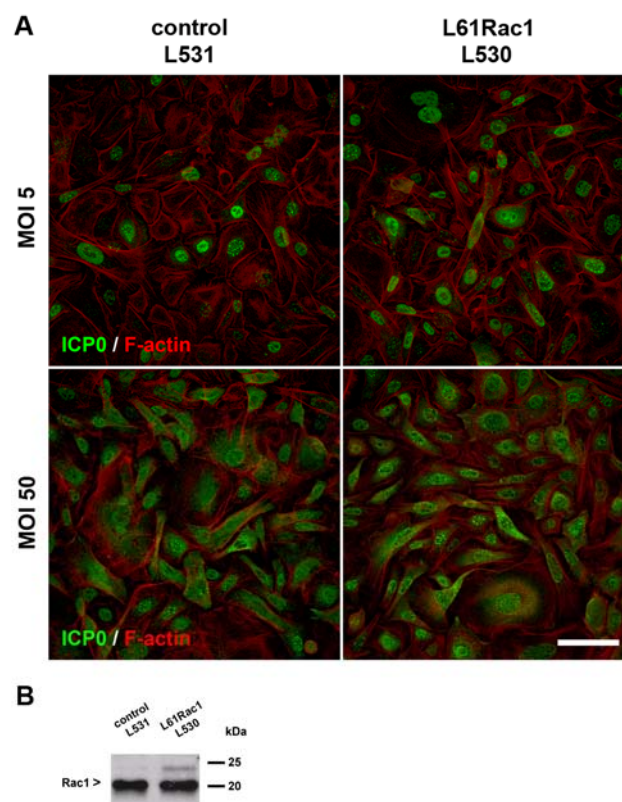
**Abb.14 Lokalisierung HSV-1 infizierter Zellen der Epidermis von Rac1 konditionalen transgenen Mäusen (Rac1 E-KO)**  
 (A und B) Konfokale Projektionen und deren Überlagerungen von whole mount-Präparaten infizierter (3h p.i., MOI100) Epidermis von Wildtyp- oder Rac1 E-KO-Mäusen (1 Jahr alt) sind gezeigt (ICP0 (mab11060, grün) und Keratin14 (AF64, polyklonal, rot)). Der Pfeilkopf stellt Talgdrüsen, der Pfeil infizierte Zellen der äußeren Wurzelscheide und der Stern infizierte Zellen des Haarbulbus dar. Die Kästchen repräsentieren die entsprechende Vergrößerung. Der Maßstab beträgt 80µm. (C) Einzelfärbungen (ICP0 (mab11060, grün)) von konfokalen Projektionen sind gezeigt. Die Kästchen veranschaulichen die entsprechende vergrößerte Überlagerung eines Schnitts mit einer Zellkern-Färbung (DAPI, blau). Je ein Zellkern von den Wildtyp- und den Rac1 E-KO-Tieren ist umrandet. Der Maßstab beträgt 6,6µm.

## 1.6 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in der L61Rac1 konditionalen transgenen Maus

### 1.6.1 Einfluss der L61Rac1-exprimierenden Epidermis der L61Rac1 konditionalen transgenen Maus auf die frühe HSV-1 Infektion

Die transiente Überexpression der konstitutiv aktiven Mutante von Rac1 (L61Rac1) hatte in HaCaT-Zellen einen inhibierenden Effekt auf die Infektion (siehe Abschnitt 1.3; Diplomarbeit, Philipp Petermann, 2006), daher sollte die Epidermis der L61Rac1 konditionalen transgenen Maus

(Doktorarbeit, Michael Tschardt, 2006), die L61Rac1 in Keratinozyten stabil exprimiert, auf einen potentiellen Effekt in der frühen HSV-1 Infektion durch *ex vivo* Infektionsstudien untersucht werden. Zusätzlich wurde auch die Epidermis der N17Rac1 konditionalen transgenen Maus analysiert. Die dominant negative Mutante N17Rac1 hatte nach transienter Überexpression in HaCaT-Zellen keinen Effekt auf die HSV-1 Infektion gezeigt (siehe Abschnitt 1.3; Diplomarbeit, Philipp Petermann, 2006). Es wurden whole mount-Präparate der Epidermis von 1 Jahr alten L61Rac1 und N17Rac1 konditionalen transgenen Mäusen sowie von Kontroll-Mäusen hergestellt (siehe Abschnitt 1.5.1). Nach 3-stündiger HSV-1 Infektion zeigte sich, dass weder ein Unterschied zwischen der L61Rac1- und der N17Rac1-Epidermis noch zwischen den konditionalen transgenen Mäusen und den Kontroll-Tieren im Hinblick auf die Infizierbarkeit der basalen Keratinozyten einstellte (Daten nicht gezeigt).



**Abb.15 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in L61Rac1-exprimierenden murinen Keratinozyten**

(A) L61Rac1-exprimierende murine Keratinozyten aus der L61Rac1 konditionalen transgenen Maus L530 und deren Kontroll-Maus L531, welche L61Rac1 nicht exprimiert, wurden 2h mit HSV-1 infiziert, fixiert und gegen ICP0 mit dem monoklonalen Antikörper mab11060 und dem sekundären AF488 anti-Maus (grün) gefärbt. F-Aktin wurde mittels Phalloidin-gekoppeltem TRITC (rot) visualisiert. Zwei verschiedene Virusmengen (MOI5 und MOI50) sind in Überlagerungen konfokaler Projektionen gezeigt. Der Maßstab beträgt 80µm. (B) Zell-Extrakte (RIPA-Methode) von Keratinozyten beider Mäuse (L531 und L530) wurden über ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis von Rac1 erfolgte mit dem monoklonalen anti-Rac1-Antikörper 23A8.

### 1.6.2 Einfluss von L61Rac1-exprimierenden murinen primären Keratinozyten auf die frühe HSV-1 Infektion

Die basalen Keratinozyten der L61Rac1 konditionalen transgenen Maus wurden im Vergleich zu den Kontroll-Tieren ähnlich gut infiziert. Dies war im Vergleich zu den Überexpressionsstudien in HaCaT-Zellen kontrovers (siehe Abschnitt 1.3; Diplomarbeit, Philipp Petermann, 2006). Daraus ergab sich die Möglichkeit, dass das Expressionslevel der konstitutiv aktiven Mutante in den Keratinozyten der L61Rac1 konditionalen transgenen Maus im Vergleich zu einer transienten Überexpression in HaCaT-



Zellen verschieden war und daher unterschiedlich die HSV-1 Infektion beeinflusste. Aus diesem Grund wurden isolierte primäre Keratinozyten der L61Rac1 konditionalen transgenen Maus untersucht (Doktorarbeit, Michael Tschamtko, 2006).

Zunächst wurden Infektionsstudien in isolierten Keratinozyten durchgeführt und es konnte ähnlich zu den Versuchen in der Epidermis (siehe Abschnitt 1.6.1) demonstriert werden, dass sich in den L61Rac1-exprimierenden Keratinozyten im Vergleich zur Kontrolle kein inhibierender Effekt auf die frühe HSV-1 Infektion einstellte. Dies wurde auch bei verschiedenen Virusmengen (MOI5 oder MOI50) beobachtet (Abb.15A).

Um der Frage nach dem Expressionslevel der konstitutiv aktiven Mutante und der potentiellen Auswirkung auf die HSV-1 Infektion nachzugehen, wurde die Expression von L61Rac1 in murinen Keratinozyten nachgewiesen. Immunfluoreszenzstudien zeigten dabei sehr schwache Signale (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurde die Expression von endogenem Rac1 im Vergleich zu L61Rac1 im Western-Blot-Verfahren analysiert. Da L61Rac1 ein Myc-Tag enthält, unterscheidet sich das Laufverhalten von L61Rac1 von endogenem Rac1. Da die Bande von L61Rac1 viel schwächer als die Bande für endogenes Rac1 war, kann man schlussfolgern, dass L61Rac1 ein sehr geringes Expressionslevel aufweist (Abb.15B). Die sehr schwache Expression von L61Rac1 kann wiederum erklären, warum kein inhibierender Effekt auf die HSV-1 Infektion in der L61Rac1 konditionalen transgenen Maus beobachtet wurde.

### **1.7 Einfluss der transienten Überexpression von Rac1-Mutanten auf die Immunantwort von MDCKII-Zellen**

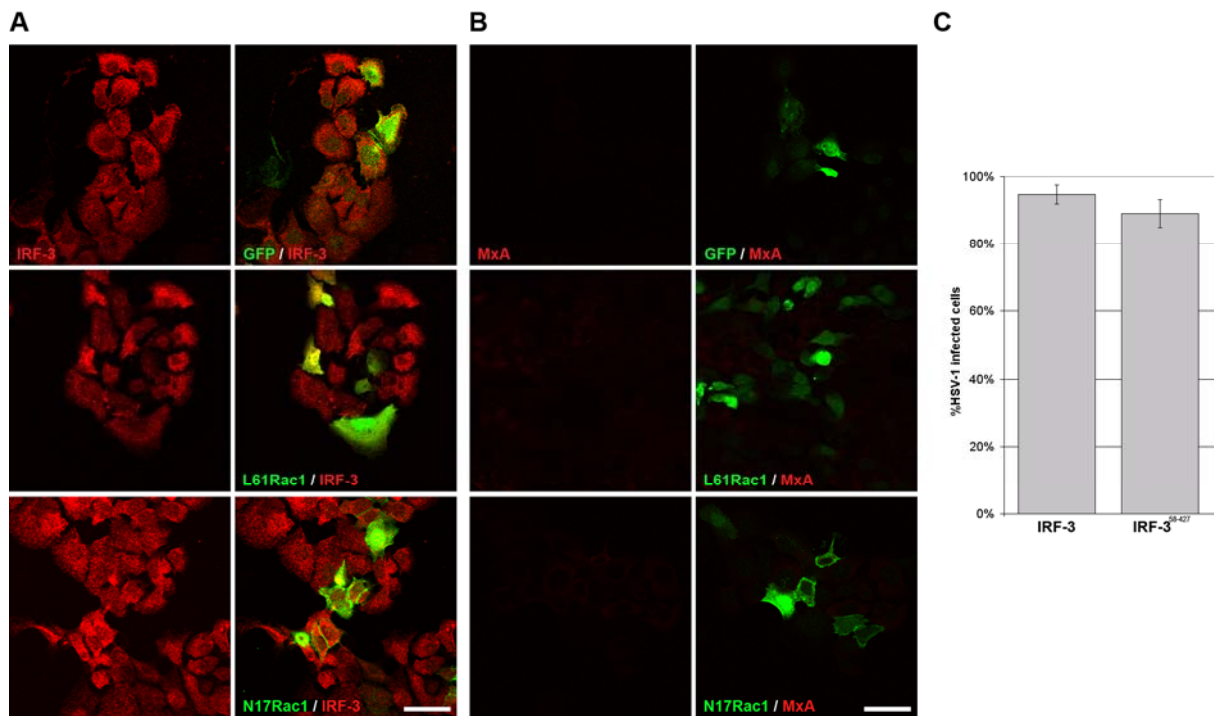
Die Aktivierung von Rac1 kann zur Phosphorylierung von IRF-3 beitragen und damit den initialen Schritt einer Immunsignalkaskade auslösen (Ehrhardt et al., 2004). IRF-3 (‘interferon regulatory factor 3’) wechselt nach Phosphorylierung und Dimerisierung vom Zytoplasma in den Zellkern und kann dort mit anderen Faktoren (p300/CBP) die Transkription der Interferone  $\beta$ -Gene anschalten (zur Übersicht Mamane et al., 1999; Taniguchi et al., 2001). Wenn das hohe Expressionslevel von L61Rac1 zur Immunisierung der Zelle führt, könnte dies ein Grund für den inhibierenden Effekt der konstitutiv aktiven Mutante auf die frühe HSV-1 Infektion sein.

Um diese Frage zu beantworten, sollten die Mutanten L61Rac1 und N17Rac1 in der Epithel-Zelllinie MDCKII überexprimiert und die Lokalisierung von IRF-3 untersucht werden (Abb.16A). Zusätzlich wurde noch die Expression der GTPase MxA verfolgt, die nach Interferonantwort im Zytoplasma akkumuliert (Abb.16B). Als Kontrolle diente die Überexpression von eGFP. Die Ergebnisse zeigen, dass weder IRF-3 in den Zellkern translozierte noch MxA im Zytoplasma akkumulierte (Abb.16A und B; Experiment in Zusammenarbeit mit Prof. F. Weber (Universität Freiburg) durchgeführt).

Um zu testen ob sich in MDCKII-Zellen durch die transiente Überexpression von IRF-3-Mutanten eine Veränderung der Infizierbarkeit von HSV-1 einstellte, wurden Infektionsstudien mit der Wildtyp-Mutante und der dominant negativen Mutante von IRF-3 durchgeführt (Abb.16C). Hierbei stellte sich heraus, dass beide Mutanten keinen Einfluss auf die frühe HSV-1 Infektion hatten.

Zusammenfassend geben die Ergebnisse keinen Hinweis darauf, dass die transiente Überexpression von L61Rac1 eine Interferonantwort in MDCKII-Zellen auslöst und so die Zelle vor einer HSV-1 Infektion schützt.





**Abb.16 Einfluss der transienten Überexpression von Rac1-Mutanten (Myc-Tag) auf eine potentielle Immunisierung und von IRF-3-Mutanten (HA-Tag) auf die frühe HSV-1 Infektion von MDCKII-Zellen**

22h nach transienter Überexpression von eGFP (Kontrolle), L61Rac1 oder N17Rac1 in MDCKII-Zellen wurden die Mutanten mittels monoklonalem anti-Myc-Antikörper und AF488 anti-Maus (grün) und polyklonalem Antikörper gegen IRF-3 (A) oder MxA (B) und AF555 anti-Kaninchen (rot) angefärbt. Der Maßstab beträgt 50µm. (C) 22h nach transienter Überexpression von IRF-3 (Wildtyp) oder IRF-3<sup>58-427</sup> (dominant negative Mutante) wurden subkonfluente MDCKII-Zellen 2h mit HSV-1 infiziert (MOI50) und anhand der frühen viralen Genexpression von ICP0 analysiert. Die Anzahl ICP0 exprimierender Zellen pro Transgen exprimierender Zellen wurde bestimmt und graphisch dargestellt (~250 Zellen pro Experiment ausgezählt). Die Mittelung zweier Experimente mit Standardabweichung ist gezeigt.

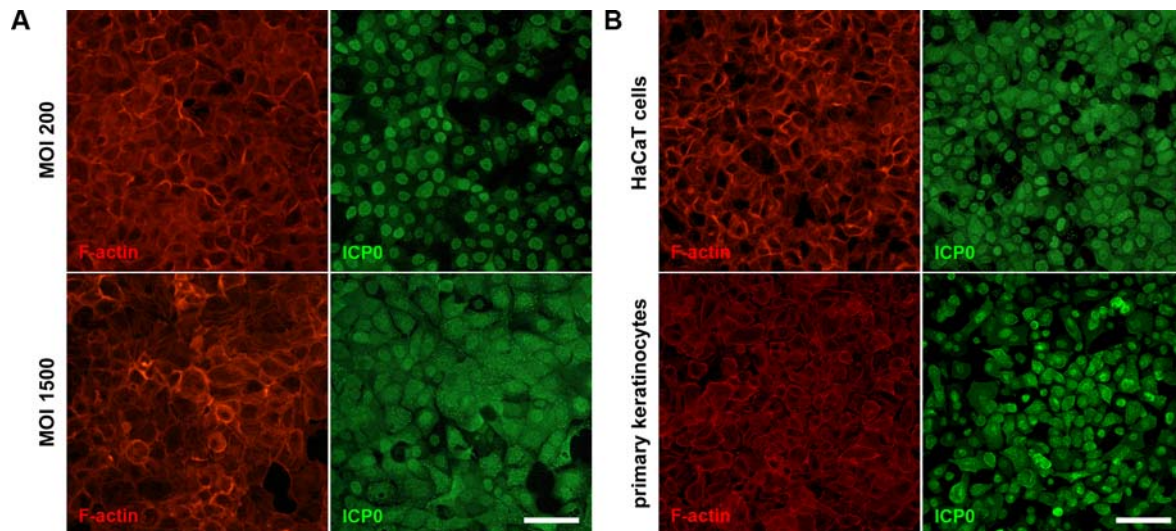
## 2. Die Charakterisierung der HSV-1 Internalisierung in humane Keratinozyten

Ein wichtiger Schritt für die Untersuchung des Viruseintritts ist die Entschlüsselung und Charakterisierung der Internalisierung von HSV-1 in die Wirtszelle. Es ist gezeigt, dass je nach Zelltyp HSV-1 über direkte Fusion mit der Plasmamembran oder über endozytotische Wege in die Zelle gelangen kann (Nicola et al., 2003, 2005; Gianni et al., 2004; Nicola und Straus, 2004; Milne et al., 2005). In diesem Kapitel wird die Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in humane Keratinozyten dargestellt. Anfängliche Studien weisen auf eine pH-Wert-abhängige endozytotische Aufnahme von HSV-1 in humane Keratinozyten hin (Nicola et al., 2005).

### 2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung

Die Untersuchung der Internalisierung von HSV-1 in humane Keratinozyten sollte zunächst elektronenmikroskopisch erfolgen und wurde in Kollaboration mit Dr. Frazer Rixon (MRC Virology Unit, Glasgow) unternommen. Hierzu wurden sowohl HaCaT-Zellen als auch humane primäre Keratinozyten verwendet. Entscheidend bei den primären Keratinozyten war, dass sie in Calcium-reduziertem Keratinozyten-Medium gehalten wurden, um durch Auflösung von Calcium-abhängigen Zell-Zell-Kontakten die Infektionseffizienz zu steigern (Abb.17B unten; siehe Abschnitt 1.1). Als Zeitpunkte der Infektion wurden 2, 10 und 30min (bei 37°C) ausgewählt. Zuvor diente ein Eisschritt als Synchronisation der Virusinternalisierung, da die Viren auf Eis zwar an die Zelle binden, aber nicht eindringen können. Des Weiteren sollten möglichst hohe Virusmengen für die Experimente eingesetzt

werden (bis maximal MOI1500), um eine hohe Anzahl von Viruspartikeln pro Zelle zu erreichen. Die drastische Erhöhung der Virusmenge führte auch zu einer Beschleunigung des Infektionsverlaufs, wie anhand der viralen Genexpression in HaCaT-Zellen beobachtet wurde (Abb.17A). Zur Überprüfung der hohen Infektionseffizienz bei den elektronenmikroskopischen Präparaten wurden parallel zu jedem Ansatz auch Immunfluoreszenz-Färbungen 2h p.i. ausgewertet (Abb.17).

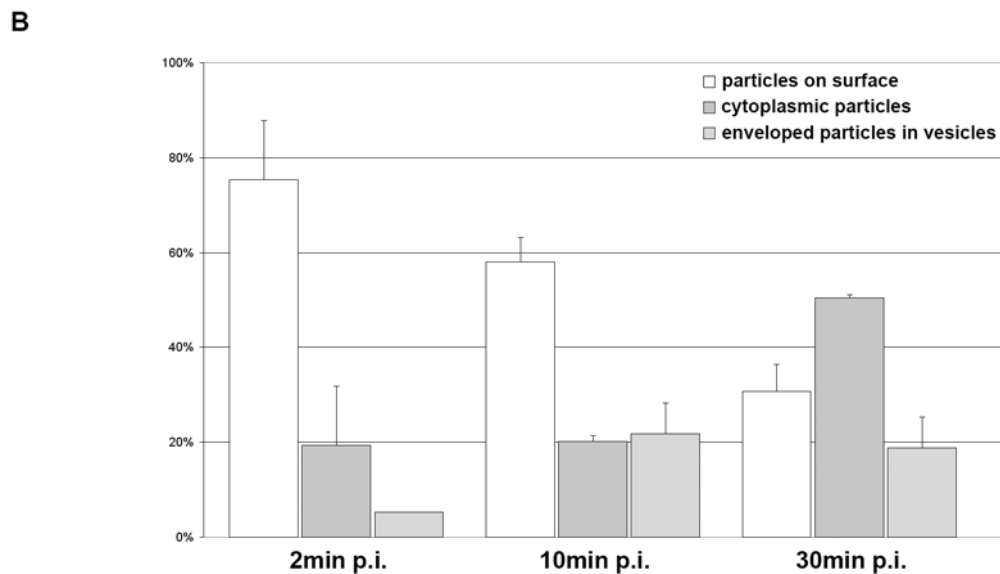
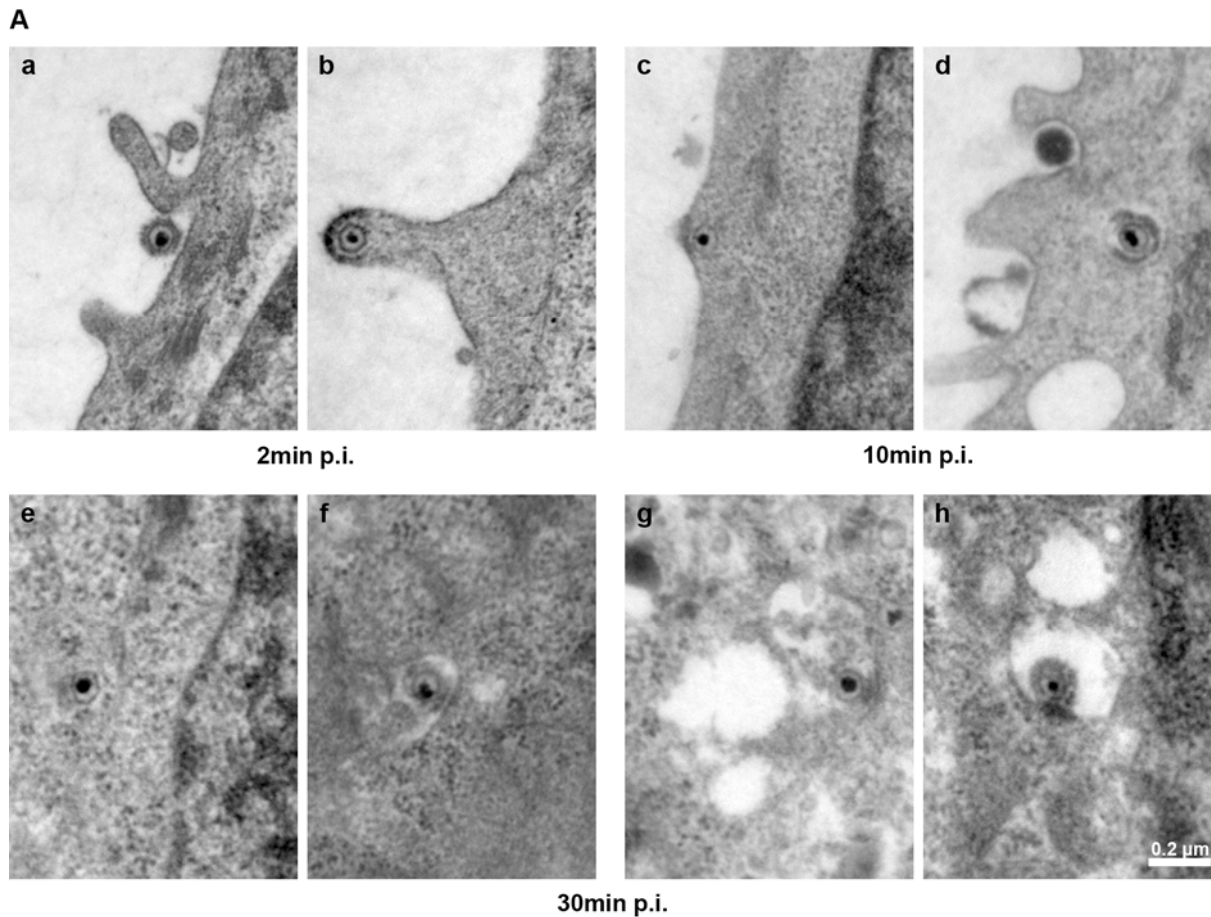


**Abb.17 Kontrolle der HSV-1 Infektionseffizienz für EM-Präparate in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinozyten**  
Konfluente HaCaT-Zellen in D-MEM (A, B oben) oder humane primäre Keratinozyten (B unten) in Calcium-reduziertem Keratinozyten-Medium wurden 2h mit unterschiedlicher Virusmenge (MOI200 oder MOI1500) (A) oder mit gleicher Virusmenge (MOI1500) (B) behandelt, fixiert und gegen ICP0 mit dem monoklonalen Antikörper mab11060 und dem sekundären AF488 anti-Maus (grün) gefärbt. F-Aktin wurde mittels Phalloidin-gekoppeltem TRITC (rot) visualisiert. Es sind Einzelfärbungen von Epifluoreszenz-Aufnahmen (A, B oben) oder konfokale Projektionen (B unten) gezeigt. Der Maßstab beträgt 80µm.

### 2.1.1 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in HaCaT-Zellen

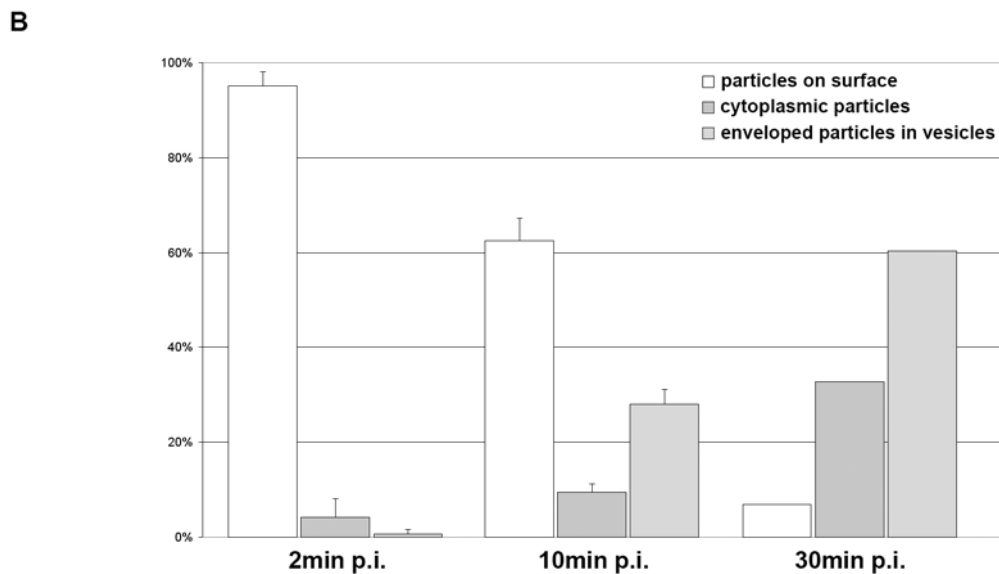
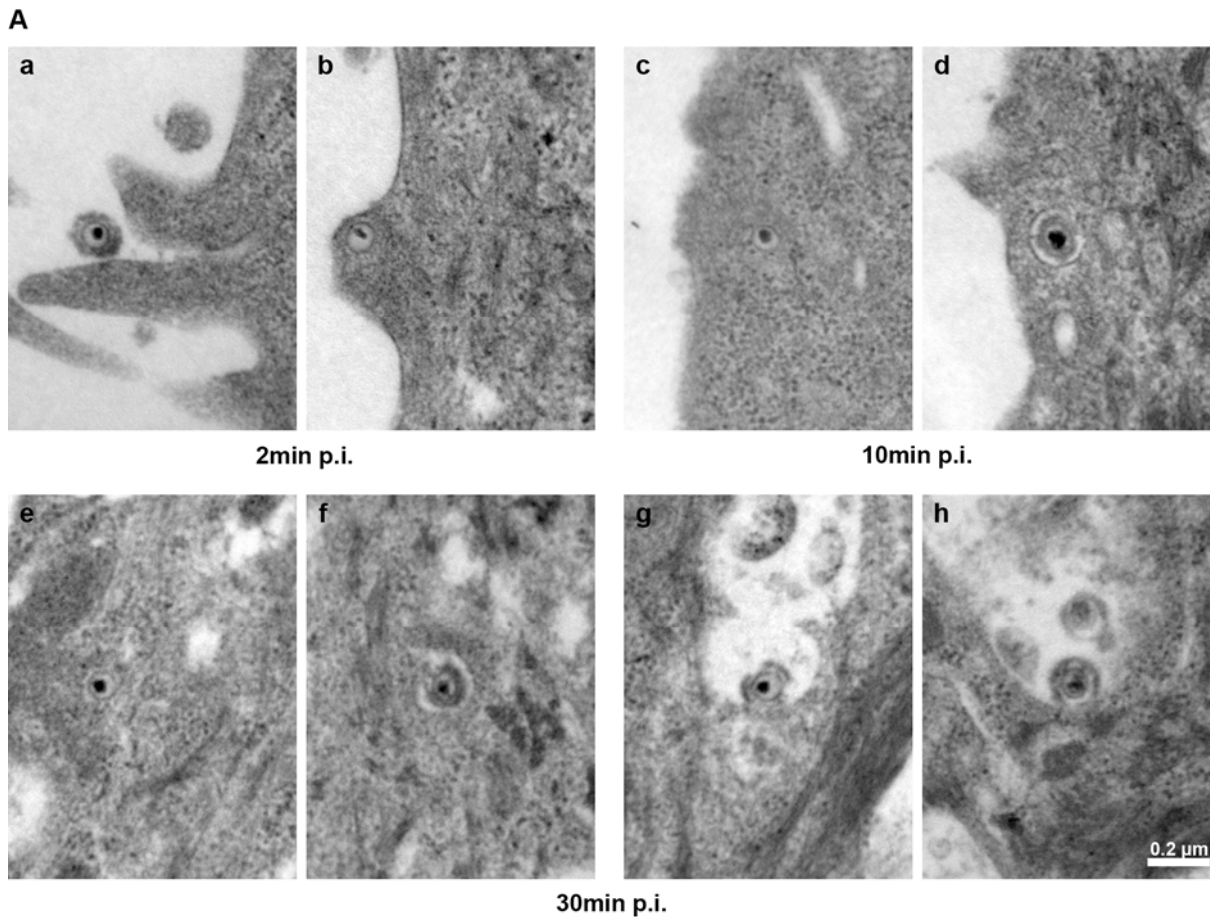
In HaCaT-Zellen wurden bei den verschiedenen Infektionszeitpunkten (2, 10 und 30min p.i.) sowohl Kapside im Zytoplasma als auch umhüllte Viruspartikel in Vesikeln gefunden. Im Detail war zu beobachten (Abb.18B), dass sich 2min p.i. 75% der Viruspartikel außerhalb an der Zelloberfläche befanden (Abb.18Aa), 19% lagen als Kapside im Zytoplasma vor (Abb.18Ab) und 5% waren in Vesikeln wiederzufinden. Interessanterweise war eine vermehrte Anzahl von Kapsiden im Zytoplasma von Ausläufern der Zelle zu beobachten (Abb.18Ab). Nach 10min p.i. waren noch 58% der Viruspartikel außerhalb der Zelle, 20% befanden sich als Kapside im Zytoplasma (Abb.18Ac) und 22% der Viruspartikel lokalisierten in Vesikeln (Abb.18Ad). 30min p.i. lag der größte Teil der Viruspartikel als Kapside im Zytoplasma vor (51%; Abb.18Ae); 19% der Viruspartikel befanden sich in Vesikeln (Abb.18Af) und 31% waren außerhalb an der Zelloberfläche. Zusätzlich wurden 30min p.i. auch Viruspartikel in größeren Vesikeln oder Kompartimenten der Zellen gefunden (Abb.18Ag und Ah), die meist auch noch anderes Material enthielten. Hierbei konnte es sich um Verdauungsvesikel der Zelle (eventuell Lysosomen) handeln.

Zusammengefasst wurden in HaCaT-Zellen sowohl Kapside im Zytoplasma als auch Viruspartikel in Vesikeln beobachtet, die 10min p.i. zu etwa gleichen Anteilen vorlagen.



**Abb.18 Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in HaCaT-Zellen**

(A) Konfluente HaCaT-Zellen wurden 1h auf Eis und nachfolgend 2, 10 oder 30min auf 37°C mit HSV-1 infiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, pelletiert und zu Präparaten für die Elektronenmikroskopie verarbeitet. Hauchdünne Schnitte der Zellen wurden anschließend analysiert. Der 2min p.i. Wert stellt Versuch 08/17 (MOI200) (Aa und Ab), der 10min p.i. Wert Versuch 09/17 (MOI1500) (Ac und Ad) und der 30min p.i. Wert 09/18O (MOI1500) (Ae – Ah) dar. Der Maßstab beträgt 0,2 $\mu\text{m}$ . (B) Die Anzahl der Viruspartikel wurde bestimmt und je nach Lokalisierung entweder auf der Zelloberfläche (particles on surface), als Kapside im Zytoplasma (cytoplasmic particles) oder als Viruspartikel in Vesikeln (enveloped particles in vesicles) 2, 10 oder 30min p.i. kategorisiert. Die Mittelung und die entsprechende Standardabweichung zweier voneinander unabhängiger Experimente sind gezeigt (~30 Zellen mit mindestens einem Viruspartikel ausgezählt).



**Abb.19 Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in humane primäre Keratinozyten**

(A) Konfluente primäre Keratinozyten in Calcium-reduziertem Keratinozyten-Medium wurden 1h auf Eis und nachfolgend 2, 10 oder 30min auf 37°C mit HSV-1 infiziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, pelletiert und zu Präparaten für die Elektronenmikroskopie verarbeitet. Hauchdünne Schnitte der Zellen wurden anschließend analysiert. Der 2min p.i. Wert stellt Versuch 09/03 (MOI1500) (Aa und Ab), der 10min p.i. Wert Versuch 09/04 (MOI1500) (Ac und Ad) und der 30min p.i. Wert 09/22 (MOI1500) (Ae – Ah) dar. Der Maßstab beträgt 0,2 $\mu\text{m}$ . (B) Die Anzahl der Viruspartikel wurde bestimmt und je nach Lokalisierung entweder auf der Zelloberfläche (particles on surface), als Kapside im Zytoplasma (cytoplasmic particles) oder als Viruspartikel in Vesikeln (enveloped particles in vesicles) 2, 10 oder 30min p.i. kategorisiert. Die Mittelung und die entsprechende Standardabweichung zweier voneinander unabhängiger Experimente sind gezeigt (~30 Zellen mit mindestens einem Viruspartikel ausgezählt).

### **2.1.2 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in humane primäre Keratinozyten**

In primären Keratinozyten wurden ebenfalls Kapside im Zytoplasma als auch Viruspartikel in Vesikeln nachgewiesen. Interessanterweise unterschieden sich deren Verhältnisse im Vergleich zu HaCaT-Zellen zu allen Infektionszeitpunkten (Abb.19B). Fast 95% der Viruspartikel waren 2min p.i. außerhalb an der Zelloberfläche (Abb.19Aa). Nur 4% der Viruspartikel lagen als Kapside im Zytoplasma vor (Abb.19Ab) und nur 1% befand sich in Vesikeln. Dagegen waren 10min p.i. bereits 28% der Viruspartikel in Vesikeln (Abb.19Ad), 9% als Kapside im Zytoplasma (Abb.19Ac) und 63% außerhalb der Zelle. Nach 30min p.i. lagen 33% der Viruspartikel als Kapside vor (Abb.19Ae), 60% waren in Vesikeln (Abb.19Af) und noch 7% befanden sich außerhalb der Zelle. Wie auch in HaCaT-Zellen zeigten sich in den primären Keratinozyten 30min p.i. ebenfalls größere Vesikel/Kompartimente mit Viruspartikeln und anderem Material (Abb.19Ag und Ah).

Die Ergebnisse zeigen, dass auch in den humanen primären Keratinozyten sowohl Kapside im Zytoplasma als auch Viruspartikel in Vesikeln vorlagen. Dennoch unterschied sich das Verhältnis beider Formen zu den verschiedenen Infektionszeitpunkten von den HaCaT-Zellen. Die Anwesenheit der Kapside im Zytoplasma deutet auf eine Internalisierung via Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran hin, während die Viruspartikel in Vesikeln für einen endozytotischen Mechanismus sprechen. Eventuell ist die endozytotische Aufnahme von HSV-1 ausgeprägter in primären Keratinozyten als in HaCaT-Zellen.

### **2.1.3 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in gehungerte humane primäre Keratinozyten**

Wegen der erhöhten Anzahl von Viruspartikeln in Vesikeln der primären Keratinozyten, stellte sich die Frage, ob eine Hungerperiode der primären Keratinozyten Einfluss auf die Internalisierung hat.

Hierzu wurde eine Versuchsreihe von gehungerten primären Keratinozyten 2 und 10min p.i. durchgeführt (siehe Abschnitt 1.2.2). Die Zellen wurden 2 Tage in FCS-freiem Calcium-reduzierten Keratinozyten-Medium gehalten und dann für eine elektronenmikroskopische Analyse präpariert. Es wurde beobachtet, dass sich die gehungerten Zellen im Vergleich zu den nicht-gehungerten Zellen (siehe Abschnitt 2.1.2) 2min p.i. in Hinblick auf die Internalisierung sehr ähnlich verhielten (97%/0%/3% (Virus an der Oberfläche/Kapside im Zytoplasma/Viruspartikel in Vesikeln) zu 95%/4%/1%). Interessanterweise wurde 10min p.i. in den gehungerten Zellen eine erhöhte Anzahl von Viruspartikeln in Vesikeln festgestellt. Ein Anstieg der Kapside im Zytoplasma war jedoch nicht zu verzeichnen (40%/10%/50% zu 63%/9%/28%).

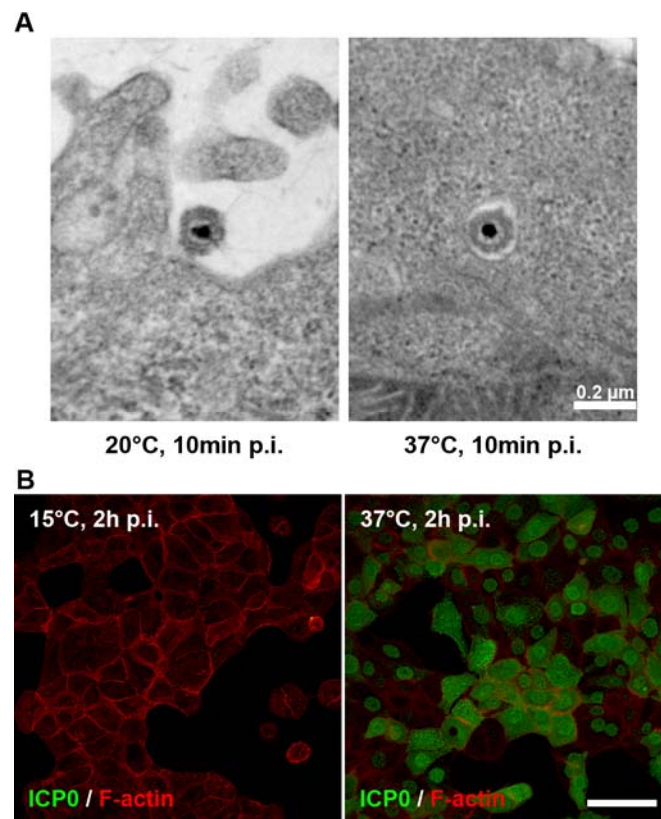
Daher kann geschlossen werden, dass in humanen primären Keratinozyten wahrscheinlich die endozytotische Aufnahme durch eine Hungerperiode gesteigert werden kann.

### **2.1.4 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in HaCaT-Zellen und humane primäre Keratinozyten bei verschiedenen Umgebungstemperaturen**

Es wurden sowohl Kapside im Zytoplasma als auch Viruspartikel in Vesikeln nachgewiesen. Wie schon erwähnt, könnte es sich hierbei um direkte Fusion und einen endozytotischen Mechanismus handeln. Da die bisherigen EM-Studien keine Aussage darüber machten, ob die Kapside und/oder die Viruspartikel in Vesikeln zu einer produktiven Infektion führen, wurden Infektionsstudien bei verschiedenen Umgebungstemperaturen durchgeführt. Nach Reduktion der Umgebungstemperatur



war zu erwarten, dass sich endozytotische Vorgänge in der Zelle verlangsamen, die direkte Fusion aber unbeeinflusst blieb (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Höning). Dementsprechend könnte also eine Temperaturreduktion den Aufnahmeprozess von HSV-1 mehr in Richtung der potentiellen direkten Fusion verschieben.



**Abb.20 Auswirkung der Umgebungstemperatur auf die HSV-1 Internalisierung in humane primäre Keratinozyten (Elektronenmikroskopie) und auf die frühe virale Genexpression in HaCaT-Zellen (konfokale Mikroskopie)**

(A) Gehungerte konfluente primäre Keratinozyten in Calcium-reduziertem Keratinozyten-Medium wurden 1h auf Eis und nachfolgend 10min auf 20°C oder 37°C mit HSV-1 infiziert (MOI1500). Anschließend wurden die Zellen fixiert, pelletiert und zu Präparaten für die Elektronenmikroskopie verarbeitet. Hauchdünne Schnitte der Zellen wurden anschließend analysiert. Die 10min p.i. Werte sind aus Versuch 09/27 und 09/28 entnommen. Der Maßstab beträgt 0,2µm. (B) Subkonfluente HaCaT-Zellen wurden 2h entweder bei 15°C oder 37°C mit HSV-1 infiziert (MOI50), fixiert und gegen ICP0 mit dem monoklonalen Antikörper mab11060 und dem sekundären AF488 anti-Maus (grün) gefärbt. F-Aktin wurde mittels Phalloidin-gekoppeltem TRITC (rot) visualisiert. Es sind Überlagerungen konfokaler Projektionen gezeigt. Der Maßstab beträgt 40µm.

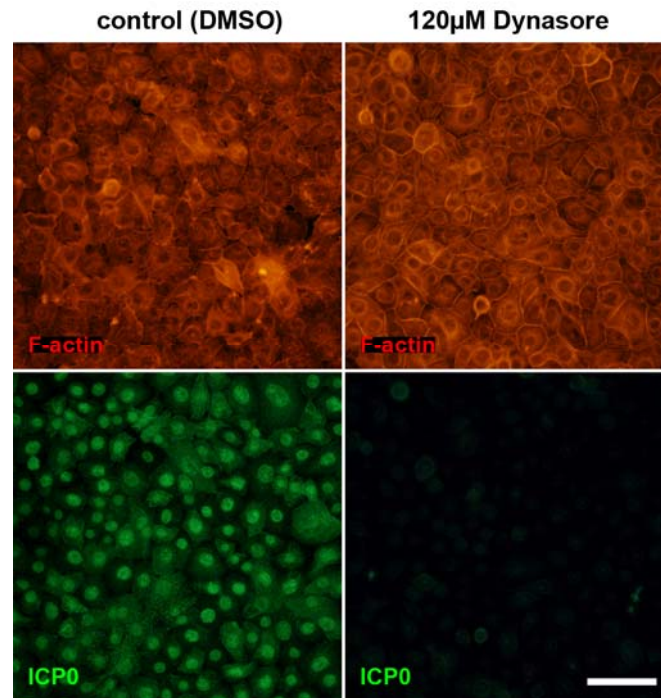
Es wurde ein elektronenmikroskopischer Versuch mit primären Keratinozyten durchgeführt, bei dem die HSV-1 Internalisierung 10min p.i. bei 20°C untersucht wurde (Abb.20A). Erstaunlicherweise zeigte sich nach Verringerung der Temperatur, dass sich noch wenige Viruspartikel in Vesikeln, aber keine Kapside im Zytoplasma befanden.

Um zu testen ob eine Temperaturverringerung grundsätzlich zu einer produktiven Infektion führte, wurden HaCaT-Zellen für 2h bei 15°C infiziert (Abb.20B). Hierbei zeigte sich, dass keine produktive Infektion mehr nachweisbar war, im Gegensatz dazu war die Kontrolle stark infiziert. Ähnliche Resultate wurden auch in anderen Zelllinien bei 15°C und 20°C beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst wurde durch die Reduktion der Temperatur kein Hinweis erzielt, welcher Internalisierungsweg zu einer produktiven Infektion führt.

## 2.2 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung durch Inhibitorstudien in humane primäre Keratinozyten und HaCaT-Zellen

Um der Frage, welcher potentielle Internalisierungsweg zu einer produktiven Infektion führt, weiter nachzugehen, wurden Inhibitorstudien eingeleitet.



**Abb.21 Kontrolle des inhibierenden Dynasore-Effekts und der HSV-1 Infektionseffizienz für EM-Präparate in humanen primären Keratinozyten**

Konfluente humane primäre Keratinozyten in Calcium-reduziertem Keratinozyten-Medium wurden für 30min auf 37°C und 15min auf 4°C mit Dynasore (120µM, gelöst in DMSO) oder der entsprechenden DMSO-Menge ohne Dynasore (Kontrolle) behandelt. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart des Inhibitors 1h auf Eis und nachfolgend 2h auf 37°C mit HSV-1 infiziert (MOI1500), fixiert und gegen ICP0 mit dem monoklonalen Antikörper mab11060 und dem sekundären AF488 anti-Maus (grün) gefärbt. F-Aktin wurde mittels Phalloidin-gekoppeltem TRITC (rot) visualisiert. Es sind Einzelfärbungen von Epifluoreszenz-Aufnahmen gezeigt. Der Maßstab beträgt 80µm.

### 2.2.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung nach Dynasore-Behandlung

Zunächst sollte überprüft werden, ob die Internalisierung von HSV-1 in humane Keratinozyten Dynamin2-abhängig war. Dazu sollte der Inhibitor Dynasore verwendet werden, der spezifisch die GTPase-Aktivität von Dynamin2 inhibiert und damit das Abtrennen sich bildender Vesikelstrukturen in die Zelle blockiert (Macia et al., 2006; Kirchhausen et al., 2008). Es ist gezeigt, dass Dynasore die Genexpression von ICP0 in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinozyten konzentrationsabhängig hemmt (Diplomarbeit, Elena Rahn, 2009). Außerdem kann dieser inhibierende Effekt in Vero-B4- und HeLa-Zellen, aber nicht in hippocampalen Neuronen, beobachtet werden (Diplomarbeit, Elena Rahn, 2009).

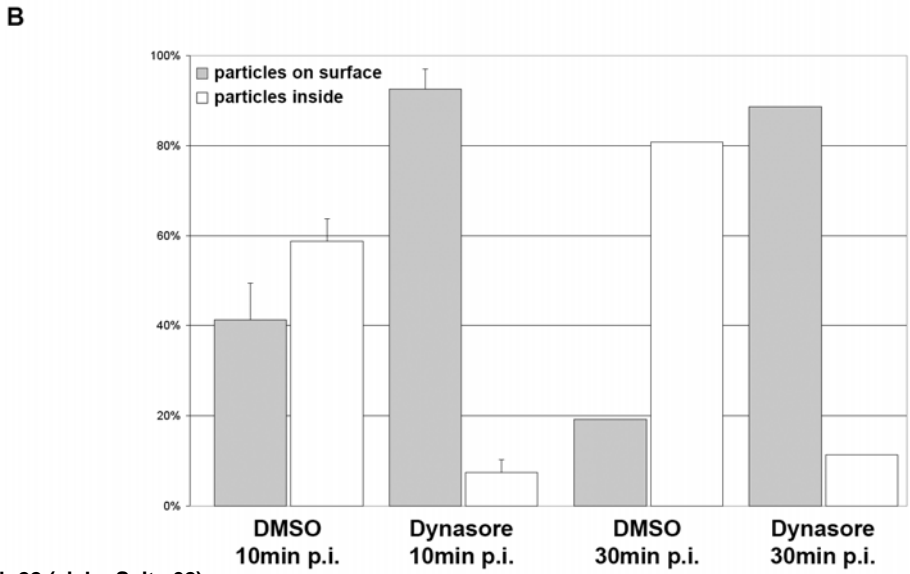
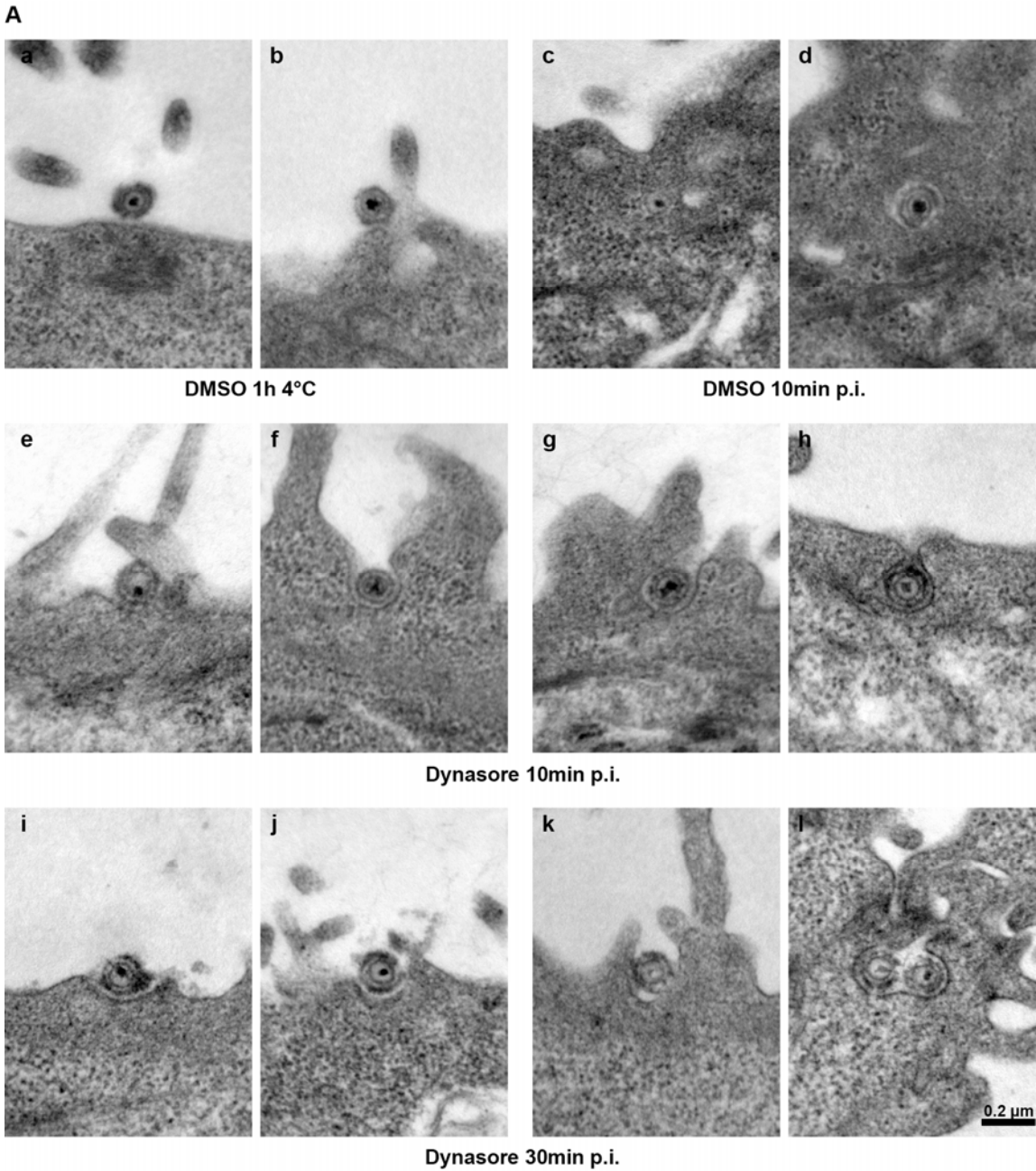


Abb.22 (siehe Seite 62)



**Abb.22 Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in Dynasore-behandelte humane primäre Keratinozyten (Seite 61)**

(A) Konfluente primäre Keratinozyten in Calcium-reduziertem Keratinozyten-Medium wurden für 30min auf 37°C und 15min auf 4°C mit Dynasore (120µM, gelöst in DMSO) oder der entsprechenden DMSO-Menge ohne Dynasore (Kontrolle) behandelt. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart des Inhibitors 1h auf Eis und nachfolgend 10 oder 30min auf 37°C mit HSV-1 infiziert (MOI1500), fixiert, pelletiert und zu Präparaten für die Elektronenmikroskopie verarbeitet. Hauchdünne Schnitte der Zellen wurden anschließend analysiert. Die DMSO-Kontrolle 1h bei 4°C stellt Versuch 09/56 (Aa und Ab) und der 10min p.i. Wert Versuch 09/53 (Ac und Ad) dar. Die Dynasore-behandelten Zellen 10min p.i. (Ae – Ah) oder 30min p.i. (Ai – Al) sind aus Versuch 09/52 bzw. 09/54 entnommen. Bei den gezeigten Bildern (A) wurde Dynasore von Kirchhausen verwendet. Der Maßstab beträgt 0,2µm. (B) Die Anzahl der Viruspartikel außerhalb (particles on surface) oder innerhalb (particles inside) der Zelle wurde nach Dynasore-Behandlung oder in den DMSO-Kontrollen bestimmt und graphisch dargestellt. Die Mittelung und die entsprechende Standardabweichung zweier voneinander unabhängiger Experimente für den 10min p.i. Wert und ein Experiment für den 30min p.i. Wert sind gezeigt (~30 Zellen mit mindestens einem Viruspartikel ausgezählt).

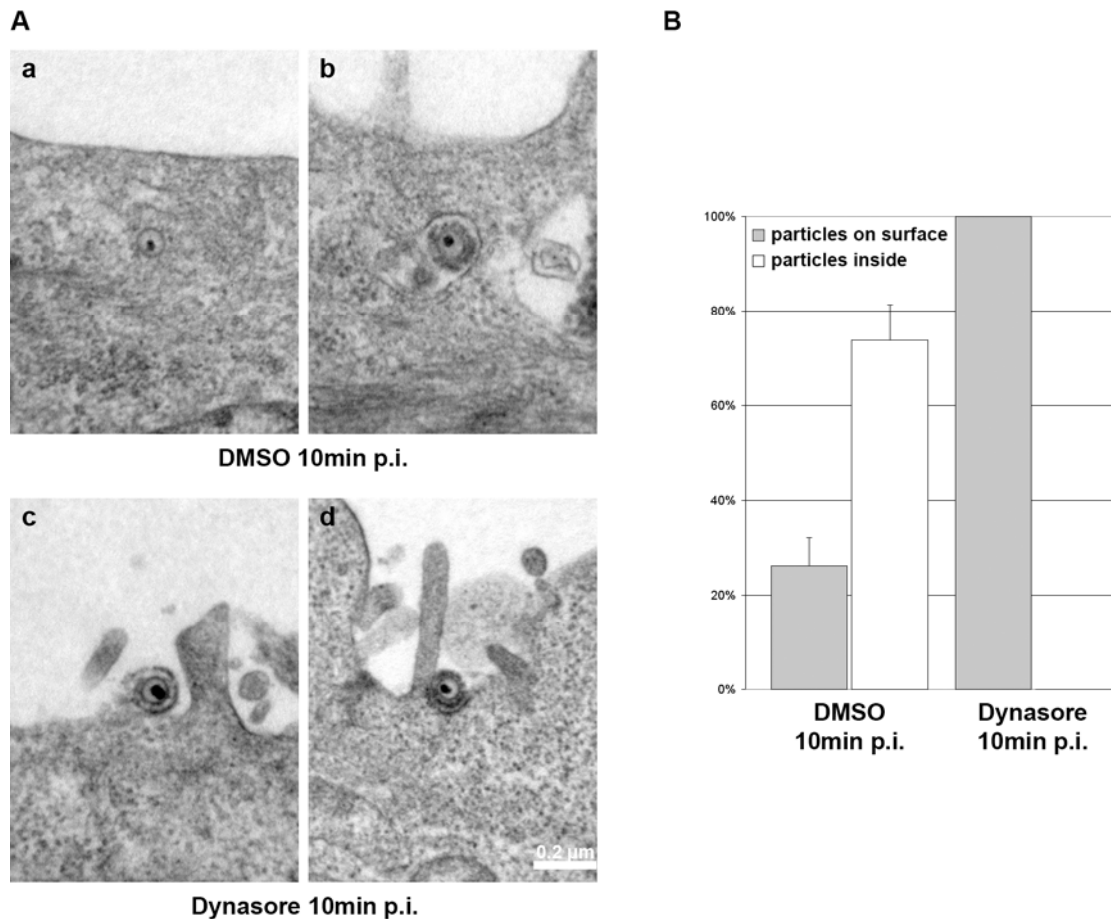
Um zu zeigen, welcher Schritt während des Viruseintritts durch Dynasore blockiert wird, wurden humane primäre Keratinozyten und HaCaT-Zellen elektronenmikroskopisch untersucht. Zu jedem elektronenmikroskopischen Präparat wurden auch hier parallel Immunfluoreszenz-Färbungen 2h p.i. als Kontrolle für den Effekt von Dynasore und der Infektionseffizienz durchgeführt (Abb.21).

**2.2.1.1 Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in humane primäre Keratinozyten und HaCaT-Zellen nach Dynasore-Behandlung**

Zunächst wurde in Vorexperimenten getestet, ob DMSO, in dem Dynasore gelöst wurde, grundsätzlich einen Einfluss auf die Internalisierung von HSV-1 in humanen Keratinozyten hat. In humanen primären Keratinozyten zeigte sich 10min p.i., dass die DMSO-Behandlung zu einer Verdopplung der Kapside im Zytoplasma und der Viruspartikel in Vesikeln führte (Daten nicht gezeigt). In HaCaT-Zellen war ebenfalls 10min p.i. eine Verdopplung der Kapside im Zytoplasma nach DMSO-Behandlung festzustellen, wobei nur eine leichte Erhöhung der Viruspartikel in Vesikeln zu verzeichnen war (Daten nicht gezeigt). Es konnte also ein Einfluss von DMSO auf die Internalisierung festgestellt werden. Da die Kontrolle zu den Dynasore-Experimenten mit der gleichen Menge DMSO behandelt wurde, waren innerhalb eines Experimentes gleiche Bedingungen geschaffen.

Die Dynasore-Experimente in humanen primären Keratinozyten zeigten, dass nach Dynasore-Behandlung der Großteil der Viruspartikel 10 und 30min p.i. im Gegensatz zur DMSO-Kontrolle nicht internalisierte. Im Detail wurde beobachtet, dass 93% der Viruspartikel 10min p.i. und 89% 30min p.i. in den Dynasore-behandelten primären Keratinozyten nicht in die Zellen aufgenommen wurden (Abb.22Ae – Al und B). Die Viruspartikel waren von leichten Einbuchtungen (Abb.22Ae und Ai) über stärkere Einstülpungen (Abb.22Af, Ag, Aj und Ak) bis hin zu vesikelförmigen Invaginationen (Abb.22Ah und Al) an der Plasmamembran anzutreffen. In der DMSO-Kontrolle dagegen waren 59% 10min p.i. (Abb.22Ac und Ad) und 81% 30min p.i. der Viruspartikel internalisiert (Abb.22B).

Zu beobachten war außerdem, dass sich die Viruspartikel an der Zelloberfläche der DMSO-Kontrolle auf Eis (nur Bindung) von den Viruspartikeln nach Dynasore-Behandlung unterschieden. In der DMSO-Kontrolle (Abb.22Aa und Ab) wiesen die Viruspartikel noch einen geringen Abstand zur Zelloberfläche auf oder befanden sich an kurzen Ausläufern der Zelle (Abb.22Ab). Interessanterweise wurden fast keine Viruspartikel in Einbuchtungen der Plasmamembran gefunden. In Dynasore-behandelten Zellen dagegen war der Großteil der Viruspartikel meist in leichten Einbuchtungen der Plasmamembran zu beobachten (Abb.22Ae und Ai).



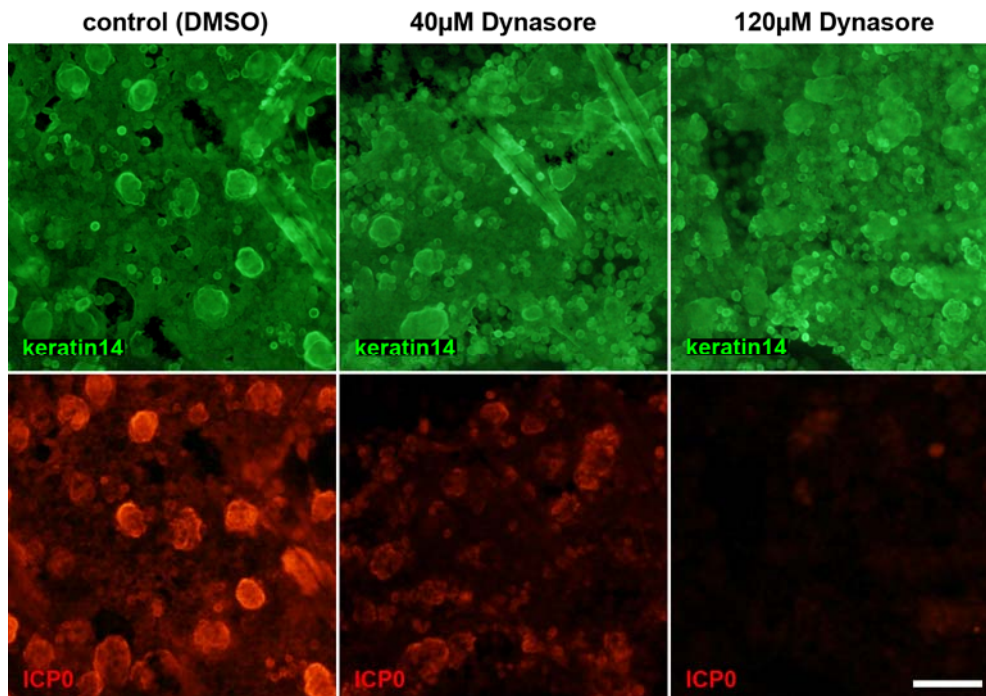
**Abb.23 Elektronenmikroskopische Untersuchung der HSV-1 Internalisierung in Dynasore-behandelte HaCaT-Zellen**

(A) Konfluente HaCaT-Zellen wurden für 30min auf 37°C und 15min auf 4°C mit Dynasore behandelt (80µM bei Ad oder 120µM bei Ac, gelöst in DMSO). Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart des Inhibitors 1h auf Eis und nachfolgend 10 oder 30min auf 37°C mit HSV-1 infiziert (MOI1500 bei Aa, Ab und Ad oder MOI500 bei Ac), fixiert, pelletiert und zu Präparaten für die Elektronenmikroskopie verarbeitet. Hauchdünne Schnitte der Zellen wurden anschließend analysiert. Die DMSO-Kontrolle 10min p.i. stellt Versuch 09/57 (Aa und Ab) dar. Die Dynasore-behandelten Zellen 10min p.i. (Ac und Ad) sind aus Versuch 10/13 (Ac) oder Versuch 09/58 (Ad) entnommen. Bei den gezeigten Bildern (A) wurde Dynasore von Tocris verwendet. Der Maßstab beträgt 0,2µm. (B) Die Anzahl der Viruspartikel außerhalb (particles on surface) oder innerhalb (particles inside) der Zelle wurde nach Dynasore-Behandlung oder in den DMSO-Kontrollen bestimmt und graphisch dargestellt. Die Mittelung und die entsprechende Standardabweichung zweier voneinander unabhängiger Experimente sind gezeigt (~30 Zellen mit mindestens einem Viruspartikel ausgezählt).

In HaCaT-Zellen wurden ähnlich wie in den primären Keratinozyten in Gegenwart des Inhibitors 10min p.i. keine Viruspartikel mehr in der Zelle beobachtet (Abb.23Ac, Ad und B). Im Gegensatz zu den primären Keratinozyten zeigten sich Viruspartikel nur in leichten Einbuchtungen der Plasmamembran (Abb.23Ac und Ad). Dies mag mit der verminderten Anzahl von Viruspartikeln pro Zelle zusammenhängen (13% der untersuchten Zellen hatten 10min p.i. mindestens ein Viruspartikel), welche bei den primären Keratinozyten deutlich höher lag (36% beim 10min p.i. Wert). Außerdem ist zu bemerken, dass viele Viruspartikel bei den HaCaT-Zellen an kleineren Ausläufern der Zellen klebten und damit nicht in Einbuchtungen der Zelloberfläche zu finden waren. In der DMSO-Kontrolle dagegen zeichnete sich eine 74%ige Internalisierung von Viruspartikeln ab (Abb.23Aa, Ab und B). Die EM-Studien zeigen in Dynasore-behandelten humanen primären Keratinozyten und HaCaT-Zellen fast keine Virusinternalisierung mehr. Im Gegensatz dazu waren Viruspartikel in Invaginationen der Plasmamembran zu finden. Somit blockiert Dynasore möglicherweise die potentiellen Internalisierungsvorgänge. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Internalisierung von HSV-1 Dynamin2-abhängig ist.

### 2.2.1.2 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in Dynasore-behandelter muriner Epidermis

Da in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinozyten eine Blockierung der HSV-1 Internalisierung durch den Inhibitor Dynasore beobachtet wurde, stellte sich die Frage, ob Dynasore auch in muriner Epidermis einen Effekt auf die HSV-1 Infektion hat. Hierzu wurde murine Epidermis *ex vivo* nach Dispasell-Behandlung (siehe Abschnitt 1.5.1) in Gegenwart des Inhibitors für 3h infiziert. Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 120µM im Gegensatz zu der Kontrolle keine Infektion visualisiert werden konnte (Abb.24). Zusätzlich wurde auch eine geringere Konzentration von Dynasore verwendet (40µM), die nicht zu einer vollständigen Inhibition der Infektion führte (Abb.24). Die ICP0-Expression wurde hier besonders in den sich-entwickelnden Haarfollikeln, bei denen die Zellkonzentration besonders hoch war, und schwächer in der interfollikulären Epidermis beobachtet. Zusammenfassend zeigte sich in den basalen Keratinozyten von muriner Epidermis *ex vivo* eine konzentrationsabhängige Inhibition der frühen HSV-1 Infektion nach Dynasore-Behandlung.



**Abb.24 Einfluss von Dynasore auf die frühe HSV-1 Infektion in muriner Epidermis (whole mount)**

Nach Separierung der Neugeborenenepidermis durch Dispasell (5mg/ml, 30min bei 37°C) und Dynasore-Behandlung von 40µM oder 120µM (gelöst in DMSO) und der entsprechenden DMSO-Kontrolle für 1h, wurde die Epidermis in Gegenwart des Inhibitors für 3h mit HSV-1 infiziert (MOI100), fixiert und gegen ICP0 mit dem monoklonalen Antikörper mab11060 und dem sekundären AF555 anti-Maus (rot) gefärbt. Zusätzlich wurde Keratin14 angefärbt (AF64, polyklonal, grün). Es sind Einzelfärbungen von Epifluoreszenz-Aufnahmen gezeigt. Der Maßstab beträgt 80µm.

### 2.2.2 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in HaCaT-Zellen nach Einwirkung von Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) und Dextrose

Da die EM-Studien auf eine Internalisierung sowohl via Fusion mit der Plasmamembran als auch auf einen endozytotischen Weg hindeuten, sollten Inhibitorstudien durchgeführt werden, um die Bedeutung der endozytotischen Aufnahme für die Infektiosität zu analysieren.

### **2.2.2.1 Der Einfluss von Ammoniumchlorid auf die frühe HSV-1 Infektion**

Zunächst wurde Ammoniumchlorid verwendet, welches als schwache Base die Ansäuerung von Endosomen verhindern kann. Hierzu wurden Infektionsstudien in HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ammoniumchlorid (0, 25, 50 und 75mM) durchgeführt. Hierbei wurde eine konzentrationsabhängige Reduktion der Infizierbarkeit beobachtet. Ammoniumchlorid führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme infizierter Zellen von 87% (0mM, Kontrolle) auf 47% (75mM) (Abb.25A). Interessanterweise zeigte auch die Untersuchung der ICP0-Lokalisierung (siehe Abschnitt 1.1), dass der Infektionsverlauf verzögert ablief. In der Kontrolle befand sich ICP0 bei 34% der Zellen im Zellkern und bei 66% im Zytoplasma. Im Gegensatz dazu lag bei 75mM Ammoniumchlorid ICP0 in 75% der Zellen im Zellkern und in 25% der Zellen im Zytoplasma vor (Abb.25A). Die Verwendung von 100mM Ammoniumchlorid blockierte dagegen die HSV-1 Infektion fast vollständig (Daten nicht gezeigt).

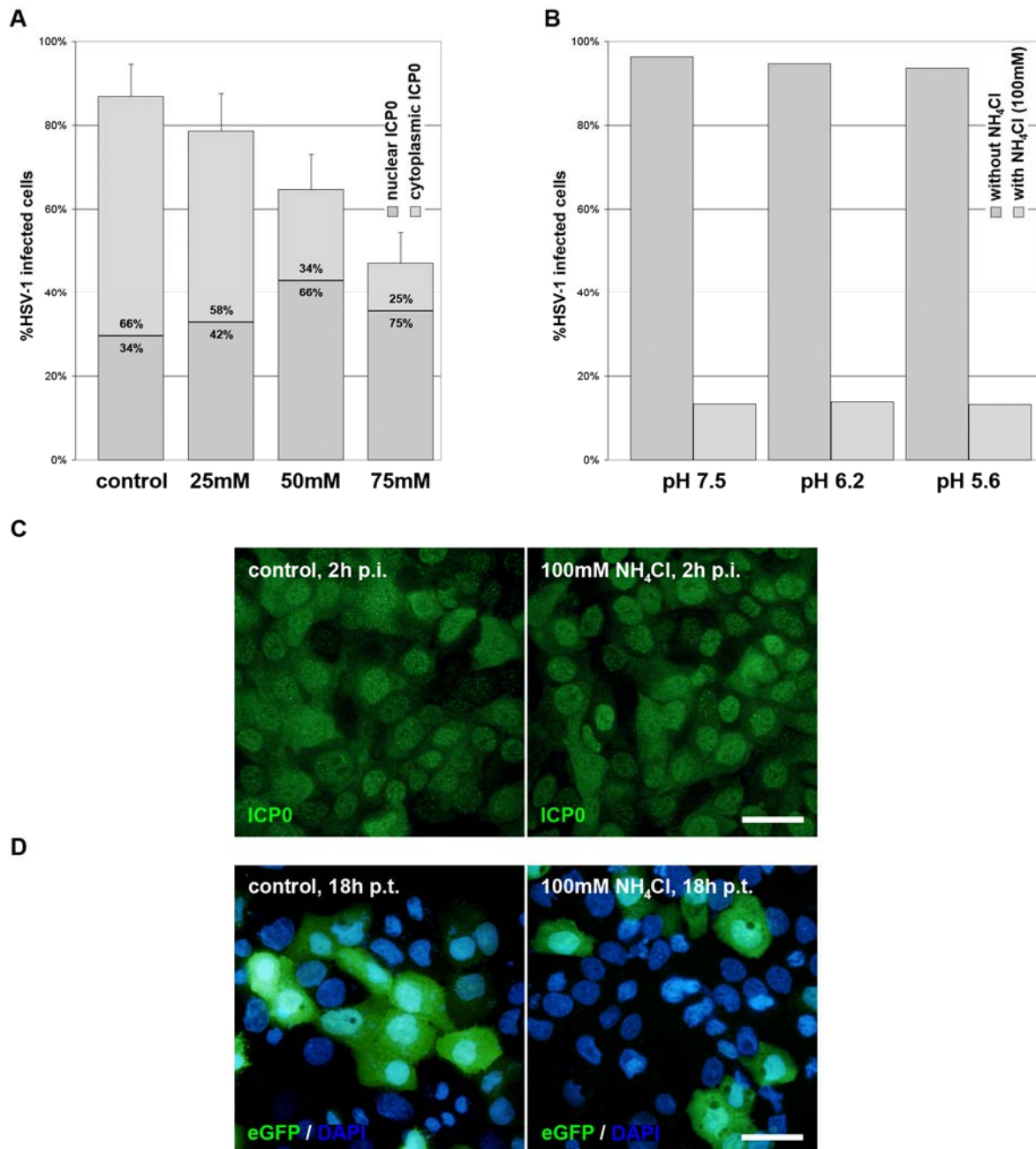
Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Ammoniumchlorid die Gesamtzahl infizierter Zellen konzentrationsabhängig reduzierte und den Verlauf der Infektion verlangsamte. Daher kann geschlossen werden, dass der pH-Wert der Endosomen für eine erfolgreiche HSV-1 Infektion von Bedeutung ist.

#### **2.2.2.1.1 Untersuchung von Ammoniumchlorid-behandelter HaCaT-Zellen auf potentielle Sekundäreffekte**

In HaCaT-Zellen wurde eine konzentrationsabhängige Reduktion der Infizierbarkeit durch Ammoniumchlorid festgestellt. Bei einer Konzentration von 100mM war fast keine Infektion mehr nachweisbar. Interessanterweise veränderte sich die Morphologie der Zellkerne ab einer Ammoniumchlorid-Konzentration von 75mM. Es zeigte sich, dass die Zellkerne kantiger wurden. Da der inhibierende Effekt von Ammoniumchlorid nicht direkt an den eintretenden Viruspartikeln, sondern an der viralen Genexpression gemessen wurde, war es entscheidend, dass die Veränderung der Zellkern-Morphologie keinen Sekundäreffekt auf die virale Genexpression ausübte.

Aus diesem Grund wurde zunächst getestet, ob der Effekt von Ammoniumchlorid reversibel war (Abb.25C). Dazu wurden HaCaT-Zellen 2,5h mit 0 oder 100mM Ammoniumchlorid inkubiert und anschließend nach mehrmaligen Waschvorgängen für 2h infiziert. Es wurde beobachtet, dass sich einerseits die Zellkern-Morphologie wieder normalisierte und andererseits die ICP0-Expression ähnlich stark zu der Kontrolle verhielt. Die Auswirkung der schwachen Base Ammoniumchlorid war also reversibel und schädigte die Zellkerne nicht auf Dauer.

Um die Funktion des Zellkerns nach Ammoniumchlorid-Behandlung zu überprüfen, wurde eine transiente Überexpression in HaCaT-Zellen bei 0, 50 und 100mM Ammoniumchlorid initiiert. Dazu wurden HaCaT-Zellen in Gegenwart der entsprechenden Ammoniumchlorid-Konzentration mit einem Reporterkonstrukt (eGFP) transfiziert. Es zeigte sich, dass trotz Anwesenheit von Ammoniumchlorid eGFP exprimiert wurde. Die Transfektionseffizienzen waren hierbei 43% bei 0mM, 39% bei 50mM und 32% bei 100mM.



**Abb.25 Einfluss von Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) auf die frühe virale Genexpression von HSV-1**

(A) Subkonfluente HaCaT-Zellen wurden 30min mit verschiedenen NH<sub>4</sub>Cl-Konzentrationen (0, 25, 50 und 75mM, gelöst in Wasser) bei 37°C inkubiert, anschließend in Gegenwart der entsprechenden NH<sub>4</sub>Cl-Konzentration für 2h mit HSV-1 infiziert (MOI20) und anhand der frühen viralen Genexpression von ICP0 analysiert. Die Anzahl infizierter Zellen der Gesamtzellzahl wurde aus der Mittelung dreier voneinander unabhängiger Experimente ermittelt und mit Standardabweichungen graphisch dargestellt. Zusätzlich wurde die Lokalisierung von ICP0 berücksichtigt (zellkernlastiges ICP0 (nuclear ICP0) oder zytoplasmatisches ICP0 (cytoplasmic ICP0), Werte in den Balken des Diagramms). Der Versuch ist von Mei-Ju Hsu durchgeführt worden. (B) Subkonfluente HaCaT-Zellen wurden 40min mit 0mM (without NH<sub>4</sub>Cl, Kontrolle) oder 100mM (with NH<sub>4</sub>Cl) NH<sub>4</sub>Cl behandelt und in Gegenwart der entsprechenden NH<sub>4</sub>Cl-Konzentration für 1h auf Eis mit HSV-1 infiziert (MOI500). Nachfolgend wurde die Temperatur auf 37°C erhöht und gleichzeitig der pH-Wert für 5min verändert (von pH 7,5 (normaler pH-Wert von D-MEM) auf 6,2 (frühe Endosomen) oder 5,6 (späte Endosomen)). Zusätzlich blieb eine Kontrolle bei einem pH-Wert von 7,5. 5min nach Temperatur- und pH-Wert-Erhöhung wurden alle Proben wieder auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und 2h bei 37°C inkubiert. Die Anzahl infizierter Zellen der Gesamtzellzahl wurde aus einem Experiment ermittelt und graphisch dargestellt. (C) Subkonfluente HaCaT-Zellen wurden mit 0mM (Kontrolle) oder 100mM NH<sub>4</sub>Cl für 2,5h bei 37°C inkubiert. Nach mehrmaligen Waschvorgängen wurden die Zellen in NH<sub>4</sub>Cl-freiem Medium für 2h mit HSV-1 infiziert (MOI50), fixiert und gegen ICP0 mit dem monoklonalen Antikörper mab11060 und dem sekundären AF488 anti-Maus (grün) gefärbt. Es sind Einzelfärbungen von Epifluoreszenz-Aufnahmen gezeigt. Der Maßstab beträgt 40µm. (D) Subkonfluente HaCaT-Zellen wurden 30min mit 0mM (Kontrolle) oder 100mM NH<sub>4</sub>Cl inkubiert und anschließend in Gegenwart der entsprechenden NH<sub>4</sub>Cl-Konzentration mit einem eGFP-Plasmid transfiziert. 18h p.t. wurden die Zellen fixiert und eine Zellkern-Färbung (DAPI, blau) durchgeführt. Das transient überexprimierte GFP ist in grün zu sehen. Es sind Überlagerungen von Epifluoreszenz-Aufnahmen gezeigt. Der Maßstab beträgt 40µm.

Die Ergebnisse zeigen, dass HaCaT-Zellen trotz Veränderung der Zellkern-Morphologie bei 100mM Ammoniumchlorid noch in der Lage waren ein Reporterkonstrukt zu exprimieren. Außerdem war der Effekt auf die Zellkern-Morphologie reversibel.

#### **2.2.2.1.2 Der Einfluss des pH-Werts auf die Internalisierung von HSV-1 in HaCaT-Zellen**

Die EM-Studien deuten auf eine Internalisierung sowohl über direkte Fusion mit der Plasmamembran als auch auf einen endozytotischen Weg. Da es nicht möglich war, in EM-Studien zu zeigen, welcher der beiden Internalisierungswege auch zu einer produktiven Infektion führte, wurde ein Versuch zur Bedeutung der direkten Fusion durchgeführt (Marsh und Bron, 1997). Durch Reduktion des pH-Werts nach Virusbindung sollte die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran eingeleitet werden. Wenn gleichzeitig die endozytotische Aufnahme blockiert wird, könnte dieser Versuchsansatz die Frage beantworten, ob die Internalisierung über direkte Fusion mit der Plasmamembran zu einer produktiven Infektion führt. Eine Voraussetzung war, dass die HSV-1 Infektion auch bei reduziertem pH-Wert ablief. Dies konnte in Versuchen mit verschiedenen pH-Werten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

HaCaT-Zellen wurden für 1h auf Eis in Gegenwart oder Abwesenheit von 100mM Ammoniumchlorid infiziert, nachfolgend für 5min einer pH-Wert-Veränderung unterzogen (pH 7,5 (Kontrolle, normaler pH-Wert von D-MEM), pH 6,2 (frühe Endosomen) und pH 5,6 (späte Endosomen)) und anschließend 2h bei normalem pH-Wert auf 37°C inkubiert. Es zeigte sich in zwei Experimenten mit unterschiedlichen Virusmengen (MOI50 (Daten nicht gezeigt) oder MOI500 (Abb.25B)), dass bei den verschiedenen pH-Werten die HaCaT-Zellen ohne Ammoniumchlorid eine ähnlich starke virale Genexpression aufwiesen (95% der Zellen waren infiziert). Mit Ammoniumchlorid behandelte HaCaT-Zellen dagegen wiesen einen inhibierenden Effekt auf die ICP0-Expression auf.

Anhand dieser Experimente kann der Schluss gezogen werden, dass durch die Veränderung des pH-Werts keine direkte Fusion mit der Plasmamembran eingeleitet werden kann und Ammoniumchlorid weiterhin einen inhibierenden Effekt hat. Durch das Fehlen einer Positivkontrolle kann nicht bestätigt werden, ob der Versuchsansatz in HaCaT-Zellen grundsätzlich funktionierte.

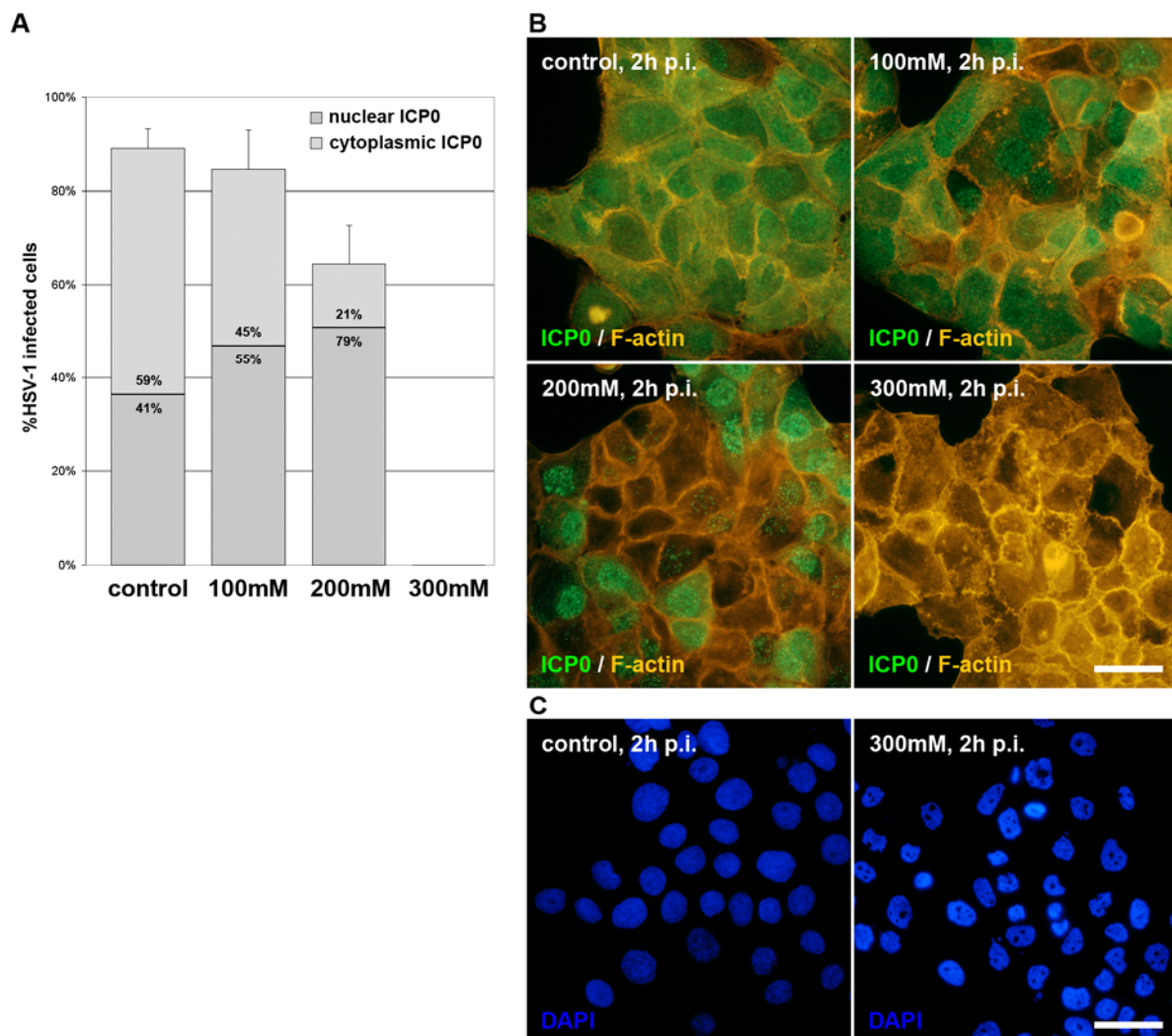
#### **2.2.2.2 Der Einfluss von Dextrose auf die frühe HSV-1 Infektion**

Hypertonisches Medium (durch Dextrose-Zugabe) kann die Bildung von Clathrin-bedeckten Einstülpungen ('Clathrin-coated pits') inhibieren und somit die Clathrin-vermittelte Endozytose blockieren (Greene und Gao, 2009). Um einen ersten Hinweis zu bekommen, ob ein Clathrin-vermittelter Aufnahmeweg bei der HSV-1 Internalisierung eine Rolle spielt, wurden Infektionsstudien in HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dextrose (0, 100, 200 und 300mM) durchgeführt (Abb.26A und B). Mit steigender Konzentration von Dextrose wurde eine Reduktion der ICP0-Expression ermittelt. Im Detail zeigte sich, dass in der Kontrolle 89%, bei 100mM 85%, bei 200mM 65% und bei 300mM 0% der Zellen infiziert waren (Abb.26A). Außerdem wurde auch eine Verzögerung des Infektionsverlaufs anhand der ICP0-Lokalisierung beobachtet. In der Kontrolle lag in 41%, bei 100mM Dextrose in 55% und bei 200mM Dextrose in 79% der Zellen ICP0 im Zellkern vor. Erstaunlicherweise war ein drastischer Abfall von 65% infizierter Zellen bei 200mM auf 0% infizierter Zellen bei 300mM zu verzeichnen.



Der Einsatz von Dextrose führte auch zu einer Veränderung der Zellkern-Morphologie. Im Gegensatz zu den Ammoniumchlorid-Versuchen (siehe Abschnitt 2.2.2.1.1) war die Veränderung jedoch stärker ausgeprägt und äußerte sich in einer Dispersion des Zellkerns (Abb.26C). Dieser Effekt setzte schon bei 100mM leicht ein und erreichte ihr Maximum bei 300mM. Die Veränderung der Zellkern-Morphologie normalisierte sich nach Reduktion von Dextrose aus dem Medium, war damit also reversibel.

Zusammenfassend zeigte sich, dass Dextrose die HSV-1 Infektion konzentrationsabhängig inhibierte und ab einer gewissen Konzentration vollständig blockierte. Die vollständige Blockade der Infektion setzte abrupt ein und war nicht linear zu den anderen Dextrose-Konzentrationen. Da sich die Zellkern-Morphologie bei den hohen Konzentrationen stark veränderte, ist ein Sekundäreffekt für den drastischen Abfall der Infizierbarkeit nicht auszuschließen. Aus diesem Grund kann nicht direkt geschlussfolgert werden, dass der HSV-1 Eintritt über Clathrin-vermittelte Endozytose abläuft.



**Abb.26 Einfluss von Dextrose auf die frühe virale Genexpression von HSV-1**

(A und B) Subkonfluente HaCaT-Zellen wurden 30min mit verschiedenen Dextrose-Konzentrationen (0, 100, 200 und 300mM, gelöst in D-MEM) bei 37°C inkubiert und anschließend in Gegenwart der entsprechenden Dextrose-Konzentration für 2h mit HSV-1 infiziert (MOI20 (A) oder MOI50 (B)). (A) Die Anzahl infizierter Zellen der Gesamtzellzahl wurde aus der Mittelung dreier voneinander unabhängiger Experimente ermittelt und mit Standardabweichungen graphisch dargestellt. Zusätzlich wurde die Lokalisierung von ICP0 berücksichtigt (zellkernlastiges ICP0 (nuclear ICP0) oder zytoplasmatisches ICP0 (cytoplasmic ICP0)), Werte in den Balken des Diagramms). Der Versuch ist von Mei-Ju Hsu durchgeführt worden. (B) Es sind Überlagerungen von Epifluoreszenz-Aufnahmen gezeigt, bei denen ICP0 mit dem monoklonalen Antikörper mab11060 und dem sekundären AF488 anti-Maus (grün) gefärbt wurde. F-Aktin wurde mittels Phalloidin-gekoppeltem TRITC (rot) visualisiert. (C) Zwei Einzelfärbungen von Zellkernen (DAPI, blau) aus dem Experiment von B (0 und 300mM Dextrose) sind gezeigt. Der Maßstab beträgt 40µm.

### **2.3 Kolokalisierungsstudien von Viruspartikeln mit Markern zellulärer Organellen in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinozyten während der frühen HSV-1 Infektion**

Um weitere Evidenz für einen endozytotischen Aufnahmeweg von HSV-1 in humanen Keratinozyten zu erhalten, sollten Kolokalisierungsstudien von eintretenden Viruspartikeln mit frühen Endosomen oder Lysosomen durchgeführt werden. Diese Studien wurden in Kollaboration mit Dr. Frazer Rixon und Dr. Roger Everett (MRC Virology Unit, Glasgow) unternommen.

Für die Untersuchungen wurde die HSV-1 Rekombinante VP26-RFP benutzt, deren Kapsidprotein VP26 mit RFP fusioniert war, um eindringende Viruspartikel zu visualisieren. Die Virusrekombinante wurde von Dr. Frazer Rixon zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde die Virusrekombinante in HaCaT-Zellen charakterisiert (Abb.27A). Hierbei zeigte sich, dass der Infektionsverlauf anhand der eindringenden Viruspartikel zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgt werden konnte. Nach 120min p.i. im Vergleich zu 30min p.i. wurde beobachtet, dass sich die Virusrekombinante im Bereich des Zellkerns konzentrierte (Abb.27A).

#### **2.3.1 Kolokalisierungsstudien der VP26-RFP HSV-1 Rekombinante mit frühen Endosomen und Lysosomen in HaCaT-Zellen**

In HaCaT-Zellen wurde 30 und 60min p.i. die Kolokalisierung der Virusrekombinante mit frühen Endosomen beobachtet (Abb.27C und D). Interessanterweise war der Großteil der Viruspartikel nicht in frühen Endosomen lokalisiert. Nach 2, 10 und 120min p.i. war keine Kolokalisierung ersichtlich. Es bleibt zu erwähnen, dass die Kolokalisierungsstudien mit einer im Gegensatz zu den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der HSV-1 Internalisierung (siehe Abschnitt 2.1) geringeren Virusmenge durchgeführt wurden (MOI50 anstatt MOI1500). Dieser Unterschied in der Virusmenge könnte auch einen Einfluss auf die zeitlichen Kolokalisierungsereignisse haben (siehe Abb.17A).

Es zeigte sich, dass nur ein kleiner Teil der Viren 30 und 60min p.i. mit frühen Endosomen kolokalisierte, daher wurde eine Kontrolle mit fluoreszierendem Transferrin durchgeführt (Abb.27B). HaCaT-Zellen wurden 30min nach Transferrin-Zugabe fixiert und gegen frühe Endosomen gefärbt. Transferrin, welches nach Bindung an den Transferrin-Rezeptor endozytotisch in die Zelle aufgenommen wird, zeigte ähnlich wie die Viruspartikel nur wenige Kolokalisierungsereignisse mit frühen Endosomen. Da der endozytotische Aufnahmemechanismus ein sehr dynamischer Prozess ist, in den beschriebenen Experimenten die Zellen nicht im lebenden Zustand, sondern fixiert, analysiert wurden und sich Transferrin ähnlich wie die Viruspartikel im Hinblick auf Kolokalisierung verhielt, schien es nicht verwunderlich, dass nur wenige Kolokalisierungsereignisse zu finden waren. Untersuchungen der Virusrekombinante 30, 60 und 120min p.i. und der Anfärbung von Lysosomen zeigten keine Kolokalisierung (Daten nicht gezeigt).

Zusammen betrachtet waren 30 und 60min p.i. in HaCaT-Zellen Kolokalisierungen der Virusrekombinante mit frühen Endosomen zu beobachten. Kolokalisierungen mit Lysosomen wurden dagegen nicht gefunden.



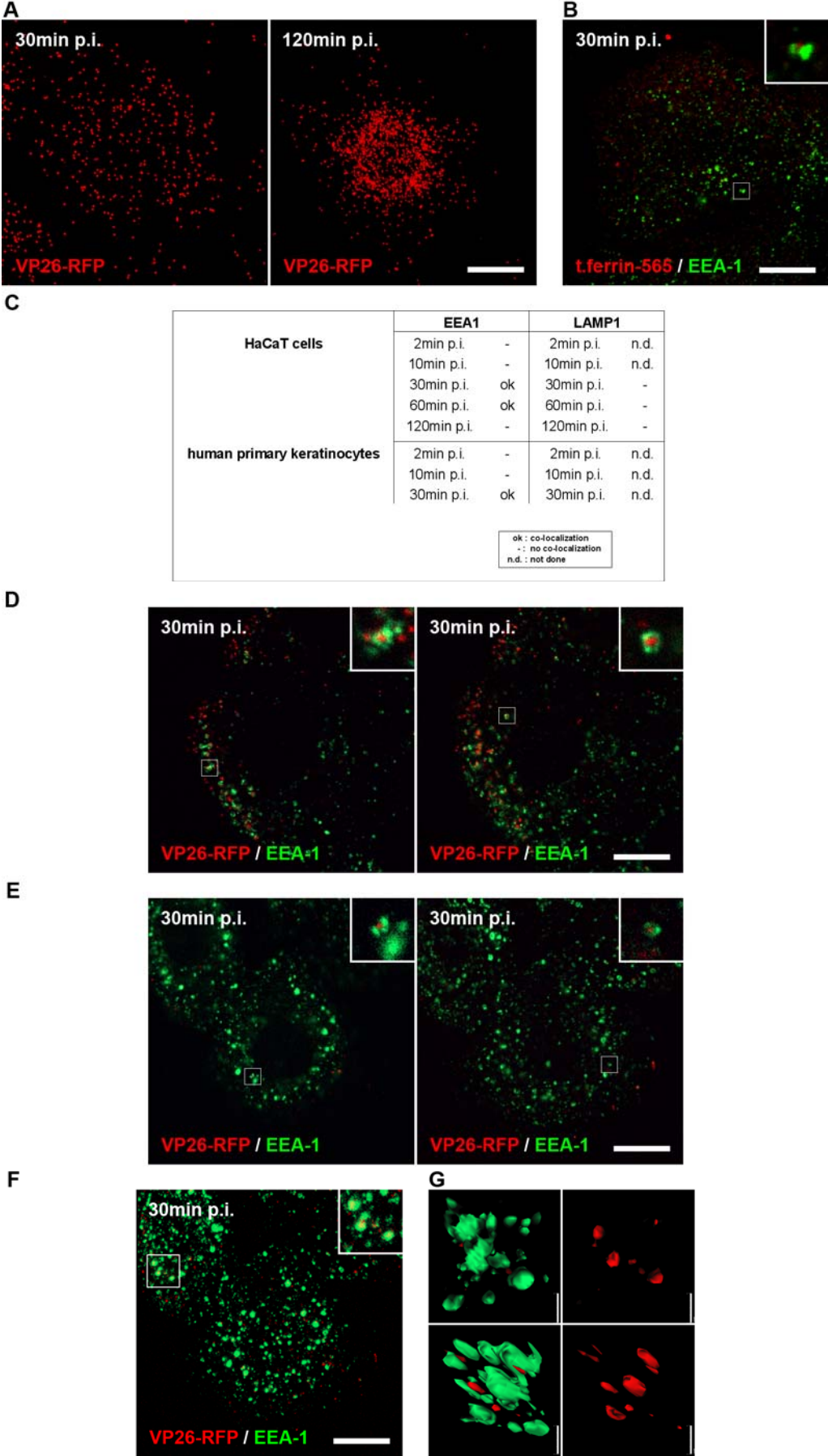


Abb.27 (siehe Seite 71)

**Abb.27 Kolokalisierungsstudien von eintretenden Viren mit zellulären Organellenmarkern**

(A) Subkonfluente HaCaT-Zellen wurden zunächst 1h auf Eis mit der HSV-1 Rekombinante VP26-RFP infiziert (MOI50) und anschließend für 30 oder 120min bei 37°C inkubiert, fixiert und analysiert. Es ist je eine konfokale Projektion einer HaCaT-Zelle mit Viruspartikeln (rot) gezeigt. (B) Subkonfluente HaCaT-Zellen wurden 30min nach Behandlung von Fluoreszenz(565)-gekoppelten Transferrin fixiert und gegen einen frühen Endosomen-Marker angefärbt (monoklonaler Antikörper EEA-1 und sekundärer AF488 anti-Maus (grün)), auch hier ging ein 1-stündiger Eisschritt voraus. Das Kästchen stellt die Vergrößerung einer Kolokalisierung dar. Es ist die Überlagerung von konfokalen Einzelschnitten gezeigt. (C) Liste durchgeführter Experimente in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinozyten. Hierbei ist EEA-1 ein Marker für frühe Endosomen und LAMP-1 ein Marker für Lysosomen. Es wurden HaCaT-Zellen (D) oder primäre Keratinozyten (E und F) 1h auf Eis mit der HSV-1 Rekombinante VP26-RFP infiziert (MOI50) und anschließend 30min auf 37°C inkubiert, fixiert und gegen frühe Endosomen mit dem monoklonalen EEA-1 Antikörper und sekundärer AF488 anti-Maus (grün) gefärbt. Die Überlagerungen von frühen Endosomen mit Viruspartikeln (rot) sind anhand von konfokalen Schnitten einer HaCaT-Zelle (D) oder von drei primären Keratinozyten (E) gezeigt. (F) Zusätzlich ist eine Überlagerung konfokaler Projektionen der drei primären Keratinozyten aus E zu sehen. Die Kästchen stellen Vergrößerung von Kolokalisierungen dar. (G) Eine 3D-Rekonstruktion aus zwei Blickwinkeln von dem in F gezeigten Kästchen ist zu sehen. Sowohl die Überlagerung der frühen Endosomen (grün) mit Viruspartikel (rot, links) als auch Viruspartikel (rot) alleine sind gezeigt. Der Maßstab beträgt 10µm (A, B, D – F) oder 2µm (G). (Seite 70)

**2.3.2 Kolokalisierungsstudien der VP26-RFP HSV-1 Rekombinante mit frühen Endosomen in humanen primären Keratinozyten**

Neben HaCaT-Zellen wurden auch in primären Keratinozyten 2, 10 und 30min p.i. Kolokalisierungsstudien mit der VP26-RFP HSV-1 Rekombinante und frühen Endosomen durchgeführt (Abb.27C und E – G). Es zeigten sich 30min p.i. ähnlich zu den Analysen in HaCaT-Zellen Kolokalisierungen mit frühen Endosomen (Abb.27E – G). Interessanterweise waren mehr und größere Endosomen in den primären Keratinozyten im Vergleich zu den HaCaT-Zellen zu finden.

Die Kolokalisierungsstudien wurden an einem konfokalen Mikroskop durchgeführt, um Kolokalisierung eindeutig zu bestimmen. Zusätzlich wurden bestimmte Bereiche von Überlagerungen konfokaler Projektionen sowohl in primären Keratinozyten (Abb.27G) als auch in HaCaT-Zellen (Daten nicht gezeigt) mittels der Autodeblur- und Autovisualize-Software (von Media Cybernetics) in dreidimensionale Rekonstruktionen verwandelt. Hier konnten Kolokalisierungen durch räumliche Modelle belegt werden (Abb.27G).

Zusammengefasst wurden auch in humanen primären Keratinozyten Kolokalisierungen von Viruspartikel mit frühen Endosomen beobachtet.

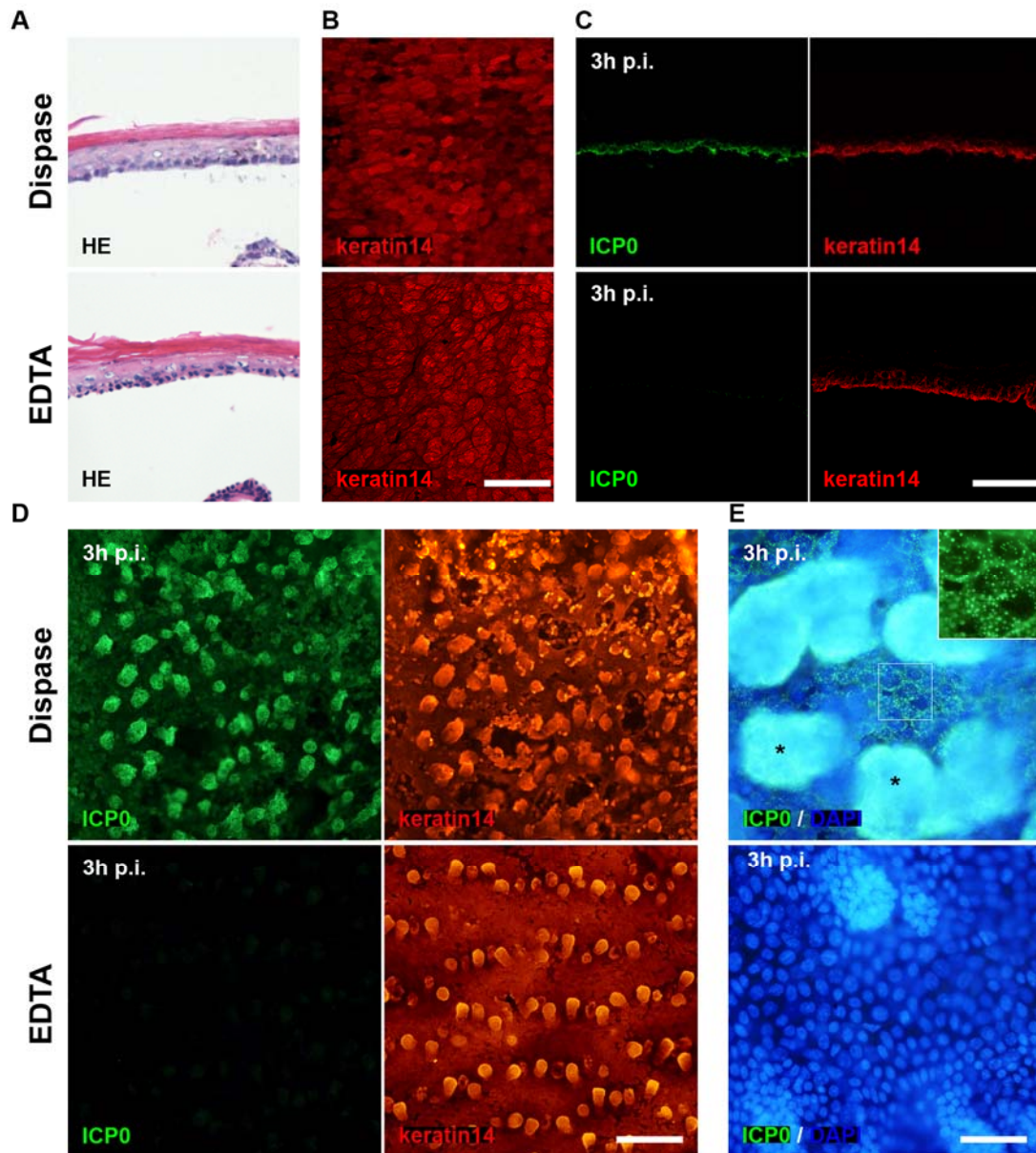
**3. Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in Gewebe**

Die Primärinfektion von HSV-1 wird im Epithel des humanen Wirtsorganismus etabliert. Hierbei stellen die Keratinozyten der Mukosa, der Haut oder der Kornea die primäre Eintrittspforte dar. Untersuchungen der frühen HSV-1 Infektion in Epithelien *ex vivo* führen daher einen großen Schritt näher an eine *in vivo* Infektionssituation. Aus diesem Grund wurde zunächst in muriner Haut/Epidermis ein Infektionsmodell der frühen HSV-1 Infektion etabliert (siehe Abschnitt 1.5.1). Der Vorteil von muriner Haut/Epidermis gegenüber humanem Gewebe ist der Einsatz von transgenen Mäusen (siehe Abschnitt 1.5 und 3.2). Diese Manipulierbarkeit ist in humanem Gewebe nicht möglich, dennoch kann der Unterschied in der Spezies auch zu anderen Ergebnissen im Hinblick auf die HSV-1 Infektion führen. Daher sollte auch ein Infektionsmodell in humaner oraler Schleimhaut, welche wie schon oben erwähnt ein *in vivo* Eintrittsportal von HSV-1 ist, etabliert werden (siehe Abschnitt 3.3).

**3.1 Einfluss der Separierungsreagenzien Dispasell und EDTA auf die frühe HSV-1 Infektion in murinem Gewebe**

Die basalen Keratinozyten der Epidermis lassen sich nach Trennung der Epidermis von der Dermis mit Dispasell effizient infizieren (siehe Abschnitt 1.5.1), allerdings waren die Keratinozyten

aufgelockert und es fehlten teilweise die Haarfollikel und Talgdrüsen über große Areale hinweg. Für Infektionsstudien in Haarfollikeln war Dispasell daher nicht geeignet. Für die Herstellung von whole mount-Präparaten wurde laut dem ursprünglichen Protokoll EDTA verwendet (Braun et al., 2003), welches zu einer schonenderen Separierung der Epidermis von der Dermis führen sollte.



**Abb.28 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion nach Separierung der Epidermis durch Dispasell oder EDTA**

Uninfizierte Epidermis nach Dispasell- oder EDTA-Behandlung ist als HE Färbungen (A) oder als whole mount-Präparate der interfollikulären Epidermis (B) dargestellt. Es sind Phasenkontrast (A) oder konfokale Projektionen gezeigt (B). Keratin14 ist mit dem polyklonalen Antikörper AF64 und AF555 anti-Kaninchen (rot) angefärbt. Es wurde Epidermis von muriner adulter Schwanzhaut verwendet. Cryo-Schnitte (C) oder whole mount-Präparate (D und E) infizierter Epidermis (3h p.i., MOI100) nach Dispasell- oder EDTA-Behandlung sind von muriner adulter Schwanzhaut (C) oder neugeborener Rücken haut zu sehen (D und E). Es sind Einzelfärbungen konfokaler Projektionen (C) oder Epifluoreszenz-Aufnahmen (D und E) gezeigt (ICP0 (mab11060, grün) und Keratin14 (AF64, polyklonal, rot) (C und D) oder ICP0 (mab11060, grün) und eine Zellkern-Färbung (DAPI, blau)). Die Sterne stellen beginnende Haarfollikel und das Kästchen die entsprechende Vergrößerung ohne DAPI dar (E). Der Maßstab beträgt 100µm (A und C), 50µm (B), 160µm (D) oder 40µm (E). Bei allen Versuchen wurde Dispasell (5mg/ml) für 30min bei 37°C oder EDTA (5mM) für 4h bei 37°C verwendet.

Der chemische Komplexbildner EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure; Spurr und Gipson, 1985) sollte die Basalmembran intakt lassen und zur Auflösung von Calcium-abhängigen 'Adherens Junction' und Desmosomen führen, während das bakterielle Enzym Dispasell von *Bacillus polymyxa* als neutrale Protease in der Basalmembran der Haut schneidet (Typ IV Kollagenase und Fibronectinase; Gipson und Grill, 1982; Stenn et al., 1989). Interessanterweise zeigte sich, dass nach EDTA-Behandlung im Gegensatz zu Dispasell keine ICP0-Expression festzustellen war (Abb.28). Aus diesem Grund wurden die Reagenzien im Hinblick auf ihre Fähigkeiten, die Epidermis von der Dermis zu trennen, untersucht (Abb.29).

### 3.1.1 Vergleich der Separierungsreagenzien Dispasell und EDTA

Die Separierung der Epidermis von der Dermis wurde mit Dispasell (5mg/ml, 30min bei 37°C) oder mit EDTA (5mM, 4h bei 37°C) zunächst mit adulten Mausschwänzen durchgeführt. Beide Reagenzien trennten die Epidermis ähnlich gut von der Dermis.

Als nächster Schritt wurde die Epidermis nach entsprechender Separierung mittels HE Färbung von Cryo-Schnitten (Abb.28A; siehe Abschnitt 1.5.1) und über das whole mount-Verfahren (Abb.28B; siehe Abschnitt 1.5.1) verglichen. An der HE Färbung wurde ein Unterschied in der Verwendung beider Reagenzien nicht verdeutlicht (Abb.28A). Erst nach stärkerer Vergrößerung der interfollikulären Epidermis und der Haarfollikel in den whole mount-Präparaten wurden Unterschiede in der Morphologie der basalen Keratinozyten beobachtet (Abb.28B). Nach Dispasell-Behandlung waren die basalen Keratinozyten (angefärbt mit dem Basalzellschicht-Marker Keratin14) aufgelockert und abgerundeter als die entsprechenden Keratinozyten nach EDTA-Behandlung (Abb.28B). Zusätzlich waren in der Dispasell-behandelten Epidermis mehr Haarfollikel abgerissen und die Talgdrüsen fehlten teilweise über große Bereiche hinweg. In der EDTA-behandelten Epidermis waren dagegen die meisten Haarfollikel und Talgdrüsen unbeeinflusst und zeigten im Gegensatz zu der Dispasell-behandelten Epidermis ein strukturiertes und einheitlicheres Muster der Keratinozyten (Daten nicht gezeigt).

Infektionsanalysen zeigten, dass sich 3h p.i. keine ICP0-Expression in der EDTA-behandelten Epidermis einstellte. In der Dispasell-behandelten Epidermis war dagegen eine virale Genexpression in den basalen Keratinozyten zu verzeichnen. Dieses Phänomen wurde sowohl in Cryo-Schnitten (Abb.28C) als auch in whole mount-Präparaten von adulter Mausschwanzepidermis (Daten nicht gezeigt) und von Neugeborenen-Epidermis (Abb.28D und E) beobachtet. Nach 3h p.i. lag ICP0 in den basalen Keratinozyten nach Dispasell-Behandlung bereits im Zytoplasma vor, dies war ein Anzeichen für eine hohe Infektionseffizienz, wohingegen in der Epidermis nach EDTA-Behandlung keine ICP0-Expression zu visualisieren war (Abb.28E).

Zusätzlich zu den Immunfluoreszenz-Färbungen sollte auch mittels Western-Blot-Verfahren die frühe virale Genexpression von ICP0 in der unterschiedlich separierten Epidermis untersucht werden (Abb.29A). Dazu wurden Zelllysate 3 und 6h p.i. hergestellt und mit einem infizierten HaCaT-Zelllysate als Positivkontrolle aufgetragen. Die Lysate wiesen nach Dispasell-Behandlung eine ICP0-Expression 3h p.i. auf, dieses Signal war 6h p.i. noch verstärkt. Die Lysate nach EDTA-Behandlung dagegen zeigten weder nach 3 noch nach 6h p.i. ein detektierbares ICP0-Signal (Abb.29A).



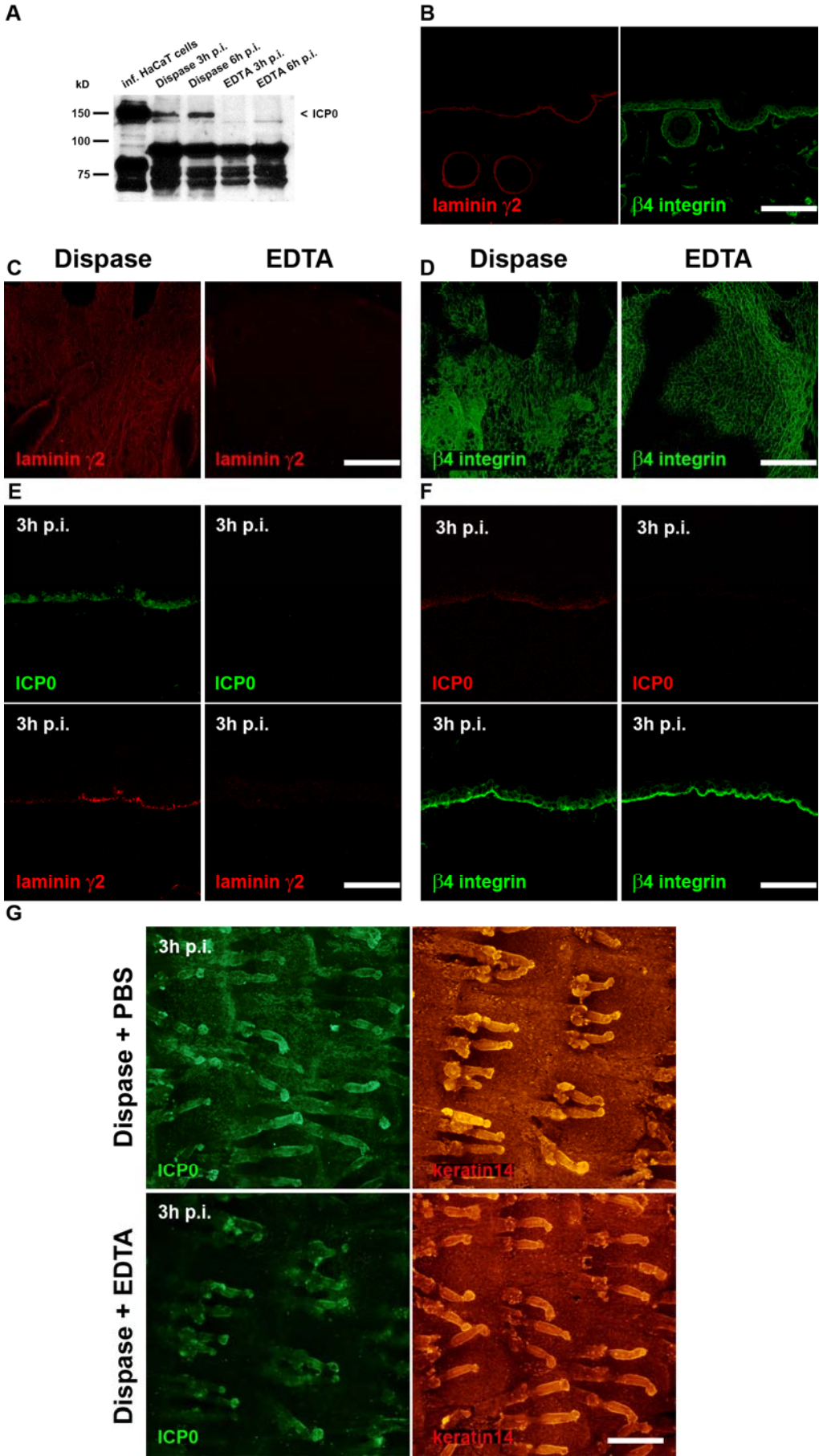


Abb.29 (siehe Seite 75)

**Abb.29 Untersuchung von Basalmembran-Markern nach Separierung der Epidermis durch Dispasell oder EDTA**

(A) Zell-Extrakte (RIPA-Methode) von infizierten HaCaT-Zellen oder Extrakte von Dispasell-/EDTA-behandelter Epidermis 3 und 6h p.i. (MOI100) wurden über ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Expression von ICP0 mit dem polyklonalen anti-ICP0-Antikörper r190 nachgewiesen. (B) Die Antikörper gegen die Basalmembran-Marker Laminin  $\gamma$ 2 (polyklonal, rot) oder  $\beta$ 4 Integrin (monoklonal, grün) sind in muriner Schwanzhaut gezeigt. (C und D) Whole mount-Präparate uninfizierter Epidermis nach Dispasell-/EDTA-Behandlung und die Färbung von Laminin  $\gamma$ 2 (polyklonal, rot) (C) oder  $\beta$ 4 Integrin (monoklonal, grün) (D) sind dargestellt. (E und F) Cryo-Schnitte infizierter Epidermis nach Dispasell-/EDTA-Behandlung (3h p.i., MOI100) und Einzelfärbungen von ICP0 (mab11060, grün) und Laminin  $\gamma$ 2 (polyklonal, rot) (E) oder ICP0 (mab11060, rot) und  $\beta$ 4 integrin (monoklonal, grün) (F) sind zu sehen. Es sind Einzelfärbungen konfokaler Projektionen gezeigt (B – F). (G) Dispasell-behandelte Epidermis wurde für 1h in PBS (Kontrolle) oder EDTA (5mM) inkubiert und anschließend für 3h in frischem Medium infiziert (MOI100). Es sind Einzelfärbungen von Epifluoreszenz-Aufnahmen gezeigt (ICP0 (mab11060, grün) und Keratin14 (AF64, polyklonal, rot)). Der Maßstab beträgt 200 $\mu$ m (B), 50 $\mu$ m (C und D), 100 $\mu$ m (E und F) oder 160 $\mu$ m (G). Bei allen Versuchen wurde Dispasell (5mg/ml) für 30min bei 37°C oder EDTA (5mM) für 4h bei 37°C und außerdem ausschließlich murine adulte Schwanzhaut verwendet. (Seite 74)

Zusammengefasst wurde festgestellt, dass keine virale Genexpression in der mittels EDTA-behandelten Epidermis stattfand. Im Gegensatz dazu waren nach Dispasell-Behandlung infizierte basalen Keratinozyten zu beobachten.

**3.1.2 Untersuchung der Basalmembran nach unterschiedlicher Separierungsmethode**

Die Verwendung von Dispasell oder EDTA als Separierungsreagenz hatte also einen Einfluss auf die HSV-1 Infektion in den basalen Keratinozyten. Möglicherweise war die Antwort des unterschiedlichen Infektionsverhaltens in der Abtrennung der Epidermis von der Dermis im Bereich der Basalmembran zu finden. Je nach dem wo Dispasell schnitt oder EDTA der Epidermis Kationen entzog, konnte eine Barriere für das Virus wegfallen oder entstehen. Es konnte aber auch mit der verstärkten Zugänglichkeit zu zellulären Rezeptoren der basalen Keratinozyten oder deren negativer Beeinflussung zusammenhängen. Um dies herauszufinden, wurden Basalmembran-Marker für Dispasell- oder EDTA-behandelte Epidermis verwendet (Abb.30).

Zunächst wurden Basalmembran-Antikörper gegen Laminin  $\gamma$ 2 (Abb.29B links),  $\beta$ 4 Integrin (Abb.29B rechts), Kollagen IV, Nidogen-1, Perlekan und Heparansulfat in muriner Gesamthaut getestet und anschließend in Mausschwanzepidermis nach Dispasell- oder EDTA-Behandlung angewendet.

Es zeigte sich in whole mount-Präparaten und in Cryo-Schnitten, dass Laminin  $\gamma$ 2, Nidogen-1 und Perlekan nach Dispasell-Behandlung, nicht aber nach EDTA-Behandlung, visualisiert werden konnten (Abb.29C und E). Kollagen IV und Heparansulfat dagegen waren nach Anwendung beider Reagenzien nicht mehr detektierbar (Daten nicht gezeigt). Da der Heparansulfat-Antikörper nur einen ganz bestimmten Bereich in den Heparansulfat-Seitenketten der Heparansulfatproteoglykane erkennt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotz Abwesenheit der Heparansulfat-Fluoreszenz noch Bindungsstellen für das Virus für die initiale Adsorption vorhanden waren.  $\beta$ 4 Integrin dagegen zeigte bei beiden behandelten Proben ein positives Signal (Abb.29D und F).

Zusammengenommen wurde beobachtet, dass nach EDTA-Behandlung bis auf  $\beta$ 4 Integrin keine der verwendeten Basalmembran-Marker visualisiert werden konnten. Dies deutet auf die Abwesenheit der Basalmembran im Gegensatz zur Dispasell-behandelten Epidermis hin. Interessanterweise war dennoch keine Infektion der EDTA-behandelten Epidermis möglich.

**3.1.3 Untersuchung des inhibierenden Effekts von EDTA in muriner Epidermis**

Um zu untersuchen, ob EDTA auch die Infizierbarkeit von Dispasell-behandelter Epidermis mindern konnte, wurde die Epidermis nach Separierung mit Dispasell für 1h entweder in PBS (Kontrolle) oder

in 5mM EDTA inkubiert und anschließend für 3h in frischem Medium infiziert. Es wurde festgestellt, dass in der Epidermis nach EDTA-Inkubation eine leicht geringere ICP0-Expression als in der Kontrolle zu verzeichnen war (Abb.29G).

Es war möglich, dass der inhibierende Effekt von EDTA auf die frühe virale Genexpression von HSV-1 aufgrund des Abfangens bivalenter Kationen (wie  $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$ ) entstand und daher eventuell die Konfiguration essentieller Rezeptoren für die HSV-1 Bindung bzw. der Internalisierung veränderte. Daher sollte überprüft werden, ob nach Separierung mit EDTA und gefolgter Rückführung von bivalenten Kationen die frühe virale Genexpression einsetzen konnte. Dazu wurden EDTA-separierte Epidermisstücke entweder in  $Ca^{2+}$ - oder  $Mn^{2+}/Mg^{2+}$ -haltigem Medium für 1h inkubiert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Zusatz von bivalenten Kationen verwendet. Nach der Inkubationszeit wurde eine Infektion für 3h durchgeführt. Hierbei wurde beobachtet, dass trotz Rückführung bivalenter Kationen keine virale Genexpression einsetzte (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend hatte EDTA auch einen inhibierenden Effekt auf die Infektion in Dispase-separierter Epidermis. Die Rückführung von bivalenten Kationen dagegen konnte den inhibierenden Effekt auf die Infektion nicht aufheben.

	Dispase	EDTA
Laminin $\gamma 2$	+	-
Collagen IV	-	-
$\beta 4$ Integrin	+	+
Nidogen 1	+	-
Perlecan	+	-
Heparan sulfate	-	-

Abb.30 Liste eingesetzter Basalmembran-Marker nach Separierung der Epidermis durch Dispase oder EDTA

### 3.1.4 Untersuchung des inhibierenden Effekts von EDTA in HaCaT-Zellen

Zur Untersuchung der Auswirkung von EDTA auf die frühe virale Genexpression sollte zur Vereinfachung der Versuchsbedingungen zunächst in Zellkultur nach der Begründung des inhibierenden Effekts gesucht werden.

Dazu wurde als erstes überprüft, ob das Virus selbst durch EDTA beeinflusst wurde. Nach Inkubation von HSV-1 in EDTA (5mM) und anschließender Infektion von HaCaT-Zellen in frischem Medium, war eine, im Vergleich zur Kontrolle, ähnlich starke ICP0-Expression zu ermitteln (Daten nicht gezeigt).

In Versuchen mit EDTA-behandelten HaCaT-Zellen (5mM, 1h) und gefolgter Infektion in EDTA-freiem Medium wurde beobachtet, dass die virale Genexpression noch stattfand. Die virale Genexpression war ähnlich stark wie in der Kontrolle, im Gegensatz dazu lösten sich die Zellen, wenn EDTA während der Infektion anwesend war, sodass der Infektionsverlauf nicht verfolgt werden konnte.

In Versuchen mit EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure; 5mM), welches im Gegensatz zu EDTA eine höhere Affinität zu Calciumionen hat, wurden ähnliche Resultate erzielt (Daten nicht gezeigt).

Es zeigte sich, dass das Virus nicht direkt von EDTA beeinflusst wurde. Längere Inkubationszeiten der HaCaT-Zellen mit EDTA/EGTA waren aufgrund der Ablösung der Zellen von ihrem Untergrund nicht

möglich. Daher konnte ein inhibierender Effekt des EDTAs nach längeren Inkubationszeiten in Zellkultur nicht untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass keine Infektion der basalen Keratinozyten nach Separierung der Epidermis von der Dermis mit EDTA im Gegensatz zu Dispasell nachweisbar war, obwohl die Experimente auf die Abwesenheit der Basalmembran als potentielle Barriere hinwiesen. Im Gegensatz zu EDTA führte die Separierung mit Dispasell zur Veränderung der Morphologie der basalen Keratinozyten. Die EDTA-Inkubation von Dispasell-behandelter Epidermis führte zu einer Verringerung der Infizierbarkeit, wobei die Rückführung von bivalenten Kationen den inhibierenden Effekt auf die Infektion nicht aufheben konnte. Daraus kann geschlossen werden, dass entweder EDTA noch eine andere Wirkung auf die Epidermis ausübt und/oder, dass Dispasell durch die Beeinflussung der basalen Keratinozyten eine bessere Zugänglichkeit für das Virus schafft.

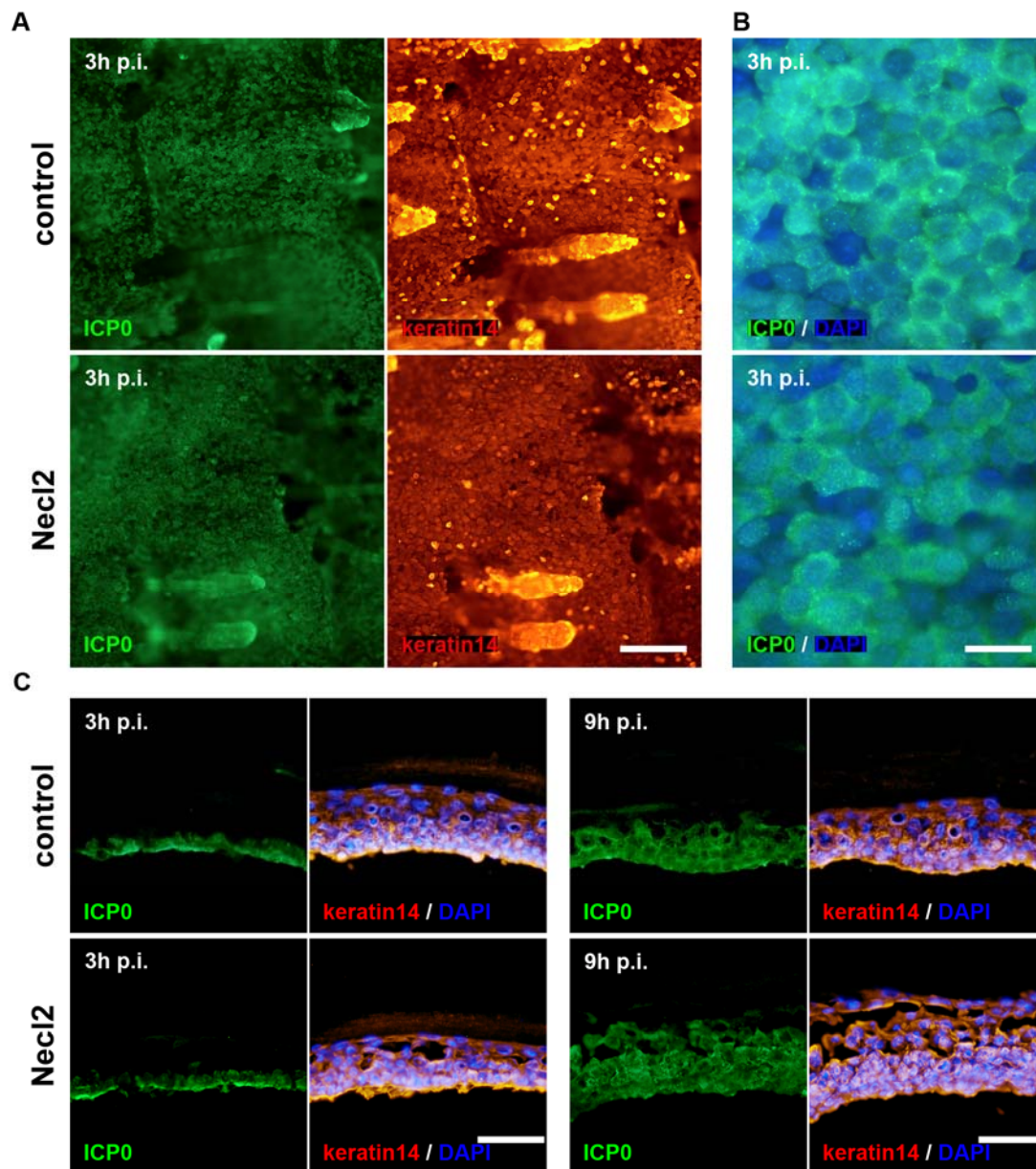
### **3.2 Einfluss der Necl2-Überexpression in der Epidermis der Necl2 konditionalen transgenen Maus auf die frühe virale Genexpression von HSV-1**

Es wird angenommen, dass eine Verwundung oder Mikroläsion einer produktiven HSV-1 Infektion vorausgeht. Daher sollte in einem Verwundungsmodell in muriner Epidermis die frühe HSV-1 Infektion untersucht werden. Hierzu wurde die Necl2 konditionale transgene Maus, die eine Keratinozyten-spezifische Überexpression von Necl2 aufweist, verwendet. Die unverletzte Epidermis dieser Maus zeigt keine offensichtlichen Defekte in der Homöostase der Haut. Erst nach Verwundung zeigt sich ein verzögerter Wundheilungsprozess (Giangreco et al., 2009). In dieser Arbeit sind anfängliche Infektionsstudien in der Necl2-Maus dargestellt, die zunächst ohne Verletzung durchgeführt wurden. Necl2 ('nectin-like molecule 2') gehört wie Nektin-1 zu der Familie von Nektinen und Nektin-ähnlichen Molekülen, die Calcium-unabhängige Adhäsionen zwischen Zellen vermitteln. Ähnlich wie die Rac1 E-KO-Maus (siehe Abschnitt 1.5) ist die Necl2-Überexpression mittels des Keratin14-Promotors nur auf die Epidermis beschränkt. Wichtig ist hierbei, dass in den bisherigen Analysen ausschließlich C57BL/6 Mäuse verwendet wurden. Bei den Necl2-Tieren handelt es sich jedoch um FVB/N Mäuse. Diese Mäuse unterscheiden sich in der Fellfarbe (weiß (Albino) statt schwarz), der Größe und der besseren Reproduktivität von den C57BL/6 Mäusen (Taketo et al., 1991). Im Hinblick auf *ex vivo* Infektionsstudien in der Epidermis verhielten sich die FVB/N Mäuse ähnlich wie die C57BL/6 Mäuse, allerdings war in whole mount-Präparaten die Infektionseffizienz ein wenig reduzierter (Daten nicht gezeigt).

#### **3.2.1 Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in der Epidermis der Necl2 konditionalen transgenen Maus**

Die Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in Necl2-Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Tieren wurde in adulter Schwanzepidermis unternommen (2 – 3 Monate alte Tiere). Die entsprechende Epidermis wurden ähnlich wie in Abschnitt 1.5.1 beschrieben für 3h *ex vivo* infiziert (es wurden drei Necl2- und zwei Wildtyp-Mäuse verwendet) und anschließend als whole mount-Präparate ausgewertet.





**Abb.31 Untersuchung der HSV-1 Infektion in der Epidermis der Necl2 konditionalen transgenen Maus**

Whole mount-Präparate (A und B) oder Cryo-Schnitte (C) der Schwanzepidermis (nach Dispasell-Behandlung) von Necl2- oder Kontroll-Mäusen 3h p.i. (MOI100) (A und B) bzw. 3h oder 9h p.i. (MOI100) (C) sind gezeigt. Zum Nachweis von ICP0 wurde der primäre Antikörper mab11060 und der sekundäre Antikörper AF488 anti-Maus (grün) verwendet. Keratin14 wurde mit dem polyklonalen Antikörper AF64 und AF555 anti-Kaninchen (rot) angefärbt. Zusätzlich ist eine Zellkern-Färbung zu sehen (DAPI, blau). Es sind Einzelfärbungen (A), Überlagerungen (ICP0 und DAPI) (B) oder Einzelfärbungen (ICP0) und Überlagerungen (Keratin14 und DAPI) (C) von Epifluoreszenz-Aufnahmen gezeigt. Der Maßstab beträgt 160µm (A), 40µm (B) oder 100µm (C).

Die ICP0-Expression der Necl2-Mäuse unterschied sich nicht von den Wildtyp-Tieren (Abb.31A und B). Das ICP0-Signal war bei beiden Mäusen stark im Zytoplasma vertreten, was auf eine fortgeschrittene Infektion deutete.

Die Haarfollikel der whole mount-Präparate konnten dagegen nur schwer beurteilt werden, da durch die Dispasell-Behandlung und der gefolgtten Separierung meist die Haarfollikel ganz oder teilweise abgelöst waren. Dennoch schien auch hier kein Unterschied in der ICP0-Expression vorhanden zu sein.

Da eine potentielle Verzögerung oder ein Ausbleiben der Infektion suprabasaler Keratinozyten-Schichten mittels whole mount-Verfahren nicht gezeigt werden konnte, wurden auch Cryo-Schnitte 3h und 9h p.i. von 7 – 8 Monate alten Mäusen hergestellt und analysiert (Abb.31C; fünf Necl2- und zwei

Wildtyp-Mäuse wurden analysiert). Es wurde anhand der frühen viralen Genexpression von ICP0 beobachtet, dass 3h p.i. lediglich die basalen Keratinozyten infiziert waren. 9h p.i. dagegen zeigten auch suprabasale Schichten ein ICP0-Signal. Dieses Phänomen war sowohl in den Necl2- als auch in den Kontroll-Mäusen festzustellen (Abb.31C).

Zusammengefasst zeigte sich in den *ex vivo* Infektionsstudien, dass die Necl2-Überexpression in unverletzter Epidermis im Vergleich zu der Kontrolle keinen Einfluss auf die frühe HSV-1 Infektion hatte.

### **3.3 Etablierung eines HSV-1 Infektionsmodell in humaner oraler Schleimhaut**

Humane Schleimhaut ist eine Eintrittspforte von HSV-1 in den Wirtsorganismus, daher ist die Charakterisierung der HSV-1 Infektion in diesem Gewebe auch für therapeutische Zwecke von höchster Wichtigkeit. Im Folgenden wird der Beginn der Etablierung eines HSV-1 Infektionsmodells in der humanen Mukosa des Mundraums geschildert. Die *ex vivo* Infektionsanalysen zur Etablierung eines HSV-1 Infektionsmodells wurden hauptsächlich im harten Gewebe des Zahnfleisches durchgeführt, während Zungengewebe und Gewebe des Mundbodens und der bukkalen Bereiche nicht verwendet wurden.

Die Infektionsanalysen zeigten, dass sich die Keratinozyten der epidermalen Mukosa stark infizieren ließen, sobald die Basalschicht der epidermalen Mukosa durch Dispasell-Behandlung frei zugänglich war. Intakte Mukosa ließ sich dagegen nicht infizieren. Erst nach mechanischer Verwundung der Mukosa wurde eine HSV-1 Infektion in den Keratinozyten festgestellt. Die Infektionseffizienz verstärkte sich noch, wenn die verwundete Mukosa vorher über einen längeren Zeitraum in Keratinozyten-Medium inkubierte.

#### **3.3.1 Untersuchung der frühen viralen HSV-1 Infektion in epidermaler Mukosa**

Als Grundvoraussetzung zur Etablierung eines *ex vivo* HSV-1 Infektionsmodells in humaner Mukosa des Mundraums sollte überprüft werden, ob sich die epidermale Mukosa nach einem chirurgischen Eingriff grundsätzlich mit HSV-1 infizieren lässt. Dazu wurde die Mukosa ähnlich wie murine Haut (siehe Abschnitt 1.5.1) für 30min bei 37°C mit Dispasell (5mg/ml) behandelt und anschließend die Epidermis von der Dermis getrennt. Es zeigte sich im Vergleich zu muriner Epidermis, dass die epidermale Mukosa einerseits viel mehr Keratinozyten-Schichten aufwies und andererseits fingerförmig in der Dermis verankert war (Abb.32A und Abb.33A). Diese fingerförmigen Verästelungen nahmen vermutlich mit dem Alter des Patienten zu (Daten nicht gezeigt). Die Schichtdicke der epidermalen Mukosa war ein Vorteil zur Etablierung eines HSV-1 Infektionsmodells, da so unterschiedliche Bereiche der suprabasalen Keratinozyten-Schichten im Vergleich zu muriner Epidermis, die nur wenige Schichten besaß, analysiert werden konnten.

Die Behandlung der Mukosa mit EDTA (5mM, 4h bei 37°C; siehe Abschnitt 3.1.1) führte nicht zur Trennung der Epidermis von der Dermis, vermutlich aufgrund der bereits erwähnten Schichtdicke und Verankerung in der Dermis (Daten nicht gezeigt).

Um die frühe HSV-1 Infektion der Dispasell-behandelten Epidermis zu untersuchen, wurde die epidermale Mukosa ähnlich wie die murine Epidermis (siehe Abschnitt 1.5.1) für verschiedene Zeitpunkte in Virus-haltigem Medium inkubiert (Abb.32). Während die epidermale Mukosa ganz in das

Medium eintauchte, schwamm die murine Epidermis auf dem Medium. Dies hing vermutlich mit der geringeren Verhornung (weniger hydrophob) und der Schichtdicke der epidermalen Mukosa zusammen. Die epidermale Mukosa wurde für minimal 3h in Virussuspension inkubiert (bei längeren Infektionszeiten wurde die Virussuspension durch frisches Medium ersetzt) und es zeigte sich, dass sich die basalen Keratinozyten der epidermalen Mukosa grundsätzlich mit HSV-1 infizieren ließen. Dabei wurde bei allen Zeitpunkten p.i. festgestellt, dass die HSV-1 Infektion ausschließlich von der basalen Seite her einsetzte, obwohl die epidermale Mukosa komplett von Virus-haltigem Medium bedeckt war. An der apikalen Seite wurde keine frühe virale Genexpression von HSV-1 festgestellt, auch wenn oberste Keratinozyten-Schichten durch den chirurgischen Eingriff verletzt wurden. Interessanterweise hatte die Hornhaut der epidermalen Mukosa im Gegensatz zu muriner Epidermis noch Zellkerne (Abb.32A und Abb.33), was möglicherweise darauf hinwies, dass die Hornhaut dünner war und die Proliferation der Zellen schneller ablief. Dennoch wurden die Keratinozyten der Hornschicht nicht infiziert.

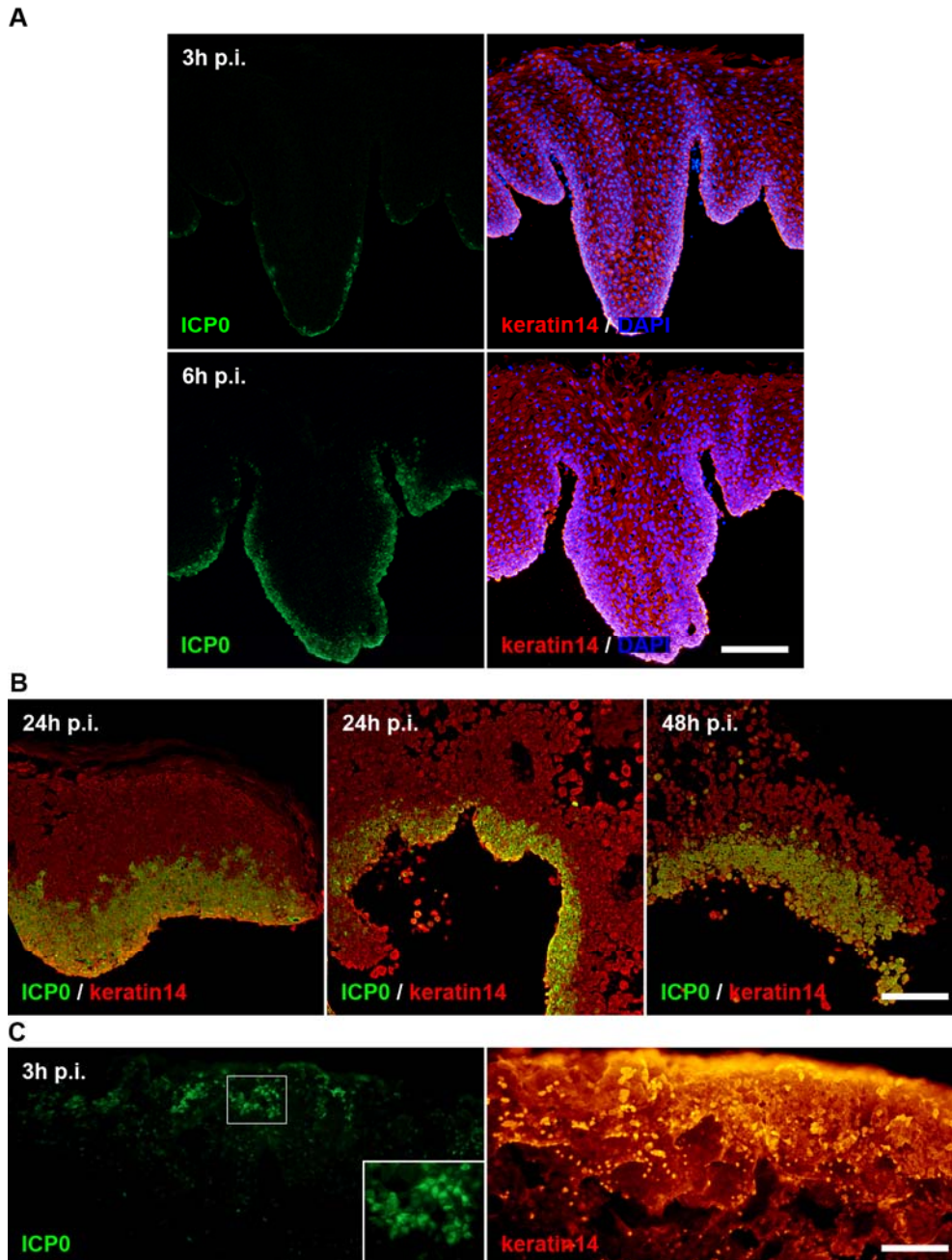
Nach 3h p.i. waren bereits einige basale Keratinozyten infiziert (Abb.32A oben). Nach 6h p.i. nahm die Zahl der infizierten Zellen zu und zusätzlich wurde die ICP0-Expression in suprabasalen Schichten detektiert (Abb.32A unten). Erwähnenswert ist, dass die Bereiche, bei denen sich zwei fingerförmige Ausbuchtungen der epidermalen Mukosa überlappten, nicht oder nicht so stark infiziert waren (Abb.32A unten). Dies konnte mit einer schlechteren Erreichbarkeit des Mediums und damit des Virus in diesem Bereich erklärt werden. Längere Infektionszeiten waren also durch eine ICP0-Expression in suprabasale Keratinozyten-Schichten gekennzeichnet. So zeigten 24h p.i. fast ein Drittel der Keratinozyten-Schichten ein ICP0-Signal (Abb.32B links).

Interessanterweise hing die HSV-1 Infektion auch von der Beschaffenheit des Gewebes ab. 24h p.i. wurde je nach Zustand des Gewebes eine starke oder auch eine schwächere ICP0-Expression verzeichnet (Vergleiche Abb.32B rechts und Abb.32B Mitte). Die Auflösung des epidermalen Gewebes war gekennzeichnet durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten und dem Abrunden von Zellen (Abb.32B Mitte). Dieser Effekt verstärkte sich noch 48h p.i. (Abb.32B rechts).

Mit Beschaffenheit ist der Zustand des Gewebes gemeint, der sich aus verschiedenen Faktoren zusammensetzt, wie beispielsweise dem Immunstatus des Patienten, Entzündungen im Bereich des Gewebes, dem Alter des Patienten, Mikroorganismen der Mundflora, die nach längeren Inkubationszeiten im Inkubator (37°C) das Gewebe beeinflussen können, sowie Apoptose/Nekrose. Diese hohe Variabilität des verwendeten Gewebes war im Gegensatz zu Gewebe von Labormäusen, die unter sterilen Bedingungen gehalten wurden, ein großer Nachteil in der Etablierung eines *ex vivo* HSV-1 Infektionsmodells. Um diese Variabilität möglichst klein zu halten wurde entzündungsfreies Gewebe von Patienten nicht zu hohen Alters verwendet.

Zusätzlich zu den Infektionsanalysen von Cryo-Schnitten (Abb.32A und B) wurden auch whole mount-Präparate von epidermaler Mukosa 3h p.i. hergestellt (Abb.32C). Es zeigte sich hierbei, dass sich ICP0 visualisieren ließ, jedoch war aufgrund der Schichtdicke und der fingerförmigen Verästelung der epidermalen Mukosa die Fokussierung am Mikroskop schwierig. Das Gewebe ließ sich außerdem nicht richtig mit einem Deckglas verschließen. Daher sollten im weiteren Verlauf und auch bei den *ex vivo* Infektionsanalysen von Gesamtgewebe (siehe Abschnitt 3.3.2 bzw. 3.3.3) Cryo-Schnitte untersucht werden.

Zusammenfassend zeigte sich, dass sich Dispasell-behandelte epidermale Mukosa von der basalen Seite aus mit HSV-1 infizieren ließ. Dabei korrelierte die Länge der Infektionszeit mit der ICP0-Expression auch in suprabasale Keratinozyten-Schichten.



**Abb.32 Untersuchung der HSV-1 Infektion in humaner epidermaler Mukosa**

Cryo-Schnitte (A und B) oder whole mount-Präparate (C) humaner epidermaler Mukosa nach Dispasell-Behandlung sind gezeigt. Es sind Einzelfärbungen (ICP0) und Überlagerungen (Keratin14 und DAPI) 3 oder 6h p.i. (MOI100) von Epifluoreszenz-Aufnahmen (A), Überlagerungen (ICP0 und Keratin14) konfokaler Projektionen 24 oder 48h p.i. (MOI100) (B) oder Epifluoreszenz-Aufnahmen von Einzelfärbungen (ICP0 oder Keratin14) 3h p.i. (MOI100) (C) zu sehen. Zum Nachweis von ICP0 wurde der primäre Antikörper mab11060 und der sekundäre Antikörper AF488 anti-Maus (grün) verwendet (A – C). Keratin14 wurde mit dem polyklonalen Antikörper AF64 und AF555 anti-Kaninchen (rot) angefärbt (A – C). Zusätzlich wurde der Zellkern gefärbt (DAPI, blau) (A). Das Kästchen gibt die entsprechende Vergrößerung wieder (C). Der Maßstab beträgt 160µm.

### 3.3.2 Untersuchung der frühen viralen HSV-1 Infektion in intakter Mukosa

Um zu untersuchen, ob nach *ex vivo* Infektion des Gesamtgewebes der Mukosa noch eine virale Genexpression von HSV-1 in den Keratinozyten nachweisbar war, wurden Schleimhautstücke 6 oder 24h in Virus-haltigem Medium inkubiert. Erwähnenswert ist hier, dass das Virus-haltige Medium nicht wie bei der Infektion von epidermaler Mukosa nach 3h durch frisches Medium ersetzt wurde. Dies war eine Vorsichtsmaßnahme, da nicht ausgeschlossen werden konnte, ob die extrazelluläre Matrix der Dermis einen gewissen Teil der Viruspartikel absorbierte. Für die Infektionsanalysen wurden außerdem Bereiche aus der Mitte der Mukosa verwendet, die nicht direkt mit dem Medium in Kontakt standen. Im Detail zeigte sich 6 und 24h p.i., dass keine virale Genexpression in den Keratinozyten intakter Mukosa nachweisbar war (Abb.33B). Außerdem war zu beobachten, dass die Fibroblasten der Dermis nicht infiziert waren. Es zeichnete sich jedoch ein starker grüner Hintergrund in der Dermis und der Hornschicht nach Verwendung des AF488 anti-Maus Sekundärantikörpers ab, der jedoch unspezifisch war (Abb.33B links). Die Keratinozyten waren also über die apikale Hornschicht und durch die Dermis/Basalmembran gegen eine Infektion geschützt. Ähnliche Resultate wurden auch mit muriner Haut festgestellt (siehe Abschnitt 1.5.1).

### 3.3.3 Untersuchung der frühen viralen HSV-1 Infektion in verletzter Mukosa

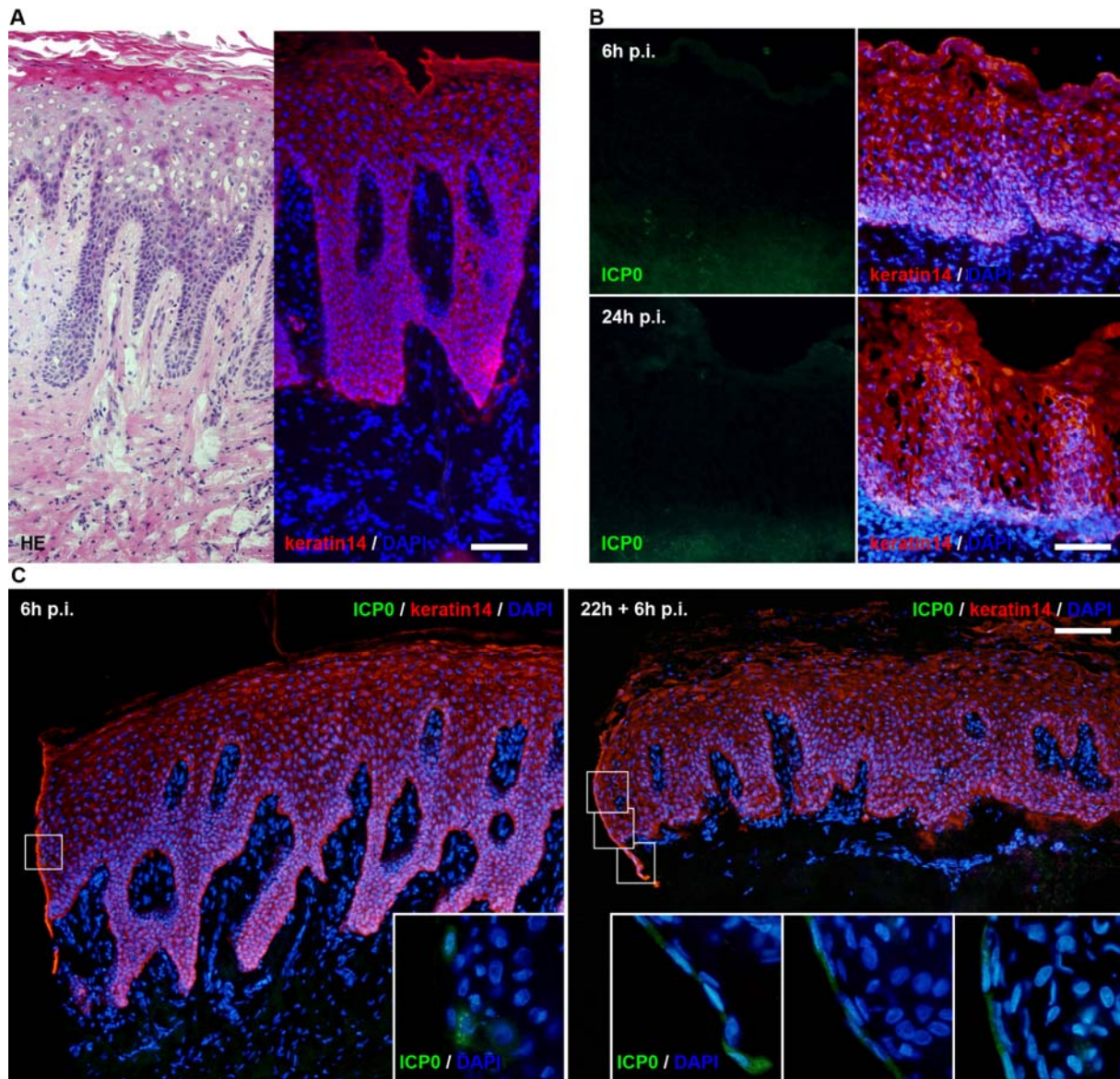
Die basalen Keratinozyten ließen sich nur infizieren, wenn eine Zugänglichkeit zur Epidermis geschaffen wurde. Daher kann der Schluss gezogen werden, dass eine Verwundung oder Mikroläsion in einer *in vivo* Infektionssituation vorausgeht, damit die Primärinfektion von HSV-1 in Keratinozyten stattfinden kann. Um diese Schlussfolgerung zu überprüfen, wurden vor einer erneuten *ex vivo* HSV-1 Infektionsanalyse mechanische Verwundungen in Schleimhautstücken mittels Skalpell erzeugt.

Zunächst sollte ähnlich zu der Studie von Moll et al. (1998) die Mukosa in einer Luft-Flüssigkeits-Interphase gehalten werden und anschließend eine HSV-1 Infektion in der epidermalen Mukosa stattfinden. Hierzu wurde die apikale Seite mit einer Kürette (3mm Durchmesser) angeritzt und das Gesamtgewebe dreimal für 10s mit einem alkoholfreien Antiseptikum (Octenisept, Schuelke-Mayr) und anschließend mit PBS gewaschen (Steinstraesser et al., 2009, 2010). Nachfolgend wurde die epidermale Seite an der Luft inkubiert und die dermale Seite der Mukosa in Keratinozyten-Medium eingetaucht. Um der Dermis einen gewissen Halt zu verleihen, wurde eine sterile Mullbinde als Untergrund gewählt (Moll et al., 1998). 22h nach Inkubation im Inkubator (37°C/5%CO<sub>2</sub>) wurde die eingeritzte Mulde an der apikalen Seite mit Virus-haltigem Medium befüllt (zirka 1µl) und 3h p.i. eingebettet. In Cryo-Schnitten war an der Mulde der epidermalen Mukosa keine HSV-1 Infektion nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Da die Mulde auch in die Dermis hineinragte, war eventuell das Virus-haltige Medium durch die Dermis diffundiert. Eine weitere mögliche Erklärung war, dass das geringe Volumen innerhalb der 3-stündigen Inkubation verdunstet war. Zusätzlich konnte auch das Antiseptikum einen negativen Effekt auf die HSV-1 Infektion haben, daher wurde die Behandlung mit dem Antiseptikum für weitere *ex vivo* Infektionsanalysen von der Mukosa gestoppt.

Es wurde festgestellt, dass einerseits die Größe des Patientenmaterials der Mukosa für eine Infektion in einer kleinen Mulde der apikalen Seite zu gering war (zirka 0,4cm x 0,4cm), da sich die Erzeugung einer kleinen Mulde in der epidermalen Mukosa schwierig gestaltete. Die oben erwähnte Studie von Steinstraesser et al. (2009, 2010) dagegen ging beispielsweise von einem Hautgewebe mit einer



Größe von 2,5cm x 2,5cm aus. Andererseits war das aufgetragene Volumen viel zu gering. Aus diesem Grund wurde eine andere Methode zur mechanischen Verwundung und anschließender *ex vivo* Infektionsanalyse verwendet.



**Abb.33 Untersuchung der HSV-1 Infektion in humaner verletzter oder unverletzter Mukosa**

Cryo-Schnitte von unverletzter uninfiltrierter (A), unverletzter infizierter (6 oder 24h p.i., MOI100) oder verletzter infizierter humaner Mukosa (6h p.i. oder 22h + 6h p.i.) (C) sind gezeigt. Die Übersicht humaner Mukosa als HE Färbung und als Immunfluoreszenz-Färbung (Keratin14 und DAPI) ist zu sehen (A). Keratin14 wurde mit dem polyklonalen Antikörper AF64 und AF555 anti-Kaninchen (rot) angefärbt (A – C). Zusätzlich wurde der Zellkern gefärbt (DAPI, blau) (A – C). Zum Nachweis von ICP0 wurde der primäre Antikörper mab11060 und der sekundäre Antikörper AF488 anti-Maus (grün) verwendet (B und C). Es sind Überlagerungen (Keratin14 und DAPI) (A), Einzelfärbungen (ICP0) und Überlagerungen (Keratin14 und DAPI) (B) oder Überlagerungen (ICP0, Keratin14 und DAPI oder ICP0 und DAPI) (C) dargestellt. (C) Mechanisch verwundete Mukosa wurde entweder direkt infiziert (6h p.i., links) oder 22h in Keratinozyten-Medium gehalten und dann infiziert (22h + 6h p.i., rechts). Die Kästchen geben die entsprechende Vergrößerung wieder (C). Der Maßstab beträgt 200µm (A und C) oder 160µm (B).

Um die experimentellen Bedingungen zu vereinfachen, wurde die HSV-1 Infektion nach mechanischer Verwundung von Mukosa ähnlich wie in dem intakten Gesamtgewebe durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein Keil von der apikalen bis zur basalen Seite des Gewebes geschnitten. Da das Gewebe sehr fest war, konnten die beiden Enden des Keils nicht umklappen und so eine potentielle Infektion verhindern. Nachfolgend wurden die angeschnittenen Gewebestückchen in Virus-haltiges Medium eingetaucht. Die Infektionsanalyse zeigte, dass sich 6h p.i. in den Keratinozyten der epidermalen

Mukosa in dem Bereich des Keils, der in direktem Kontakt zum Medium stand, eine ICP0-Expression nachweisen ließ (Abb.33C links). Interessanterweise war diese virale Expression sehr schwach ausgeprägt. Eine 3-stündige Infektion der mechanisch verwundeten Mukosa (Daten nicht gezeigt) beispielsweise war nicht mit der Dispasell-behandelten epidermalen Mukosa 3h p.i. vergleichbar (siehe Abschnitt 3.3.1). Es war jedoch zu berücksichtigen, dass durch die mechanische Verwundung andere Schichten der Keratinozyten Zugang zum Virus-haltigen Medium hatten, wohingegen nach Dispasell-Behandlung nur basale Keratinozyten einen direkten Kontakt zum Virus-haltigen Medium aufwiesen. Daher ist nicht eindeutig zu klären, ob der Grund der verminderten Infektion an den suprabasalen (mehr-differenzierten) Keratinozyten oder an der fehlenden Dispasell-Inkubation lag. Erst nach Erhöhung der Infektionsdauer (bis zu 24h p.i.) steigerte sich die virale Genexpression im Wundbereich der epidermalen Mukosa.

Zusammengefasst zeigte sich, dass eine mechanische Verletzung gefolgt von direkter Infektion zu einer geringen Anzahl infizierter Keratinozyten im Bereich der Verwundungslinie führte.

Da eine Verwundung im Organismus Wundheilungsprozesse auslöst, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Beginn der Wundheilung die HSV-1 Infektion begünstigen könnte. Wichtig ist hierbei zu berücksichtigen, dass das zu etablierende *ex vivo* HSV-1 Infektionsmodell vom Immunsystem des Wirtsorganismus abgekoppelt war und daher ausschließlich die molekulare Ebene der Zellen untersucht werden konnte. Wundheilungsprozesse waren also primär von den Keratinozyten in Nähe der Wunde selbst zu erwarten, diese konnten sich in einer Aktivierung der Keratinozyten äußern. Die Problematik mit der Aktivierung von Keratinozyten bestand darin, dass sie erst 2 Tage nach Verwundung einsetzte (persönliche Mitteilung PD Dr. I. Haase). Es war also schwer, *ex vivo* und in so kurzen Zeiträumen einen Teil des Wundheilungsprozess zu imitieren, dennoch zeigte sich, dass 22h nach Inkubation der verwundeten Mukosa in Keratinozyten-Medium und gefolgter HSV-1 Infektion (Abb.33C rechts) eine Zunahme der viralen Genexpression von HSV-1 im Vergleich zu einer direkten Infektion (Abb.33C links) zu verzeichnen war. Um einen direkten Vergleich zu gewährleisten wurde das Patientenmaterial wenn möglich halbiert, mechanisch verwundet und entweder direkt oder nach 22-stündiger Inkubation in Keratinozyten-Medium infiziert. So wurde anhand verschiedener Versuche zu verschiedenen Infektionszeiten (drei Versuche mit 3h p.i. bzw. 22h + 3h p.i., zwei Versuche mit 6h p.i. bzw. 22h + 6h p.i. und ein Versuch mit 24h p.i. bzw. 22h + 24h p.i.) eine Zunahme der viralen Genexpression von HSV-1 im direkten Vergleich beobachtet. Einzelexperimente mit verschiedenen Infektionszeitpunkten ohne/mit Inkubation konnten ebenfalls diese Tendenz aufzeigen. Interessanterweise verkleinerte sich das Verhältnis der Infektionseffizienz je höher die Infektionszeitpunkte lagen. 3h p.i. wurde teilweise keine ICP0-Expression nachgewiesen, wohingegen mit Inkubationsschritt ein deutliches ICP0-Signal zu erkennen war. Nach 24h p.i. war dagegen das Verhältnis aus direkter Infektion und Inkubationsschritt mit gefolgter Infektion sehr ähnlich. Der größte Unterschied dieses Verhältnisses wurde hierbei nach einer 6-stündigen Infektion verzeichnet (Abb.33C). Dies deutete an, dass durch die höheren Inkubationszeiten eine Veränderung der Keratinozyten einsetzt, die die Zellen für eine HSV-1 Infektion anfälliger macht.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Keratinozyten von verletztem Schleimhautgewebe in frühen Infektionszeitpunkten schlecht infizieren ließen. Interessanterweise war eine erhöhte Infektionseffizienz nach Vorinkubation der verletzten Mukosa in Keratinozyten-Medium zu beobachten.

## V. Diskussion

### 1. Die Bedeutung von Rac1 und Cdc42 für die frühe HSV-1 Infektion in Keratinozyten

Die Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 sind Schlüsselregulatoren des Aktin-Zytoskeletts, und spielen daher in den meisten fundamentalen Aktivitäten wie Zell-Polarität, Differenzierung, Bewegung, Migration, Proliferation und Überleben der Zelle eine entscheidende Rolle (zur Übersicht Heasman und Ridley, 2008). Pathogene besitzen die Fähigkeit die zelluläre Signaltransduktion für ihre Bedürfnisse zu nutzen oder anzupassen (zur Übersicht Münter et al., 2006). Ein prominenter Vertreter der Viren, welcher die Signaltransduktion der Rho GTPasen zur Optimierung der Infektion moduliert, ist das Vacciniavirus (zur Übersicht Frischknecht und Way, 2001). Studien zur Initiation der Infektion und Beteiligung der Rho GTPasen bzw. des Aktin-Zytoskeletts sind auch für Herpesviren bekannt, jedoch sind diese Untersuchungen meist in nicht-pathophysiologisch-relevanten Zelllinien durchgeführt worden (zur Übersicht Favoreel et al., 2007). Daher lag das zentrale Interesse dieser Arbeit in der Untersuchung der HSV-1 Infektion in den Epithel-Zellen der Haut/Schleimhäute, den humanen Keratinozyten, welche die *in vivo* Eintrittspforte in den Wirtsorganismus darstellen. Erste Studien in der Nierenepithel-Zelllinie MDCKII weisen auf eine HSV-1 Infektion hin, die von einer regulierten Rac1- und Cdc42-Signaltransduktion abhängig ist (Hoppe et al., 2006). Um eine potentielle Wechselwirkung der HSV-1 Infektion mit den Rho GTPasen auch in Keratinozyten zu untersuchen, wurden transiente Überexpressionen von Rho GTPase-Mutanten und RNA Interferenz-Studien mit Rho GTPase-siRNAs durchgeführt. Zusätzlich wurde die HSV-1 Infektion in muriner Epidermis, die in den Keratinozyten kein Rac1 exprimiert, analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Signaltransduktion von Rac1 und Cdc42 nicht für eine effiziente Initiation der HSV-1 Infektion in Keratinozyten benötigt wird, die konstitutiv aktiven Mutanten von Rac1 und Cdc42 jedoch das Potential haben mit der Infektion zu interferieren.

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 in HaCaT-Zellen analysiert. Hierbei wurde eine temporäre Veränderung der Aktivitätszustände während der frühen HSV-1 Infektion aufgezeigt. Eine Ursache für die Veränderung der Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 könnte die Bindung von HSV-1 an zelluläre Rezeptoren sein. Ein viel versprechender Kandidat ist der potentielle Eintrittsrezeptor Nektin-1, da er erstens in HaCaT-Zellen hoch-exprimiert vorliegt (Huber et al., 2001) und zweitens das Potential hat durch Trans-Interaktion mit anderen Nektinen Rac1 und Cdc42 zu aktivieren (Honda et al., 2003). So könnte die Bindung von HSV-1 an Nektin-1 und/oder die Wechselwirkung mit Nektin-1 während der Internalisierung die Signaltransduktion der Rho GTPasen stimulieren bzw. deren Aktivitätszustände verändern.

In Studien der frühen HSV-1 Infektion nach transienter Überexpression von Rac1- und Cdc42-Mutanten in HaCaT-Zellen wurde beobachtet, dass die Expression konstitutiv aktiver Mutanten die Anzahl infizierter Zellen drastisch verringern können. Dieser inhibierende Effekt blieb auch nach längerer Infektionszeit stabil. Die transiente Überexpression der dominant negativen Mutante von Cdc42 zeigte ebenfalls eine Reduktion der Infizierbarkeit, wohingegen die dominant negative Rac1-Mutante und die Wildtyp-Mutanten von Rac1 und Cdc42 keinen Effekt hatten. In MDCKII-Zellen sind ähnliche Effekte mit den Rho GTPase-Mutanten auf die frühe HSV-1 Infektion beschrieben (Hoppe et al., 2006). Zusätzlich zeigt Hoppe et al. (2006), dass die transiente Überexpression der Bindedomäne



von N-WASP, welche kompetitiv aktives Cdc42 bindet und damit einen dominant negativen Effekt auf die Signaltransduktion von Cdc42 ausübt, keinen Einfluss auf die HSV-1 Infizierbarkeit hat. Dies deutet an, dass der inhibierende Effekt mit der dominant negativen Cdc42-Mutante mit Vorsicht zu betrachten ist. Möglich wäre auch, dass die Unterdrückung eines ständigen Zyklus aus aktivem und inaktivem Cdc42 durch die transiente Überexpression der Cdc42-Mutanten zur Reduktion der Infizierbarkeit führt. Ein Beispiel hierfür findet sich in der Neuronenentwicklung von Drosophila, die durch die Überexpression der konstitutiv aktiven oder dominant negativen Mutanten der Rho GTPase Drac1 gestört ist (Luo et al., 1994). Da der inhibierende Effekt auf die Infizierbarkeit über die virale Genexpression von ICP0 analysiert wurde, könnten verschiedene Schritte des Viruseintritts durch die konstitutiv aktiven Mutanten blockiert sein. In MDCKII-Zellen ist zu beobachten, dass nicht die Internalisierung der Viren gestört ist, da sich Kapside im Zellinneren befinden. Aus diesem Grund wird vermutet, dass spätere Schritte der Infektion wie beispielsweise der Transport oder die virale Genexpression inhibiert sind (Hoppe et al., 2006). Da die Untersuchungen mit den Rho GTPase-Mutanten auch in Keratinozyten ähnliche Effekte auf die HSV-1 Infektion zeigten, ist anzunehmen, dass auch in Keratinozyten nicht die Internalisierung blockiert ist. Denkbar wäre eine Inhibition des Transports der Kapside entlang von Mikrotubuli, da die Rho GTPasen eine entscheidende Rolle bei den Mikrotubuli-basierten Transportvorgängen spielen (Palazzo und Gundersen, 2002; Wittmann et al., 2003). Des Weiteren könnte auch die virale Genexpression inhibiert sein. Eine mögliche Erklärung wäre die Induktion einer antiviralen Antwort über die Rho GTPase Rac1, welche das Potential besitzt über IRF-3 die Transkription der Interferon  $\beta$ -Gene anzuschalten (Ehrhardt et al., 2004). Erste Ergebnisse der Untersuchung zu einer potentiellen Immunisierung durch die transiente Überexpression der konstitutiv aktiven Rac1-Mutante in MDCKII-Zellen können dies jedoch nicht bestätigen. Fraglich bleibt, ob eine antivirale Antwort über IRF-3 überhaupt in MDCKII-Zellen oder humanen Keratinozyten ausgelöst werden kann. Daher wurden in MDCKII-Zellen sowohl die Wildtyp-Mutante als auch die dominant negative Mutante von IRF-3 transient überexprimiert. Ein Effekt auf die HSV-1 Infizierbarkeit wurde in anfänglichen Untersuchungen jedoch nicht festgestellt.

Um den potentiellen Einfluss der Signaltransduktion der Rho GTPasen während der frühen HSV-1 Infektion näher zu charakterisieren, wurden RNA Interferenz-Studien in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinozyten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Reduktion von endogenem Rac1 und/oder Cdc42 keinen Effekt auf die Infizierbarkeit oder die Virusproduktion von HSV-1 hatte. Dies galt auch für die Reduktion von RhoA. Erstaunlicherweise führten die Reduktionen der Rho GTPasen, die wichtige Schlüsselregulatoren der Zelle darstellen, nicht zu einer Veränderung der Zell-Morphologie oder hatten einen Einfluss auf die Proliferation und das Überleben der Keratinozyten. Dieses Phänomen kann auch in einer Studie zur Rac1-Reduktion in humanen adulten Keratinozyten ('normal human adult keratinocytes' (NHAK)) bestätigt werden, da die Rac1-Reduktion auch hier keinen Einfluss auf die Proliferation oder das Überleben der Zellen hat. Weiter können nur minimale Veränderungen der Zell-Morphologie in einer Teilpopulation der Keratinozyten beobachtet werden. Dennoch stellt diese Studie auch Unterschiede zu den Kontrollen heraus, wie beispielsweise die veränderte Expression von Keratin10 und Involucrin. Interessanterweise bleibt die Expression des Basalzellmarkers Keratin14 unverändert (Nikolova et al., 2008).

Um zu überprüfen, ob die Reduktion der Rho GTPasen auch in anderen Epithelzellen keinen Effekt auf die HSV-1 Infektion hat, wurden MDCKII-Zellen untersucht. Hierbei wurde nach Rac1-Reduktion ähnlich zu den humanen Keratinozyten kein Effekt auf die Infizierbarkeit festgestellt, wohingegen die Cdc42-Reduktion zur Auflösung von Zell-Zell-Kontakten führte und sich, durch die vermeintlich bessere Zugänglichkeit für das Virus, eine höhere Infektionseffizienz einstellte. In MDCKII-Zellen tritt HSV-1 bevorzugt über basolaterale Membranen ein, sodass in konfluenten Kulturen fast keine Infektion nachgewiesen werden kann (Schelhaas et al., 2003). Erst nach Verletzung oder Calcium-Verringerung zeigt sich eine drastische Erhöhung der Infizierbarkeit (Topp et al., 1997; Yoon und Spear, 2002; Schelhaas et al., 2003). Daher ist die Erhöhung infizierter Zellen nach Auflösung der Zell-Zell-Kontakte durch die Cdc42-Reduktion vermutlich ein Sekundäreffekt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Reduktion von Rac1 und Cdc42 keinen offensichtlichen Einfluss auf die Initiation der HSV-1 Infektion sowohl in humanen Keratinozyten als auch in MDCKII-Zellen hatte.

Durch die Verwendung der RNA Interferenz können zwar hohe Reduktionseffizienzen erreicht werden, allerdings besteht die Möglichkeit, dass noch geringe Konzentrationen der entsprechenden Rho GTPasen nach Reduktion in den Zellen vorhanden sind. Falls Rac1 und/oder Cdc42 für eine erfolgreiche Initiation der HSV-1 Infektion essentiell sind, könnten diese kleinen Mengen möglicherweise ausreichend sein. Daher bestand das Interesse in einem transgenen Maus-Modell, welches kein Rac1 exprimiert, die frühe HSV-1 Infektion zu untersuchen. Da die Rac1 KO-Maus zur Letalität in der frühen Embryogenese führt (Sugihara et al., 1998), wurde eine konditionale transgene Maus verwendet, die Keratinozyten-spezifisch kein Rac1 exprimiert (Rac1 E-KO). Um die Bedeutung von Rac1 in der frühen HSV-1 Infektion zu untersuchen, wurde zunächst ein *ex vivo* Infektionsmodell von muriner Wildtyp-Epidermis etabliert. Hierbei ließ sich die ICP0-Expression in den basalen Keratinozyten der isolierten Epidermis 3h p.i. visualisieren. Die Studien in der Rac1 E-KO-Maus wiesen ähnlich zu den RNA Interferenz-Analysen keine Unterschiede in der Infizierbarkeit von HSV-1 auf. Obwohl Unterschiede in der späten Phasen der Infektion wie die virale Ausbreitung in suprabasale Keratinozyten-Schichten nicht ausgeschlossen werden können, ist die initiale HSV-1 Infektion in der Basalzellschicht der Epidermis Rac1-unabhängig. Der Phänotyp der Rac1 E-KO-Maus zeigt keine offensichtlichen Defekte in der interfollikulären Epidermis, im Gegensatz dazu ist die Haarfollikel-Ausbildung gestört (Chrostek et al., 2006). Da die interfollikuläre Epidermis keine offensichtlichen Defekte in der Rac1 E-KO-Maus besitzt, überrascht es nicht, dass auch die frühe HSV-1 Infektion nicht beeinflusst wird. Interessanterweise macht sich die Abwesenheit von Rac1 erst nach physiologischem Stress wie bei Verwundungen bemerkbar, da der Wundheilungsprozess in der Haut vermindert abläuft und sogar in der oralen Schleimhaut ganz ausbleibt (Tschardt et al., 2007; Castilho et al., 2010).

Um den inhibierenden Effekt der konstitutiv aktiven Mutanten auf die Infizierbarkeit von HSV-1 näher zu untersuchen, wurden *ex vivo* Infektionsstudien in der Epidermis einer L61Rac1 konditionalen transgenen Maus durchgeführt. Diese Epidermis wurde sowohl mit der Epidermis einer N17Rac1 konditionalen transgenen Maus und mit Wildtyp-Tieren verglichen und es zeigte sich, dass die Infizierbarkeit der L61Rac1-Epidermis nicht reduziert war. Infektionsstudien in isolierten Keratinozyten der L61Rac1 transgenen konditionalen Maus kamen zu einem ähnlichen Resultat. Eine Begründung

könnte hierbei das Expressionslevel der konstitutiv aktiven Mutante darstellen, welches im Vergleich zu einer transienten Überexpression sehr gering war.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die Signaltransduktion der Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 nicht für die Initiation der HSV-1 Infektion in Keratinozyten essentiell ist und die Virus-induzierte Veränderung der Aktivitätszustände von Rac1 und Cdc42 vermutlich keine funktionale Bedeutung hat. Aufgrund des inhibitorischen Effekts der konstitutiv aktiven Mutanten von Rac1 und Cdc42 kann vermutet werden, dass eine effiziente HSV-1 Infektion eine Herunterregulierung der Aktivitätszustände der Virus-induzierten Rac1- und Cdc42-Aktivitäten benötigt. Dies könnte bedeuten, dass die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts während der viralen Infektion wichtig ist.

## **2. Die Charakterisierung der HSV-1 Internalisierung in humane Keratinozyten**

Für den Eintritt von Viren in die Zellen sind verschiedene Eintrittsmechanismen beschrieben, die vom Virustyp und von der Zelllinie bzw. deren Oberflächenrezeptoren abhängen (zur Übersicht Mercer et al., 2010). Für HSV ist dabei die direkte Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran, ein pH-Wert-abhängiger und ein pH-Wert-unabhängiger endozytotischer Eintrittsmechanismus beschrieben (Fuller und Spear, 1987; Fuller et al., 1989; Wittels und Spear, 1991; Fuller und Lee, 1992; Nicola et al., 2003, 2005; Gianni et al., 2004; Nicola und Straus, 2004; Milne et al., 2005). Da die primäre Eintrittspforte von HSV-1 in den Wirtsorganismus das Epithel der Schleimhaut, Haut und Kornea darstellt, war es entscheidend den Eintrittsmechanismus in Keratinozyten im Detail zu charakterisieren. Ein wichtiges Merkmal, um die Modulation der zellulären Signaltransduktion beim HSV-1 Eintritt zu verstehen, ist die Internalisierung des Virus in die Wirtszelle.

Zunächst wurde elektronenmikroskopisch die Internalisierung von HSV-1 sowohl in HaCaT-Zellen als auch in humanen primären Keratinozyten analysiert. Erstaunlicherweise wurden Kapside im Zytoplasma und Viruspartikel in Vesikeln beobachtet. Die Daten deuten daher auf eine Internalisierung sowohl über direkte Fusion mit der Plasmamembran als auch über einen endozytotischen Weg. Viren besitzen zwar das Potential verschiedene Internalisierungswege zu nutzen, jedoch ist die Internalisierung meist von der verwendeten Zelllinie oder der Expression von bestimmten Oberflächenrezeptoren abhängig (siehe Einleitung). Die Verwendung von verschiedenen Internalisierungswegen innerhalb einer Zelllinie durch ein bestimmtes Virus ist dagegen in der Literatur nur selten zu finden. So zeigen Infektionsstudien von Parvoviren des Schweins (‘porcine parvovirus’ (PPV)) in Schweinefibroblasten, dass die Internalisierung vermutlich über verschiedene endozytotische Mechanismen ablaufen kann. Wird die Calthrin-vermittelte Endozytose oder die Makropinozytose durch einen spezifischen Inhibitor blockiert, führt dies in beiden Fällen zur Reduktion der Infizierbarkeit auf 50%. Interessanterweise führt auch die Verwendung der Kombination beider Inhibitoren nicht zur vollständigen Inhibition der Infektion. Daher vermuten die Autoren sogar, dass noch ein dritter Internalisierungsweg eine entscheidende Rolle spielt (Boisvert et al., 2010). Auch die Internalisierung des Adeno-assoziierten Virus Typ5 (AAV5) kann in humanen embryonalen Fibroblasten über zwei endozytotische Internalisierungswege ablaufen (Clathrin-vermittelte und Caveolae-vermittelte Endozytose) (Bantel-Schaal et al., 2009). Die Frage hinter einem multiplen Internalisierungsmechanismus ist, ob die Viruspartikel in den unterschiedlichen Aufnahmevehikeln oder nach direkter Fusion auch zu einer produktiven Infektion beitragen. Denkbar wäre also, dass die

Viruspartikel in Vesikeln bei der HSV-1 Internalisierung in humane Keratinozyten zur lysosomalen Degradation führen, da 30min p.i. größere Vesikelstrukturen mit Viruspartikeln und anderem Material elektronenmikroskopisch beobachtet wurden. Ein Argument gegen eine lysosomale Degradation ist die Abwesenheit von Koloalisierungsereignissen der Viruspartikel mit Lysosomen in Immunfluoreszenz-Färbungen. Welcher Internalisierungsweg zu einer produktiven Infektion führt, ist experimentell schwierig zu beantworten, dennoch deuten die Daten erstmals auf einen dualen Internalisierungsmechanismus von HSV-1 in humane Keratinozyten. Zusätzlich unterschieden sich die Verhältnisse beider potentieller Mechanismen in den verwendeten humanen Keratinozyten. So wurden 10min p.i. in humanen primären Keratinozyten im Gegensatz zu den HaCaT-Zellen mehr Viruspartikel in Vesikeln als Kapside im Zytoplasma gefunden. HaCaT-Zellen sollten im Wesentlichen die Eigenschaften von basalen primären Keratinozyten besitzen, welche auch beim Wachstums- und Differenzierungsverhalten in Kultur beobachtet werden kann (Boukamp et al., 1988) oder sich am Beispiel der Expression von  $\alpha 5$ -Integrin und Keratin1 verdeutlichen lässt (Pivarcsi et al., 2001). Andererseits sind auch Unterschiede der HaCaT-Zellen zu den humanen primären Keratinozyten beschrieben. Ein Beispiel ist die Expression des Keratinpaars K1/K10 im Hinblick auf einen abnormalen Vitamin A-Metabolismus (Törmä et al., 1999). Die Unterschiede in den potentiellen Internalisierungswegen verdeutlichen, dass eine Verallgemeinerung von Zelllinien und primären Zellen mit Vorsicht zu betrachten ist.

Unsere Arbeitsgruppe hat begonnen die Bedeutung von Dynamin für die HSV-1 Aufnahme in Keratinozyten zu untersuchen. Inhibitorstudien in HaCaT-Zellen und humanen primären Keratinozyten zeigen, dass die Blockierung der GTPase-Aktivität von Dynamin2 durch den Inhibitor Dynasore (Macia et al., 2006) zu einer konzentrationsabhängigen Blockierung der HSV-1 Infektion führt (Diplomarbeit, Elena Rahn, 2009). Um die Bedeutung von Dynamin2 für die HSV-1 Internalisierung in die basalen Keratinozyten in intakter Epidermis nachzuweisen, wurde Dynasore auch in murinem Gewebe *ex vivo* verwendet. Interessanterweise zeigte sich hierbei, dass Dynasore auch die HSV-1 Infektion in den basalen Keratinozyten der Epidermis konzentrationsabhängig inhibiert.

Eine Funktion von Dynamin2 ist die Abschnürung der membrangebundenen Vesikel ins Zellinnere ('membrane fission'), die beispielsweise bei der Clathrin-vermittelten Endozytose genutzt wird (zur Übersicht Mettlen et al., 2009). Dynasore kann daher durch Inhibition von Dynamin2 den Zustand invaginierter Vesikel stabilisieren (Macia et al., 2006). Um diesen Effekt bei der Internalisierung von HSV-1 in humanen Keratinozyten näher zu charakterisieren, sollten elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Die Problematik von elektronenmikroskopischen Infektionsstudien ist die erforderliche Virusmenge, die eingesetzt werden muss, damit genügend Viruspartikel analysiert werden können. Daher gestaltet sich der Einsatz von Inhibitoren schwierig, da durch die hohen Virusmengen inhibitorische Effekte überkommen werden können. Aus diesem Grund muss auch die Inhibitorosis erhöht werden. Dies wiederum kann für die Zellen toxisch sein. Im Fall von Dynasore ließen sich allerdings elektronenmikroskopische Untersuchungen durchführen, da bei einer nicht-zelltoxischen Konzentration von Dynasore eine fast 100%ige Inhibition stattfand.

Im Detail zeigte sich hierbei sowohl in HaCaT-Zellen als auch in humanen primären Keratinozyten, dass nach Dynasore-Behandlung fast keine Viruspartikel mehr in den Zellen zu beobachten waren. Interessanterweise blockierte Dynasore daher nicht nur die Dynamin2-abhängige endozytotische

Aufnahme, sondern möglicherweise auch die direkte Fusion. Besonders in primären Keratinozyten waren Viruspartikel an invaginierten Stellen der Plasmamembran zu finden. In den primären Keratinozyten waren alle Stufen einer Invagination zu beobachten, wohingegen in HaCaT-Zellen Viruspartikel nur in leichten Einstülpungen gefunden wurden. Der Grund hierfür beruht vermutlich auf verschiedenen Beobachtungen. Erstens wurden in HaCaT-Zellen 10min p.i. im Vergleich zu primären Keratinozyten mehr Kapside im Zytoplasma gefunden, daraus kann geschlussfolgert werden, dass auch weniger Viren über einen endozytotischen Schritt ins Zellinnere gelangen. Zweitens befanden sich in HaCaT-Zellen vielmehr Viruspartikel an Ausläufern und nicht direkt an der Zelloberfläche, somit konnten wiederum weniger Invaginationseignisse analysiert werden. Ein dritter Grund könnte der bereits erwähnte Unterschied der Zelllinie im Vergleich zu den primären Zellen sein.

Möglicherweise spielt Dynamin2 auch bei der direkten Fusion eine entscheidende Rolle, da auch in Vero-B4-Zellen, bei denen eine Internalisierung über direkte Fusion beschrieben ist (Nicola et al., 2003; Milne et al., 2005), durch Behandlung mit Dynasore die HSV-1 Infektion blockiert ist (Diplomarbeit, Elena Rahn, 2009). Denkbar wäre, dass Dynasore eine potentielle Funktion von Dynamin2 (z.B. eine Auflockerung) an dem Aktin-Kortex inhibiert. Der Aktin-Kortex ist eine mehrere hundert Nanometer dünne Schicht eines quervernetzten Aktin-Netzwerks direkt unter der Plasmamembran, welches direkt-fusionierte Viren zum Übergang ins Zytoplasma passieren müssen. Eine direkte Verbindung von Dynamin2 zum Aktin-Zytoskelett ist beispielsweise in Sertoli-Zellen bei der phagozytischen Aufnahme beschrieben (Otsuka et al., 2009). Der Einfluss von Dynamin2 auf F-Aktin-reiche Strukturen zeigt sich vermutlich im Komplex mit Cortactin, welches sowohl direkt an Aktin-Filamente als auch an Dynamin binden kann (Mooren et al., 2009). Interessanterweise ist ein Hauptwirkungsbereich von Cortactin ('cortical actin binding protein') der Aktin-Kortex (zur Übersicht Ammer und Weed, 2008). Unsere Ergebnisse sind ein erster Hinweis für eine Dynamin-Abhängigkeit der HSV-1 Internalisierung in humanen Keratinozyten und legen nahe, dass verschiedene Internalisierungswege blockiert werden.

Um die Bedeutung einer endozytotischen Aufnahme von HSV-1 in humane Keratinozyten näher zu charakterisieren, wurden Inhibitor- und Kolokalisierungsstudien durchgeführt. In HaCaT-Zellen wurde nach Verwendung von Ammoniumchlorid, welches die Ansäuerung von Endosomen verhindert, eine konzentrationsabhängige Inhibition der Infizierbarkeit beobachtet. Auch der Einsatz von hypertonischem Medium, welches die Clathrin-vermittelte Endozytose blockieren kann (Greene und Gao, 2009), führte in HaCaT-Zellen zu einer leichten Verringerung der HSV-1 Infektion. Beide Inhibitoren führten grundsätzlich bei mittleren Konzentrationen zu einer Reduktion der Anzahl infizierter Zellen. Erst nach Verwendung von hohen Konzentrationen war eine vollständige Inhibition der Infizierbarkeit zu erreichen. Zusätzlich war bei den mittleren Konzentrationen auch der Infektionsverlauf pro infizierter Zelle verändert. Dies konnte anhand der Lokalisierung von ICP0 beobachtet werden. Da ICP0 zunächst im Zellkern und im späteren Verlauf der Infektion ins Zytoplasma relokalisiert, zeigte die Verwendung von mittleren Konzentrationen eine Verzögerung des Infektionsverlaufs. Zu berücksichtigen ist bei Verwendung der hohen Konzentrationen, dass sich die Zellkerne veränderten. Daher war nicht eindeutig zu klären, ob die virale Genexpression von HSV-1 aufgrund eines toxischen Effekts der Zelle ausblieb. Da die Infizierbarkeit anhand der Analyse der viralen Genexpression von ICP0 überprüft wurde, kann nicht zwischen einer Blockierung der

Internalisierung und einem toxischen Effekt auf die zelluläre Genexpression unterschieden werden. Denkbar wäre also, dass durch den Einsatz von Ammoniumchlorid bzw. Dextrose bei mittleren Konzentrationen die potentielle endozytotische Aufnahme blockiert ist, die potentielle direkte Fusion aber noch ablaufen könnte und daher eine Reduktion der Infizierbarkeit und eine Verzögerung des Infektionsverlaufs zu beobachten war. Eine direkte Untersuchung der eindringenden Viruspartikel ist daher erforderlich.

Kolokalisierungsstudien der Viruspartikel mit frühen Endosomen zeigten, dass sich Viruspartikel in frühen Endosomen sowohl in HaCaT-Zellen als auch in humanen primären Keratinozyten 30min p.i. befanden. Untersuchungen mit einem Lysosomen-Marker zeigten dagegen keine Kolokalisierungen. Interessanterweise war die Kolokalisierung erst 30min p.i. zu beobachten, wobei in den EM-Versuchen schon zwischen 2 und 10min p.i. umhüllte Viruspartikel in Vesikeln zu finden waren. Möglicherweise führte die erforderliche hohe Virusmenge in den EM-Versuchen zu einer beschleunigten Internalisierung der Viruspartikel oder die Vesikelstrukturen 2 und 10min p.i. waren (noch) keine Endosomen. Ein Beispiel für eine endozytotische Aufnahme, die nicht mit frühen Endosomen verschmelzen, ist die Caveolae-vermittelte Endozytose, die Kompartimente der frühen und späten Endosomen bzw. die lysosomale Degradation umgehen kann. Andererseits sind Caveosomen im Gegensatz zu Clathrin-umhüllten Vesikeln sehr zähe Vesikel, die mehrere Minuten für eine Abschnürung benötigen (zur Übersicht Doherty und McMahon, 2009). Zusätzlich zeigen erste Studien mit Inhibitoren der Caveolae-vermittelten Endozytose in humanen Keratinozyten, dass HSV-1 vermutlich nicht über Caveosomen in die Zelle gelangt (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe Mörsdorf).

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Internalisierung von HSV-1 in humane Keratinozyten sowohl über direkte Fusion mit der Plasmamembran als auch über einen endozytotischen Weg abläuft. Es zeigt sich hierbei, dass die Internalisierung Dynamin2-abhängig ist. Über die Infektiosität der aufgenommenen Kapside oder Viruspartikel in Vesikeln kann jedoch noch keine Aussage getroffen werden. Initiale Inhibitor- und Kolokalisierungsstudien stellen die Bedeutung eines endozytotischen Internalisierungswegs heraus, der möglicherweise pH-Wert-abhängig ist.

### **3. Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion in Gewebe**

Die primäre Infektion von HSV-1 findet im Epithel der Mukosa, Haut oder Kornea statt. Keratinozyten bilden dabei die Eintrittspforte in den Wirtsorganismus. Die HSV-1 Infektion ist in Zellkultur gut charakterisiert und beruht meist auf Untersuchungen in Zelllinien, die in der *in vivo* Infektion keine Rolle spielen. Wie sich der Infektionsverlauf nach Reaktivierung im lebenden Organismus verhält, ist im Tier-Modell untersucht, wobei die initiale Infektion und der Eintrittsweg von HSV-1 in die Epithelien noch nahezu unerforscht sind. Das zentrale Interesse war daher, die HSV-1 Infektion im Gewebe *ex vivo* zu charakterisieren. Zusätzlich konnte so auch die Barrierefunktion der Haut näher untersucht werden. Zunächst wurde ein Infektionsmodell in der Maus etabliert, da durch die Verwendung von transgenen Mäusen bestimmte Fragestellungen beantwortet werden können. Dennoch war es entscheidend auch ein humanes Infektionsmodell *ex vivo* aufzustellen, um die HSV-1 Infektion möglichst nah an einer *in vivo* Infektion zu untersuchen. Hierzu wurden Infektionsstudien in humaner oraler Schleimhaut, die gleichzeitig auch eine Eintrittspforte von HSV-1 *in vivo* darstellt, durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die basalen Keratinozyten infizieren lassen, sobald durch Dispasell-Behandlung eine Zugänglichkeit geschaffen wurde. Von der apikalen Seite dagegen ereignet sich keine Infektion. Erste Verwundungsstudien deuten an, dass der Eintrittsweg von HSV-1 in die humane Schleimhaut von der Zugänglichkeit zu Keratinozyten im Wundbereich abhängt.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die murine Haut oder die humane orale Mukosa in Virussuspension inkubiert, jedoch führte dies nicht zu einer Infektion in den Keratinozyten. Die Dermis und/oder Basalmembran stellte möglicherweise von der basalen Seite und die Hornhaut von der apikalen Seite eine effiziente Barriere dar. Nagetiere besitzen außerdem unter der Haut noch eine Muskelschicht (Panniculus carnosus), die ebenfalls den Zugang des Virus zu den Keratinozyten blockieren könnte. In einer Infektionsstudie in lebenden Mäusen ist gezeigt, dass die Basalmembran nach intradermaler Injektion von HSV-1 für die Zugänglichkeit des Virus zu Keratinozyten möglicherweise eine Barriere darstellt. Dies wird auch durch die Infektionsanalyse von Vero-B4-Zellen, die in einem Zwei-Kammer-System durch eine künstliche Basalmembran von der Virussuspension separiert sind und nicht infiziert werden können, verdeutlicht (Weeks et al., 2000). Von der apikalen Seite der murinen Epidermis kann keine Infektion stattfinden, da die dicke Hornschicht aus toten Keratinozyten, die durch Zellkernverlust und vollständige Keratinisierung gekennzeichnet sind, keine Virusvermehrung mehr zulässt. Die humane Schleimhaut dagegen weist allgemein entweder nur eine anfängliche oder gar keine Verhornung auf (zur Übersicht Squier und Kremer, 2001). Für die Infektionsstudien wurden größtenteils humane Schleimhautstücke von Bereichen des Zahnfleisches, welches eine anfängliche Verhornung zeigt, verwendet. Im Gegensatz zur murinen Hornhaut sind in der epidermalen Mukosa größtenteils noch Zellkerne, wenn auch klein und geschrumpft, bis in die obersten Schichten zu erkennen (zur Übersicht Berkowitz et al., 2009). Diese nicht vollständig-keratinisierten Schichten (Parakeratinisierung) waren vermutlich nicht mehr stoffwechselaktiv genug, um zur Vermehrung des Virus beizutragen.

Da keine Infektion in den Keratinozyten in der unverletzten murinen Haut bzw. humanen Mukosa festzustellen war, wurden verschiedene Reagenzien verwendet, um die Epidermis von der Dermis zu trennen. Wie auch schon die Studie von Schelhaas et al. (2003) in humaner Vorhaut zeigt, ist die Zugänglichkeit der basalen Keratinozyten für eine erfolgreiche HSV-1 Infektion notwendig. Für die anfängliche Untersuchung der verschiedenen Separierungsreagenzien wurde zunächst murine Haut verwendet. Es zeigte sich, dass Dispasell für eine effiziente Trennung der Epidermis von der Dermis verwendet werden konnte. Auch die Infektion der basalen Keratinozyten der interfollikulären Epidermis konnte hiermit veranschaulicht werden. Dispasell war jedoch im Gegensatz zu EDTA als Separierungsreagenz in der interfollikulären Epidermis reaktiver und führte teilweise zum Verlust von Haarfollikel und Talgdrüsen. EDTA war zwar schonender, aber erstaunlicherweise fand keine Infektion der basalen Keratinozyten mehr statt. Die Vermutung liegt nahe, dass die beiden Reagenzien eine unterschiedliche Trennung der Epidermis von der Dermis zeigen. Eine mögliche Erklärung könnte die potentielle Barrierefunktion der Basalmembran sein. Aus diesem Grund wurden die Reagenzien im Hinblick auf die Lokalisierung von Basalmembran-Markern analysiert. Dispasell ist ein bakterielles Enzym, das die Eigenschaft einer Typ IV Kollagenase und Fibronektinase besitzt (Gipson und Grill, 1982; Stenn et al., 1989), wohingegen EDTA ein chemischer Komplexbildner ist, der zur Auflösung von Calcium-abhängigen 'Adherens Junction' und Desmosomen führt (Spurr und Gipson, 1985).

EDTA sollte also die Basalmembran unbeeinflusst lassen und nur in der Verbindung der basalen Keratinozyten untereinander bzw. in den Kontaktstellen der Keratinozyten zur Basalmembran aktiv sein, wohingegen Dispasell innerhalb der Basalmembran schneiden sollte. Die Ergebnisse zeigen, dass EDTA vermutlich zur Ablösung der Basalmembran von der Epidermis führt, da im Gegensatz zu Dispasell fast keine Basalmembran-Marker mehr nachzuweisen waren. Ähnliche Resultate sind auch im Epithel der Kornea nach Dispasell- bzw. EDTA-Behandlung und in der Mukosa nach EDTA-Behandlung zu beobachten (Spurr und Gipson, 1985; Holmstrup et al., 1985). Die Inhibition der Infektion der basalen Keratinozyten nach EDTA-Behandlung hatte daher vermutlich eine andere Ursache. Eine mögliche Erklärung wäre die Dispasell-Behandlung, die im Gegensatz zu EDTA teilweise zum Abrunden der basalen Keratinozyten führte und damit eventuell eine bessere Zugänglichkeit zu Oberflächenrezeptoren für HSV-1 gewährleistete.

Infektionsstudien in der humanen Mukosa zeigten, dass sich die basalen Keratinozyten ähnlich wie in der murinen Epidermis nach Dispasell-Behandlung effizient infizieren ließen. Die Epidermis der humanen Mukosa ist im Gegensatz zu der murinen Epidermis dicker und fingerartig mit der Dermis verknüpft (zur Übersicht Berkowitz et al., 2009). Die Dicke der epidermalen Mukosa hatte den Vorteil den Eintrittsweg von HSV-1 in das Gewebe über verschiedene epidermale Schichten verfolgen zu können. Es zeigte sich, dass nach längeren Infektionszeiten auch suprabasale Keratinozyten-Schichten der Epidermis infiziert wurden. Möglicherweise führte neu-gebildetes Virus der basalen Keratinozyten-Schicht zu einer Infektion suprabasaler Schichten, oder das Virus hatte durch die Dispasell-Behandlung bessere Zugänglichkeit zu suprabasalen Schichten.

Die Experimente zeigen, dass ein Zugang zu den Keratinozyten geschaffen werden muss, damit sich eine produktive Infektion in den Keratinozyten etablieren kann. Daher kann geschlussfolgert werden, dass einer *in vivo* Infektionssituation eine Verwundung oder Mikroläsion des Epithels vorausgeht. Um erste Erfahrungen mit Verwundungsexperimenten in einem Maus-Modell zu sammeln, wurde eine konditionale transgene Maus verwendet, bei der die Wundheilung verzögert ablief. Bei dieser Maus war das Protein Necl2 Keratinozyten-spezifisch überexprimiert (Giangreco et al., 2009). Necl2 gehört zu der Familie von Adhäsionsmolekülen, zu denen auch der potentielle Eintrittsrezeptor Nektin-1 zählt. Der Phänotyp dieser Maus zeigt keine offensichtliche Defekte in der Homöostase der Haut, dennoch ist die epidermale Proliferation reduziert. Erst bei einer Verwundung zeigt sich, dass die Wundheilung verzögert ist (Giangreco et al., 2009). Anfängliche *ex vivo* Infektionsstudien in der Necl2 konditionalen transgenen Maus ohne Verwundung zeigten, dass sich kein Unterschied in der Infektion basaler Keratinozyten und bei der Ausbreitung von HSV-1 in suprabasale Keratinozyten-Schichten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren einstellte. Es sind weitere Infektionsstudien geplant, um die Infizierbarkeit der Epidermis in einer Verwundungssituation zu überprüfen.

Um den Eintrittsweg von HSV-1 und die Rolle der Barrierefunktion in humaner Mukosa näher zu charakterisieren, wurden Infektionsstudien nach mechanischen Verwundungen der Schleimhaut durchgeführt. Es wurden verschiedene Arten von mechanischer Verwundung getestet, allerdings zeigte das Anschneiden der Schleimhaut mit nachfolgender Inkubation in Virussuspension die besten Erfolge. Nach mechanischer Verwundung wurden infizierte Keratinozyten entlang der Verwundungslinie beobachtet. Interessanterweise erhöhte sich die Zahl infizierter Zellen bei Inkubation der verwundeten Mukosa für 22h in Keratinozyten-Medium. Die mechanische Verwundung



*ex vivo* kann die Wundsituation bzw. den Wundheilungsprozess *in vivo* nicht nachstellen, da das Modell einerseits vom Immunsystem abgekoppelt und andererseits nicht mehr mit dem Blutkreislauf verbunden ist. Daher konzentriert sich die Untersuchung einer mechanischen Wunde *ex vivo* auf die molekularen Determinanten der Zellen. *In vivo* führt eine Wunde zur Aktivierung von Keratinozyten. Hierbei verlassen die Keratinozyten an dem Wundrand ihren basalen oder differenzierten Zustand und beginnen zu proliferieren und zu migrieren. Dabei sezernieren sie Zytokine und Wachstumsfaktoren, die für die Stimulation anderer Keratinozyten sorgen (zur Übersicht Morasso und Tomic-Canic, 2005). Die Inkubation der verwundeten Mukosa *ex vivo* könnte zumindest den Beginn einer Aktivierung darstellen, da die Keratinozyten am Wundrand 22h nach Inkubation abgerundeter waren. Eine andere Möglichkeit für das Abrunden könnte auch die lange Inkubation der Mukosa im Medium sein. Nichtsdestotrotz führte die Inkubation der verwundeten Mukosa zu einer Erhöhung infizierter Zellen. Interessanterweise zeigte die Infektion der basalen Keratinozyten nach Dispasell-Behandlung eine höhere Infizierbarkeit als nach mechanischer Verwundung und/oder Inkubation der verwundeten Schleimhaut in Keratinozyten-Medium. Der Grund könnte der Grad der Differenzierung sein, da in der Wundsituation alle Keratinozyten-Schichten Zugang zur Virussuspension hatten. Dies könnte bedeuten, dass sich basale Keratinozyten effizienter infizieren lassen.

Die HSV-1 Infektionsstudien in der humanen oralen Mukosa *ex vivo* bilden zum ersten Mal die Möglichkeit den Eintritt von HSV-1 im *in vivo* Epithel zu untersuchen. Aufgrund der hohen Variabilität der Schleimhautproben kann nur ein gewisser Prozentsatz für Infektionsanalysen verwendet werden, um eine gewisse Vergleichbarkeit aufrecht zu erhalten. Ein weiteres Problem ist die Kurzlebigkeit des Gewebes in Zellkultur. Daher wäre der Einsatz von organotypischen Zellkultur-Modellen für weiterführende Fragestellungen sinnvoll. Durch diese standardisierteren Versuchsbedingungen der organotypischen Modelle könnten viele Bedingungen erprobt oder etabliert und schließlich im Gewebe *ex vivo* überprüft werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die unverletzte Haut bzw. Schleimhaut eine effiziente Barriere für HSV-1 in den Wirtsorganismus darstellt. Erst die Vermittlung eines Zugangs zu den stoffwechselaktiven Keratinozyten durch Dispasell oder Verwundung führt zu einer produktiven Infektion.

#### **4. Ausblick**

**4.1** Untersuchungen der frühen HSV-1 Infektion in humanen Keratinozyten und in der murinen Epidermis zeigten, dass die Initiation der Infektion nicht von der Rac1-/Cdc42-Signaltransduktion abhängig war, aktive Mutanten von Rac1/Cdc42 aber mit der Infektion interferieren konnten. Die Rac1-defiziente murine Epidermis weist keine offensichtlichen Defekte in der interfollikulären Epidermis auf, erst nach Verwundung stellt sich die Bedeutung von Rac1 heraus, da der Wundheilungsprozess verzögert abläuft bzw. in der murinen epidermalen Mukosa ganz ausbleibt (Chrostek et al., 2006; Tschardtke, et al., 2007; Castilho et al., 2010). In dieser Arbeit wurden *ex vivo* Infektionsstudien in der Rac1 E-KO-Maus in unverwundeter Epidermis durchgeführt. Da allgemein angenommen wird, dass eine Verwundung oder Mikroläsion der Haut einer produktiven Infektion vorausgeht, wäre die *ex vivo* Untersuchung der frühen Infektion in der Epidermis bzw. der epidermalen Mukosa der Rac1 E-KO-Maus nach Verwundung sehr interessant. Da die Abwesenheit von Rac1 zu einer abnormalen Wundheilung führt, könnte die HSV-1 Infektion im Wundbereich der

Rac1 E-KO-Maus im Vergleich zu Wildtyp-Tieren anders ablaufen. Zum Vergleich wäre auch die *ex vivo* Analyse der frühen HSV-1 Infektion in der Necl2 konditionalen transgenen Maus, bei der Necl2 Keratinozyten-spezifisch überexprimiert ist, sinnvoll, da auch hier eine Verzögerung der Wundheilung beobachtet wird (Giangreco et al., 2009).

**4.2** Elektronenmikroskopische Untersuchungen der HSV-1 Internalisierung in humanen Keratinozyten zeigten, dass sowohl Kapside im Zytoplasma als auch umhüllte Viruspartikel in Vesikel zu beobachten waren. Weiter wurde ermittelt, dass die Internalisierung Dynamin2-abhängig war. Erste Inhibitor- und Kollokalisierungsstudien deuten auf die Beteiligung eines endozytotischen Aufnahmemechanismus hin. Zur weiteren Charakterisierung der HSV-1 Internalisierung in Keratinozyten könnten weitere Inhibitorstudien durchgeführt werden, die bislang durch die Quantifizierung der viralen Genexpression stattfand. Um die Quantifizierungsmethode zu erweitern, wäre die Analyse der eintretenden Viren durch 'live cell imaging' mit Virusrekombinanten denkbar. So könnte eine dreifach-fluoreszierende HSV-1 Rekombinante verwendet werden, bei der die Virushülle, das Tegument und das Kapsid fluoreszieren (De Oliveira et al., 2008), um die potentiellen Internalisierungswege von HSV-1 zu unterscheiden. Außerdem wäre die Entschlüsselung des Eintrittsrezeptors von HSV-1 in Keratinozyten wichtig. Ein möglicher Kandidat ist der Eintrittsrezeptor Nektin-1, welcher in humanen Keratinozyten hoch-exprimiert ist (Huber et al., 2001). Hierzu könnten Infektionsanalysen mittels RNA Interferenz von Nektin-1 oder Blockierungen mit Nektin-1-Antikörpern durchgeführt werden. Anfängliche RNA Interferenz-Studien mit Nektin-1-siRNAs in HaCaT-Zellen zeigten allerdings keine Reduktion von Nektin-1. Interessant wäre auch die Analyse der frühen HSV-1 Infektion in der Nektin-1 KO-Maus, wie sie bei Barron et al. (2008) beschrieben ist. Die Verwendung dieser transgenen Maus, deren Keratinozyten kein Nektin-1 exprimieren, könnte eine direkte Aussage über die Bedeutung von Nektin-1 als potentiellen Eintrittsrezeptor machen. Initiale Studien deuten an, dass vermutlich nicht nur Nektin-1 bei der produktiven Infektion von HSV-1 in Keratinozyten eine Rolle spielt.

**4.3** Studien zum Eintritt von HSV-1 in das Epithel von muriner Haut und humaner oraler Mukosa zeigten, dass eine produktive Infektion erst dann möglich war, wenn ein direkter Zugang zu den stoffwechselaktiven Keratinozyten geschaffen wurde. Dies wurde auch in ersten Verwundungsexperimenten in humaner oraler Schleimhaut festgestellt. Es bestehen bereits mehrere Modellansätze wie das 'skin organ culture model' oder das 'human skin chamber model', um humanes Hautgewebe *ex vivo* für längere Zeit in Kultur zu halten (Moll et al., 1998; Steinstraesser et al., 2009, 2010). Diese Modelle werden teilweise für Wunduntersuchungen mit multiresistenten Bakterien verwendet, daher wäre es wichtig diese Modelle auch für die Untersuchung der frühen HSV-1 Infektion zu nutzen. Wegen der begrenzten Verfügbarkeit von humaner oraler Schleimhaut, könnten kombinierend auch organotypische epitheliale Zellkultur-Modelle für Infektionsstudien verwendet werden, um bestimmte Fragestellungen zu beantworten oder neue Techniken zur Infektionsanalyse zu etablieren. Zusätzlich wäre es von Interesse die Eigenschaft von DispaseII als Separierungsreagenz näher zu untersuchen. Da sich die basalen Keratinozyten nach DispaseII-Behandlung effizient infizieren lassen, eine Wundsituation jedoch nur eine schwache Infektion der Keratinozyten entlang der Verwundungslinie aufzeigt, wäre die Kombination aus Verwundung und DispaseII-Behandlung

interessant. Des Weiteren wäre es wichtig den Differenzierungsgrad der suprabasalen Keratinozyten zu bestimmen, bei dem sich keine Infektion mehr einstellt. Dies könnte mit Keratin-Markern und/oder Proliferationsmarkern untersucht werden. Da die *in vivo* Infektionssituation in humaner oraler Schleimhaut auch vom Speichel im Mundraum abhängt, könnten *ex vivo* Infektionsstudien in verwundeter Schleimhaut in Kombination mit Speichelflüssigkeit initiiert werden.

## VI. Literaturverzeichnis

- Acosta, E.G., Castilla, V., and Damonte, E.B.** 2009. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell Microbiol.* 11, 1533-49.
- Akula, S.M., Pramod, N.P., Wang, F.Z., and Chandran, B.** 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.
- Alonso, L., and Fuchs, E.** 2006. The hair cycle. *J Cell Sci.* 119, 391-3.
- Ammer, A.G., and Weed, S.A.** 2008. Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton.* 65, 687-707.
- Anderson, W.A., Margruder, B., and Kilbourne, E.D.** 1961. Induced reactivation of herpes simplex virus in healed rabbit corneal lesions. *Proc Soc Exp Biol Med.* 107, 628-32.
- Arii, J., Uema, M., Morimoto, T., Sagara, H., Akashi, H., Ono, E., Arase, H., and Kawaguchi, Y.** 2009. Entry of Herpes simplex virus 1 and other alphaherpesviruses via the paired immunoglobulin-like type 2 receptor. *J. Virol.* 83, 4520-4527.
- Aspenström, P.** 2009. The Pombe Cdc15 Homology Proteins. Molecular Biology Intelligence Unit. Landes Bioscience.
- Asselineau, D., Bernhard, B., Bailly, C., and Darmon, M.** 1985. Epidermal morphogenesis and induction of the 67 kD keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface. *Exp Cell Res.* 159, 536-539.
- Bantel-Schaal, U., Braspenning-Wesch, I., and Kartenbeck, J.** 2009. Adenoassociated virus type 5 exploits two different entry pathways in human embryo fibroblasts. *J. Gen. Virol.* 90, 317-322.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., and Domingo, E.** 2001. Evolution of cell recognition by viruses. *Science.* 292, 1102-05.
- Barron, M.J., Brookes, S.J., Draper, C.E., Garrod, D., Kirkham, J., Shore, R.C., and Dixon, M.J.** 2008. The cell adhesion molecule nectin-1 is critical for normal enamel formation in mice. *Hum Mol Genet.* 17, 3509-20.
- Bartlett, A.H., and Park, P.W.** 2010. Proteoglycans in host-pathogen interactions: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med.* 1, 12:e5.
- Bell, E., Ehrlich, H.O., Buttle, D.J., and Nakatsuji, T.** 1981. A living tissue formed in vitro and accepted as full thickness skin equivalent. *Science.* 211, 1274-1278.
- Bell, E., Ivarsson, B., and Merrill, C.** 1979. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76, 1274-1278.
- Benitah, S.A., Frye, M., Glogauer, M., and Watt, F.M.** 2005. Stem cell depletion through epidermal deletion of Rac1. *Science.* 309, 933-935.
- Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N., and Dautry-Varsat, A.** 1999. Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J Cell Sci.* 112, 1303-11.
- Berkowitz, B.K.B., Holland, G.R., and Moxham, B.J.** 2009. Oral Anatomy, Histology and Embryology 4<sup>th</sup> edition, Mosby.
- Blanpain, C., and Fuchs, E.** 2009. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10, 207-17.
- Bodde, H.E., Holman, B., Spies, F., Weerheim, A., Kempenaar, J., Mommaas, M., and Ponc, M.** 1990. Freeze-fracture electron microscopy of in vitro reconstructed human epidermis. *J Invest Dermatol.* 95, 108-116.
- Boisvert, M., Fernandes, S., and Tijssen, P.** 2010. Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *J Virol.* 84, 7782-7792.
- Bokoch, G.M.** 2005. Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol.* 15, 163-71.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E.** 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biology.* 106, 761-71.
- Braff, M.H., and Gallo, R.L.** 2006. Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier. *Curr Top Microbiol Immunol.* 306, 91-110.
- Braun, K.M., Niemann, C., Jensen, U.B., Sundberg, J.P., Silva-Vargas, V., and Watt, F.M.** 2003. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development.* 130, 5241-55.
- Castilho, R.M., Squarize, C.H., Leelahavanichkul, K., Zheng, Y., Bugge, T., and Gutkind, J.S.** 2010. Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. *PLoS One.* 5, e10503.

- Castilho, R.M., Squarize, C.H., Patel, V., Millar, S.E., Zheng, Y., Molinolo, A., and Gutkind, J.S.** 2007. Requirement of Rac1 distinguishes follicular from interfollicular epithelial stem cells. *Oncogene*. 26, 5078-85.
- Chan, L.S.** 1997. Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front Biosci*. 2, d343-52.
- Cheshenko, N., Liu, W., Satlin, L.M., and Herold, B.C.** 2007. Multiple receptor interactions trigger release of membrane intracellular calcium stores critical for herpes simplex virus entry. *Mol. Biol Cell*. 18, 3119-30.
- Chrostek, A., Wu, X., Quondamatteo, F., Hu, R., Sanecka, A., Niemann, C., Langbein, L., Haase, I., and Brakebusch, C.** 2006. Rac1 is crucial for hair follicle integrity but is not essential for maintenance of the epidermis. *Mol. Cell Biol*. 26, 6957-6970.
- Clement, C., Tiwari, V., Scanlan, P.M., Valyi-Nagy, T., Yue, B.Y.J.T., and Shukla, D.** 2006. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J. Cell Biol*. 174, 1009-1021.
- Cocchi, F., Menotti, L., Dubreuil, P., Lopez, M., and Campadelli-Fiume, G.** 2000. Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HlgR) and nectin2 (PRR2/HveB). *J. Virol*. 74, 3909-17.
- Cocchi, F., Menotti, L., Mirandola, P., Lopez, M., and Campadelli-Fiume, G.** 1998. The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily 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.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L.** 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 422, 37-44.
- Coulomb, B., Lebreton, C., and Dubertret, L.** 1989. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol*. 92, 122-125.
- Coyne, C.B., and Bergelson, J.M.** 2006. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*. 124, 119-31.
- Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G., and Way, M.** 1995. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature*. 378, 636-8.
- Cureton, D.K., Massol, R.H., Saffarian, S., Kirchhausen, T.L., and Whelan, S.P.** 2009. Vesicular stomatitis virus enters cells through vesicles incompletely coated with clathrin that depend upon actin for internalization. *PLoS Pathog*. 5, e1000394.
- Damm, E.M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., and Helenius, A.** 2005. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *J Cell Biol*. 168, 477-88.
- De Oliveira, A.P., Glauser, D.L., Laimbacher, A.S., Strasser, R., Schraner, E.M., Wild, P., Ziegler, U., Breakefield, X.O., Ackermann, M., and Fraefel, C.** 2008. Live visualization of herpes simplex virus type 1 compartment dynamics. *J. Virol*. 82, 4974-4990.
- Del Pozo, M.A., and Schwartz, M.A.** 2007. Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell Biol*. 17, 246-50.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T.** 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem*. 78, 857-902.
- Ehrhardt, C., Kardinal, C., Wurzer, W.J., Wolff, T., von Eichel-Streiber, C., Pleschka, S., Planz, O., and Ludwig, S.** 2004. Rac1 and PAK1 are upstream of IKK-epsilon and TBK-1 in the viral activation of interferon regulatory factor-3. *FEBS Lett*. 567, 230-8.
- Empig, C.J., and Goldsmith, M.A.** 2002. Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *J Virol*. 76, 5266-70.
- Everett, R.D., and Maul, G.G.** 1994. HSV-1 IE protein Vmw110 causes redistribution of PML. *EMBO J*. 13, 5062-5069.
- Favoreel, H.W., Enquist, L.W., and Feierbach, B.** 2007. Actin and Rho GTPases in herpesvirus biology. *Trends Microbiol*. 15, 426-33.
- Feig, L.A.** 1999. Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol*. 1, E25-7.
- Freedberg, I.M., Eisen, A.Z., Wolff, K., Austen, K.F., Goldsmith, L.A., and Katz, S.I.** 2003. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine (6<sup>th</sup> edition). Chapter: The structure and development of skin. Chu, D.H., Haake, A.R., Holbrook, K., and Loomis, C.A.
- Frischknecht, F., and Way, M.** 2001. Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol*. 11, 30-38.
- Fuchs, E.** 1988. Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation. *Trends Genet*. 4, 277-81.
- Fuller, S., von Bonsdorff, C.H., and Simons, K.** 1984. Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK. *Cell*. 38, 65-77.
- Fuller, A.O., and Lee, W.C.** 1992. Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. *J. Virol*. 66, 5002-5012.

- Fuller, A.O., Santos, R.E., and Spear, P.G.** 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., and Spear, P.G.** 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., and Spear, P.G.** 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science.* 280, 1618-1620.
- Giangreco, A., Jensen, K.B., Takai, Y., Miyoshi, J., and Watt, F.M.** 2009. Nectin2 regulates epidermal adhesion and wound repair. *Development.* 136, 3505-14.
- Gianni, T., Campadelli-Fiume, G. and Menotti, L.** 2004. Entry of herpes simplex virus mediated by chimeric forms of nectin1 retargeted to endosomes or to lipid rafts occurs through acidic endosomes. *J. Virol.* 78, 12268-76.
- Gipson, I.K., and Grill, S.M.** 1982. A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 23, 269-73.
- Greene, W., and Gao, S.J.** 2009. Actin dynamics regulate multiple endosomal steps during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus entry and trafficking in endothelial cells. *PLoS Pathog.* 5, e1000512.
- Griffiths, A., Renfrey, S., and Minson, T.** 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.
- Halford, W.P., and Schaffer, P.A.** 2000. Optimized viral dose and transient immunosuppression enable herpes simplex virus ICP0-null mutants to establish wild-type levels of latency in vivo. *J. Virol.* 74, 5957-67.
- Hanahan, D.** 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In: *DNA Cloning 1* (Glover, D.M., ed.), Practical Approach Series, IRL Press.
- 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.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J.** 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 690-701.
- Hill, T.J., Field, H.J., and Blyth, W.A.** 1975. Acute and recurrent infection with herpes simplex virus in the mouse: a model for studying latency and recurrent disease. *J. Gen. Virol.* 28, 341-53.
- Holmstrup, P., Dabelsteen, E., and Harder, F.** 1985. EDTA separation and recombination of epithelium and connective tissue of human oral mucosa. *Studies of tissue transplants in nude mice. Exp Cell Biol.* 53, 32-40.
- Honda, T., Shimizu, K., Kawakatsu, T., Fukuhara, A., Irie, K., Nakamura, T., Matsuda, M., and Takai, Y.** 2003. Cdc42 and Rac small G proteins activated by trans-interactions of nectins are involved in activation of c-Jun N-terminal kinase, but not in association of nectins and cadherin to form adherens junctions, in fibroblasts. *Genes Cells.* 8, 481-91.
- Hoppe, S., Schelhaas, M., Jaeger, V., Liebig, T., Petermann, P., and Knebel-Mörsdorf, D.** 2006. Early herpes simplex virus type 1 infection is dependent on regulated Rac1/Cdc42 signalling in epithelial MDCKII cells. *J. Gen. Virol.* 87, 3483-94.
- 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., and Johnson, D.** 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., and Syrjänen, S.** 1999. Herpes simplex virus type 1 infection has two separate modes of spread in threedimensional keratinocyte culture. *J. Gen. Virol.* 80, 2149-2155.
- Hurd, J., and Robinson, T.W.** 1977. Herpes virus reactivation in a mouse model. *J. Antimicrob Chemother. Suppl A,* 99-106.
- Jaeger, V., Hoppe, S., Petermann, P., Liebig, T., Jansen, M., Renné, T., and Knebel-Mörsdorf, D.** 2010. Herpes simplex virus type 1 entry into epithelial MDCKII cells: Role of VASP activities. *J. Gen. Virol.* 91, 2152-7.
- Kaiser, A.D., and Hogness, D.S.** 1960. The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. *J. Mol. Biol.* 2, 392-415.
- Kalia, M., and Jameel, S.** 2009. Virus entry paradigms. *Amino Acids.* (Epub ahead of print).
- Kirchhausen, T., Macia, E., and Pelish, H.E.** 2008. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods Enzym.* 438, 77-93.
- Kruchten, A.E., and McNiven, M.A.** 2006. Dynamin as a mover and pincher during cell migration and invasion. *J. Cell Sci.* 119, 1683-1690.
- Krummenacher, C., Baribaud, I., Eisenberg, R.J., and Cohen, G.H.** 2003. Cellular localization of nectin-1 and glycoprotein D during herpes simplex virus infection. *J. Virol.* 77, 8985-8999.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-5.

- Lee, S.H., Jeong, S.K., and Ahn, S.K.** 2006. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J.* 47, 293-306.
- Lehmann, M.J., Sherer, N.M., Marks, C.B., Pypaert, M., and Mothes, W.** 2005. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J. Cell Biol.* 18, 317-25.
- Lencer, W.I., Hirst, T.R., and Holmes, R.K.** 1999. Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin. *Biochim Biophys Acta.* 1450, 177-90.
- Liang, Y., Kurakin, A., and Roizman, B.** 2005. Herpes simplex virus 1 infected cell protein 0 forms a complex with CIN85 and Cbl and mediates the degradation of EGF receptor from cell surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 5838-43.
- Llorente, A., van Deurs, B., Garred, O., Eker, P., and Sandvig, K.** 2000. Apical endocytosis of ricin in MDCK cells is regulated by the cyclooxygenase pathway. *J Cell Sci.* 113, 1213-21.
- Locker, J.K., Kuehn, A., Schleich, S., Rutter, G., Hohenberg, H., Wepf, R., and Griffiths, G.** 2000. Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. *Mol. Biol. Cell.* 7, 2497-511.
- 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., and Jan, Y.N.** 1994. Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast function. *Genes Dev.* 8, 1787-1802.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., and Kirchhausen, T.** 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell.* 10, 839-850.
- Mackenzie, I.C., and Fusenig, N.E.** 1983. Regeneration of organized epithelial structure. *J Invest Dermatol.* 81, 189s-194s.
- Mamane, Y., Heylbroeck, C., Genin, P., Algarte, M., Servant, M.J., LePage, C., DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R., and Hiscott, J.** 1999. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene.* 237, 1-14.
- Marsh, M., and Bron, R.** 1997. SFV infection in CHO cells: cell-type specific restrictions to productive virus entry at the cell surface. *J. Cell Sci.* 110, 95-103.
- Marsh, M., and Helenius, A.** 2006. Virus entry: Open sesame. *Cell.* 124, 729-740
- Maul, G.G., and Everett, R.D.** 1994. The nuclear location of PML, a cellular member of the C3HC4 zinc-binding domain protein family, is rearranged during herpes simplex virus infection by the C3HC4 viral protein ICP0. *J. Gen. Virol.* 75, 1223-1233.
- McKendall, R.R., Vogelzang, N., and Jackson, G.G.** 1974. Herpes virus latency in spinal ganglia of mice without illness. *Proc Soc Exp Biol Med.* 146, 1093-6.
- McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R. and Yoon, Y.** 2000. The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem. Sci.* 25, 115-120.
- Menotti, L., Cerretani, A., Hengel, H., and Campadelli-Fiume, G.** 2008. Construction of a fully retargeted herpes simplex virus 1 recombinant capable of entering cells solely via human epidermal growth factor receptor 2. *J Virol.* 82, 10153-61.
- Mercer, J., and Helenius, A.** 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol.* 11, 510-20.
- Mercer, J., Schelhaas, M., and Helenius, A.** 2010. Virus entry by endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 803-33.
- Mettlen, M., Pucadyil, T., Ramachandran, R., and Schmid, S.L.** 2009. Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans.* 37, 1022-6.
- Meyers, C., and Laimins, L.A.** 1994. In vitro systems for the study and propagation of human papillomaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 187, 199-215.
- Milne, R.S.B., Nicola, A.V., Whitbeck, J.C., Eisenberg, R.J., and Cohen, G.H.** 2005. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 79, 6655-63.
- Modrow, S., Falke, D., and Truyen, U.** 1997. *Molekulare Virologie. Eine Einführung für Biologen und Mediziner.* Spektrum Akademischer Verlag.
- Moll, I., Houdek, P., Schmidt, H., and Moll, R.** 1998. Characterization of epidermal wound healing in a human skin organ culture model: acceleration by transplanted keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 111, 251-8.
- Montgomery, R.I., Warner, M.S., Lum, B.J., and Spear, P.G.** 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell.* 87, 427-36.
- Mooren, O.L., Kotova, T.I., Moore, A.J., and Schafer, D.A.** 2009. Dynamin2 GTPase and Cortactin Remodel Actin Filaments. *J Biol Chem.* 284, 23995-4005.
- Morasso, M.I., and Tomic-Canic, M.** 2005. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol Cell.* 97, 173-83.

- Münter, S., Way, M., and Frischknecht, F.** 2006. Signaling during pathogen infection. *Sci STKE*. re5.
- Murata, T., Goshima F., Daikoku T., Takakuwa H., and Nishiyama, Y.** 2000. Expression of herpes simplex virus type 2 US3 affects the Cdc42/Rac pathway and attenuates c-Jun N-terminal kinase activation. *Genes Cells*. 5, 1017-27.
- Naughton, G., Jacob, L., and Naughton, B.** 1989. A physiological skin model for in vitro toxicity studies. Mary Ann Liebert, New York.
- Nicola, A.V., Hou, J., Major, E.O., and Straus, S.E.** 2005. Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J. Virol.* 79, 7609-16.
- Nicola, A.V., McEvoy, A.M., and Straus, S.E.** 2003. Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J. Virol.* 77, 5324-32.
- Nicola, A.V. and Straus, S.E.** 2004. Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. *J. Virol.* 78, 7508-17.
- Nikolova, E., Mitev, V., Minner, F., Deroanne, C.F., and Poumay, Y.** 2008. The inhibition of the expression of the small Rho GTPase Rac1 induces differentiation with no effect on cell proliferation in growing human adult keratinocytes. *J Cell Biochem*. 103, 857-864.
- O'Donnell, C.D., and Shukla, D.** 2008. The Importance of Heparan Sulfate in Herpesvirus Infection. *Virology*. 23, 383-393.
- Oh, M.J., Akhtar, J., Desai, P., and Shukla, D.** 2010. A role for heparan sulfate in viral surfing. *Biochem Biophys Res Commun*. 391, 176-81.
- Otsuka, A., Abe, T., Watanabe, M., Yagisawa, H., Takei, K., and Yamada, H.** 2009. Dynamin 2 is required for actin assembly in phagocytosis in Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 378, 478-82.
- Palazzo, A.F., and Gundersen, G.G.** 2002. Microtubule-actin cross-talk at focal adhesions. *Sci. STKE* 139, PE31.
- Patel, K.P., Coyne, C.B., and Bergelson, J.M.** 2009. Dynamin- and lipid raft-dependent entry of decay-accelerating factor (DAF)-binding and non-DAF-binding coxsackieviruses into nonpolarized cells. *J Virol*. 83, 11064-77.
- Pelkmans, L., Puntener, D., and Helenius, A.** 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*. 296, 535-39.
- Petermann, P.** 2006. Untersuchung der frühen Herpes simplex Virus Typ 1 Infektion in HaCaT-Zellen: Bedeutung von Rac1 und Cdc42 (Diplomarbeit). Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.
- Petermann, P., Haase, I., and Knebel-Mörsdorf, D.** 2009. Impact of Rac1 and Cdc42 signalling during early herpes simplex virus type 1 infection of keratinocytes. *J. Virol.* 83, 9759-9772.
- Pivarsci, A., Szell, M., Kemeny, L., Dobozy, A., and Bata-Csorgo, Z.** 2001. Serum factors regulate the expression of the proliferation-related genes alpha5 integrin and keratin 1, but not keratin 10, in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. 293, 206-13.
- Ploubidou, A., Moreau, V., Ashman, K., Reckmann, I., González, C., and Way, M.** 2000. Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function. *EMBO J*. 19, 3932-44.
- Ponec, M., Weerheim, A., Kempenaar, J., Mommaas, A.M., and Nugteren, D.H.** 1988. Lipid composition of cultured human keratinocytes in relation to their differentiation. *J Lipid Res*. 29, 949-961.
- Powell, K.L., and Watson, D.H.** 1975. Some structural antigens of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 29, 167-178.
- Rahn, E.** 2009. Bedeutung von Dynamin2 und PACSIN2 für die frühe Herpes *simplex* Virus Typ1 Infektion in Keratinozyten (Diplomarbeit). Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.
- Regnier, M., Schweizer, J., Michel, S., Bailly, C., and Prunieras, M.** 1986. Expression of high molecular weight (67K) keratin in human keratinocytes cultured on dead de-epidermized dermis. *Exp Cell Res*. 165, 63-72.
- Roizman, B., Knipe, D.M., and Whitley, R.J.** 2007. Herpes simplex viruses. In Knipe, D.M. et al. (ed.) *Fields virology*, 5<sup>th</sup> edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
- Russell, W.C., Newman, C., and Williamson, D.H.** 1975. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature*. 253, 461-2.
- Sanderson, C.M., Frischknecht, F., Way, M., Hollinshead, M., and Smith, G.L.** 1998. Roles of vaccinia virus EEV-specific proteins in intracellular actin tail formation and low pH-induced cell-cell fusion. *J Gen Virol*. 79, 1415-25.
- Sanderson, C.M., and Smith, G.L.** 1998. Vaccinia virus induces Ca<sup>2+</sup>-independent cell-matrix adhesion during the motile phase of infection. *J Virol*. 72, 9924-33.
- Satoh, T., Arai, J., Suenaga, T., Wang, J., Kogure, A., Uehori, J., Arase, N., Shiratori, I., Tanaka, S., Kawaguchi, Y., Spear, P.G., Lanier, L.L., and Arase, H.** 2008. PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell*. 132, 935-44.



- Schelhaas, M., Jansen, M., Haase, I., and Knebel-Mörsdorf, D.** 2003. Herpes simplex virus type 1 exhibits a tropism for basal entry in polarized epithelial cells. *J. Gen. Virol.* 84, 2473-2484.
- Schepis, A., Schramm, B., de Haan, C.A., and Locker, J.K.** 2006. Vaccinia virus-induced microtubule-dependent cellular rearrangements. *Traffic.* 7, 308-23.
- Scriba, M., and Tatzber, F.** 1981. Pathogenesis of Herpes simplex virus infections in guinea pigs. *Infect Immun.* 34, 655-61.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N.W., Bai, X., Esko, J.D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Rosenberg, R.D., and Spear, P.G.** 1999. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell.* 99, 13-22.
- Simons, K., and Ikonen, E.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387, 569-72.
- Smith, J.L., Campos, S.K., and Ozburn, M.A.** 2007. Human papillomavirus type 31 uses a caveolin 1- and dynamin 2-mediated entry pathway for infection of human keratinocytes. *J Virol.* 81, 9922-31.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Spear, P.G., Eisenberg, R.J., and Cohen, G.H.** 2000. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology.* 275, 1-8.
- Spurr, S.J., and Gipson, I.K.** 1985. Isolation of corneal epithelium with Dispase II or EDTA. Effects on the basement membrane zone. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 26, 818-27.
- Squier, C.A., and Kremer, M.J.** 2001. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 29, 7-15.
- Stachelscheid, H., Ibrahim, H., Koch, L., Schmitz, A., Tschardt, M., Wunderlich, F.T., Scott, J., Michels, C., Wickenhauser, C., Haase, I., Brüning, J.C., and Niessen, C.M.** 2008. Epidermal insulin/IGF-1 signalling control interfollicular morphogenesis and proliferative potential through Rac activation. *EMBO J.* 27, 2091-101.
- Steinert, P.M.** 2000. The complexity and redundancy of epithelial barrier function. *J. Cell Biol.* 151, F5-F7.
- Steinstraesser, L., Rittig, A., Gevers, K., Sorkin, M., Hirsch, T., Kesting, M., Sand, M., Al-Benna, S., Langer, S., Steinau, H.U., and Jacobsen, F.** 2009. A human full-skin culture system for interventional studies. *Eplasty.* 9, e5.
- Steinstraesser, L., Sorkin, M., Niederbichler, A.D., Becerikli, M., Stupka, J., Daigeler, A., Kesting, M.R., Stricker, I., Jacobsen, F., and Schulte, M.** 2010. A novel human skin chamber model to study wound infection ex vivo. *Arch Dermatol Res.* 302, 357-65.
- Stenn, K.S., Link, R., Moellmann, G., Madri, J., and Kuklinska, E.** 1989. Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol.* 93, 287-90.
- Stoker, M., and MacPherson, I.** 1964. Syrian hamster fibroblast cell line and its derivatives. *Nature.* 203, 1355-1357.
- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A., and Katsuki, M.** 1998. Rac1 is required for the formation of the three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17, 3427-3433.
- Syrjänen, S., Mikola, H., Nykanen, M., and Hukkanen, V.** 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.
- Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H., and Rikitake, Y.** 2008a. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 309-42.
- Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., and Ogita, H.** 2008b. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 603-615.
- Taketo, M., Schroeder, A.C., Mobraaten, L.E., Gunning, K.B., Hanten, G., Fox, R.R., Roderick, T.H., Stewart, C.L., Lilly, F., Hansen, C.T., and Overbeek, P.A.** 1991. FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 2065-9.
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., and Tanaka, N.** 2001. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol.* 19, 623-55.
- Todaro, G.J., and Green, H.** 1962. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.* 17, 299-313.
- Topp, K.S., Rothman, A.L., and Lavail, J.H.** 1997. Herpes virus infection of RPE and MDCK cells: polarity of infection. *Exp. Eye Res.* 64, 343-354.
- Törmä, H., Rollman, O., and Vahlquist, A.** 1999. The vitamin A metabolism and expression of retinoid-binding proteins differ in HaCaT cells and normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 291, 339-45.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4.

- Tscharntke, M.** 2006. Funktionale Charakterisierung von Rac1 in der epidermalen Wundheilung *in vivo* und *in vitro* (Doktorarbeit). Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.
- Tscharntke, M., Pofahl, R., Chrostek-Grashoff, A., Smyth, N., Niessen, C., Niemann, C., Hartwig, B., Herzog, V., Klein, H.W., Krieg, T., Brakebusch, C., and Haase, I.** 2007. Impaired epidermal wound healing *in vivo* upon inhibition or deletion of Rac1. *J Cell Sci.* 120, 1480-90.
- Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C.** 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11, 2295-2322.
- Veettil, M.V., Sharma-Walia, N., Sadagopan, S., Raghu, H., Sivakumar, R., Naranatt, P.P., and Chandran, B.** 2006. RhoA-GTPase facilitates entry of Kaposi's Sarcoma-Associated 2 Herpesvirus (KSHV/HHV-8) into adherent target cells in a Src-3 dependent manner. *J Virol.* 80, 11432-46.
- Visalli, R.J., Courtney, R.J., and Meyers, C.** 1997. Infection and replication of herpes simplex virus type 1 in an organotypic epithelial culture system. *Virology.* 230, 236-243.
- 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 E. Cells. London: Academic Press.
- Weeks, B.S., Ramchandran, R.S., Hopkins, J.J., and Friedman, H.M.** 2000. Herpes simplex virus type-1 and -2 pathogenesis is restricted by the epidermal basement membrane. *Arch Virol.* 145, 385-96.
- Wiechelman, K.J., Braun, R.D., and Fitzpatrick, J.D.** 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 175, 231-7.
- Wittels, M., and Spear, P.G.** 1991. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* 18, 271-90.
- Wittmann, T., Bokoch, G.M., and Waterman-Storer, C.M.** 2003. Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1. *J. Cell Biol.* 161, 845-851.
- Yasumura et al.** 1963. *Nippon Rhinsho.* 21, 1209.
- Yoon, M., and Spear, P.G.** 2002. Disruption of adherens junctions liberates nectin-1 to serve as receptor for herpes simplex virus and pseudorabies virus entry. *J Virol.* 76, 7203-8.
- Zamudio-Meza, H., Castillo-Alvarez, A., González-Bonilla, C., and Meza, I.** 2009. Cross-talk between Rac1 and Cdc42 GTPases regulates formation of filopodia required for dengue virus type-2 entry into HMEC-1 cells. *J Gen Virol.* 90, 2902-11.

## VII. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dagmar Mörsdorf für die ausgezeichnete Betreuung meiner Doktorarbeit. Ihre vielseitige Unterstützung, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen guten Ratschläge trugen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei. Zudem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich im Ausland Erfahrungen sammeln konnte.

Herrn Professor Dr. Günter Plickert möchte ich für die Übernahme des Koreferats herzlich danken.

Ein herzlicher Dank gilt auch Prof. Dr. Mats Paulsson, PD Dr. Markus Plomann und PD Dr. Ingo Haase für die freundliche Unterstützung und ebenfalls ständige Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte ich auch den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mörsdorf und Plomann. Besonders möchte ich hierbei Elena Rahn, Sylvia Schael, Jan Kormann, Dr. Daniela Mainz, Barbara Merkl und Mei-Ju Hsu hervorheben. Bei allen anderen Mitarbeitern des Zentrums für Biochemie möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung jeglicher Art und für die interessanten Besprechungen bedanken. Zusätzlich gilt ein Dank an Dr. Franziska Möller.

Herzlich möchte ich auch Dr. Frazer Rixon und Dr. Roger Everett für die hervorragende Betreuung bei meinen Forschungsaufenthalten in der MRC Virology Unit (Glasgow) meinen Dank aussprechen. Zusätzlich möchte ich hierbei Dr. Chris Boutell, Dr. Daniel Jones, Dr. Kyle Grant, Vera Lukashuck, David McNab, Chris Parsons und Emilia Vanni hervorheben.

Mein besonderer Dank gebührt meiner Familie und meiner Freundin Ria für das unendliche Vertrauen und die moralischer Unterstützung. Auch möchte ich meinen Freunden danken, die immer an mich geglaubt haben! Danke, dass es euch gibt!

## 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 vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Professor Dr. Dagmar Mörsdorf betreut worden.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgenden Titeln publiziert:

**Hoppe, S., Schelhaas, M., Jaeger, V., Liebig, T., Petermann, P., and Knebel-Mörsdorf, D.** 2006. Early herpes simplex virus type 1 infection is dependent on regulated Rac1/Cdc42 signalling in epithelial MDCKII cells. *J. Gen Virol.* 87, 3483-94.

**Petermann, P., Haase, I., and Knebel-Mörsdorf, D.** 2009. Impact of Rac1 and Cdc42 signalling during early herpes simplex virus type 1 infection of keratinocytes. *J. Virol.* 83, 9759-9772.

**Jaeger, V., Hoppe, S., Petermann, P., Liebig, T., Jansen, M., Renné, T., and Knebel-Mörsdorf, D.** 2010. Herpes simplex virus type 1 entry into epithelial MDCKII cells: Role of VASP activities. *J. Gen Virol.* 91, 2152-7.

Köln, den 04.11.2010

---

Philipp Petermann