

**Die Beteiligung zellulärer Rezeptoren
am Eintritt von Herpes simplex Virus 1
in Haut und Mundschleimhaut**

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

vorgelegt von

Katharina Thier

aus Wickede

Köln, 2018

Berichterstatterinnen: Prof. Dr. Dagmar Mörsdorf
Prof. Dr. Sigrun Korsching

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 2018

Zusammenfassung

Die Haut und die Schleimhäute sind primäre Eintrittspforten für das Humanpathogen Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) *in vivo*. Wie HSV-1 die epitheliale Barriere überwindet und welche Rezeptoren an der HSV-1-Infektion in Haut und Schleimhaut beteiligt sind, war bisher nicht bekannt und sollte daher in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Die zellulären Proteine Nektin-1 und HVEM können den Eintritt von HSV-1 in seine Zielzellen vermitteln. Vorangegangene Arbeiten konnten Nektin-1 als Hauptrezeptor in muriner Epidermis und primären murinen Fibroblasten identifizieren. In Abwesenheit von Nektin-1 kann ein weiterer Rezeptor einen weniger effizienten HSV-1-Eintritt vermitteln. Expressionsanalysen sollten daher die Präsenz des alternativen Rezeptors HVEM in muriner Epidermis und murinen Fibroblasten aufschlüsseln. HVEM war auf der Oberfläche einer Subpopulation basaler Keratinozyten der Epidermis nachweisbar und könnte dort in Abwesenheit von Nektin-1 den HSV-1-Eintritt vermitteln. Primäre Keratinozyten exprimierten dagegen kein HVEM mehr, sobald sie in Kultur gehalten wurden. Das Fehlen von HVEM korrelierte mit einer blockierten Infektion Nektin-1-defizienter primärer Keratinozyten. Die Infektion Nektin-1-defizienter muriner Fibroblasten hingegen war nicht blockiert, sondern nur verzögert. Hier zeigten die Analysen dieser Arbeit, dass HVEM auf den meisten Fibroblasten stark exprimiert war. Damit kann HVEM sowohl in muriner Epidermis als auch in primären murinen Fibroblasten Nektin-1 als Korezeptor für HSV-1 ersetzen.

Bevor HSV-1 durch die zellulären Korezeptoren internalisiert wird, bindet es an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) auf der Zelloberfläche. Die Hemmung der viralen Adsorption an HSPGs durch Heparin in muriner Epidermis reduzierte die Infektion basaler Keratinozyten und bestätigte damit die essenzielle Beteiligung der HSPGs am HSV-1-Eintritt. Da kürzlich der Scavenger-Rezeptor MARCO als zusätzlicher Adsorptionsfaktor für HSV-1 beschrieben wurde, sollte dessen Rolle in murinen und humanen Hautzellen näher untersucht werden. Die HSV-1-Infektion muriner Fibroblasten und Epidermis war jedoch von der Abwesenheit von MARCO nicht beeinträchtigt. Dies lässt vermuten, dass MARCO keine essenzielle Rolle beim HSV-1-Eintritt in Hautzellen spielt. Eine Behandlung mit dem Scavenger-Rezeptor-Liganden poly(I) reduzierte die HSV-1-Infektion in humanen Keratinozyten und Fibroblasten sowie in murinen Fibroblasten und muriner Epidermis. Poly(I) zeigte jedoch auch in Abwesenheit von MARCO ein inhibitorisches Potenzial, das also keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Beteiligung von MARCO am HSV-1-Eintritt zuließ. Wie poly(I) stattdessen die Aufnahme von HSV-1 blockiert, könnte zukünftig Hinweise auf weitere zelluläre Faktoren geben, die am Eintritt von HSV-1 in Hautzellen beteiligt sind.

Verwundete murine Haut-Explantate zeigten nach *ex vivo*-Infektion mit HSV-1 keine infizierten Zellen. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob eine – möglicherweise durch die Kultivierung und Verwundung der Haut-Explantate ausgelöste – Interferon (IFN)-Antwort den HSV-1-Eintritt verhindert. Im Mausmodell zeigte sich, dass IFN-stimulierte Keratinozyten mit HSV-1 infizierbar waren. Weiterhin war die Infektion in muriner Epidermis von IFN-Rezeptor-defizienten Mäusen nicht verstärkt. Dies verdeutlicht, dass eine mögliche IFN-vermittelte antivirale Antwort in der murinen Epidermis den HSV-1-Eintritt in Keratinozyten nicht beeinträchtigt und eine fehlende IFN-Antwort die Infektion nicht begünstigt.

In vivo erfolgt die Infektion mit HSV-1 über die humane orale Mukosa. Welche Rezeptoren und zellulären Faktoren dabei eine Rolle spielen, wurde in dieser Arbeit erstmals in einem *ex vivo*-Infektionsmodell humaner vestibulärer Mukosa untersucht. Intakte Mukosa-Explantate waren vor einer HSV-1-Infektion geschützt. Wurde jedoch vor der Infektion das unter dem Epithel liegende Bindegewebe entfernt, konnte das Virus die basalen Keratinozyten des Epithels effizient infizieren und sich im Verlauf der Infektion auch auf darüberliegende Keratinozyten ausbreiten. Expressionsanalysen zeigten, dass die meisten Keratinozyten des Mukosa-Epithels Nektin-1 auf ihrer Oberfläche exprimierten, während HVEM nur auf einer Subpopulation der Zellen zu finden war. Dies legt nahe, dass Nektin-1 in humaner oraler Mukosa als Hauptrezeptor für HSV-1 fungiert. Da HSV-1 *in vivo* wahrscheinlich über kleine Läsionen in orale Mukosa eindringen kann, wurde die Infizierbarkeit verwundeter oraler Mukosa-Explantate überprüft. Selbst nach Skalpellschnitten durch alle Epithelschichten hindurch und langen Infektionszeiten konnten keine infizierten Zellen nachgewiesen werden. Das Epithel kann also auch nach mechanischer Verwundung dem Virus noch eine effiziente Barriere bieten.

Abstract

Skin and mucosa are primary portals of entry for the human pathogen herpes simplex virus 1 (HSV-1) *in vivo*. So far, it is unknown how HSV-1 overcomes the epithelial barrier to enter the host and which receptors are involved in the infection of skin and mucosa.

The cellular proteins nectin-1 and HVEM can mediate the entry of HSV-1 into target cells. Previous studies identified nectin-1 as the major entry receptor for HSV-1 infection of murine epidermis and primary murine fibroblasts. However, in the absence of nectin-1 entry of HSV-1 still occurs in a less efficient manner. To identify the presence of HVEM as an alternative receptor, expression analyses were performed in murine epidermis and fibroblasts. HVEM was detected on the surface of a subpopulation of basal epidermal keratinocytes, potentially mediating entry of HSV-1 in the absence of nectin-1. In contrast, primary keratinocytes lost the expression of HVEM once kept in culture. The loss of HVEM expression correlated with a block of infection observed in these nectin-1-deficient primary keratinocytes. Analyses of nectin-1-deficient murine fibroblasts revealed that HSV-1 infection was not blocked but delayed. Expression analyses showed that HVEM was strongly expressed on the surface of most nectin-1-deficient fibroblasts. Overall, HVEM can replace nectin-1 as a co-receptor for HSV-1 in murine epidermis as well as in primary murine fibroblasts.

HSV-1 binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) prior to its internalization by cellular co-receptors. The inhibition of viral adsorption to HSPGs by heparin in murine epidermis reduced the infection of basal keratinocytes suggesting an essential contribution of HSPGs during entry of HSV-1. Recently, the scavenger receptor MARCO was described as an additional factor to mediate adsorption of HSV-1. Therefore, the impact of MARCO on HSV-1 infection was analysed. The absence of MARCO did not affect HSV-1 infection of murine fibroblasts and epidermis suggesting no essential role of MARCO during HSV-1 entry into skin cells. Treatment with the scavenger receptor ligand poly(I) reduced HSV-1 infection of human keratinocytes and fibroblasts as well as of murine fibroblasts and epidermis. Of note, poly(I) displayed its inhibitory potential even in the absence of MARCO leaving the contribution of MARCO to the entry of HSV-1 unresolved. Instead, further studies into understanding blocking mechanisms of poly(I) during the uptake of HSV-1 could elucidate yet unknown factors involved in the entry of HSV-1 into skin cells.

Ex vivo infection of wounded murine skin explants with HSV-1 did not result in infected cells. Herein, it was analysed whether an interferon (IFN)-mediated immune response, potentially induced by cultivation and wounding of skin explants, interferes with entry of HSV-1. In a

mouse model, IFN-stimulated keratinocytes were still susceptible to HSV-1. Furthermore, HSV-1 infection of murine epidermis from IFN receptor-deficient mice was not enhanced. This suggests that an IFN-mediated antiviral response does not restrict HSV-1 entry into keratinocytes and that IFN deficiency does not increase HSV-1 infection of murine epidermis.

In vivo, HSV-1 infection occurs via the human oral mucosa. In this thesis, the first *ex vivo* infection model of human vestibular mucosa was established to examine which receptors and cellular factors play a role during entry of HSV-1 into its natural target tissue. Intact mucosal explants were not susceptible to HSV-1 infection. However, once the connective tissue underneath the epithelium was removed, the virus efficiently infected the basal keratinocytes of the epithelium. Moreover, virus infection spread to upper layers of keratinocytes late during infection. Expression analyses revealed nectin-1 on the surface of most keratinocytes of the mucosal epithelium whereas HVEM was detected only on a subpopulation of cells. This suggests nectin-1 as primary receptor for the entry of HSV-1 into human oral mucosa. As HSV-1 might enter mucosa via microlesions *in vivo*, the susceptibility of wounded mucosal explants was tested. Even scalpel cuts throughout the epithelial layers combined with long infection times did not lead to infected cells in the mucosal explants. Thus, the mucosal epithelium provides an efficient barrier against HSV-1 invasion even after mechanical wounding.