

Die Herpes-simplex-Virus-Infektion
humaner, neuronaler Zellen:
Funktion der S1P-vermittelten
Signaltransduktion im viralen
Replikationszyklus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Henrik Schanbacher

geboren am 20.03.1991 in Kirchheim unter Teck

Gutachter

1: apl. Prof. Dr. Andreas Henke, Jena

2: Prof. Dr. Markus Gräler, Jena

3: Prof. Dr. med. Wulf Schneider, Regensburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.08.2018

Staatsexamen: 29.11.2019

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	2
1.1 Das Herpes-simplex-Virus	3
1.1.1 Klinik	4
1.1.2 Epidemiologie	5
1.1.3 Ätiologie	6
1.1.4 Pathophysiologie	6
1.1.5 Therapie	9
1.1.6 Problematik	9
1.2 Der Sphingosin-1-Phosphat-Signalweg und seine Bedeutung innerhalb des viralen Replikationszyklus	10
1.2.1 Das S1P im Stoffwechsel der Zelle	10
1.2.2 Modulation der zellulären S1P-Signaltransduktion durch HSV-1 .	14
2 Ziele der Arbeit	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Geräte	18
3.1.2 Antikörper	19
3.1.3 Zellen	20
3.1.4 Chemikalien	20
3.2 Zellkulturen	24
3.2.1 Verozellen	24
3.2.2 Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)	24
3.2.3 Neuroblastomzellen (SK-N-LO)	25
3.3 Infektion zur Herstellung eines Virusstocks, HSV-1 (Kos)	26
3.4 Virustitration von HSV-1 auf Verozellen mithilfe des TCID ₅₀	27

3.5	Viruskinetik	27
3.6	Bestimmung des ZPE bei SH-SY5Y-, SK-N-LO- und Verozellen	28
3.7	Modulation der S1P-Signalwege in HSV-1-infizierten Zellen	28
3.7.1	Vitalitätstestung	28
3.7.2	Inhibition der SK1 durch SKI-178	31
3.7.3	Modulation der S1PR ₁ und R ₃₋₅ durch FTY-720	32
3.7.4	Inhibition des S1PR ₂ durch JTE-013	33
3.7.5	Inhibition der PI3K durch LY-294002	33
3.7.6	Inhibition von Rac1 durch NSC-23766	33
3.7.7	Aktivierung der AMPK durch AICAR	33
3.7.8	Inhibition der ROCK durch Y-27632	34
3.7.9	Inhibition der ERK-Kinase 1/2 durch U-0126	35
3.8	Proteinchemische Methoden	35
3.8.1	Proteinisolierung	35
3.8.2	Proteinbestimmung	36
3.8.3	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	36
3.8.4	Western-Blot	37
3.9	Fluoreszenzmikroskopie	38
4	Ergebnisse	40
4.1	Viruskinetik	40
4.2	Zytopathischer Effekt bei SH-SY5Y-, SK-N-LO- und Verozellen	41
4.3	Modulation der S1P-Signalwege in HSV-1-infizierten Zellen	44
4.3.1	SKI-178 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen	44
4.3.2	FTY-720 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen	48
4.3.3	JTE-013 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen	49
4.3.4	LY-294002 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen	51
4.3.5	NSC-23766 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen	53
4.3.6	AICAR in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen	55
4.3.7	Y-27632 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen	56
4.3.8	U-0126 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen	58
4.4	Westernblot der viralen Thymidinkinase nach Applikation von AICAR	60
4.4.1	Einfluss von AICAR auf die Proteinexpression in HSV-1-infizierten SH-SY5Y-Zellen	60

4.4.2	Einfluss von AICAR auf die Proteinexpression bei HSV-1-infizierten SK-N-LO-Zellen	62
4.5	Einfluss von AICAR bei der Fluoreszenzmarkierung viraler Proteine . . .	63
5	Diskussion	67
5.1	SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen als Modell für neuronale Zellen	67
5.2	Viruskinetik in Neuroblastomzellen	68
5.3	Einfluss des S1P-Signalwegs innerhalb des viralen Replikationszyklus . .	69
5.3.1	Einfluss von SKI-178 auf die Virusreplikation	69
5.3.2	Einfluss von FTY-720 auf die Virusreplikation	71
5.3.3	Einfluss von JTE-013 auf die Virusreplikation	72
5.3.4	Einfluss von LY-294002 auf die Virusreplikation	73
5.3.5	Einfluss von NSC-23766 auf die Virusreplikation	75
5.3.6	Einfluss von Y-27632 auf die Virusreplikation	76
5.3.7	Einfluss von AICAR auf die Virusreplikation	77
5.3.8	Einfluss von U-0126 auf die Virusreplikation	79
5.4	Ausblick	80
6	Schlussfolgerungen	81
	Literaturverzeichnis	82
	Anhang	93

Verzeichnis der Abkürzungen

Wortabkürzungen

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALDH2	Aldehyddehydrogenase 2
AMP	Adenosin-monophosphat
AMPK	AMP-aktivierte-Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
bad	Bcl-2-associated death promoter
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
bim	Bcl-2-like protein 11
BSA	bovines Serumalbumin
Cdc42	cell division control protein 42
CK2	Casein-Kinase 2
DAG	Diacylglycerin
DBH	Dopamin- β -Hydroxylase
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethyendiamintetraessigsäure
EGF	epithelial growth factor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
EMEM	Eagle's minimal essential medium
ERKK	ERK-Kinase
FBS	fetales bovines Serum
g	Glycoprotein
GAG	Glukosaminoglykan
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
G-Protein	guanin nucleotide binding Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HSK	Herpes simplex Keratitis
HSV-1	Herpes-simplex-Virus Typ 1
HSVE	Herpes-Enzephalitis
HVEM	herpesvirus-entry-mediator
ICP	infected cells protein
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin

IP₃	Inositol-tri-phosphat
LAT	latency-associated-transcript
NGF	nerve growth factor
NPC	Nukleärer Porenkomplex
MAPK/ERK	mitogen-activated kinase/extracellular-signal-regulated kinase
Mcl-1	induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
PAK	p21-activated kinase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDE2	Phosphodiesterase 2
PK1	phosphoinositide-dependent kinase 1
PGC1	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIC	protease inhibitor cocktail
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma kinase
Ras	rat sarcoma
Rho	Ras homologue
ROCK	Rho-assoziierte Kinase
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Sph	Sphingosin
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGPP1/2	Sphingosin-1-Phosphat Phosphatase 1/2
Sirt-1	silent mating type information regulation 2 homolog 1
SK	Sphingosin-Kinase
SPL	S1P-Lyase
S1PR	S1P-Rezeptor
spns2	spinster 2
TBST	tris-buffered saline with Tween-20
TCID	tissue culture infectious dose

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TK	Thymidinkinase
TNF	tumor necrosis factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TyrK	Tyrosinkinase
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHS	virion host shutoff
VP	Virusprotein
VZV	Varicella-Zoster-Virus
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
ZNS	Zentralnervensystem
ZPE	zytopathischer Effekt

Physikalische und mathematische Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung	Einheit
°C	Grad Celsius	[1 °C]
bp	Basenpaar	[1 bp]
d	Tag	[1 d]
Da	Dalton	[1 Da]
g	Gramm	[1 g]
h	Stunde	[1 h]
l	Liter	[1 l]
λ	Wellenlänge Lambda	
M	Molarität	[1 M]
min	Minuten	[1 min]
MOI	multiplicity of infection	[1 MOI]
mol	Mol	[1 mol]
m	Meter	[1 m]
sec	Sekunden	[1 sec]
V	Volt	[1 V]

Zusammenfassung

Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) ist ein neurotropes Virus mit hoher weltweiter Prävalenz. Die Erkrankungsformen, welche durch das Virus hervorgerufen werden können, reichen von einfachen Hautläsionen bis zu fatalen Verläufen einer Enzephalitits. Wie andere Viren beeinflusst HSV-1 die zelluläre Signaltransduktion zur Optimierung seiner Replikation. So nimmt es u. a. Einfluss auf die Signalwege ausgehend von Sphingosin-1-Phosphat (S1P), welche für zelluläres Überleben, Migration und Zellmorphologie, aber auch für neuronale Zellkommunikation wichtig sind.

Diese Arbeit untersuchte eine Einflussnahme auf jene zellulären Signale hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Virusreplikation. Virusquantifizierungen wurden mittels tissue culture infectious dose (TCID)₅₀-Titrations durchgeführt. Hierbei konnten virushemmende Effekte durch Inhibition der S1P-Rezeptoren (S1PRs), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), ERK-Kinase 1/2 (ERKK) sowie durch Modulation der AMP-aktivierte-Proteinkinase (AMPK) gezeigt werden. Bei Applikation der jeweiligen Substanzen FTY-720, LY-294002, U-0126 und AICAR konnte die Replikation in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen gehemmt werden. Ein Vergleich der Wirkungen bei SK-N-LO-Neuroblastomzellen, welche sich in PI3K γ -, p53- und phosphatase and tensin homolog (PTEN)-Aktivität von SH-SY5Y-Zellen unterscheidet, stellte die Bedeutung der PI3K für die HSV-1-Replikation heraus. Das auf diese Weise durchgeführte Screening lieferte Hinweise, dass Modulatoren des S1P-Signalwegs bei neuronalen Zellen Einfluss auf die Virusreplikation haben.

1 Einleitung

"Wer die Geometrie begreift, vermag in dieser Welt alles zu verstehen."

Galileo Galilei (1564-1642) beschrieb mit seinen Worten ein Verständnis für den inneren Aufbau von Systemen, den Plan, nach denen sie konstruiert werden können. Dieser Aufbau sollte nicht nur beschrieben und bis ins Detail dokumentiert, sondern vielmehr "begriffen" werden. Biologische Systeme machen es dem Wissenschaftler bisweilen schwer, ihren Bauplan, vor allem aber ihre Funktionsweise, zu verstehen. Oft sind sie nicht konstant im Verhalten gegen äußere Einflüsse, sondern in der Lage, sich fein abgestimmt auf Änderungen ihrer Umwelt einzustellen und diese Anpassung nach Bedarf zu modulieren. In der virologischen Forschung finden sich unterschiedliche, komplexe Geometrien und beinahe perfekte Ausformung räumlicher Gestalt. Sie treten in Form von Viruspartikeln mit ikosaedrischer, helikaler oder komplexer Symmetrie der Kapside auf. Mit Hilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie sind wir heute in der Lage, detaillierte Bilder der Oberfläche dieser Körper zu erstellen und damit jeden Teil ihres Aufbaus zu vermessen und nachzuvollziehen (Rochat et al. 2014). Es ist möglich, ein relativ genaues Modell dieser Formen aufzubauen, um uns die submikroskopischen Partikel mit einem Durchmesser von 20 bis maximal 260 nm (humane Viren) vor Augen zu führen. Einige filamentöse Viren erreichen eine Länge von bis zu 1400 nm. Wir können Bilder der Fusion von Virus und Wirtszelle erzeugen oder die Virionen beim Verlassen der Zelle beobachten. Haben wir nun ihre Geometrie begriffen? Verstehen wir den Zusammenhang zwischen Infektion und Einflussnahme auf zelluläre Prozesse? Unsere bildgebenden Systeme für die Erforschung von Viren sind beeindruckend: Neben den genannten Oberflächenbeschreibungen können Viren mit Hilfe gentechnischer Manipulation markiert und damit in ihrer Bewegung intrazellulär beobachtet werden. Ihre induzierten Proteine können zu jedem Zeitpunkt einer Infektion nachgewiesen und in ihrer Funktion untersucht werden. Damit ist nur ein kleiner Teil der heutigen Möglichkeiten genannt, trotzdem wurde die gesamte "Geometrie" dieser Systeme noch nicht vollständig aufgeklärt. Mit kleinen Puzzlesteinen viraler Funktionen kann ein Verständnis für molekulare Krankheitsprozesse bei einem Zusammentreffen von Mensch und Virus entwickelt werden. Dem Ziel, in möglichst vie-

len Situationen eines Patienten therapeutisch handlungsfähig zu bleiben, wird auf diese Weise mehr und mehr ein Weg geebnet. Einen solchen Puzzlestein soll auch diese Arbeit darstellen.

1.1 Das Herpes-simplex-Virus

Das HSV-1 gehört zur Familie der *Herpesviridae*, Doppelstrang-DNA-Viren, welche mehrere bedeutende Vertreter humanpathogener Erreger wie das Varicella-Zoster-Virus (VZV) oder das Epstein-Barr-Virus (EBV) in sich vereint. HSV-1 führte durch Ausprägung charakteristischer Symptome zur Namensgebung der Virusfamilie, da das zugehörige Krankheitsbild beim Menschen typische, gruppierte Bläschen mit klar-flüssigem Inhalt aufweist. Altgriechisch $\epsilon\rho\pi\epsilon\iota\nu$ (herpein) bedeutet 'kriechen', was recht bildhaft den Charakter der Krankheits- und Hautläsionsausbreitung beschreibt. Heute wird diese Eigenschaft eher dem lateralen Transfer des Virus von Zelle zu Zelle zugeordnet. Dieser steht einer vorwiegend lytischen Vermehrung, wie sie beispielsweise beim Poliovirus typisch ist, gegenüber. HSV-1 wird zur Unterfamilie der α -*Herpesvirinae* gezählt. Mitglieder dieser Gruppe zeichnen sich durch einen schnellen Replikationszyklus, variable Wirtsspezifität und die Fähigkeit zu lytischer oder latenter Infektion aus. Wird der Aufbau eines einzelnen Virions (Abb. 1.1) betrachtet, so findet sich ein behülltes Kapsid aus 162 tubulären Kapsomeren, welche die DNA umgeben. Die ca. 200 nm großen icosaedrischen Partikel umfassen neben den genannten Elementen ein amorphes Tegument, welches 20 Proteine, wie z. B. Virusprotein 16 (VP16) und auch virale DNA enthält (Kelly et al. 2009).

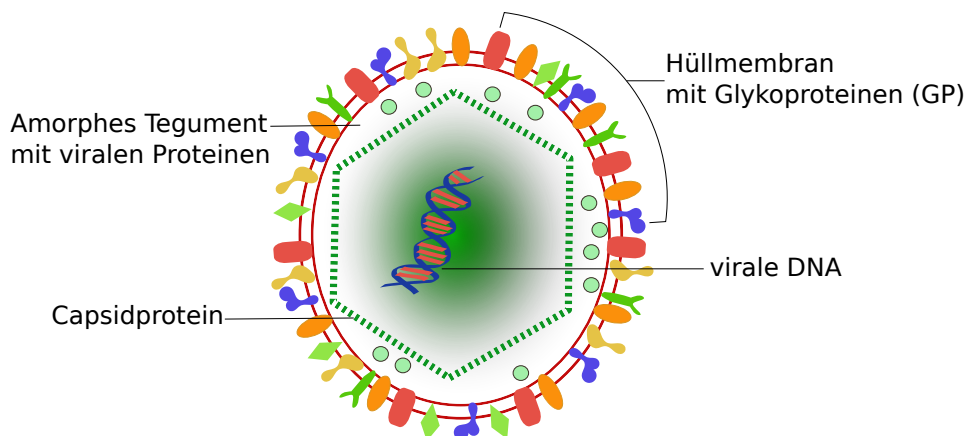


Abbildung 1.1: HSV-1: schematischer Aufbau mit Kapsid, Hüllmembran und integralen Glykoproteinen.

Im Viruspartikel liegt die DNA linear vor. Sie besteht bei HSV-1 aus 152 kbp und codiert für 80 Gene. Das virale Erbgut wird in zwei kovalent verbundene Sektionen unterteilt, welche als unique long (U_L) und unique short (U_s) bezeichnet werden. Erste-re beinhaltet hoch konservierte Genregionen, welche auch in den anderen Herpesvirus-Unterfamilien Homologe zeigen. Darunter findet sich u. a. die Information für Strukturproteine. Die Gene der U_s -Region enthalten dagegen α -*Herpesvirinae*-spezifische Abschnitte, welche häufig für Nicht-Struktur-Proteine codieren. Sie spielen bei der Infektion und Übernahme zellulärer Funktionen eine ausschlaggebende Rolle. Hier liegen beispielsweise die Gene für U_s3 -Proteinkinase und das U_s8a -Protein. Beide scheinen vor allem für die Neuroinvasivität von HSV-1 wichtig zu sein (Kato et al. 2016).

1.1.1 Klinik

HSV-1 ist das ätiologische Agens unterschiedlicher Krankheitsbilder, die teilweise auseinander hervorgehen. Die am häufigsten beobachtete Ausprägung ist *Herpes labialis*, welcher charakteristische Symptome in Form von schmerzhaften, gruppierten Vesikulae (Bläschen), häufig im Bereich des Innervationsgebiets des *Nervus trigeminus*, zeigt. Durch Kratzen und weitere Schädigung der betroffenen Keratinozyten durch den intrazellulären Erreger kommt es zu Sekundäreffloreszenzen wie Krusten und Papeln. Dabei ist eine Superinfektion bakterieller Genese ebenfalls möglich. HSV-1 kann hierbei lebenslang in einem Wirt persistieren, periodisch apparent werden und dabei weitere Wirte infizieren, abhängig vom jeweiligen Immunstatus und Latenzort (Oxford et al. 2016). Bei der Erstinfektion von Säuglingen werden zum Teil multiple, runde, zu großem Beut konfluierende Vesiculae und Allgemeinsymptome wie Fieber und Abgeschlagenheit beobachtet, sowie eine vorbestehende atopische Dermatitis berichtet. Nach dieser Befundkonstellation kann ein *Eczema herpeticatum* vorliegen. Dieses prägt sich häufig an Gesicht und Hals aus und stellt eine schwere und potentiell lebensbedrohliche Erkrankung dar. Bei immunsupprimierten Patienten und Kleinkindern kann eine Erstinfektion auch schwerwiegender, in Form der *Stomatitis aphthosa* ausfallen. Bei Untersuchung der Betroffenen findet sich ein stark reduziertes Allgemeinbefinden mit Fieber, zervikaler Lymphadenopathie, schmerzhafter Rötung und Erosionen der gesamten Mundschleimhaut sowie Befall der *Gingiva*. Sprechen und Nahrungsaufnahme können sehr schmerzhaft und daher eingeschränkt sein.

Durch Infektion der *Kornea* ist die Ausprägung einer *Herpes simplex Keratitis* (HSK) möglich. Diese präsentiert sich meist in einer dendritischen Form mit Befall des Epithels und stellt eine der Hauptursachen für Erblindung von Patienten in den Industrienationen

dar. Heute weist sie jedoch rückläufige Prävalenz auf (Claoué und De Cock 1996).

Eine schwerwiegende Komplikation der HSV-1-Infektion stellt die Herpes-Enzephalitis (HSVE) dar. Sie ist die häufigste Form der sporadischen Enzephalitis mit tödlichem Ausgang weltweit (Klein 2017). In ihrer apparenten Form ist sie vor allem bei immunsupprimierten Patienten anzutreffen. Insgesamt sind etwa 10 bis 20 % aller Enzephalitiden durch HSV-1 verursacht, bei 70 % der über 50-jährigen liegt bereits eine latente Infektion der zerebralen Neurone vor (Wozniak et al. 2005). Kommt es in einer solchen Situation zu immunsuppressiven Zuständen, kann die Erkrankung symptomatisch werden. Dieser Prozess äußert sich zunächst unspezifisch mit einem Prodromalstadium, welches wenige Tage andauert. Ähnlich wie bei anderen Formen der Enzephalitis entstehen kaum richtungsweisende Allgemeinsymptome, darunter Fieber, Nausea, Kopfschmerz und Abgeschlagenheit (Hanley et al. 1987). Im Folgenden kann es zu zerebralen Herdsymptomen kommen, wobei besonders fokale epileptische Anfälle, aphasische Störungen und Vigilanzminderung typisch sind (Masuhr et al. 2013). Zusätzlich werden bei einem Teil der Patienten Harn- und Stuhlinkontinenz beobachtet (Tyler et al. 1995). Im weiteren klinischen Verlauf sind vermindertes Begriffsvermögen und Gedächtnis sowie eine affektive Labilität möglich.

1.1.2 Epidemiologie

Das HSV-1 ist weltweit verbreitet. Unter der globalen Normalbevölkerung herrscht um die 4. Lebensdekade eine Serumpositivität von 80–90 % (Corey und Spear 1986). Entgegen dieser Zahl sank die Prävalenz in Industrienationen während der letzten 50 Jahre. So publizierte eine europäische Studie Serumpositivität bei nur 65,5 % der Bevölkerung (Malvy et al. 2005). Werden Serumproben von Patienten mit einer positiven *Herpes labialis*-Anamnese untersucht, so zeigt sich bei 93 % ein positiver Antikörpernachweis (Blackwelder et al. 1982). Für die rekurrente Form der Erkrankung besteht weltweit eine Prävalenz von 20–49 %. Dabei findet sich eine unterschiedliche Frequenz der Ausbrüche mit 5–23 % jeden Monat, über 58–61 % alle 1–4 Monate und zu 19–61 % zweimal pro Jahr (Spruance et al. 1977). Insgesamt scheiden 0,65–15 % aller Erwachsenen dauerhaft HSV-1 über den Speichel aus (Klein 2016). Für einige Personengruppen wie medizinisches Personal oder Athleten in Kontaktsportarten besteht ein erhöhtes Risiko der Akquisition (*'Herpes gladiatorum'*) (Belongia et al. 1991). Weiterhin zeigen insbesondere immunsupprimierte Patienten ein erhöhtes Risiko für eine Reaktivierung und Entwicklung der rekurrenten Erkrankungsform (Djuric et al. 2007).

1.1.3 Ätiologie

Über 90 % der Primärinfektionen mit HSV-1 verlaufen asymptomatisch und werden daher von den betreffenden Personen nicht bemerkt. Sie präsentieren sich als orale Tröpfcheninfektion mit einer Inkubationszeit von 2 bis 12 Tagen (Herold 2015). Kritisch ist der Kontakt mit sekretierenden Läsionen eines Überträgers. Er ermöglicht den Viren das Eindringen in Epidermis, Dermis oder sogar sensorische und vegetative Nervenendigungen des potentiellen Wirts. Liegt bei einem infizierten Patienten eine bläschenbildende, symptomatische Erkrankung vor, ist der Virustiter im Sputum 100 bis 1000-fach höher als während der asymptomatischen Phasen (Corey und Spear 1986). Eine Übertragung wird damit deutlich wahrscheinlicher (Douglas und Couch 1970). Neben dieser häufigsten Form der Transmission wurde auch ein Fall dokumentiert, bei dem durch Kornea-transplantation die Übertragung des Virus auf einen seronegativen Glaukom-Patienten iatrogen herbeigeführt wurde. Die Infektion führte zur Erblindung (Remeijer et al. 2001).

Die Primärinfektion mit Entwicklung einer Enzephalitis erfolgt in den meisten Fällen über die Nasenschleimhaut und die *Fila olfactoria* des *Nervus olfactorius* im Bereich der *Area cribrosa*. Durch retrograden Transport des Virus in den Neuronen gelangt es auf diesem Weg in das Frontalhirn und sekundär in den Temporallappen (Hudson et al. 1991). Lag im Voraus bereits eine HSV-1-Infektion vor, beispielsweise in Form eines *Herpes labialis*, kann über transaxonale Ausbreitung im Rahmen eines Rezidivs ebenfalls eine HSVE entstehen. Eine dritte Strategie des Virus führt bei Immunkompromittierten oder Neugeborenen über Virämie zur Entzündung des Kortex (Stanberry et al. 1994).

Die endogene Reaktivierung erfolgt aus persistierenden Viren im *Ganglion trigeminale* oder Nervenzellen des *Plexus lumbosacralis* bei Fieber, Infektionen, Sonnenbestrahlung, Verletzungen, hormonellen Veränderungen, psychischer Belastung oder Immunschwäche. In ebendiesen Stress-assoziierten Situationen (Freeman et al. 2007) entstehen von Neuem, je nach Latenzort, periorale oder anogenitale Bläschen, welche verschorfen und ohne Narbenbildung abheilen (Herold 2015).

1.1.4 Pathophysiologie

Nach Aufnahme des Virus, beispielsweise durch die Nasenschleimhaut, kommt es zur Bindung an die Wirtszelle (Abb. 1.2), genauer, an Glukosaminoglykane (GAG) und Ig-like-Rezeptoren der Zellmembran, darunter Nectin-1 α , Nectin- δ sowie Nectin-2 β . HSV-1 trägt zu diesem Zweck Glykoproteine (g) auf seiner Oberfläche, welche insgesamt für Adsorption, Penetration aber auch für eine spätere Antikörperantwort verantwortlich sind.

Die Proteine gC und gB binden an GAG, gD interagiert mit verschiedenen Nectinen, dem herpesvirus-entry-mediator (HVEM) sowie 3-O-sulfatiertem Heparansulfat. Eine Funktion des gD ist es, gH/gL und gB so zu rekrutieren, dass sie optimal mit GAG interagieren können (Knipe und Howley 2013). Im Folgenden kommt es zur Konformationsänderung des Protein-Rezeptor-Komplexes und zur Fusion der Virushülle mit der Zellmembran.

Das frei im Zytoplasma befindliche Kapsid wird mit Hilfe der Kapsidproteine und dem Motorprotein Dynein entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert und bindet hier an den nukleären Porenkomplex (NPC) (Knipe und Howley 2013). Die virale DNA wird mit Hilfe des Virusproteins 1-2 (VP1-2) in den Zellkern entlassen und zirkularisiert durch direkte Ligation der Enden und Rekombination der betreffenden Sequenzen. HSV-1 hält für seine Replikation 84 Transkripte in 5 Arten von Genen bereit. In der Anfangsphase der Infektion, d. h. in den ersten Stunden nach Eintritt in die Zelle bis zu einem Maximum nach 2 bis 4 h, werden kaskadenartig immediäre, frühe Transkripte (α -mRNAs) produziert, um durch deren Translation die Kontrolle über die Produktion der β 1- und -2-Gene zu gewährleisten. Die effektive Transkription wird durch die zelluläre RNA-Polymerase II ermöglicht und u. a. durch das Virusprotein (VP)16 gesteuert. Die Transkription anderer, zellulärer mRNA wird durch ein weiteres virales Protein, das virion host shutoff (VHS), blockiert. Die β -Gene codieren für Thymidinkinase (TK), DNA-Polymerase und Helicase, sodass nach deren Transkription und Translation die Replikation der viralen DNA möglich wird. Diese wiederum induziert selbst die Transkription der γ -Gene (γ 1 und 2), welche für Strukturproteine, wie z. B. VP21, VP22 und VP24 codieren. Sie erzwingen die Assemblierung neuer Virionen (Modrow et al. 2010). Zelluläre Signalwege, wie beispielsweise die Apoptose, versuchen, diesen Mechanismen entgegenzuwirken, jedoch sorgen eine Reihe von infected cells proteins (ICPs) und andere virale Proteine in den meisten Fällen für Umgehung der Abwehrstrategien. Der hier beschriebene lytische Zyklus der Replikation führt damit zur Freisetzung neuer Viren aus der Zelle. Neben dieser Strategie ist auch eine Infektion benachbarter Zellen via Zell-zu-Zell-Kontakte möglich. Dies wird mithilfe der Glykoproteine gE/gI, gM und gD realisiert (Modrow et al. 2010). Herpesviren sind auch fähig, eine Latenz zu etablieren. Dabei verbleibt HSV-1 beim Menschen typischerweise in neuronalen Zellen, ohne Symptome hervorzurufen. Die Detektion des infektiösen Virus ist in diesem Zeitraum nicht möglich. Es wird mit einer Geschwindigkeit von 2 mm/h retrograd, entlang der Axone bis zum Nucleus eines Neurons transportiert und dringt in Form viraler DNA in diesen ein. α -, β - und γ -Gene sind aufgrund zellulärer Abwehr jedoch blockiert und führen nicht

zu viraler Protein- oder DNA-Synthese. Einige latency-associated-transcripts (LATs), welche nicht polyadenyliert sind und keine Cap-Struktur besitzen, werden jedoch in geringer Menge translatiert und haben in Bezug auf die Wirtszelle eine antiapoptotische Wirkung. Durch Verletzungen der Haut, damit einhergehender Prostaglandinfreisetzung und dem daraus resultierenden zellulären Stress kann es zu einer Reaktivierung der latenten Infektion kommen und ein lytischer Replikationszyklus induziert werden (Oxford et al. 2016).

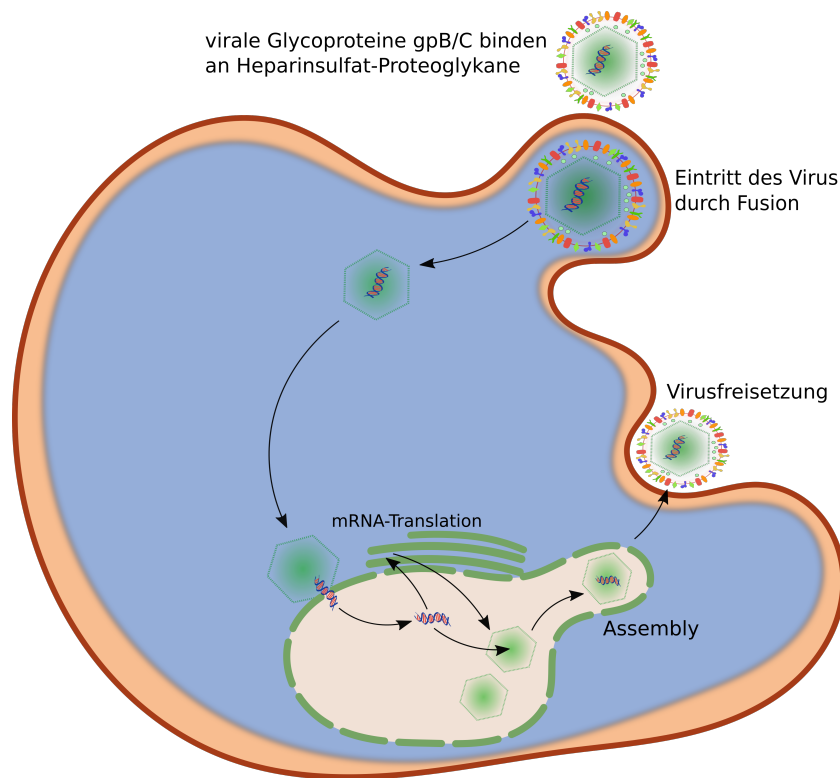


Abbildung 1.2: Infektionszyklus von HSV-1: Nach Anheftung an die Zellmembran kommt es endozytotisch oder durch Fusion zum Eintritt des Virus. Mit Hilfe der Mikrotubuli gelangt das Virus zum Zellkern und entlässt in diesen die virale DNA durch den NPC. Nach Transkription und Translation der viralen Gene, sowie Assemblierung neuer Virionen gelangt das Virus zurück zur Zellmembran und wird freigesetzt.

Während der Ausbreitung des Virus im Organismus führt die peripher initiierte Infektion an Nasenschleimhaut, *Kornea*, *Konjunktiva* oder einer anderen, nicht mehr intakten Hautbarriere nach mehrfacher Replikation zur Migration des Virus in neuronale Ganglienzellen. Von hier aus kann eine retrograde Wanderung zur Infektion des Zentralnervensystems (ZNS) führen oder eine Reaktivierung der peripheren Symptome durch

erneute Replikation des Virus in den primären Wirtszellen stattfinden.

1.1.5 Therapie

Bei einem apparenten *Herpes labialis* kann mit lokaler Aciclovir-Salbe behandelt werden. Wirkungsvoller gegen replizierendes HSV, jedoch nicht gegen latente Erreger, ist die systemische Therapie mit Aciclovir, alternativ Famciclovir oder Valaciclovir. Diese Wirkstoffe beruhen auf dem Prinzip eines Guanosinanalogs mit einer azyklischen Seitenkette, welches nach dreifacher Phosphorylierung durch virus- und wirtseigene Thymidinkinasen spezifisch die virale DNA-Polymerase hemmt (Aktories 2009). Es erfolgt ein Kettenabbruch nach Einbau des azyklischen Analogons. Das Cytidinanalogon Cidofovir zeigt neben seiner Indikation bei Humanes Cytomegalievirus (HCMV)-Infektionen Aktivität gegen TK-negative und damit Aciclovir-resistente Herpesviren (Rodriguez und Zachary 2017). Schmerzhaftes Vesikuläres oder Aphthen der Schleimhaut sollten zusätzlich symptomatisch durch Schleimhautpflege und Analgesie behandelt werden. Neben den genannten Therapieoptionen kann bei *Herpes labialis* auch eine topische Anwendung von Foscarnet in Betracht gezogen werden. Bei Verdacht auf eine HSVE muss in jedem Fall eine Intensivtherapie zur Prophylaxe eines Hirnödems eingeleitet werden. Aciclovir als systemische Therapie wird ebenfalls angewendet.

1.1.6 Problematik

In den vergangenen Jahren wurden vermehrt Virusstämme nachgewiesen, welche Resistenzen gegen die etablierten Therapien durch Nukleosidanaloga besitzen. Besteht eine komplizierte HSV-1-Infektion aufgrund resistenter Viren werden die oben aufgeführten Virostatika unwirksam. Es erscheint in dieser Hinsicht wünschenswert, eine Therapiealternative zu entwickeln. Bei einigen der heute angewendeten Wirkstoffe besteht die Gefahr schwerwiegender unerwünschter Arzneimittelwirkungen. So kann das bei akuten, mukokutanen HSV-Infektionen AIDS-kranker Patienten eingesetzte Foscarnet häufig ($\geq 1/100$, $< 1/10$ Patienten) u. a. zu Leukopenie, Thrombozytopenie, Neutropenie, Sepsis, gestörter Koordination, Konvulsion, peripherer Neuropathie, Tremor oder auch zu akutem Nierenversagen führen (aus Fachinfo-Service, Foscavir). Neue Therapiestrategien, basierend auf wirtseigenen Prozessen, gehen dem Problem der Resistenz aus dem Weg. Die betreffenden Signalwege bieten einerseits eine hohe genetische Konstanz, sind jedoch andererseits für die erfolgreiche Virusreplikation unabdingbar. Einen solchen Prozess stellen auch die Signalkaskaden des Sphingosin-1-Phosphats (S1P) dar.

1.2 Der Sphingosin-1-Phosphat-Signalweg und seine Bedeutung innerhalb des viralen Replikationszyklus

Sphingosin (Sph) sowie sein phosphoryliertes Derivat, S1P wurden lange Zeit als einfache Zwischenprodukte eines Abbauwegs des Sphingomyelins gesehen (Stoffel und Assmann 1970). Wie andere Verbindungen der Zellmembran setzt sich auch das Sphingomyelin aus einem polaren und einem unpolaren Teil zusammen. Zur Gewährleistung einer Homöostase und Integrität der Membranfunktionen ist eine fein abgestimmte Kontrolle von Auf- und Abbau der Sphingolipide notwendig. Bei einer Defizienz kataboler Enzyme, den Sphingomyelinasen, kann es zu einer Akkumulation des Sphingomyelins in zellulären Lysosomen kommen. Eine solche Sphingolipidose stellt die Niemann-Pick-Erkrankung dar. Sie geht mit Hepatosplenomegalie, einer interstitiellen Lungenerkrankung und Dyslipidämie einher (Patterson 2016, Schuchman und Wasserstein 2015).

Der lysosomale Abbau über S1P und Ceramid einerseits sowie andererseits der Abbau zu Phosphatidylethanolamin durch die S1P-Lyase (SPL) detoxifiziert das Molekül (Spiegel und Milstien 2003). Letztere spielt bei der Kontrolle der intrazellulären S1P-Konzentration eine Hauptrolle, da durch sie der letzte, irreversible Schritt der Degradation katalysiert wird. Bei einem Enzymdefekt oder Fehlen der SPL akkumuliert S1P in der Zelle und entwickelt toxische Wirkung (Mitroi et al. 2016). In jüngster Zeit wurden Funktionen des Paares Sph und S1P bekannt, die weit über jene einfacher Metabolite hinausreichen.

1.2.1 Das S1P im Stoffwechsel der Zelle

S1P entsteht durch enzymatische Phosphorylierung von Sph durch die Sphingosin-Kinase (SK) (Abb. 1.3), ein hauptsächlich zytosolisches Enzym, welches in zwei Isoformen vorkommt, SK1 und SK2. Unter ihnen scheint die SK2 prädominant im Gehirn zu sein (Blondeau et al. 2007). Durch unterschiedliche Signalmoleküle, vor allem Wachstumsfaktoren wie nerve growth factor (NGF), epithelial growth factor (EGF) und vascular endothelial growth factor (VEGF) sowie Zytokine wie tumor necrosis factor α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β), kann die SK aktiviert werden. Darüber hinaus sind viele weitere Aktivatoren dieses Enzyms beschrieben worden (Maceyka et al. 2002). Da es sich bei den Signalwegen der Wachstumsfaktoren um Tyrosinkinase (TyrK)-assoziierte Kaskaden handelt, sind jeweils weitere Effektoren zwischengeschaltet (Cooray 2004).

Nach Aktivierung transloziert die SK zur Plasmamembran. Dort liegt Sph, das spezifische Substrat des Enzyms, in erhöhter Konzentration vor, sodass effizient S1P synthetisiert werden kann. Durch die SK wird Sph zu S1P phosphoryliert und über spezifische Transporter, darunter spinster 2 (spns2), in den Extrazellulärraum transportiert (Hisano et al. 2012, Blaho und Hla 2014). Damit handelt es sich in erster Linie um einen auto- bzw. parakrinen Mechanismus, es wurden jedoch auch intrazelluläre Funktionen von S1P als Signalmolekül beobachtet (Cuvillier et al. 1996, Olivera und Spiegel 1993).

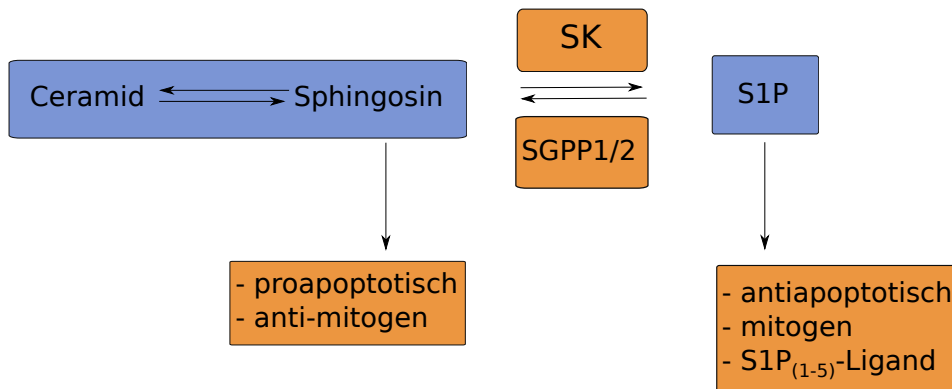


Abbildung 1.3: Stoffwechselgleichgewicht von Ceramid, Sph und S1P; Sphingosin-1-Phosphat Phosphatase 1/2 (SGPP1/2).

Abhängig von Gewebetyp, Entwicklung und Alter eines jeweiligen Patienten, zeigen sich unterschiedliche Expressionsmuster der S1PRs 1 bis 5 (Blaho und Hla 2014). Die S1PR₁₋₃ finden sich in den meisten Geweben, sie sind jedoch vor allem im kardiovaskulären System dominant (Waeber et al. 2004). Die Ausprägung des S1PR₄ ist auf Immunzellen begrenzt (Dillmann et al. 2015). S1PR₅ kommt vorrangig in der weißen Substanz des ZNS vor (Terai et al. 2003). Die Bindung von S1P an seine spezifischen Rezeptoren führt zu deren Aktivierung durch Autophosphorylierung und Weiterleitung des Signals über guanin nucleotide binding proteins (G-Proteine) (Abb. 1.4). So ist die Aktivierung aller S1PRs an die Funktion eines inhibitorischen G-Proteins ($G_{i/o}$) gekoppelt, die Aktivierung von S1PR₂ und S1PR₃ zusätzlich an G_q und die der S1PR₄ und S1PR₅ zusätzlich an $G_{12/13}$.

Diese G-Proteine führen als intrazelluläre Signalmoleküle zu einer Vielfalt an induzierten und untereinander vernetzten Signalkaskaden, welche insgesamt Auswirkungen auf Proliferation, Überleben und Apoptose, Zellmigration und die Ausprägung von Zell-zu-Zell-Kontakten haben. Allgemein kann dem S1P eine antiapoptotische und mitogene Wirkung zugeordnet werden (Spiegel und Milstien 2002). Es ist hierbei jedoch zu beach-

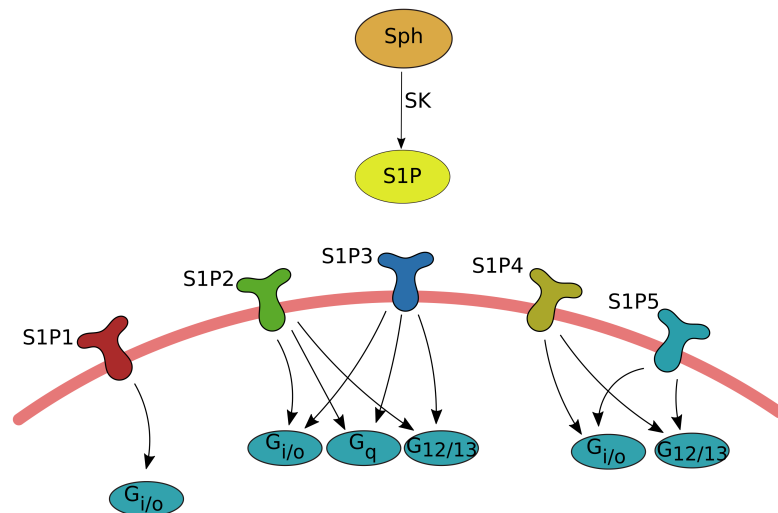


Abbildung 1.4: Signaltransduktion der S1PR nach Bindung des Liganden S1P (S1P-Synthese aus Sph erfolgt intrazellulär).

ten, dass sich bei Akkumulation von S1P v. a. durch intrazelluläre Kalzium-Freisetzung sowie weitere Prozesse auch eine proapoptotische oder toxische Wirkung ausprägen kann (Mitroi et al. 2016, Hagen et al. 2009).

Im Folgenden werden die einzelnen Signalwege ausgehend vom extrazellulären S1P betrachtet (Abb. 1.5). Eine konsekutive Anlagerung von Guanosin triphosphat (GTP) durch das $G_{i/o}$ -Protein nach Bindung des S1P an $S1PR_{1-5}$ führt zu Aktivierung der PI3K und folgender Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) an der 3'OH-Gruppe des Inositolrings zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) (Vanhaesebroeck et al. 2001). Dieses bewirkt eine Aktivierung der Serin/Threonin-Proteinkinase B (PKB) über die phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1). PKB nimmt eine zentrale Rolle in Signalwegen für zelluläres Überleben und Zellzykluskontrolle ein. Über Hemmung von p21, p27, Glycogen synthase Kinase 3- β (GSK3- β), Bcl-2-associated death promoter (bad), Bcl-2-like protein 11 (bim) sowie Caspase 9 einerseits und Aktivierung von X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) und induced myeloid leukemia cell differentiation protein (Mcl-1) andererseits, steuert PKB in komplexem Maße die Apoptose einer Zelle (Liu und Cohen 2015). Darüber hinaus beeinflusst ihre Aktivität die zelluläre Motilität und Morphologie. Einen relevanten Anteil daran hat die p21-activated kinase 1 (PAK1) und weitere, an der Dynamik des Zytoskeletts beteiligten Signalmoleküle, wie beispiels-

weise cell division control protein 42 (Cdc42). Als Gegenspieler der PI3K fungiert die PTEN, welche daher als Tumorsuppressorprotein eingeordnet werden kann (Spitzenberg et al. 2010). Ihre Aktivierung führt zu Apoptose und Zellzyklusstop. Neben der PKB-Aktivierung hat PIP3 auch einen Einfluss auf die GTPase Ras-related C3 botulinum toxin substrate (Rac1). Rac1 kann zwei unterschiedliche Konformationen einnehmen, die inaktive, GDP-gebundene und die aktive, GTP-gebundene. Gemeinsamer Effektor von Rac1 und der durch das $G_{i/o}$ -Protein inaktivierten Proteinkinase A (PKA) sind die p21-activated kinase (PAK) 1-6 (Bachmann et al. 2013). Sie können in zwei Gruppen eingeteilt werden. PAK1, 2, und 3 werden durch kleine GTPasen wie Cdc42-GTP oder Rac1-GTP aktiviert. Diese Zustandsänderung der Serin/Threonin-Proteinkinasen führt zur Ausprägung von Lamellipodien, flachen, eher lippenförmigen Ausstülpungen der zellulären Membran. Ihre Struktur wird durch verzweigte Aktinpolymere gewährleistet. Gemeinsam mit weiteren Signalen, welche auf die Reorganisation des Zytoskeletts einwirken, findet Rac1 damit seine Bedeutung unter anderem in der Ausbildung von Zell-zu-Zell-Kontakten sowie dem axonalen Wachstum neuronaler Zellen.

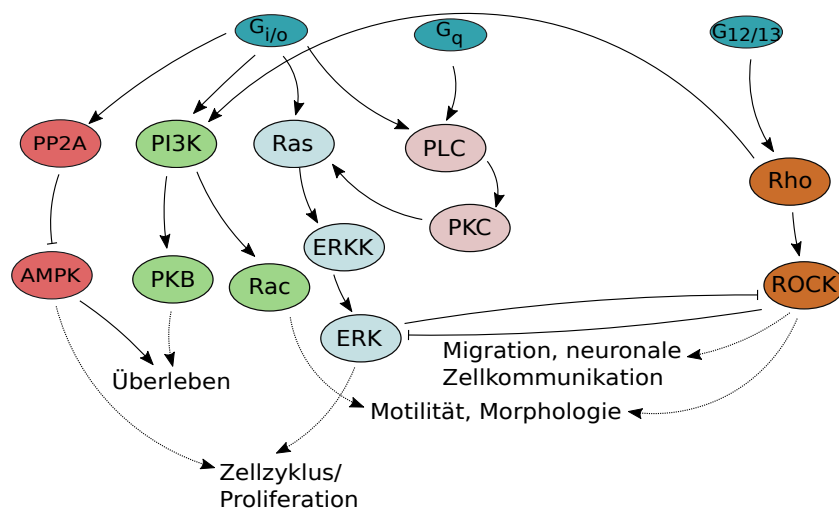


Abbildung 1.5: Vereinfachte Darstellung einiger, für die HSV-1-Replikation relevanter Signalkaskaden, ausgehend von den S1P-abhängigen GPCR.

Neben den bereits genannten Effektoren des $G_{i/o}$ -Proteins aktiviert die β -Untereinheit auch das kleine G-Protein rat sarcoma (Ras), welches über die weitere Signalkaskade, über rapidly accelerated fibrosarcoma kinase (Raf), mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) und mitogen-activated kinase/ extracellular-signal-regulated kinase (MAPK/ERK) Auswirkungen auf Proliferation und Migration von Zellen nehmen kann (Brinkmann 2007).

Die Aktivierung des G_q -Proteins durch die $S1PR_{2-5}$ führt zu einer erhöhten Affinität der Phospholipase $C\beta$ ($PLC\beta$) zu ihrem Reaktionsedukt. PIP₂ ist sowohl Substrat der PI3K als auch der Phospholipase C (PLC). Durch die Reaktion der PLC entsteht Diacylglycerin (DAG) und Inositol-tri-phosphat (IP₃). DAG ist in der Lage, die Proteinkinase C (PKC) zu aktivieren. Diese spielt eine wichtige Rolle bei Signaltransduktion sowie der Regulation von Wachstum und Differenzierung.

Zuletzt wird durch $S1PR_{2-5}$ das $G_{12/13}$ -Protein aktiviert und kann über seine β -Untereinheit das kleine G-Protein Ras homologue (Rho) in die GTP-gebundene Form überführen. Wie bei allen G-Proteinen wird dies durch einen guanine nucleotide exchange factor (GEF) gewährleistet. Nachgeordnet ist die Rho-assoziierte Kinase (ROCK). Sie spielt eine wichtige Rolle für Migration von Zellen und die Integrität der neuronalen Zellkommunikation. So hemmt ROCK die zelluläre Bewegung, reduziert die endotheliale Barrierefunktion und induziert Vasokonstriktion (Brinkmann 2007).

1.2.2 Modulation der zellulären S1P-Signaltransduktion durch HSV-1

Für eine erfolgreiche Virusreplikation von HSV-1 ist die Einflussnahme auf unterschiedliche zelluläre Signal- und Stoffwechselwege notwendig. Darunter befinden sich auch Signalkaskaden des S1P.

Im Zusammenhang mit der S1P-Rezeptoraktivierung wurde bereits die Wirkung des S1P-Rezeptorblockers FTY-720 in HSV-1-infizierten Mäusen analysiert. Ziel der Experimente war es, die anti-inflammatorische Wirkung von FTY-720 auf die virusinduzierte Immunpathologie zu untersuchen. Die Applikation von FTY-720 reduzierte die Entwicklung einer HSK; eine direkte Wirkung des Inhibitors auf die Virusreplikation wurde in diesen Studien jedoch nicht erfasst (Reddy et al. 2014, Sehrawat und Rouse 2008).

Für das β -Herpesvirus HCMV wurde bereits gezeigt, dass es, zur Optimierung der eigenen Replikation, Einfluss auf die SK und die zelluläre Dihydro-S1P-Konzentrationen nimmt (Machesky et al. 2008).

Eine Großzahl der viralen Proteine von HSV-1 sind aktuell bekannt, wobei in den meisten Fällen die genaue Funktion nicht abschließend geklärt ist. Auch die exakte Anzahl kann aufgrund der speziellen Genomorganisation nicht sicher angegeben werden (Arvin et al. 2007). Relevant für die Beeinflussung zellulärer Signalwege, welche im Zusammenhang mit S1P stehen, erscheinen die Produkte der viralen Gene U_s3 , U_s5 , U_s6 sowie das VP11/12 und die LAT-Proteine (Knipe und Howley 2013). Alle gehören zu den spä-

ten Transkripten, den γ -Genen. Besondere Bedeutung für die effektive Replikation hat das ausreichend lange Überleben der betreffenden Wirtszelle. Mit Hilfe der genannten VP11/12 sowie dem U_s3 -Protein, einer Proteinkinase, aktiviert HSV-1 u. a. die zelluläre PI3K (Eaton et al. 2014). Die Bedeutung und Funktion der zugehörigen Signaltransduktion in HSV-1-infizierten Zellen wurde bereits umfassend untersucht (Strunk et al. 2016, Tiwari und Shukla 2010, Zheng et al. 2014). Damit verbunden sind Prozesse, die u. a. zur Steigerung der Zellproliferation, -migration, -vitalität und des Überlebens der Zellen beitragen (Nakada et al. 2011, Pyne et al. 2016, Takuwa et al. 2012, Yang et al. 2015). In diesem Kontext reduziert die LY-294002-basierte Inhibition der PI3K-Aktivität die HSV-1-Vermehrung während verschiedener Phasen des Replikationszyklus (Benetti und Roizman 2006); möglicherweise durch Inhibierung interzellulärer Kontakte (Tiwari und Shukla 2010). U_s3 -Protein nimmt außerdem durch Förderung der Phosphorylierung von Substraten wie der PKA und dem U_s8A -Protein Einfluss auf die virale Zentralnervensystem (ZNS)-Invasion (Kato et al. 2016).

Jedoch ist nicht nur das reine Überleben sondern auch der zeitweilige Zustand der Wirtszelle für die erfolgreiche Replikation wichtig. Abhängig von deren Fortschritt ist HSV-1 in der Lage, seine Wirtszelle in die geeignete Phase des Zellzyklus zu bringen. Das Protein mitogen-activated kinase/extracellular-signal-regulated kinase (MAPK/ERK) schafft unter Einfluss des Virus in humanen *larynx epidermoid carcinoma cell line* (Hep-2)-Kulturen die Voraussetzung für eine G1/S-Progression und damit einhergehend für eine erfolgreiche Replikation (Colao et al. 2017). Demgegenüber wird der metabolische Zustand einer Zelle u. a. durch die Adenosin-monophosphat (AMP)-Konzentration und die assoziierte AMPK gesteuert. HSV-1 moduliert zur Optimierung seiner Replikation deren Phosphorylierung (Martin et al. 2014). Auch in diesem Zusammenhang spielt S1P eine Rolle, indem der S1PR₁ bei Bindung seines Liganden die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) aktiviert, welche ihrerseits die AMPK durch Dephosphorylierung inaktivieren kann (St-Cyr Giguère et al. 2017). Die Steigerung der AMPK-Aktivität in neuronalen Zellen durch Phytoalexine, wie z. B. Resveratrol oder Flavonole, wie das Quercetin, zeigt eine virushemmende Wirkung (Leyton et al. 2015).

Ebenfalls auf die Apoptose, jedoch auf anderem Weg, wirkt sich die Aktivität von gJ, dem Produkt des U_s5 -Gens aus. Es ermöglicht die Blockade des Fas- und GranzymB-abhängigen Zelltods durch Hemmung der Caspasen 3, 6 und 9 (Jerome et al. 2001). Auf einem dritten Weg führt gD, das Genprodukt von U_s6 , zu einem ähnlichen Effekt. Es ist in der Lage, an den zellulären Insulin-like growth factor- (IGF)-II-Rezeptor zu binden, durch den subsequent die Aktivierung des PKB-Signalwegs ausgelöst wird (Scalia et al.

2001).

Auch die LATs wirken während der Latenz des Virus auf den S1P-Signalweg ein, indem ihre Genprodukte die PKB aktivieren (Carpenter et al. 2015, Li et al. 2010) und die Caspase-3 inhibieren. Weiterhin ermöglichen sie möglicherweise die Verbreitung des Virus, indem die Ausprägung von Neuriten, welche Zell-zu-Zell-Kontakte darstellen, gefördert wird (Li et al. 2010). In diesem Kontext könnte die Rac1- bzw. Rho/ROCK-vermittelte Signaltransduktion von Bedeutung sein (Andor et al. 2001, Dixit et al. 2008).

Die Modulation des zellulären S1P-Signalwegs erfolgt bei einer HSV-1-Infektion auf vielfältige Art und Weise. Wie die Schwerpunkte hierbei hinsichtlich der Relevanz für eine erfolgreiche Replikation zu setzen sind, ist noch nicht abschließend geklärt.

2 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation soll evaluiert werden, inwiefern der Replikationszyklus des HSV-1 während einer Infektion von Neuroblastomzellen, welche als Modell für humane Neuronen verwendet werden, durch die Inhibition des Sphingosinkinase-Signalwegs beeinflusst werden kann. Es soll dargestellt werden, wie sich die Viruskinetik während einer Infektion ohne und unter der Einwirkung unterschiedlicher Modulatoren, welche alle in die Signalwege des S1P eingreifen, verhält. Bisherige Vorstellungen über das Zusammenspiel der S1PR-nachgeordneten Signalwege und deren Einfluss auf eine erfolgreiche Virusreplikation sollen durch Auswahl geeigneter Zielproteine überprüft werden. Von einigen viralen Proteinen sind die Funktionen bekannt, bei einem Großteil jedoch nicht vollständig geklärt, wie auch das Zusammenspiel zwischen ihnen häufig unklar ist. Durch die gezeigten Experimente kann in Teilen die Relevanz zellulärer Einflussfaktoren auf die Effektivität der HSV-1-Replikation evaluiert werden. Dabei werden Virustiter, die Expression viraler Markerproteine sowie mikroskopische Auswertungen herangezogen, um je nach Modulation durch die o. g. Substanzen Effekte nachzuvollziehen. Somit könnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg eine relevante Rolle in der Replikation und Virulenz von HSV-1 spielt und es auf unterschiedlichem Wege möglich ist, die Vermehrung des Virus, seine Virulenz sowie seinen zytopathischen Effekt auf Neuroblastomzellen zu hemmen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 3.1: Geräte und Material

Gerät/Material	Modell	Hersteller
24-well-Platten mit Deckel, steril		Greiner
96-well-Platten mit Deckel, steril		Greiner
Energieversorgung	Consort EV202	Consort bvba
Gefrierschrank (-20°C)		Liebherr GmbH
Gefrierschrank (-80°C)	FORMA 900 SERIES	Thermo Fisher Scientific Inc
Inkubationsschrank	BBD 6220	Heraeus CellStar
Kamera	AxioCam Erc5s	Carl Zeiss AG
Lichtmikroskop	Axio Vert.A1	Carl Zeiss AG
microplate reader	FLUOstar Omega	BMG LABTECH
Mischer	MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co.KG
Mischer	Vortex Mixer 7-2020	neoLab Migge
8-fach Multipipette	200 μl	Eppendorf
Pipetten	1000 μl , 200 μl , 100 μl , 10 μl	Eppendorf
Pipetten	Pipetman	Gilson Inc
Pipetten, Graduierung 1/10 ml	10 ml	Greiner
Pipettierhilfe	CellMate II	Matrix Technologies
SDS-PAGE- und Blot-Apparatur	Mini Protean	Biorad

Tabelle 3.1: Geräte und Material: Fortsetzung

Gerät/Material	Modell	Hersteller
Röhrchen mit Fuß	50 ml	Corning Falcon
Spitzen für Eppendorf-Pipetten	1000 μ l, 200 μ l, 100 μ l, 10 μ l	CytoOne Star Lab
Thermomixer	5436	Eppendorf
Zellkulturflasche CELLSTAR®	50 ml, 25 cm ²	Greiner
Zellkulturflasche CELLSTAR®	250 ml, 75 cm ²	Greiner
Zellkulturflasche CELLSTAR®	550 ml, 175 cm ²	Greiner
Zentrifuge	5418R	Eppendorf
Zentrifuge	Biofuge stratus	Heraeus

3.1.2 Antikörper

Tabelle 3.2: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Antigen	Charakterisierung	Ursprung	Hersteller
HSV-1 TK	primär, polyklonal	Ziege	Santa Cruz
hu β -Aktin	primär, monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Kaninchen IgG	sekundär, polyklonal, konjugiert mit alkali- scher Phosphatase	Ziege	Acris
Ziege IgG	sekundär, polyklonal, konjugiert mit alkali- scher Phosphatase	Ziege	Acris
ICP, Strukturantigene	primär, polyklonal	Ziege	Acris
Ziege IgG	sekundär, monoklonal, Cy3-konjugiert	Kaninchen	Acris

3.1.3 Zellen

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Zelllinien verwendet:

Tabelle 3.3: Verwendete Zellen

Zelllinie	Charakterisierung	Herkunft	Vertrieb
Verozellen	adhärentes Wachstum mit epithelialer Morphologie	Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze	ATCC: CCLL 81
SH-SY5Y	adhärentes, epitheliales Wachstum	humane Neuroblastomzellen	ATCC: CRL-2266
SK-N-LO	adhärentes, epitheliales Wachstum	humane Neuroblastomzellen	CLS-Nummer: 300400

3.1.4 Chemikalien

Tabelle 3.4: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
bovines Serumalbumin (BSA)	Promega
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen
Ethyendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva
Methanol 99,5 %	Fluka
Na ₄ P ₂ O ₇	Sigma Aldrich

Tabelle 3.4: Verwendete Chemikalien: Fortsetzung

Chemikalie	Hersteller
Na ₃ VO ₄	Sigma Aldrich
Paraformaldehyd 4 %	Morphisto
Phenylmethanolsulfonylfluorid (PMSF) (0,2 mM)	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS) ultra pure	Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Triton X100	Boehringer
Trypsin-Chelat-Lösung	Biochrom/interne Herstellung

Tabelle 3.5: Gebrauchsfertige Testsysteme und Produkte

Name	Verwendung	Hersteller
Bradford-Reagenz	Proteinbestimmung	Sigma Aldrich
BSA	Waschmedium	Promega
BSA Proteinstandard (Stammlösung 1,4 mg/ml)	Proteinbestimmung	BioRad
Cell-Proliferation-Reagent (WST-1)	Zytotoxizitätstest	Roche
Donkey-Serum	Fluoreszenzmarkierung	Santa Cruz
Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)	Zellkultur	Lonza

Tabelle 3.5: Gebrauchsfertige Testsysteme und Produkte: Fortsetzung

Name	Verwendung	Hersteller
Eagle's minimal essential medium (EMEM)	Zellkultur	Lonza
fetales bovines Serum (FBS)	Zellkultur	Gibco
Hoechst-33342	Immunfluoreszenzmarkierung	Thermo Scientific
IS-antifading-medium	Immunfluoreszenzmarkierung	dianova
NBT/BCIP (20 Tbl.)	Westernblot	Roche
Nitrozellulosemembran (Amersham®Protan®0,45 μ m NC)	Westernblot	GE Healthcare
protease inhibitor cocktail (PIC)	Proteinisolierung	Roche
Proteinmarker (PageRuler®prestained protein ladder)	SDS-PAGE	Thermo Scientific

Tabelle 3.6: Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Medium/Lösung	Zusammensetzung
Wachstumsmedium für Verozellen	EMEM + 5 % FBS
Wachstumsmedium für SH-SY5Y	DMEM + 10 % FBS
Wachstumsmedium für SK-N-LO	DMEM + 10 % FBS
4-fach Laufpuffer	0,4 % (m/V) SDS in 1,5 M Tris/HCL pH 6,8
4-fach Sammelpuffer	0,4 % (m/V) SDS in 0,5 M Tris/HCL pH 6,8
10-fach Laufpuffer	1,92 ml Glycin, 1 % (m/V) SDS, 250 mM Tris/HCL, pH 8,3
Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol in H ₂ O
2-fach Proteinladepuffer	100 mM Tris/HCl pH 6,0, 4% (m/V) SDS 10 % (V/V) β -Mercaptoethanol 20 % (V/V) Glycerol 0,1 % Bromphenolblau
tris-buffered saline with Tween-20 (TBST)	150 mM NaCl, 0,05 % (V/V) Tween-20, 10 mM Tris/HCl in H ₂ O, pH 8,0
Magermilch-Lösung (5 %)	25 g Magermilch 500 ml TBST-Puffer
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄
Waschpuffer	50 mM Tris pH 7,4, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA 50 mM NaF + frisch zugesetzt: 1 mM DTT, 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 1 mM Na ₃ VO ₄
Lysepuffer	Waschpuffer mit 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS 1 mM, PMSF 10 μ l/ml, PIC

Tabelle 3.7: Verwendete Modulatoren

Modulator	Konzentration [mmol/l]	Lösungsmittel	Hersteller
SKI-178	16,5	DMSO	Selleckchem
FTY-720	1	Methanol	Sigma Aldrich
JTE-013	10	DMSO	Tocris
LY-294002	80	DMSO	Jena Bioscience
AICAR	20	H ₂ O	Sigma Aldrich
NSC-23766	18,8	H ₂ O	Sigma Aldrich
Y-27632	10	DMSO	Selleckchem
U-0126	10	DMSO	MCE

3.2 Zellkulturen

3.2.1 Verozellen

Verozellen wurden ausgehend von einer konfluent bewachsenen T75-Flasche in EMEM mit 5 % FBS kultiviert. Zum Zweck einer Umsetzung erfolgte das enzymatische Detachment mit 3 ml einer chelatierten Trypsin-Lösung und Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ für 15 min. Die Zellen wurden in 10 ml serumhaltigen Medium (EMEM + 5 % FBS) aufgenommen und vereinzelt, was mikroskopisch gesichert werden konnte. Für eine Umsetzung im Verhältnis 1:3 wurden 7 ml der Zellsuspension in eine T175-Zellkulturflasche überführt und 3 ml in der T75-Flasche belassen. Beide Flaschen wurden mit frischem EMEM+5 % FBS befüllt. Hierbei wurden Volumina von 30 ml/T75-Flasche und 50 ml/T175-Flasche eingehalten. Bei 37 °C und 1 % CO₂ wurden die Zellen inkubiert und konnten so nach ca. 3 d abermals umgesetzt oder weiterverarbeitet werden.

3.2.2 Neuroblastomzellen (SH-SY5Y)

SH-SY5Y-Zellen (s. Abb. 3.1, A) stellen eine etablierte Zelllinie dar, welche ausgehend von SK-N-SH, einer nicht-klonierten Neuroblastom-Zelllinie, 1970 aus einem metastati-

schen Knochentumor kultiviert (Biedler et al. 1973), über die Subline SH-SY und SH-SY5 erzeugt wurde. Sie zeigt im Vergleich zu Ratten-Ganglien-Zellen eine erniedrigte Expression der Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) (Biedler et al. 1978). In den durchgeführten Versuchen wurde die Zelllinie SH-SY5Y jeweils SK-N-LO-Zellen (s. Abb. 3.1, B) gegenübergestellt. Sie weist im Vergleich eine erniedrigte PI3K γ - und p53-Aktivität, sowie eine erhöhte PTEN-Aktivität auf (Madishetti et al. 2014, Spitzenberg et al. 2010).

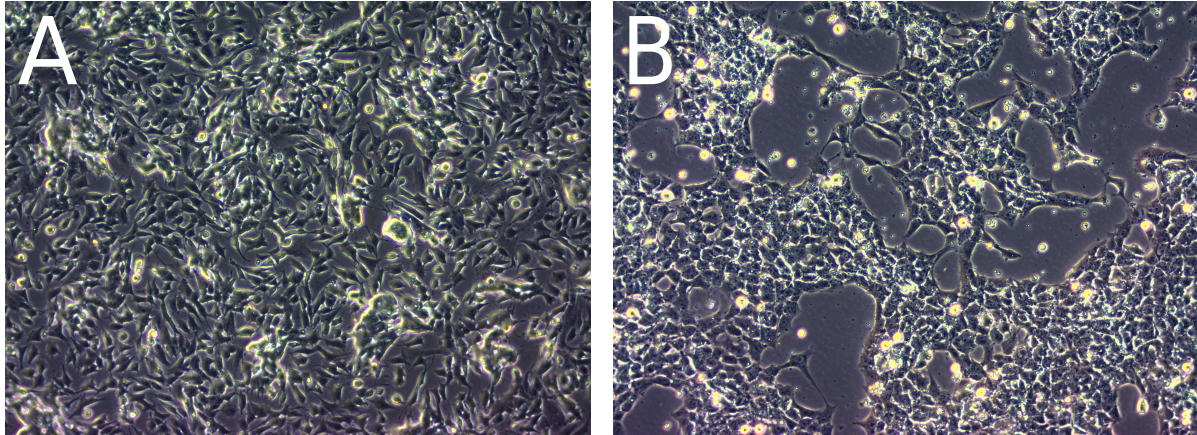


Abbildung 3.1: A: SH-SY5Y-Zellen, konfluenter Zellrasen vor Infektion. B: SK-N-LO-Zellen, mäßig konfluenter Zellrasen vor Infektion (Vergrößerung: 100x)

Neuroblastomzellen wurden ausgehend von einer konfluent bewachsenen T25-Flasche in DMEM mit 10 % FBS kultiviert. Zur Subkultivierung wurde das Ablösen mit 1 ml chelatierter Trypsin-Lösung durchgeführt. Nach Inkubation für 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen in 10 ml DMEM+10 % FBS aufgenommen und im Verhältnis 1:3 geteilt, wobei 5 ml der Zellsuspension in eine T75-Flasche überführt, 5 ml in der T25-Flasche belassen wurden. Beide Flaschen wurden mit frischem DMEM+10 % FBS befüllt. Hierbei konnten Volumina von 10 ml/T25-Flasche und 30 ml/T75-Flasche eingehalten werden. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach ca. 3 d konnte die Zellkultur von Neuem geteilt werden, sodass im Weiteren pro Woche eine Umsetzung und 2-facher Mediumswechsel beibehalten wurde. Die folgenden Subkultivierungen erfolgten im Verhältnis 1:20.

3.2.3 Neuroblastomzellen (SK-N-LO)

SK-N-LO ist ebenfalls eine etablierte Zelllinie (Bruchelt et al. 1985). Die Neuroblastomzellen wurden ausgehend von einer konfluent bewachsenen T25-Flasche mit 10 ml DMEM+10 % FBS kultiviert. Zur Subkultivierung erfolgte das Ablösen mit 1 ml che-

latierter Trypsin-Lösung. Nach Inkubation für 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen in 10 ml DMEM+10 % FBS aufgenommen und im Sinne eines Umsetzungsverhältnisses von 1:3 5 ml der Zellsuspension in eine T75-Flasche überführt; 5 ml verblieben in der T25-Flasche. Die Zellkulturflaschen wurden mit frischem DMEM+10 % FBS befüllt, wobei Volumina von 10 ml/T25-Flasche und 30 ml/T75-Flasche eingehalten wurden. Nach ca. 3 d bei 37 °C und 5 % CO₂ Inkubation konnte wiederum umgesetzt oder die Zellen einer anderen Verwendung zugeführt werden. Die weitere Subkultivierung erfolgte im Verhältnis 1:10.

3.3 Infektion zur Herstellung eines Virusstocks, HSV-1 (Kos)

Das bei -80 °C eingefrorene Virus HSV-1 (Kos) wurde handwarm aufgetaut. Die erhaltene Virussuspension wurde für 5 sec geschüttelt. 50 µl der Suspension wurden in eine vorgelegte 10 ml Lösung Serum-freien EMEM pipettiert. Die erhaltene virushaltige Flüssigkeit wurde auf die Verozellkultur einer T75-Zellkulturflasche gegeben. Diese wurde für 1 h bei 37 °C und 1 % CO₂ inkubiert. Nach dieser Infektionszeit wurde das Inokulum abgenommen und verworfen. 30 ml EMEM+5 % FBS wurden zugegeben und für 24 h bei 37 °C und 1 % CO₂ inkubiert.

Das Inokulum der infizierten Zellkultur in der T75-Flasche wurde mit einer Glaspipette abgenommen und in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Es wurden 3 Kryo-Röhrchen mit je 1 ml des Überstands befüllt und bei -80 °C eingefroren. 1 ml des Überstands wurde mit 14 ml serumfreiem EMEM verdünnt und zur Infektion einer T175-Flasche mit Verozellen verwendet. Es erfolgte die Inkubation für 1 h bei 37 °C und 1 % CO₂. Das Inokulum wurde entfernt und verworfen. Es wurden 35 ml EMEM+5 % FBS zugegeben und für 36 h bei 37 °C und 1 % CO₂ inkubiert.

Die mit HSV-1 infizierte T175-Flasche wurde für 48 h bei -20 °C eingefroren.

Die Zellkultur der T175-Flasche wurde aufgetaut und zur Zentrifugation und Abtrennung des Zelldetritus zu gleichen Teilen in 2 Falcon-Röhrchen überführt. Es wurde bei 600 x g und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit je 1 ml in 34 Kryo-Röhrchen pipettiert und diese bei -80 °C als Virusstock eingefroren.

3.4 Virustitration von HSV-1 auf Verozellen mithilfe des TCID₅₀

Zur Vorbereitung der Titration nach dem TCID-Verfahren wurde die Zellzahl der Verozellen bestimmt und auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt.

Von 3 Proben des Virusstocks wurden Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-10} angelegt, wobei auf einer 96-well-Platte 3 Reihen je Probe vorgesehen waren. Zu diesem Zweck wurden $225 \mu\text{l}$ serumfreies EMEM in den Kavitäten vorgelegt und $25 \mu\text{l}$ des Virus zur Verdünnungsstufe 10^{-1} pipettiert. Im Folgenden wurden die anderen Verdünnungsstufen ausgehend von Stufe 10^{-1} pipettiert. Auf weiteren 96-well-Platten wurden Verozellen definierter Konzentration (2×10^5) derart ausgesät, dass für jede Verdünnungsreihe 4 Auswertungsreihen vorhanden waren. Es erfolgte zur Anheftung der Zellen eine Inkubation bei 37°C und 1 % CO_2 für 1 h. In jedes well wurden $50 \mu\text{l}$ der jeweiligen Virusverdünnung pipettiert. Nach 3 d bei 37°C und 1 % CO_2 erfolgte die mikroskopische Auswertung anhand des zytopathischen Effekts (ZPE).

3.5 Viruskinetik

Zur Darstellung der Kinetik einer HSV-1-Infektion auf SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen wurden 2 24-well-Platten mit Zellen angelegt. Die Aussaat der Zellsuspensionen erfolgte mit 2×10^5 Zellen/ml, welche durch Ablösen und Verdünnung aus einer konfluent bewachsenen T75-Flasche gewonnen werden konnten. Je 20 wells wurden mit $500 \mu\text{l}$ Zellsuspension/well befüllt, um eine 3-fach-Messung der Zeitpunkte 0, 6, 12, 24, 36, 72 h zu gewährleisten und je eine Zellkontrolle und Zählkontrolle mitzuführen. Um mit der Infektion der Zellen beginnen zu können, sollte ein konfluenter Zellrasen vorliegen, allerdings bleiben auch bei vollständiger Konfluenz der SH-SY5Y-Zellen Interzellularräume sichtbar (s. Abb. 3.1). Die Infektion erfolgte im Folgenden mit einer Dosis von 5 MOI, wobei $200 \mu\text{l}$ /well verwendet und 1 h Anheftungszeit bei 37°C und 5 % CO_2 gewährleistet wurden. Nachfolgend wurde das Inokulum abgenommen, durch $500 \mu\text{l}$ DMEM+10 % FBS ersetzt und im Fall des Zeitpunkts 0 der Viruskinetik unmittelbar wieder abgenommen und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurden 3 Proben je Zeitpunkt und Zelllinie erhalten, welche bei -20°C bis zur auswertenden Titration eingefroren wurden.

3.6 Bestimmung des ZPE bei SH-SY5Y-, SK-N-LO- und Verozellen

Zur mikroskopischen Darstellung des ZPE wurde je Zelllinie eine 6-well-Platte mit 2×10^5 Zellen/ml/well angelegt. Dies entspricht einer Zählkontrolle, einer Kontrolle, einer zweifachen Darstellung der MOI 0,1 sowie jeweils einzelner Darstellungen der MOI 1 und 5. Bei vollständiger Konfluenz wurde nach Zellzählung die entsprechende Dosis des Virus eingestellt und nach Abnahme des Mediums mit 1 ml Inokulum/well infiziert. Nach der Anheftungszeit von 1 h wurde dieses wiederum entfernt und durch 2 ml DMEM+10 % FBS bzw. EMEM+5 % FBS ersetzt. Es erfolgte die mikroskopische Beobachtung aller drei MOI zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 36, 72 h in 100-facher und 200-facher Vergrößerung, wobei die jeweilige Kontrolle mitgeführt wurde.

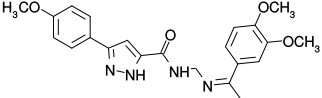
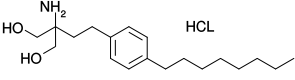
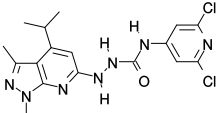
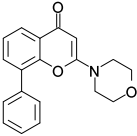
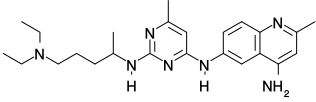
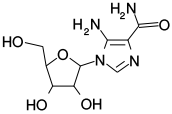
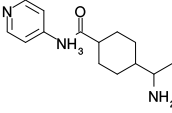
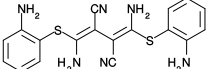
3.7 Modulation der S1P-Signalwege in HSV-1-infizierten Zellen

Viele der zelleigenen Signalwege spielen für eine erfolgreiche Replikation eine Rolle. Mit Hilfe von 8 Modulatoren (s. Tab. 3.8) innerhalb der S1P-Signalwege kann die Bedeutung dieser charakterisiert und eventuell die Effektivität der HSV-1-Infektion beeinflusst werden.

3.7.1 Vitalitätstestung

Zum Ausschluss eventueller Toxizität der eingesetzten Modulatoren des S1P-Signalwegs auf die verwendeten Zelllinien wurde der Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche) verwendet. Das verwendete Reagenz ist eine klare Lösung, welches WST-1 sowie ein Elektron-koppelndes Reagenz in Phosphatpuffer enthält. WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulphonat) wird in diesem Assay durch mitochondriale Dehydrogenasen intakter Zellen zu Formazan umgesetzt, welches dunkelrot erscheint (s. Abb. 3.2). Je mehr vitale Zellen vorhanden sind, desto höher ist die entsprechende Enzymkonzentration und auch die Menge an umgesetzten WST-1. Die Konzentration des Produkts kann durch Absorbanzmessung bei 450 nm bestimmt und mit einer Lösungsmittel-Kontrolle ins Verhältnis gesetzt werden. Eine signifikante Schädigung der Zellen wurde unter 80 % relative Vitalität angenommen.

Tabelle 3.8: Modulatoren des S1P-Signalwegs

Inhibitor	Funktion	Strukturformel
SKI-178	Inhibition der SK1	
FTY-720	funktionelle Inhibition der S1PR _{1,3-5}	
JTE-013	Inhibition des S1PR ₂	
LY-294002	Inhibition der PI3K	
NSC-23766	Inhibitor des kleinen G-Proteins Rac1	
AICAR	Aktivierung der AMPK	
Y-27632	Inhibition der ROCK	
U-0126	Inhibition der ERK-Kinase 1/2	

Zur Vorbereitung des WST-1 wurden SH-SY5Y-Zellen bzw. SK-N-LO-Zellen mit einer Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml in 3x5 wells einer 96-well-Platte ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h inkubiert bis ein konfluenter Monolayer mikroskopisch nachweisbar war. Das in den Kavitäten vorliegende Medium (DMEM+10 % FBS) wurde durch mit dem jeweiligen Modulator versetztes Medium ausgetauscht, wobei bestimmte Konzentrationen verwendet wurden (s. Tab. 3.9). Drei Kavitäten dienten als Kontrolle mit DMSO, Methanol oder H₂O. Für alle Modulatoren bis auf U-0126 wurden jeweils 3 wells pro Konzentration nach 24 h per WST-1 ausgewertet. Bei Verwendung von U-0126 erfolgte diese Auswertung zusätzlich bereits nach 1 h Inkubation. In jede zu

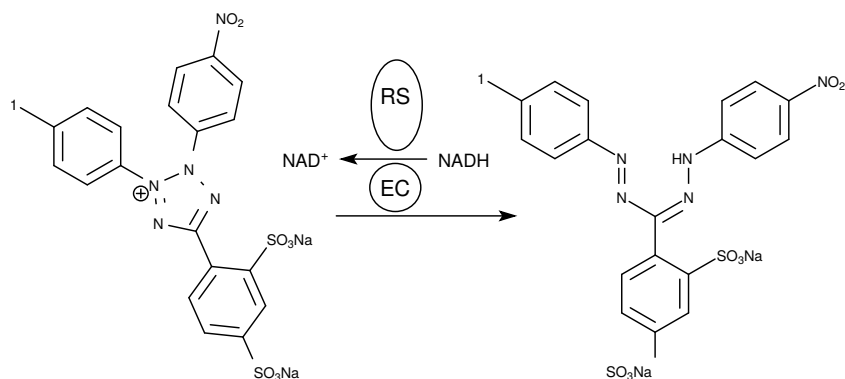


Abbildung 3.2: Katalytische Spaltung des Tetrazoliums Salzes zu Formazan durch mitochondriale Enzyme; EC = electron coupling reagent; RS = mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system; nach Roche Cell Proliferation Reagent WST-1

untersuchende Kavität wurden hierfür 10 μl des WST-1-Reagenz gegeben und für 2 h bei 37 $^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 unter Lichtabschluss inkubiert. Es folgte die Auswertung per Absorbanzmessung bei 450 nm gegen DMEM+10 % FBS mit 10 μl WST-1 als Leerwert.

Tabelle 3.9: Verwendete Konzentrationen der S1P-Signalweg-Modulatoren

Modulator	Lösungsmittel	Konzentration (SH-SY5Y) [$\mu\text{mol/l}$]	Konzentration (SK-N-LO) [$\mu\text{mol/l}$]
SKI-178	DMSO	0,1, 1, 4, 10	0,1, 1, 4, 10
FTY-720	Methanol	0,01, 0,1, 0,5, 1	0,01, 0,1, 0,5, 1
JTE-013	DMSO	0,01, 0,1, 0,5, 1, 10	0,01, 0,1, 0,5, 1, 10
LY-294002	DMSO	0,1, 0,5, 1, 2,5, 4, 10	1, 2,5, 4, 10
NSC-23766	H_2O	10, 20, 30, 50, 100	1, 5, 10
AICAR	H_2O	0,01, 0,05, 0,1, 0,5	0,5, 1, 2
Y-27632	DMSO	1, 5, 10	1, 5, 10
U-0126	DMSO	5, 10, 15	1, 2,5, 5

3.7.2 Inhibition der SK1 durch SKI-178

Dem gesamten S1P-Signalweg übergeordnet erscheint die SK1, welche Sph zu S1P phosphoryliert. Durch SKI-178 (Dimethoxyphenyl-ethyliden-methoxyphenyl-pyrazol-carbohydrazide, N-(1E)-1-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethylidene) -3-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrazol-5-carbohydrazid) (s. Tab. 3.8, SKI-178) kann in reversibler, kompetitiver Weise selektiv die SK1 gehemmt werden ($K_i = 1,33$). Damit wird die S1P-Synthese verhindert und alle von S1PR abhängigen Signalwege moduliert.

Virustiterbestimmung bei Anwendung von SKI-178 bei SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen

Um die Viruskonzentration 24 h p. i. bei SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen unter SKI-178-Einfluss zu bestimmen, wurden beide Zelllinien mit einer Ausgangskonzentration von 4×10^5 Zellen/ml in 24-well-Platten ausgesät und innerhalb von 24 h zu einem konfluenten Layer wachsen gelassen. In jeweils 3 Parallel-wells wurden DMSO-Kontrolle und SKI-178 in den Konzentrationen 1,4 und 10 $\mu\text{mol/l}$ zugegeben. Es erfolgte die Vorinkubation über weitere 24 h. Nach der Zellzahlbestimmung und Berechnung der benötigten Viruskonzentration wurde eine Infektionsdosis von 5 MOI eingestellt und die Zellen über eine Anheftungszeit von 1 h infiziert. Nach Abnahme des Inokulums und Ersatz durch DMEM+10 % FBS wurden die infizierten Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ über 24 h inkubiert. Die abgenommenen Überstände aus den wells wurden auf Verozellen in 96-well-Platten titriert und nach dem TCID₅₀ ausgewertet.

Zur Darstellung einer zeitlichen Abhängigkeit des SKI-178-Einflusses auf die HSV-1-Replikation wurden wiederum 24-well-Platten mit 4×10^5 Zellen/ml und 1 ml/well ausgesät. Bei vollständiger Konfluenz wurden nach Abnahme des Mediums je 3 wells pro Zeitpunkt (6 h, 12 h, 24 h) mit DMSO-Kontrolle bzw. 4 μM SKI-178 über 24 h vorinkubiert. Im Folgenden wurde der Überstand abgenommen und nach Zellzählung und Einstellung einer MOI von 5 die Infektion der Zellen durchgeführt. Nach 1 h Anheftungszeit wurde das Inokulum entfernt und mit 500 μl DMEM+10 % FBS ersetzt. Die Abnahme der Überstände erfolgte zu den Zeitpunkten 6, 12 und 24 h wonach alle Überstände bei -20 °C eingefroren wurden. Nach Auftauen der Proben wurden sie, zur Abtrennung der Zellreste, für 20 sec zentrifugiert und nachfolgend der Titration auf Verozellen zugeführt.

Um eine MOI-Abhängigkeit der SKI-178-Wirkung auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden Zellen beider Zelllinien mit einer Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml in 24-well-Platten ausgesät, über 24 h bis zur Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO₂ gebracht

und im Folgenden mit 4 μ M SKI bzw. DMSO in DMEM+10 % FBS zur Kontrolle für weitere 24 h vorinkubiert. Jeweils 6 wells (3-fache Bestimmung mit SKI und DMSO-Kontrolle) wurden mit derselben Viruskonzentration infiziert. Dabei wurden 0,1, 1 und 5 MOI verwendet. Es erfolgt die Anheftung des Virus über 1 h im Inkubator und der folgende Austausch des Inokulums gegen 500 μ l DMEM+10 % FBS. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und bei -20 °C eingefroren. Nach Auftauen der Proben wurden diese für 20 sec zentrifugiert, um mögliche Konglomerate von Zellresten und Virus zu entfernen und durch Titration auf Verozellen einer TCID₅₀-Bestimmung zugeführt.

Zur Untersuchung intrazellulärer Virusreplikation bei SKI-Einwirkung wurden Zellen beider Zelllinien mit einer Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml in 24-well-Platten ausgesät, über 24 h bis zur Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO₂ gebracht und im Folgenden mit 4 μ M SKI bzw. DMSO in DMEM+10 % FBS zur Kontrolle für weitere 24 h vorinkubiert. Sechs wells wurden mit einer MOI von 0,1 infiziert. Es erfolgte die Anheftung des Virus über 1 h im Inkubator und daraufhin der Austausch des Inokulums gegen 500 μ l DMEM+10 % FBS. Nach 6 h wurden die Überstände abgenommen und die infizierten Zellen durch Zugabe von 200 μ l Trypsin-Lösung und Spülen mit 300 μ l DMEM+10 % FBS gewonnen. Beide Probenserien wurden bei -20 °C eingefroren. Nach Auftauen der Proben wurden diese für 20 sec zentrifugiert, um mögliche Konglomerate von Zellresten und Virus zu entfernen und durch Titration auf Verozellen einer TCID₅₀-Bestimmung zugeführt.

3.7.3 Modulation der S1PR₁ und R₃₋₅ durch FTY-720

Die Substanz FTY-720 (Fingolimod) (s. Tab. 3.8, FTY-720) bindet nach Metabolisierung als Phosphatester selektiv die S1PR₁ und R₃₋₅ und führt zu deren Aktivierung. Es handelt sich hierbei um einen funktionellen Antagonismus, da es zur schnellen Internalisierung der S1PR kommt und sie nach Ubiquitinylierung abgebaut werden. FTY-720 ist ZNS-gängig und akkumuliert in der weißen Substanz. Bisher liegen Studien zum therapeutischen Einsatz von Fingolimod im Rahmen der Polyradikulopathie, des Asthma bronchiale, der Amyotrophen Lateralsklerose sowie der Schizophrenie vor. Da viele Funktionen des S1P über die genannten Rezeptoren etabliert werden, kann die Hemmung dieser einen Einfluss auf die Virusreplikation haben. Die Bestimmung der Zytotoxizität sowie die TCID₅₀-Bestimmung erfolgten auf dieselbe Weise wie bei Verwendung von SKI-178 mit den abweichenden Konzentrationen und Lösungsmittel lt. Tab. 3.9. Für SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen wurden MOI von 0,1 bzw. 1 gewählt.

3.7.4 Inhibition des S1PR₂ durch JTE-013

Der S1PR₂ spielt besonders im Rahmen der neuronalen Erregbarkeit, der Gefäßneubildung sowie der Migration von Zellen eine Rolle. Durch JTE-013 (s. Tab. 3.8, JTE-013) kann er selektiv gehemmt werden. Zytotoxizitätstests und Bestimmung der Virustiter nach Inkubation mit JTE-013 erfolgten auf dieselbe Weise wie bei Verwendung von SKI-178 mit den in Tab. 3.9 angegebenen Konzentrationen und Lösungsmittel. Für SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen wurden MOI von 0,1 bzw. 1 gewählt.

3.7.5 Inhibition der PI3K durch LY-294002

Durch LY-294002 (s. Tab. 3.8, LY-294002) können PI3K der Klasse I, α , β und δ gehemmt werden (King et al. 1997). Neben dieser hauptsächlichen Funktion zeigt die Substanz einige weitere Aktivitäten innerhalb der zellulären Signalwege. So wurde gezeigt, dass sie inhibitorische Effekte u. a. auf Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2), Casein-Kinase 2 (CK2), Phosphodiesterase 2 (PDE2), Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3)- β sowie eine Störung des Chaperons p97/VPC ausprägen kann (Gharbi et al. 2007). LY-294002 wurde aus dem Flavonoid Quercetin entwickelt und stellt einen kompetitiven Inhibitor dar. Durch Verwendung der Substanz erscheint es möglich, einen Antagonismus zur Aktivität der Virusproteine 11/12 (VP11/12) und des U₃-Proteins zu erreichen. WST-1 und Virustiterbestimmung erfolgten in derselben Weise wie bei Verwendung von SKI-178 mit den abweichenden Konzentrationen lt. Tab. 3.9. Für SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen wurden MOI von 0,1 bzw. 1 gewählt.

3.7.6 Inhibition von Rac1 durch NSC-23766

NSC-23766 (s. Tab. 3.8, NSC-23766) hemmt das Protein Rac1, einen Effektor des PI3K-Signalwegs, welcher u. a. Einfluss auf PAK-1 sowie die zelluläre Migration und neuronale Zellkommunikation nimmt. Die hier durchgeführten Zytotoxizitätstests und TCID₅₀-Bestimmungen entsprechen denen mit SKI-178 mit den Konzentrationen lt. Tab. 3.9. Für SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen wurden MOI von 0,1 bzw. 1 gewählt.

3.7.7 Aktivierung der AMPK durch AICAR

Auf mehreren Wegen beeinflusst HSV-1 die Apoptose. So wird die Aktivität der zellulären AMPK während der frühen Infektion beeinträchtigt, um die Virusproteinexpression zu steigern. Dies erfolgt möglicherweise über die indirekte Aktivierung von mammalian

target of rapamycin complex 1 (mTORC1), welches unabdingbar für eine Cap-abhängige Translation viraler Proteine ist (Leyton et al. 2015). Späte (γ -) Gene werden vorerst inhibiert. Im weiteren Verlauf der Infektion wird die AMPK reaktiviert, um ein Überleben der Wirtszelle so lange zu gewährleisten, bis innerhalb des lytischen Replikationszyklus genügend Viren gebildet wurden, um die Infektion anderer Zellen zu ermöglichen. Gleichzeitig kann über die Aktivierung der AMPK und die damit verbundene silent mating type information regulation 2 homolog 1 (Sirt-1)-Stimulation eine Verminderung der Entzündungsreaktion erreicht werden, da von beiden Signalen aus $\text{NF}\kappa\text{B}$ gehemmt wird. Sirt-1 aktiviert dabei peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC1)- α sowie die AMPK. Diese Faktoren inhibieren die Funktion von $\text{NF}\kappa\text{B}$. Eine relevante Rolle in dieser Signalkaskade spielt τ -Protein, welches abhängig vom Phosphorylierungsmuster die Mikrotubuli-Struktur innerhalb von Neuronen stabilisiert. Durch die AMPK erfolgt eine Hemmung der abnormalen Hyperphosphorylierung von τ -Protein in SH-SY5Y-Zellen. Diese Hyperphosphorylierung wird von HSV-1 gesteigert, womit nachfolgend die Degradation des Proteins durch Caspase-3 an D⁴²¹ eingeleitet wird. HSV-1 erreicht dadurch eine Störung der zellulären Mikrotubuli-Dynamik und beispielsweise die Schädigung von Neuriten in neuronalen Zellen (Leyton et al. 2015).

AICAR (s. Tab. 3.8, AICAR) stellt einen Aktivator der AMPK dar und kann somit während der späten Infektion einer gesteigerten Virusreplikation entgegen wirken. Die Versuche mit AICAR wurden wie jene mit SKI-178, mit den Konzentrationen und Lösungsmittel lt. Tab. 3.9 durchgeführt. Für SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen wurden MOI von 0,1 bzw. 1 gewählt.

3.7.8 Inhibition der ROCK durch Y-27632

Durch die Substanz Y-27632 (s. Tab. 3.8, Y-27632) kann spezifisch die ROCK gehemmt werden, welche über das kleine G-Protein Rho ebenfalls Einfluss auf neuronale Zellkommunikation und Migration, wie auch die Ausprägung von Zell-zu-Zell-Kontakten nimmt. Die Zytotoxizitätstests und Virustiterbestimmung mit Y-27632 wurden wie bei den Versuchen mit SKI-178 bei angepassten Konzentrationen und Lösungsmittel lt. Tab. 3.9 durchgeführt. Für SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen wurden MOI von 0,1 bzw. 1 gewählt.

3.7.9 Inhibition der ERK-Kinase 1/2 durch U-0126

U-0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien) (s. Tab. 3.8, U-0126) stellt einen selektiven Inhibitor der ERK-Kinase (ERKK) 1 und 2 dar. Dieses Enzym ist in der Lage, MAPK/ERK durch Phosphorylierung zu aktivieren. Wie bereits beschrieben, spielt ERK als Effektor aller S1PR für Zellzyklus und Proliferation eine wichtige Rolle (s. S. 13). Die Versuche mit U-0126 erfolgten wie jene mit SKI-178 bei einer abweichenden Vorinkubationszeit von 1 h und den angepassten Konzentrationen lt. Tab. 3.9. Für SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen wurden MOI von 0,1 bzw. 1 gewählt.

3.8 Proteinchemische Methoden

3.8.1 Proteinisolierung

Zur Vorbereitung einer Proteinisolierung aus infizierten bzw. schein-infizierten Neuroblastomzellen wurden SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen in je 4 Petrischalen (Durchmesser = 9 cm) ausgesät. Darunter fanden sich eine Zählkontrolle, eine Probe zur schein-Infektion, sowie je eine zur Vorinkubation mit AICAR und der zugehörigen H₂O-Kontrolle. Zur Gewährleistung eines konfluenten Zellrasens nach 24 h wurden die Zellen mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml und 10 ml/Schale ausgebracht. Eine Vorinkubation mit AICAR in der Konzentration 0,1 mmol/l für SH-SY5Y-Zellen und 2 mmol/l für SK-N-LO-Zellen wurde über ebenfalls 24 h unter Einbeziehung einer H₂O-Kontrolle durchgeführt. Nach Abschluss der vorgesehenen Zeit wurde für beide Zelllinien die Zellzahl bestimmt und eine MOI von 0,1 für SH-SY5Y- bzw. 1 für SK-N-LO-Zellen berechnet. Die Petrischalen der H₂O-Kontrolle sowie jene mit AICAR wurden entsprechend mit HSV-1 (Kos) bei einer Anheftungszeit von 1 h bei 37°C und 5% CO₂ infiziert. Die schein-infizierte Kontrolle wurde jeweils identisch behandelt, ohne Virus zuzufügen. Es folgte eine Inkubation über 24 h. Für eine erfolgreiche Isolierung der zellulären und viralen Proteine in infizierten Zellen wurden die vorliegenden Proben lysiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der erfolgreichen HSV-1-Infektion wurden die 3 verbleibenden Zellproben zweimalig mit 4 ml Waschpuffer (pH 7,4) gewaschen. Die Zusammensetzung desselben aus Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), EDTA, Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), Natriumfluorid (NaF), Dithiothreitol (DTT), Natriumdiphosphat (Na₄P₂O₇) und Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) gewährleistet eine Erhaltung der in den Folgeversuchen benötigten Proteine durch eine Hemmung zellulärer Proteasen und Luftoxidation. Nach vollständiger Entfernung von Flüssigkeitsresten aus

den Schalen wurden die Zellen für 15 min einem Lysepuffer ausgesetzt. Dieser enthält 1% Triton-X100 (O-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenoxy]polyethoxyethanol) und 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS) als Detergenzien, um Proteine aus den Zellen und Membranen herauszulösen. Weiterhin sind ein protease inhibitor cocktail (PIC) sowie Phenylmethylsulfonylfluorid/Dimethylsulfoxid (PMSF/DMSO) mit 5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ zum Schutz der Proteine enthalten. Während der Inkubation mit Lysepuffer wurden die Schalen mehrfach geschwenkt. Nachfolgend konnte das Zellysate mithilfe eines Zellschabers gewonnen und bei 4 °C und 3000 rpm für 6 min zentrifugiert werden, um den Zelldetritus zu entfernen. Der proteinhaltige Überstand wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

3.8.2 Proteinbestimmung

Für die Durchführung eines Westernblots wurden Proteinproben gleicher Konzentration benötigt. Um diese jeweils exakt zu bestimmen, musste eine Kalibrierungskurve erstellt werden. Da die Konzentration eines Proteingemisches erfasst werden sollte, wurde als Standard bovines Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 2,5, 5,0, 7,5, 10, 12,5 und 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aqua bidest. verwendet. Alle Arbeiten zur Proteinbestimmung erfolgten auf Eis. Ausgehend von einer BSA-Stammlösung (1,4 mg/ml) wurde die entsprechende Verdünnungsreihe angelegt und 100 μl je Probe in eine 96-well-Platte übertragen. Die Proteinproben aus den Zellysaten wurden in den Verhältnissen 1:500, 1:1000, 1:2500 und 1:5000 in Aqua bidest. verdünnt und ebenfalls mit 100 μl /Kavität aufgetragen. Zu jeder Probe wurden 100 μl Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBBG) pipettiert und die Platten lichtgeschützt gehalten. Der Farbstoff bildet mit kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine Komplexe, welche im Gegensatz zum nicht komplexierten Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 595 nm sowie einen erhöhten Absorptionskoeffizienten aufweisen. Die Steigerung der Absorbanz kann daher photometrisch ermittelt werden. Innerhalb von 30 min erfolgte die Messung als Zweifachbestimmung. Auf diese Weise wurde die Kalibrierungskurve erstellt und die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt. Die weiter zu verwendende Verdünnung wurde auf Grundlage geringster Abweichung zwischen beiden Absorbanzwerten einer Probe und der Lage innerhalb der Kurve festgelegt.

3.8.3 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Um eine Darstellung der viralen Thymidinkinase und dem Kontrollprotein β -Aktin im Westernblot zu ermöglichen, musste das Proteingemisch aus dem Zellysate der infizierten

und schein-infizierten Zellen zunächst aufgetrennt werden. Die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht diese Trennung der Proteine nach ihrer hydrodynamischen Beweglichkeit, d. h. abhängig von der Molekülgröße, und zusätzlich nach ihrer Ladung. Hierbei werden zunächst alle Disulfidbrücken durch Mercaptoethanol gespalten. Das SDS fungiert als anionisches Detergens, welches alle nicht-kovalenten Bindungen innerhalb der Proteine spaltet und durch Micellenbildung die Eigenladungen des jeweiligen Proteins maskiert. Die Gesamtladung der Micellen wird damit negativ und proportional zur Molekülgröße (Renneberg 2007).

Zur Herstellung eines Polyacrylamid-Trenngels wurden in einem 5-ml-Eppendorf-Gefäß 2,0 ml Acrylamid (30%), 1,6 ml Aqua bidest., 1,2 ml 4-fach-Laufpuffer, 21,5 μ l Ammoniumpersulfat (APS) sowie als Katalysator der Reaktion 5,5 μ l Tetramethylethylen-diamin (TEMED) gemischt. Der noch fließfähige Ansatz wurde zwischen 2 Glasplatten einer Gießhilfe eingebracht und unter Luftabschluss durch Aqua bidest. bis zum Festwerden für 20 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Das darüber aufzubringende Sammelgel wurde aus 0,2 ml Acrylamid (30%), 0,93 ml Aqua bidest., 0,4 ml 4-fach-Sammelpuffer, 20,5 μ l APS sowie 2,0 μ l TEMED gemischt und auf das Trenngel gegossen. Pro Gel wurden 10 Taschen durch Einführen eines Kamms gebildet. Nach 20 min wurde der Kamm entfernt und die Festigkeit des Gels geprüft.

Vor Beginn der Elektrophorese wurden die Proteinproben aus den Lysaten in Eis aufgetaut, nachfolgend im Verhältnis 1:1 mit einem Proteinladepuffer gemischt und ad 30 μ l mit Aqua bidest. aufgefüllt, sodass eine Proteinkonzentration von 50 μ g/30 μ l vorlag. Die Denaturierung erfolgte einerseits durch das im Proteinladepuffer enthaltene Mercaptoethanol und SDS, andererseits für 5 min durch Erwärmung auf 95 °C. Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer überführt und diese mit 1-fach-Laufpuffer aufgefüllt. Eine Proteinmarker (PageRuler® Prestained protein Ladder), welcher eine Einordnung zwischen 10 und 170 kDa ermöglicht sowie die vorbereiteten Proben wurden aufgetragen und die Elektrophorese bei 100 V über 2 h durchgeführt.

3.8.4 Western-Blot

Um Virus- und Kontrollproteine aus der PAGE zur Auswertung sichtbar zu machen, müssen die entstandenen Banden vom Gel auf eine Nitrocellulose- (NC) Membran übertragen und markiert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Western-Blot und eine Alkalische Phosphatase- (AP) basierte Färbung durchgeführt. Dieses Verfahren bietet eine hohe Spezifität in Bezug auf die virale Thymidinkinase bzw. das Kontrollprotein β -Aktin. Der im ersten Schritt durchgeführte Blot beruht auf der negativen Nettoladung

der SDS-Micellen, in welchen sich die Proteine befinden. Durch Anlegen eines elektrischen Felds mit einer Spannung von 12 V bewegen sich die anionischen SDS-Protein-Komplexe vom Gel in Richtung der Anode auf die NC-Membran, an welcher durch ionische und polare Wechselwirkungen eine Adsorption erfolgt. Im zweiten Schritt werden unspezifische Bindungen durch Zusetzen von 5 % Magermilch in TBST blockiert und die primären Antikörper gegen TK bzw. β -Aktin sowie gegen deren Fc-Teil gerichtete sekundäre, AP-tragende Antikörper aufgebracht. Die eigentliche Färbung erfolgt durch Zugabe des Farbstoffs Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) in Kombination mit dem Phosphatgruppen-Donor 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und die an den sekundären Antikörpern gekoppelten AP. Es entsteht eine deutliche blau-Färbung der Banden.

Alle Bestandteile der Blotkammer wurden vor Verwendung in Blot-Puffer getränkt und in der Reihenfolge Schwamm, Filterpapier, NC- Membran, Trenngel, Filterpapier, Schwamm zwischen Lochplatten eingeklemmt und in die Blotkammer eingeführt. Diese wurde mit Blot-Puffer befüllt. Das Blotten erfolgte unter Eiskühlung über Nacht. Die erhaltene NC-Membran mit Proteinen wurde für 1 h mit Magermilch in TBST behandelt. Nach zweifachem Waschen mit TBST erfolgte die Inkubation der Membranen mit den primären AK gegen TK (Verdünnung 1:500 in Magermilch/TBST) bzw. β -Aktin (Verdünnung 1:1000 in Magermilch/TBST) in getrennten Blot-Wannen bei 4 °C über Nacht. Nach Entfernung von ungebundenem primären AK durch dreifaches Waschen mit TBST wurden die Membranen bei RT für 1 h mit den entsprechenden sekundären AK (Verdünnung: 1:1000 in Magermilch/TBST) behandelt. Die drei Waschschritte wurden wiederholt und das Färbereagens NBT/BCIP mit 10 ml/Wanne auf die Membranen gegeben. Nach 3 min unter Lichtausschluss wurde die Reaktion durch Spülen mit Aqua bidest. beendet. Die getrockneten Membranen konnten zur Auswertung herangezogen werden.

3.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die Methode der Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht u. a. die Darstellung zellulärer Bestandteile durch vorherige Antikörper-vermittelte Markierung. In den durchgeführten Versuchen wurden SH-SY5Y- bzw. SK-N-LO-Zellen auf Deckgläschen in 24-well-Platten kultiviert und einer Vorinkubation mit AICAR, sowie einer Infektion mit HSV-1 (Kos) ausgesetzt. Die AICAR-Konzentrationen, MOI und Inkubationszeiten entsprachen de-

nen der proteinchemischen Untersuchungen. Die Deckgläschen wurden nach Abschluss der 24 h zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen daraufhin durch Applikation von 4% Paraformaldehyd über 20 min fixiert. Die so erhaltenen, stabilen Zellrasen wurden durch Behandlung mit Triton-X100®-Lösung (0,1%) in PBS für 5 min permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden im Folgenden durch Inkubation mit *blocking solution* (1 % BSA, 1:20 donkey serum/PBS) blockiert und die Zellen dann für jeweils 1 h bei RT mit dem primären (Anti-HSV-1, goat, Acris®, Verdünnung 1:1000) und sekundären AK (Cy3-Anti-goat, OriGene®, Verdünnung 1:100). Der zweite Antikörper war dabei mit Cyanin 3 (Cy3) gekoppelt. In einem letzten Schritt wurde eine Zellkernfärbung mit Hoechst-33342®(1:500 in PBS) über 10 min bei 37 °C durchgeführt. Nach jeder dieser Inkubationen wurde zweifach mit PBS gewaschen. Zur Auswertung der Zellen wurden die Deckgläschen mit Immunoselect®Antifading Mounting Medium auf Objektträgern eingebettet und fluoreszenz- und lichtmikroskopisch untersucht. Für die Darstellung der Zellkernfärbung wurde eine Anregungswellenlänge von $\lambda=340-380$ nm, für die der viralen Proteine von $\lambda=555$ nm gewählt. Die Lichtemission bei Hoechst-33342 zeigt eine Wellenlänge von $\lambda=435-485$ nm, diejenige von Cy3-rabbit-anti-goat von $\lambda=528$ nm.

4 Ergebnisse

4.1 Viruskinetik

Wie bereits dargestellt, unterscheiden sich die verwendeten Neuroblastomzelllinien in mehreren Proteinaktivitäten. So zeigt SK-N-LO-Zellen im Vergleich zu SH-SY5Y-Zellen eine vermehrte PI3K γ - und p53- sowie eine verminderte PTEN-Aktivität. Um beide Zelllinien hinsichtlich einer HSV-1-Infektion mit dem Stamm Kos zu charakterisieren, wurde in Abhängigkeit der Zeit p. i. der jeweilige TCID₅₀-Wert bestimmt (Abb. 4.1). Bei SK-N-LO-Zellen zeigte sich initial ein höherer Titer als 6 h p. i. Der steilste Anstieg innerhalb der Replikationskurve liegt zwischen 6 und 12 h p. i.

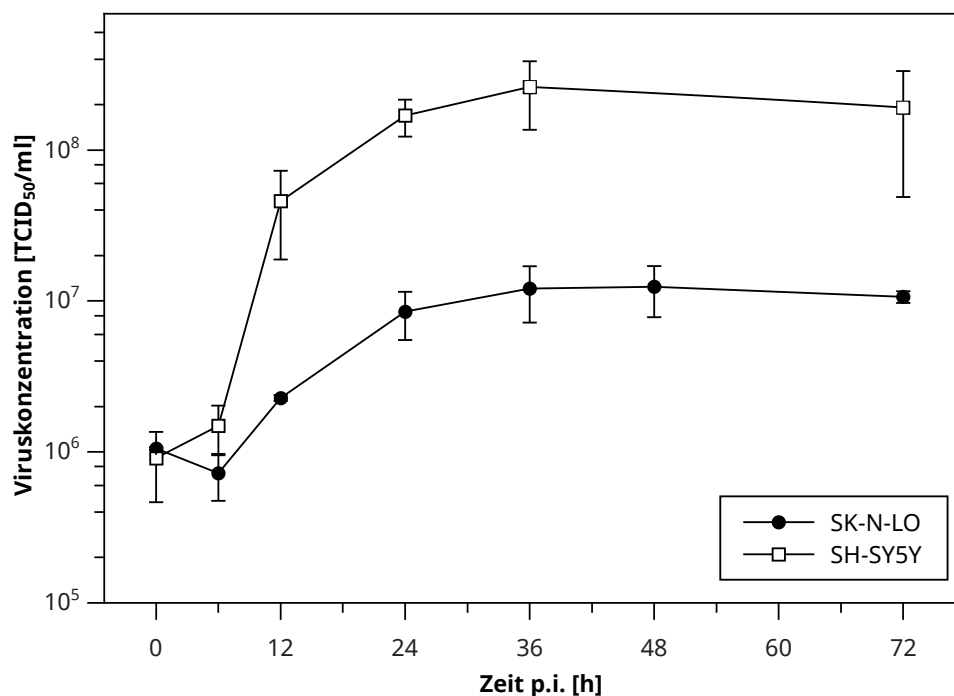


Abbildung 4.1: Zeitlicher Verlauf einer HSV-1-Infektion in SK-N-LO- und SH-SY5Y-Zellen, dargestellte TCID₅₀-Werte beruhen auf 3 unabhängigen Einzelversuchen und stellen Durchschnittswerte \pm SD dar.

Das Maximum wird nach 36 h erhalten und liegt bei $4,14 \times 10^6$ TCID₅₀/ml. Danach fällt der Titer langsam ab. Während dieser Tendenz zeigte sich keine starke Schwankung im Anstieg bis zum Zeitpunkt 72 h p. i. Bei SH-SY5Y-Zellen zeigte sich initial kein gegenüber 6 h p. i. erhöhter Titer sowie ein im Vergleich zu SK-N-LO-Zellen steilerer Anstieg bis zum Zeitpunkt 12 h p. i. Es findet sich ein Maximum von $8,73 \times 10^7$ TCID₅₀/ml bei 36 h p. i. mit folgendem, langsamen Titerabfall.

SH-SY5Y-Zellen zeigen im Überstand während der Infektion mit HSV-1 (Kos) einen ca. 20-fach höheren maximalen Virustiter als die SK-N-LO-Kulturen. Im Verlauf der Viruskinetik stellen sich beide Zelllinien ähnlich dar und zeigen den Zeitpunkt der maximalen Replikation zwischen 24 und 36 h p. i.

4.2 Zytopathischer Effekt bei SH-SY5Y-, SK-N-LO- und Verozellen

Um die Vulnerabilität der verwendeten Zelllinien in Bezug auf eine HSV-1-Infektion zu bestätigen, wurden zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 36 und 72 h p. i. mikroskopische Auswertungen des ZPE bei den Zelllinien SH-SY5Y und SK-N-LO im Vergleich zu Verozellen vorgenommen. Bei allen Versuchen wurden schein-infizierte Kontrollen mitgeführt.

Für die Infektionen aller Zelllinien wurden die MOI 0,1, 1 und 5 gewählt. Bei SH-SY5Y-Zellen zeigt sich bei allen MOI in abgestufter Ausprägung bereits nach 6 h eine Abrundung von Zellen sowie eine Verlängerung der Zell-zu-Zell-Kontakte. In der 0,1-MOI-Gruppe sind nach 24 h der Großteil der Zellen von ZPE geprägt und etwa die Hälfte bereits vom Boden der Kavität abgelöst, was auf Zelltod schließen lässt. Nach 36 und 72 h finden sich nur noch vereinzelt lebende Zellen deformierter Gestalt oder unter Verlust der Integrität; Zell-zu-Zell-Kontakte haben sich gelöst und zeigen mehrfache Auftreibungen. Bei verstärkter Ausprägung des ZPE findet mit dem Zelltod kein Rückzug von Fortsätzen statt, vielmehr zeigt sich deren Fragmentierung und Auflösung. Die ZPE bei 1 (Abb. 4.2) und 5 MOI entsprechen denen bei 0,1 MOI weitgehend, der Zustand fast vollständiger Ausprägung entsteht jedoch bereits nach 12 h. Nach 24 h wurden hier nur noch vereinzelt lebende Zellen beobachtet. In der schein-infizierten Kontrolle fanden sich kein ZPE sowie eine zeitabhängige, deutliche Zunahme der Zelldichte.

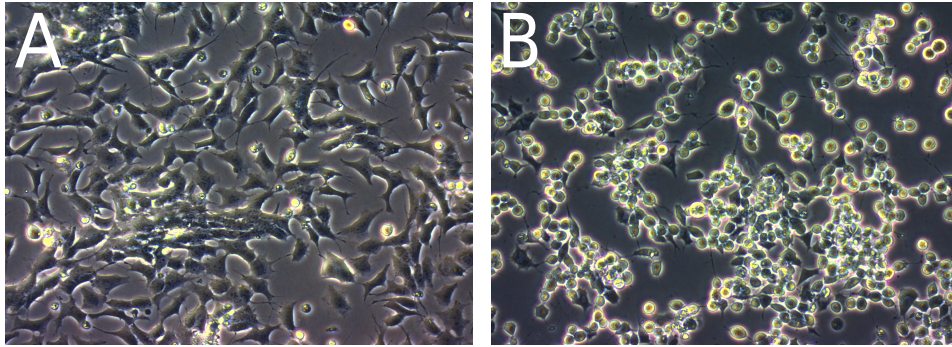


Abbildung 4.2: Polarisationsmikroskopische Darstellung des ZPE bei SH-SY5Y-Zellen nach Infektion mit HSV-1 (Kos)(Vergrößerung: 200x), 1 MOI, zu den Zeitpunkten 0 (A) und 12 h (B) p. i.; anhand der Aufhellung deutlich zu erkennen ist die Abrundung der Zellen, das teilweise Ablösen von der Oberfläche sowie die Ausprägung von verlängerten Zellfortsätzen nach 12 h.

Das mikroskopische Bild der SK-N-LO-Kulturen weist in der schein-infizierten Kontrolle sowie zum Zeitpunkt 0 h p. i. bei allen MOI einen mosaikartigen Zellverband auf (Abb. 4.3,A). Die Zellkörper liegen dicht beieinander und bilden nur an subkonfluenten Stellen des Monolayers deutlich sichtbare Zell-zu-Zell-Kontakte. Der ZPE zeigt sich auch hier bei 0,1 MOI bereits 6 h p. i., allerdings deutlich geringer ausgeprägt als bei SH-SY5Y-Zellen. Die Zellen erscheinen größtenteils intakt und im Verband liegend; einzelne zeigen Abrundung und Lösung vom Boden der Kavität. Nach 24 h findet sich in den 0,1 MOI-Versuchen eine Auflösung der mosaikartigen Zellgruppierung; große Teile der Zellen zeigen einen ZPE in Form von Abrundung, Bildung von überlangen Zellausläufern sowie Ablösung vom Boden (Abb. 4.3 B). Auch hier sind im weiteren Verlauf Zerfall und Auflösung der Zellausläufer erkennbar. Nach 36 h erscheint der Großteil der Zellen aufgehellt und abgelöst, was auf Zelltod schließen lässt.

Ein Bild mit spezifischen ZPE wird bei Infektion von Verozellen mit HSV-1 (Kos) sichtbar (Abb. 4.4). Eine schein-infizierte Kontrolle zeigt einen konfluenten Zellrasen polygonaler Zellen ohne Interzellularspalten. Im Gegensatz zu beiden Neuroblastomzelllinien bilden die Verozellen als ersten ZPE Synzythien unterschiedlicher Größe und Beschaffenheit aus. Deutlich sichtbar werden diese bei 0,1 MOI, 12 h p. i. (Abb. 4.4 B). Sie beinhalten zu diesem Zeitpunkt ca. 8 bis 10 Zellkerne und nehmen etwa den 5-fachen Raum einer Einzelzelle ein. Die Zahl der beinhalteten Kerne sowie die Größe der Synzythien steigt mit fortschreitender Zeit p. i.. Nach 36 h erscheinen bei allen verwendeten Infektionsdosen virale Plaques in Form von Lücken im Monolayer (Abb. 4.4 C). Im

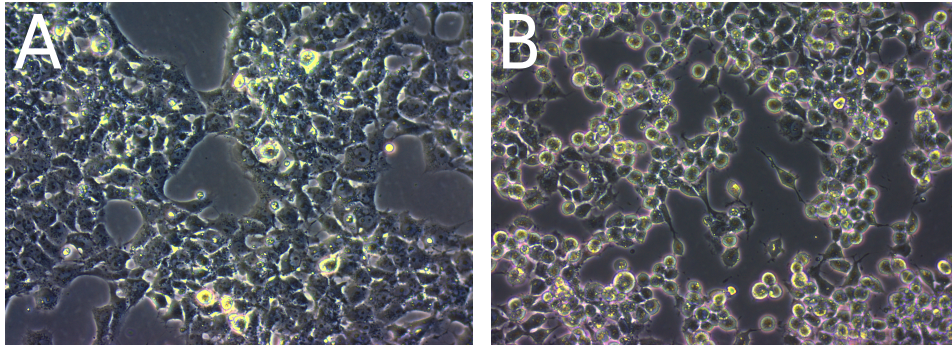


Abbildung 4.3: Polarisationsmikroskopische Darstellung des ZPE bei SK-N-LO-Zellen nach Infektion mit HSV-1 (Kos)(Vergrößerung: 200x), 0,1 MOI, zu den Zeitpunkten 0 (A) und 24 h (B) p. i.; anhand der Aufhellung deutlich zu erkennen ist die Abrundung der Zellen, das teilweise Ablösen von der Oberfläche sowie die Ausprägung von verlängerten Zellausläufern nach 24 h.

weiteren Verlauf schwindet die zelluläre Struktur in den Synzythien und infizierte Einzelzellen lösen sich vollständig ab. Im Gegensatz zu beiden Neuroblastomzelllinien werden zu keinem Zeitpunkt überlange Zellausläufer sichtbar. Ähnlichkeit besitzen allenfalls die zuletzt erhaltenen Zellverbindungen innerhalb von Synzythien.

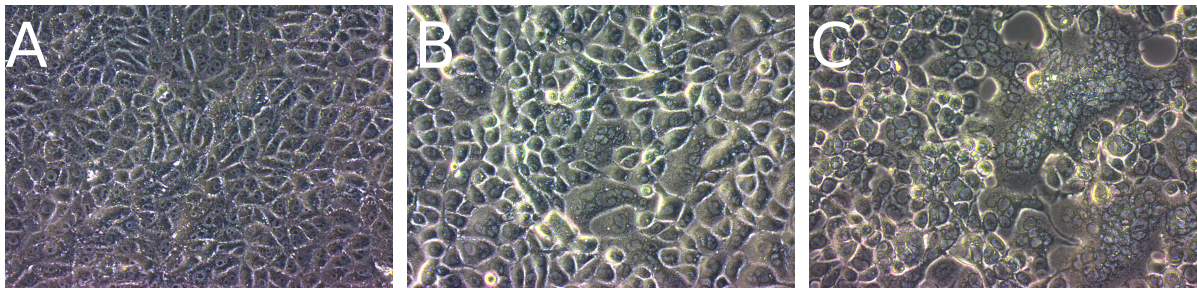


Abbildung 4.4: Polarisationsmikroskopische Darstellung des ZPE bei Verozellen nach Infektion mit HSV-1 (Kos)(Vergrößerung: 200x), 0,1(C) und 1(B) MOI, zu den Zeitpunkten 0 (A), 12 (B) und 24 h (C) p.i.; sichtbar sind die ausgeprägte Synzythienbildung zu den Zeitpunkten 12 und 24 h p. i., die Zunahme der Zahl der enthaltenen Kerne sowie nach 24 h die Defektbildung im Monolayer.

4.3 Modulation der S1P-Signalwege in HSV-1-infizierten Zellen

4.3.1 SKI-178 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen

Zytotoxizität

Die Toxizität von SKI-178 wurde für beide Zelllinien getestet (Abb. 4.5) Nach 24 h Inkubation zeigte sich nur eine geringe Schwankung der Vitalität bei SH-SY5Y-Zellen. Es waren keine signifikanten Schädigungen der Zellen erkennbar. Auch bei SK-N-LO-Zellen konnte kein toxischer Effekt von SKI-178 nachgewiesen werden.

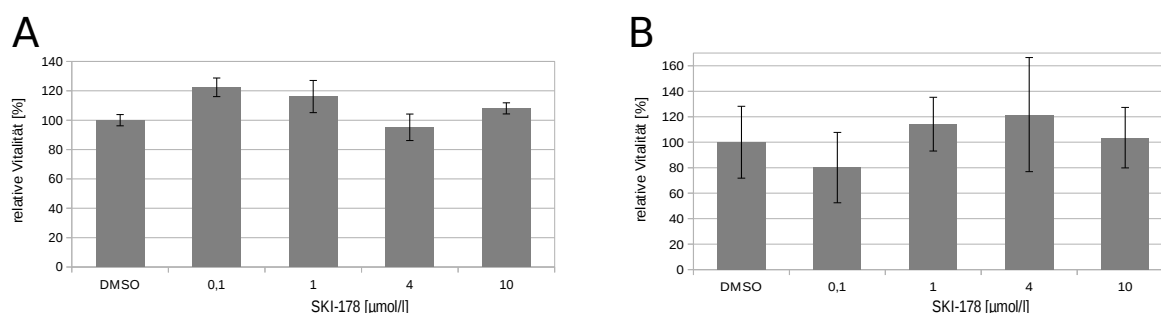


Abbildung 4.5: Vitalitätstest von SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach 24 h Inkubation mit SKI-178; dargestellt ist der relative Wert in Abhängigkeit von der SKI-Konzentration im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

HSV-1-Infektion in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen nach Applikation von SKI-178

Die ersten Versuche mit SKI-178 wurden mit 5 MOI durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse beruhen jeweils auf 3 unabhängigen Versuchen in denen 3 Proben je SKI-Konzentration parallel geführt wurden. Gezeigt sind der TCID₅₀-Mittelwerte aus den Titrationen auf Verozellen. In einer ersten Versuchsanordnung (Abb. 4.6) wurden bei 5 MOI nach 24 h die Überstände entnommen und der Virustiter bestimmt. Für SH-SY5Y-Zellen zeigte sich kein Effekt auf die Replikation von HSV-1. In den Experimenten mit SK-N-LO-Zellen konnte eine Reduktion des TCID₅₀ auf bis 41,35 % bei einer SKI-Konzentration von 4 µM, auf bis 47,37 % bei 1 µM nachgewiesen werden. Eine proportionale Konzentrationsabhängigkeit dieses Effekts fand sich jedoch nicht. Bei einer

SKI-Konzentration von 10 μM entsprach der Titer der Kontrolle.

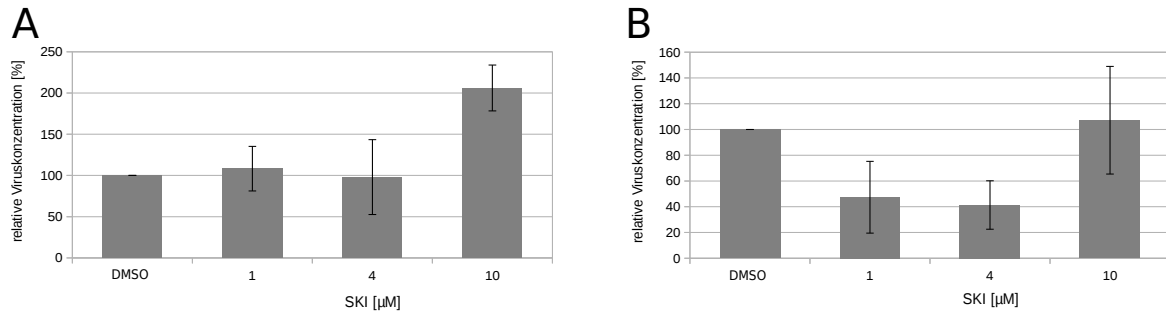


Abbildung 4.6: HSV-1-Infektion von SH-SY5Y-Zellen nach Applikation von SKI-178 (A); HSV-1-Infektion von SK-N-LO-Zellen nach Applikation von SKI-178 (B); dargestellt ist die relative Viruskonzentration in Abhängigkeit von der SKI-Konzentration im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

In einer zweiten Versuchskonstellation wurde nur der Effekt bei 4 μM SKI in Abhängigkeit von der Zeit p. i. untersucht (Abb. 4.7). Dabei wurden die Überstände nach 6, 12 und 24 h entnommen. Die gezeigten Resultate sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelproben. Der TCID_{50} lag bei allen SKI-Konzentrationen über dem der Kontrolle. Der zuvor festgestellte Effekt nach 24 h konnte nicht reproduziert werden. Allerdings zeigte sich in den Versuchen eine große Varianz der Ergebnisse, sodass der im Vorversuch gefundene Effekt nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

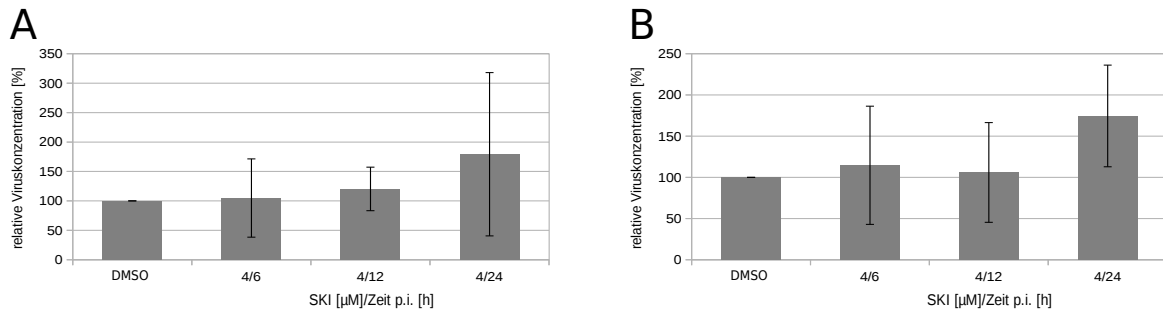


Abbildung 4.7: HSV-1 auf SH-SY5Y-Zellen unter SKI-178 (A); HSV-1-Infektion von SK-N-LO-Zellen nach Applikation von SKI-178 (B); dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der Zeit p. i. nach Applikation von SKI [4 μM] im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ± SD.

Die dritte Anordnung verfolgte das Ziel, eine Effektabhängigkeit des SKI von der MOI darzustellen (Abb. 4.8). Dazu wurden die MOI 0,1, 1 und 5 gewählt. SKI wurde wiederum in der Konzentration 4 μM verwendet. Die dargestellten Ergebnisse beruhen auf drei parallelen Proben eines Versuchs. In keiner der Zelllinien konnte ein reduktiver Effekt auf die Virusreplikation nachgewiesen werden. Bei deutlicher Varianz der Ergebnisse zeigte sich eher eine Steigerung der Replikation nach Applikation von SKI. Dabei lag die maximale relative Viruskonzentration in SH-SY5Y-Zellen bei 169,83 % mit 0,1 MOI, bei SK-N-LO-Zellen bei 691,31 % mit 1 MOI.

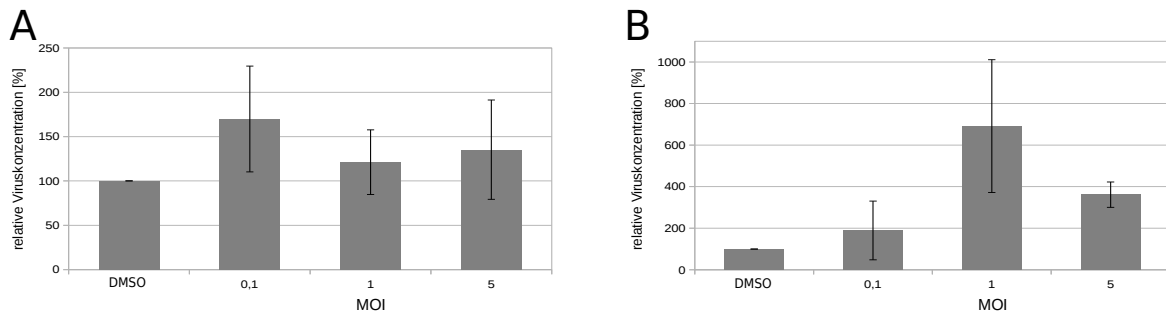


Abbildung 4.8: HSV-1-Infektion von SH-SY5Y-Zellen nach Applikation von SKI-178 (A); HSV-1-Infektion von SK-N-LO-Zellen nach Applikation von SKI-178 (B); dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der MOI nach 24 h p. i. nach Applikation von SKI [4 μM] im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ± SD.

Zuletzt wurde in einer vierten Variation des Experiments der $TCID_{50}$ mit $4 \mu M$ SKI in 6 h p.i. entnommenen Proben untersucht (Abb. 4.9). Ziel war die Darstellung der MOI-Abhängigkeit der SKI-Wirkung nach kürzerer Zeit. Zu diesem Zweck wurden wiederum die MOI 0,1, 1 und 5 verwendet. Die Ergebnisse stammen aus 3 parallelen Proben eines Versuchs. Bei SH-SY5Y-Zellen zeigte sich eine Reduktion des HSV-1-Titers bei 0,1 MOI auf 31,74 % relative Viruskonzentration. Unter höherer MOI war kein Effekt nachzuweisen.

Bei SK-N-LO-Zellen wurde ebenfalls eine Reduktion des $TCID_{50}$ sichtbar. So konnten bei einer Infektionsdosis von 1 MOI eine relative Viruskonzentration von 34,32 % bestimmt werden, was das Minimum innerhalb des Versuchs darstellt. Auch bei 5 MOI kam es zur Senkung des Virustiters auf 45,79 %.

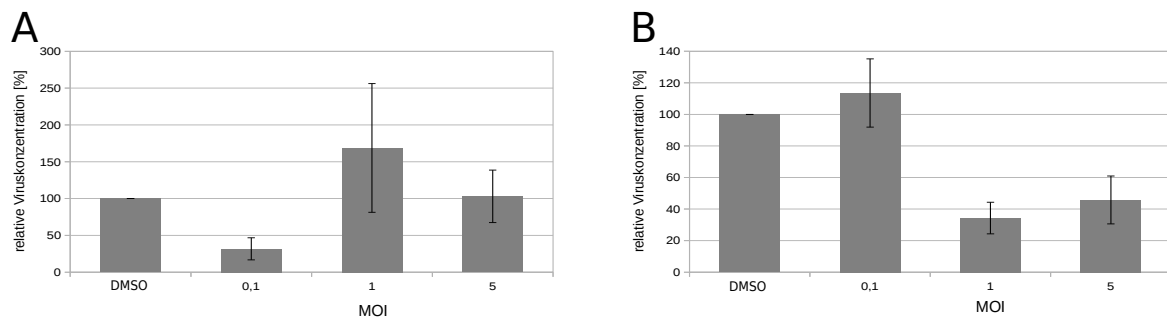


Abbildung 4.9: HSV-1-Infektion von SH-SY5Y-Zellen nach Applikation von SKI-178 (A); HSV-1-Infektion von SK-N-LO-Zellen nach Applikation von SKI-178 (B); dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der MOI nach 6 h p. i. mit SKI [$4 \mu M$] im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

4.3.2 FTY-720 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen

Zytotoxizität

Für eine Testung der Zytotoxizität von FTY-720 im WST-1 wurden die Konzentrationen 10, 100, 500 und 10000 nmol/l verwendet. Die Kontrolle erfolgte mit dem Lösungsmittel DMSO. Für keine der beiden Zelllinien zeigte sich eine relevante Schädigung durch FTY-720 nach 24 h Inkubation (s. Abb. 4.10). Die Substanz wurde in den angegebenen Konzentrationen daher als nicht toxisch eingestuft.

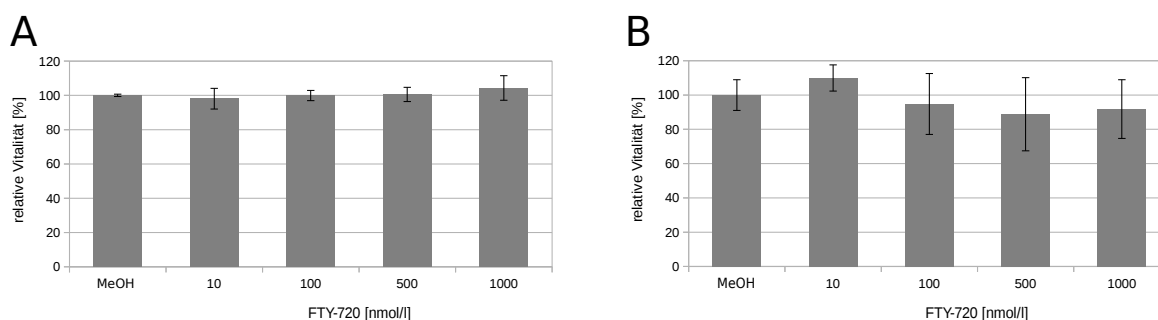


Abbildung 4.10: SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von FTY-720; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Vitalität von der FTY-Konzentration im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen nach Applikation von FTY-720

Um den Effekt einer S1P-Rezeptor-Inhibition darzustellen, wurden alle Proben als Überstände nach 24 h p. i. entnommen. Dies entspricht dem Zeitpunkt maximaler Replikation. FTY-720 hemmt die S1PR₁ und S1PR₃₋₅. In den durchgeführten Versuchen wurden die Konzentrationen 10, 100, 500 und 1000 nmol/l verwendet. Die Ergebnisse für SH-SY5Y-Zellen beruhen auf 2, diejenigen für SK-N-LO-Zellen auf 4 unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 parallel geführten Proben. Sie zeigen die relative Viruskonzentration nach Applikation von FTY-720 in Bezug auf eine Lösungsmittelkontrolle mit Methanol in DMEM+FBS sowie in Abhängigkeit von der FTY-Konzentration (Abb. 4.11).

Bei der Verwendung von SH-SY5Y-Zellen (Abb. 4.11 A) konnte eine minimale relative Viruskonzentration von 76,89 % (\pm 1,75 %) bei 1000 nmol/l FTY gefunden werden.

Auch mit 10 nmol/l wurde eine Reduktion von 78,65 % ($\pm 15,24$ %) gezeigt. Die weiteren verwendeten Konzentrationen 100 und 500 nmol/l zeigten keinen hemmenden Effekt, sondern lagen über dem TCID₅₀ der Kontrolle mit einem Maximum von 126,56 % ($\pm 15,55$ %) bei 100 nmol/l. Damit stellt sich keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von FTY-720 auf die Virusreplikation dar.

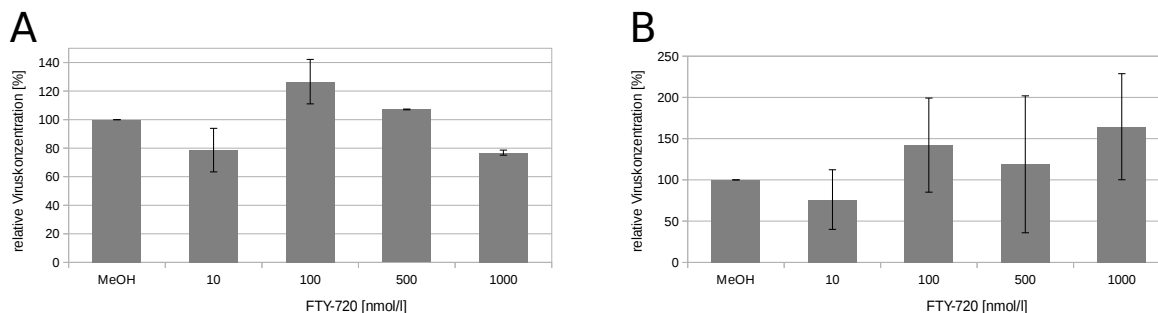


Abbildung 4.11: HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von FTY-720; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der FTY-Konzentration 24 h p. i. im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

Im Vergleich erfolgten die Versuche mit SK-N-LO-Zellen (Abb. 4.11 B). Hier zeigte sich eine deutlich größere Standardabweichung der Ergebnisse, jedoch kein klarer Effekt auf die Virusreplikation. Der minimale TCID₅₀ wurde bei einer FTY-720-Konzentration von 10 nmol/l gefunden. Er lag bei 76,11 % ($\pm 36,17$ %) und damit im ähnlichen Bereich wie das Minimum bei den SH-SY5Y-Zellen. Die weiterhin verwendeten Konzentrationen 100, 500 und 1000 nM führten nicht zu einer Hemmung der Virusreplikation. Der maximale relative Titer von 164,46 % ($\pm 64,22$ %) wurde bei 1000 nM gefunden. Insgesamt zeigte sich auch bei SK-N-LO-Zellen keine deutliche Abhängigkeit der Virusreplikation von der FTY-720-Konzentration.

4.3.3 JTE-013 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen

Zytotoxizität

Zur Bestimmung der Zytotoxizität des S1PR₂-Inhibitors JTE-013 wurden die konfluenten Zellen mit den Konzentrationen 10, 100, 500, 1000 und 10000 nmol/l über 24 h inkubiert. Eine Kontrolle wurde mit DMSO in DMEM+FBS geführt. Keine der genann-

ten Konzentrationen zeigte innerhalb Zytotoxizitätsmessung eine relevante Zellschädigung (Abb. 4.12).

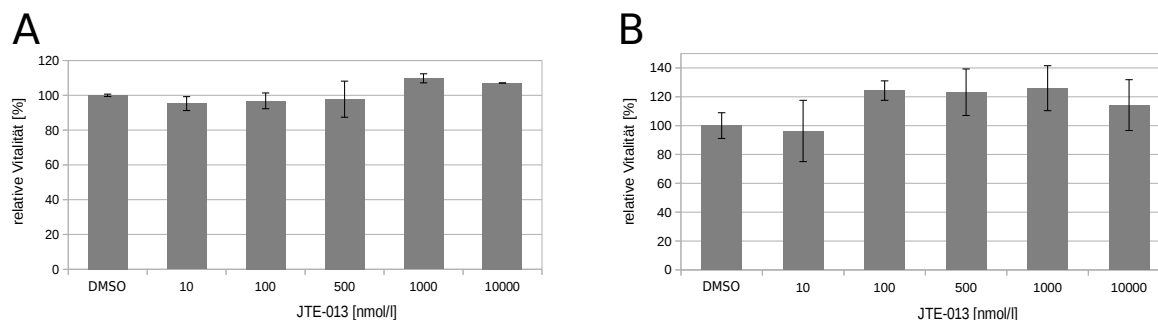


Abbildung 4.12: SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von JTE-013; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Vitalität von der JTE-013-Konzentration nach 24 h Inkubation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

HSV-1-Infektion von SH-SY5Y und SK-N-LO-Zellen nach Applikation von JTE-013

Alle Versuche mit JTE-013 wurden mit einer MOI von 0,1 und einer Inkubationszeit von 24 h p. i. durchgeführt. Als Bezugskontrolle wurden infizierte Zellen bei alleiniger Applikation von Lösungsmittel in DMEM+FBS mitgeführt. Die dargestellten Ergebnisse (Abb. 4.13) beruhen auf 2 bzw. 3 unabhängigen Versuchen für SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen mit je 3 geführten Parallelproben und zeigen Mittelwerte. Die absoluten TCID₅₀-Werte weisen dabei eine große Differenz voneinander auf, sodass eine Darstellung derer Mittelwerte aus den Maximal- und Minimalwerten hier nicht sinnvoll erscheint. Es werden daher nur relative Werte gezeigt, welche sich jeweils auf die mitgeführte Kontrolle beziehen.

In den Experimenten mit SH-SY5Y-Zellen konnte keine Reduktion der relativen Viruskonzentration durch Applikation von unterschiedlichen Konzentrationen an JTE-013 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen im Gegenteil eine Steigerung derselben auf maximal 208,79 % (\pm 27,91 %) bei 10000 nmol/l des Inhibitors. Ein Minimum bei den mit JTE-013 vorinkubierten Proben fand sich mit 103,21 % (\pm 34,85 %) bei 10 nmol/l.

Ein anderes Bild ergibt sich bei der Zelllinie SK-N-LO. Bei den durchgeführten Versuchen konnte eine Reduktion der relativen Viruskonzentration unter den JTE-013-Konzentrationen 10, 100, 500 und 1000 nmol/l gezeigt werden. Das Minimum fand sich

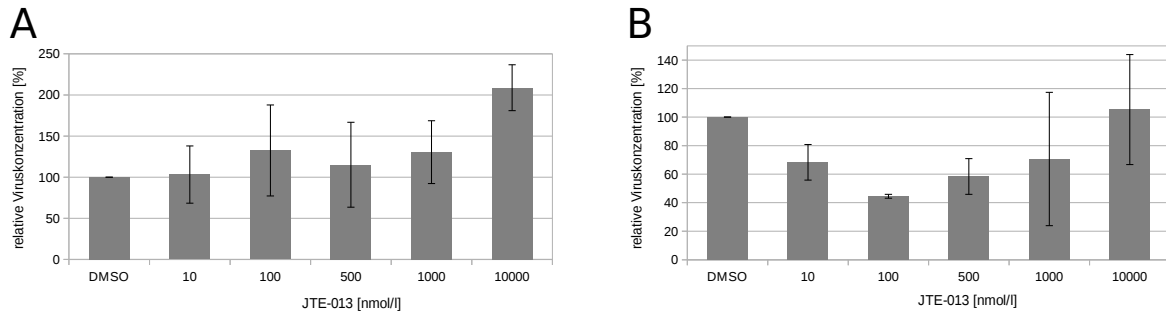


Abbildung 4.13: HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von JTE-013; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der JTE-013-Konzentration 24 h p.i. im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

mit 44,50 % (\pm 1,33) bei 100 nmol/l. Dagegen zeigte sich unter 10000 nmol/l eine Erhöhung der relativen Viruskonzentration auf das Maximum von 105,32 % (\pm 38,56). Damit wird keine direkte Abhängigkeit der Reduktion von der JTE-013-Konzentration erkennbar. Auch bei der Messung für 1000 nmol/l überstreicht die Standardabweichung 100 %, womit hier ebenfalls keine Reduktion angenommen werden kann.

4.3.4 LY-294002 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen

Zytotoxizität

Der Zytotoxizitätstest mit LY-294002 zeigte bei der Zelllinie SH-SY5Y (Abb. 4.14 A) bereits ab einer Konzentration von 2,5 μ mol/l eine Reduktion der relativen Vitalität auf 82,98 %, die sich bei weiterer Erhöhung der Inhibitor-Konzentration weitestgehend ähnlich darstellt (Daten nicht gezeigt). Es wurden daher für die Versuche mit SH-SY5Y-Zellen LY-294002-Konzentration von 0,1, 0,5 und 1 μ mol/l verwendet.

Bei SK-N-LO-Zellen konnte innerhalb der LY-294002-Konzentration 1, 2,5 und 4 μ mol/l keine Toxizität nachgewiesen werden (Abb. 4.14 B). Bei 10 μ mol/l fiel die relative Vitalität auf 85,24 %, sodass diese Konzentration in den durchgeführten Experimenten nicht verwendet wurde.

HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen nach Applikation von LY-294002

Die Experimente zur Inhibition der PI3K durch LY-294002 wurden bei SH-SY5Y-Zellen mit den Konzentration 0,1, 0,5 und 1 μ mol/l bei einer MOI von 0,1 im Vergleich zur

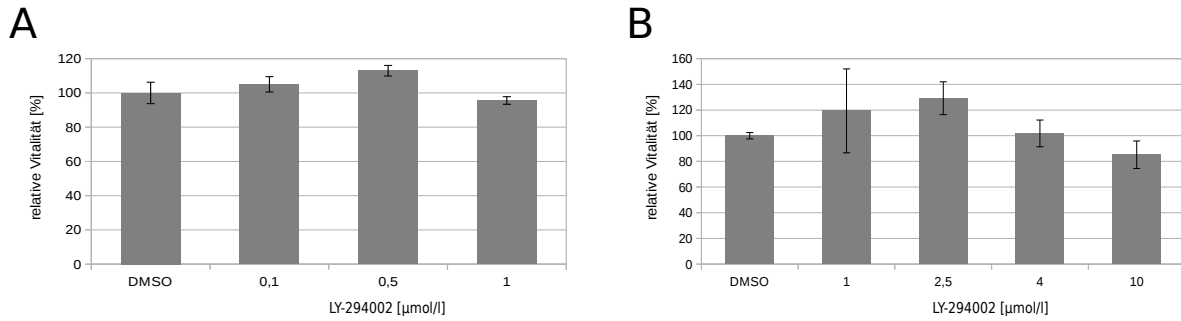


Abbildung 4.14: SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von LY-294002; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Vitalität von der LY-294002-Konzentration nach 24 h Inkubation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

DMSO-Kontrolle durchgeführt. Die hier dargestellten Mittelwerte (Abb. 4.15 A) beruhen auf drei unabhängigen Versuchen mit je 3 parallel geführten Proben. Unter dem Einfluss der maximalen Konzentration des Inhibitors zeigte sich eine deutliche Reduktion der relativen Viruskonzentration auf 32,28 % (\pm 14,84 %). Bei 0,1 $\mu\text{mol/l}$ fand sich eine Reduktion auf 91,56 % (\pm 37,16 %), sodass die Standardabweichung (SD) 100 % überstreicht. Ein Effekt kann daher nicht sicher angenommen werden. Das Maximum fand sich unter 0,5 $\mu\text{mol/l}$ mit 112,84 % (\pm 11,98 %). Damit ergab sich innerhalb der verwendeten Konzentrationen keine direkte Abhängigkeit des reduktiven Effekts von der LY-294002-Konzentration.

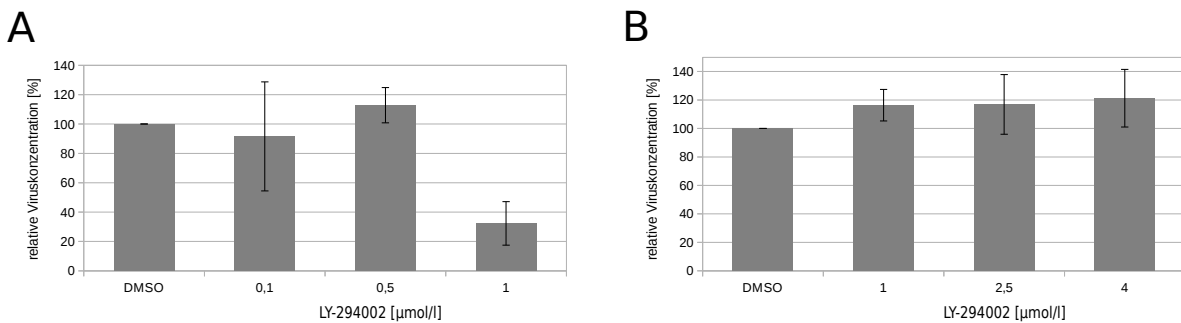


Abbildung 4.15: HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von LY-294002; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der LY-294002-Konzentration 24 h p. i. im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

Für die Versuche mit der Zelllinie SK-N-LO wurden die LY-294002-Konzentrationen 1, 2,5 und 4 $\mu\text{mol/l}$ in DMSO zur Vorinkubation verwendet. Die dargestellten Ergeb-

nisse zeigen Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je drei Parallelen (Abb. 4.15 B). Es konnte hierbei kein reduzierender Effekt auf die relative Viruskonzentration nachgewiesen werden. Unter jeder der verwendeten Inhibitor-Konzentrationen wurde eine Erhöhung der relativen Viruskonzentration sichtbar, wobei sich ein Maximum von 121,27 % ($\pm 20,21$ %) bei 4 $\mu\text{mol/l}$ und ein Minimum von 116,34 % ($\pm 11,07$ %) bei 1 $\mu\text{mol/l}$ einstellte.

4.3.5 NSC-23766 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen

Zytotoxizität

Um die eventuelle Zytotoxizität des Inhibitors NSC-23766 abzuklären, wurden Zellen der Linie SH-SY5Y mit den Konzentrationen 10, 20, 30, 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ inkubiert (Abb. 4.16 A). Die Kontrolle erfolgte mit Aqua bidest. in DMEM+FBS. Bei 100 $\mu\text{mol/l}$ zeigte sich eine reduzierte relative Vitalität von 75,52 % ($\pm 1,98$ %). Die niedrigeren Konzentrationen zeigten keine reduzierte Vitalität. Außer der maximalen Konzentration wurden daher alle weiteren als nicht toxisch eingestuft, sodass im Folgenden 10, 25 und 50 $\mu\text{mol/l}$ verwendet werden konnten.

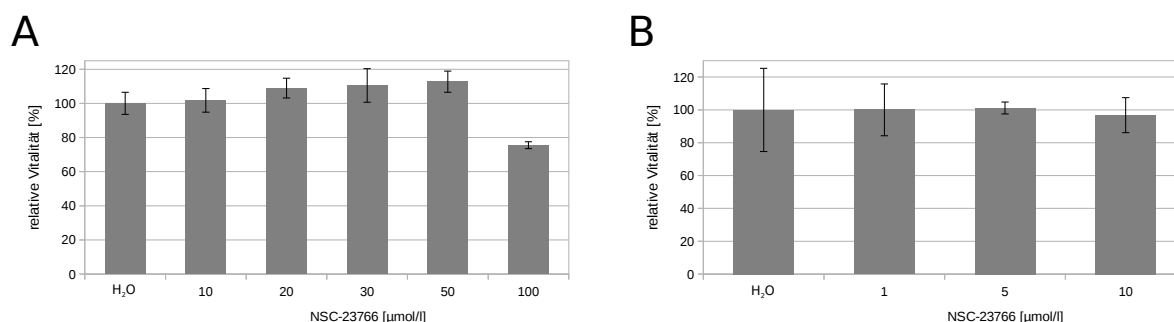


Abbildung 4.16: SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von NSC-23766; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Vitalität von der NSC-23766-Konzentration nach 24 h Inkubation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

Bei SK-N-LO-Zellen (Abb. 4.16 B) zeigte sich bereits ab 20 $\mu\text{mol/l}$ eine Reduktion der relativen Vitalität auf 65,30 % ($\pm 8,12$ %) (Daten nicht gezeigt), sodass zur Darstellung eines Effekts eine Serie niedrigerer NSC-23766-Konzentrationen getestet wurden. Für diese, 1, 5 und 10 $\mu\text{mol/l}$, zeigte sich keine Toxizität im WST-1-Test.

HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen nach Applikation von NSC-23766

Für eine Darstellung des Einflusses des Rac1-Inhibitors NSC-23766 auf die Virusreplikation wurden SH-SY5Y-Zellen mit 10, 25 und 50 $\mu\text{mol/l}$ NSC-23766 in DMEM+FBS über 24 h vorinkubiert. In Abb. 4.17 A sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit je 3 parallel geführten Proben dargestellt. Bei keiner der verwendeten NSC-23766-Konzentrationen zeigte sich ein reduzierender Effekt auf die relative Viruskonzentration in Bezug zu einer Kontrolle mit Lösungsmittel in DMEM+FBS. Ein Maximum fand sich bei 25 $\mu\text{mol/l}$ NSC-23766 mit einer relativen Viruskonzentration von 240,47 % ($\pm 66,88$ %). Das Minimum lag bei 145,50 % ($\pm 7,62$ %) unter 10 $\mu\text{mol/l}$. Damit führten alle verwendeten Konzentrationen zu einer Steigerung der relativen Viruskonzentration ohne Hinweis auf eine direkte Konzentrationsabhängigkeit.

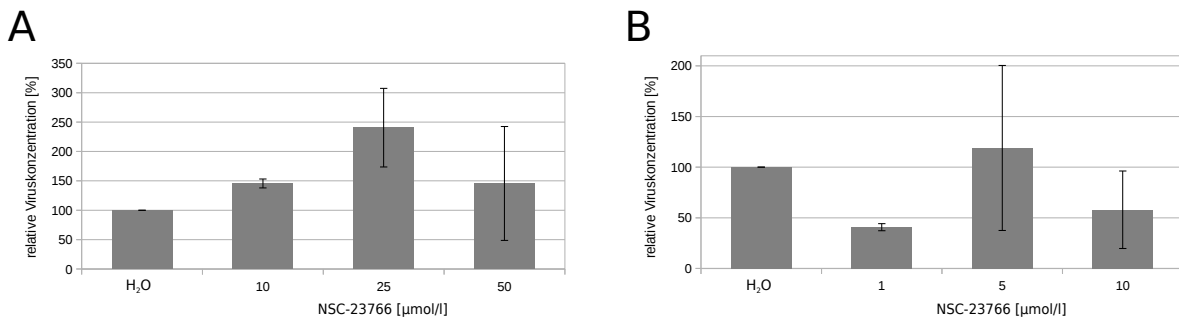


Abbildung 4.17: HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von NSC-23766; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der NSC-23766-Konzentration 24 h p. i. im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

Unter Anwendung des Inhibitors bei SK-N-LO-Zellen (Abb. 4.17 B) ergaben sich mit 1 und 10 $\mu\text{mol/l}$ NSC-23766 Reduktionen der relativen Viruskonzentration auf 40,78 % ($\pm 3,50$ %) bzw. 57,99 % ($\pm 38,29$ %). Eine Steigerung der Konzentration in Bezug auf die Kontrolle wurde unter 5 $\mu\text{mol/l}$ gefunden. Dieses Maximum von 118,94 % ($\pm 81,50$ %) unterlag jedoch einer großen Schwankung der Einzelmesswerte. Insgesamt zeigte sich bei SK-N-LO-Zellen ein Effekt von NSC-23766, jedoch keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit.

4.3.6 AICAR in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen

Zytotoxizität

Die für die folgenden Versuche auf Toxizität zu prüfenden Konzentrationen von AICAR 0,5, 1 und 2 mmol/l wurden im WST-1-Test gegen das Lösungsmittel Wasser geprüft. Für SH-SY5Y-Zellen (Abb. 4.18 A) ergab sich bereits ab einer AICAR-Konzentration von 0,5 mmol/l eine Reduktion der relativen Vitalität auf 68,48 % ($\pm 6,39$ %) (Daten nicht gezeigt), sodass weitere, niedrigere Vergleichskonzentrationen gewählt wurden, welche keine toxischen Effekte induzierten. Für SK-N-LO-Zellen konnte bei keiner der initial gewählten Konzentrationen eine relevante reduzierte relative Vitalität gefunden werden (Abb. 4.18 B). Eine geringe Erniedrigung des Messwerts ergab sich unter 2 mmol/l auf 90,06 % ($\pm 10,53$ %), was jedoch als nicht toxisch angenommen wurde.

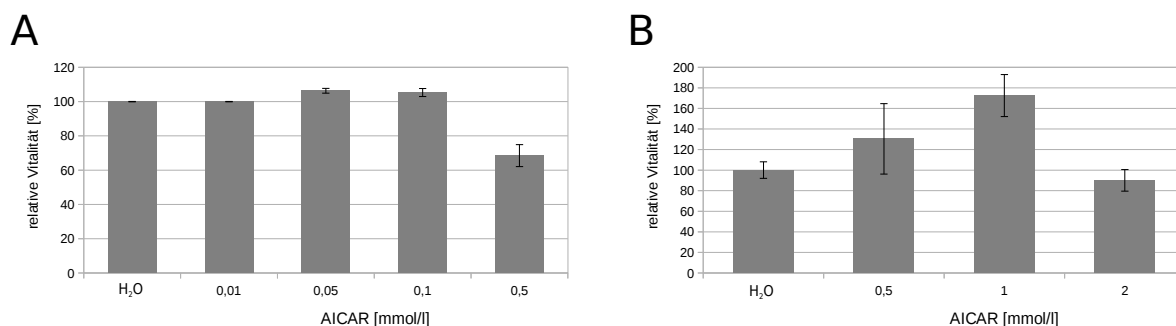


Abbildung 4.18: SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von AICAR; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Vitalität von der AICAR-Konzentration nach 24 h Inkubation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen nach Applikation von AICAR

Um einen Einfluss des AMPK-Modulators AICAR auf die Virusreplikation zu zeigen, wurden für SH-SY5Y-Zellen die Konzentrationen 0,01, 0,05 und 0,1 mmol/l bei 0,1 MOI verwendet. In den Versuchen mit SK-N-LO-Zellen wurden zur Vorinkubation 0,5, 1 und 2 mmol/l bei einer MOI von 1 verwendet. Als Kontrolle diente Wasser in DMEM+FBS. Die dargestellten Ergebnisse (Abb. 4.19) beruhen auf drei unabhängigen Versuchen mit je drei Parallelproben.

Bei der Zelllinie SH-SY5Y (Abb. 4.19 A) zeigte sich bei 0,05 sowie 0,1 mmol/l AICAR eine Reduktion der relativen Viruskonzentration. Sie erreichte ein Minimum von

73,06 % ($\pm 13,71$ %) bei 0,1 mmol/l sowie eine Reduktion auf 90,17 % ($\pm 32,35$ %) nach Applikation von 0,05 mmol/l. Das Maximum lag mit 118,72 % ($\pm 42,30$ %) bei 0,01 mmol/l. Innerhalb dieser Versuche zeigte sich eine direkte Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der AICAR-Konzentration mit einem Minimum unter der höchsten verwendeten.

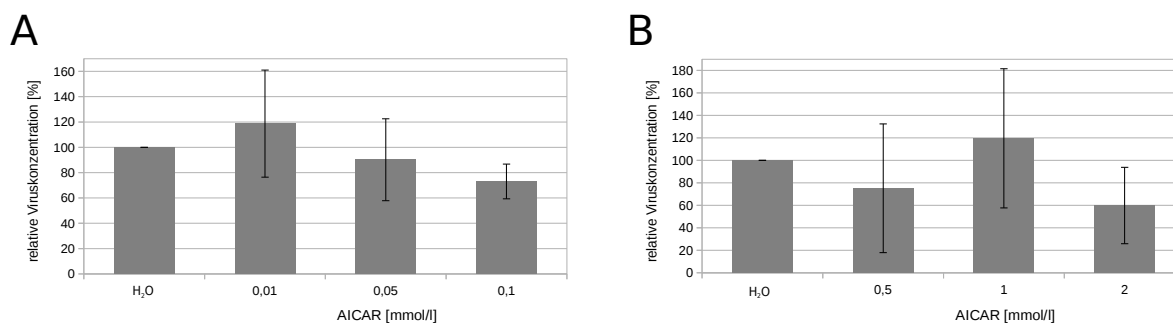


Abbildung 4.19: HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von AICAR; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der AICAR-Konzentration 24 h p. i. im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

Ebenfalls einen deutlichen Effekt auf die Virusreplikation hatte AICAR bei SK-N-LO-Zellen (Abb. 4.19 B). Hier zeigten sich sowohl bei 0,5 als auch 2 mmol/l reduzierte relative Viruskonzentrationen mit einem Minimum von 59,90 % ($\pm 33,98$ %) bei 2 mmol/l. Nach Applikation von 0,5 mmol/l stellte sich eine solche von 75,16 % ($\pm 57,25$ %) dar. Das Maximum fand sich bei 1 mmol/l AICAR mit 119,64 % ($\pm 61,89$ %). Damit konnte bei SK-N-LO-Kulturen keine direkte Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der AICAR-Konzentration gezeigt werden.

4.3.7 Y-27632 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen

Zytotoxizität

Der ROCK-Inhibitor Y-27632 wurde zur Bestimmung eventueller Zytotoxizität in den Konzentrationen 1, 5 und 10 μ mol/l verwendet. In keiner der Messungen beider Zelllinien zeigte sich eine relevante Absenkung der relativen Vitalität (Abb. 4.20). Ein Minimum von 103,90 % ($\pm 1,82$ %) bei SH-SY5Y-Zellen (Abb. 4.20 A) und 104,60 % ($\pm 11,62$ %) bei SK-N-LO-Zellen (Abb. 4.20 B) fand sich unter 10 μ mol/l. Die Substanz wurde in den verwendeten Konzentrationen als nicht toxisch eingestuft.

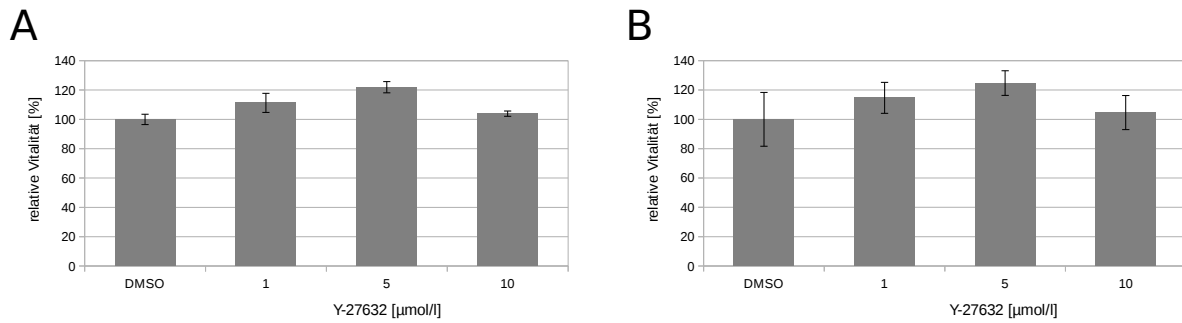


Abbildung 4.20: SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von Y-27632; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Vitalität von der Y-27632-Konzentration nach 24 h Inkubation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen nach Applikation von Y-27632

Zum Nachweis eines eventuellen Effekts des ROCK-Inhibitors Y-27632 auf die Virusreplikation wurden die o. g. Konzentrationen in Vorinkubation über 24 h verwendet. Die dargestellten Ergebnisse (Abb. 4.21) beruhen auf drei unabhängigen Versuchen mit je drei Parallelproben. Bei SH-SY5Y-Zellen (Abb. 4.21 A) fand sich nach Applikation von 10 $\mu\text{mol/l}$ ein Minimum der relativen Viruskonzentration von 85,17 % ($\pm 38,22$ %) sowie eine Reduktion auf 96,11 % ($\pm 38,58$ %) bei 1 $\mu\text{mol/l}$. In beiden Fällen überstreicht jedoch die SD 100 %, sodass ein Effekt nicht sicher angenommen werden kann. Das Maximum der relativen Viruskonzentration fand sich mit 108,84 % ($\pm 67,03$ %) bei 5 $\mu\text{mol/l}$. In Folge dieser Wertaufstellung konnte bei SH-SY5Y-Zellen keine direkte Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der Y-27632-Konzentration dargestellt werden.

Auch nach Anwendung von Y-27632 bei SK-N-LO-Zellen zeigten sich reduzierte relative Viruskonzentrationen (Abb. 4.21 B). Das Minimum lag mit 69,79 % ($\pm 41,31$ %) bei 10 $\mu\text{mol/l}$. Auch die beiden niedrigeren Konzentrationen 1 und 5 $\mu\text{mol/l}$ zeigten eine Reduktion der Messwerte auf 71,47 % ($\pm 50,93$ %) bzw. 87,73 % ($\pm 50,74$ %). Alle ermittelten Werte wiesen jedoch eine SD auf, welche 100 % überstreicht, sodass ein Effekt des Inhibitors auf die Virusreplikation nicht angenommen werden kann. Ebenfalls wird keine direkte Abhängigkeit der Reduktion der relativen Viruskonzentration von der Y-27632-Konzentration sichtbar.

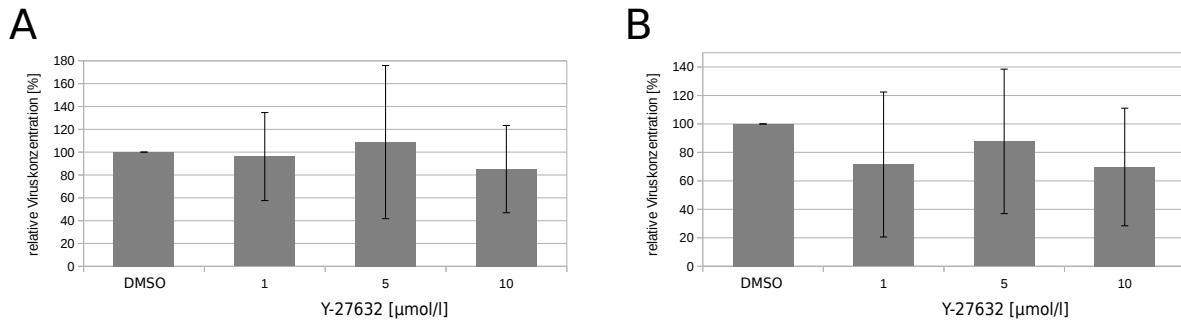


Abbildung 4.21: HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von Y-27632; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der Y-27632-Konzentration 24 h p. i. im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

4.3.8 U-0126 in SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen

Zytotoxizität

Um für den ERKK-Inhibitor U-0126 die mögliche Zytotoxizität auf beide Zelllinien zu testen, wurden zunächst die Konzentrationen 5, 10 und 15 $\mu\text{mol/l}$ gewählt. Während bei SH-SY5Y-Kulturen kein Zellschaden nachweisbar war (s. Abb. 4.22 A), zeigten die beiden höheren Konzentrationen bei SK-N-LO-Zellen eine Toxizität mit einer relativen Vitalität von unter 80 % (Daten nicht gezeigt). Es wurden daher für diese Zelllinie niedrigere Konzentrationen (1 und 2,5 $\mu\text{mol/l}$) getestet, welche im WST-1 keinen Zellschaden aufzeigten (Abb. 4.22 B).

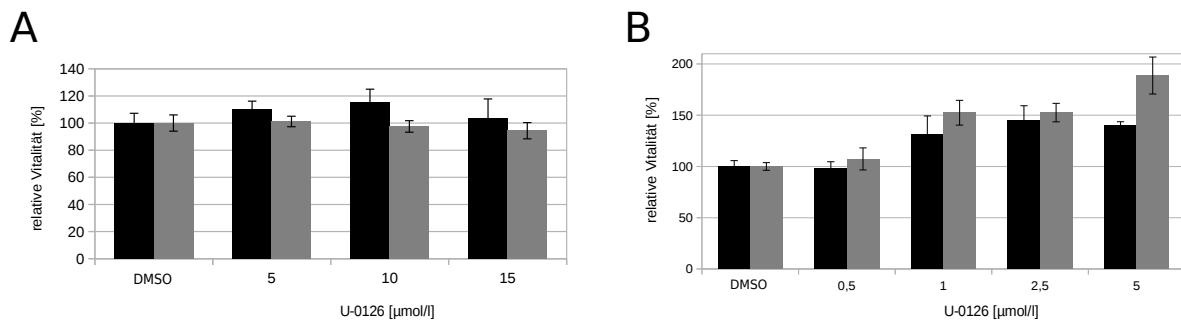


Abbildung 4.22: SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von U-0126; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Vitalität von der U-0126-Konzentration nach 1 (schwarz) und 24 h (grau) Inkubation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen nach Applikation von U-0126

Um den Einfluss des ERKK-Inhibitors U-0126 auf die Virusreplikation zu bestimmen, wurden die beiden Neuroblastomzellkulturen mit o. g. Konzentrationen der Substanz über 1 h vorinkubiert. Die Messwerte der relativen Viruskonzentration (Abb. 4.23) beruhen auf drei unabhängigen Versuchen mit je drei Parallelproben und beziehen sich auf eine infizierte Lösungsmittelkontrolle. Bei den SH-SY5Y-Zellen wurden hierbei nach Applikation von 5 und 15 $\mu\text{mol/l}$ U-0126 Reduktionen des relativen Virustiters gefunden, welche ein Minimum von 73,37 % ($\pm 10,16$ %) bei 5 $\mu\text{mol/l}$ und einen relativen Wert von 86,44 % ($\pm 12,90$ %) bei 15 $\mu\text{mol/l}$ aufwiesen (Abb. 4.23 A). Das Maximum fand sich mit 106,61 % ($\pm 5,05$ %) bei 10 $\mu\text{mol/l}$. Bei SK-N-LO-Zellen konnte ebenfalls eine Hemmung der Virusreplikation festgestellt werden (Abb. 4.23 B). Anders als in SH-SY5Y-Kulturen führten dabei alle verwendeten U-0126-Konzentrationen zu diesem Effekt. Das Minimum der relativen Viruskonzentration lag in diesen Versuchen mit 65,11 % ($\pm 13,33$ %) bei 2,5 $\mu\text{mol/l}$. Bei Verwendung von 1 und 5 $\mu\text{mol/l}$ U-0126 stellten sich die Ergebnisse mit 86,86 % ($\pm 65,81$ %) bzw. 85,30 % ($\pm 31,06$ %) relative Viruskonzentration dar und überstreichen in ihrer SD damit in beiden Fällen 100 %. Ein Effekt kann damit für diese Konzentrationen nicht sicher angenommen werden. Auf Basis dieser Ergebnisse kann ebenfalls keine direkte Konzentrationsabhängigkeit des replikationshemmenden Effekts nach Applikation von U-0126 postuliert werden.

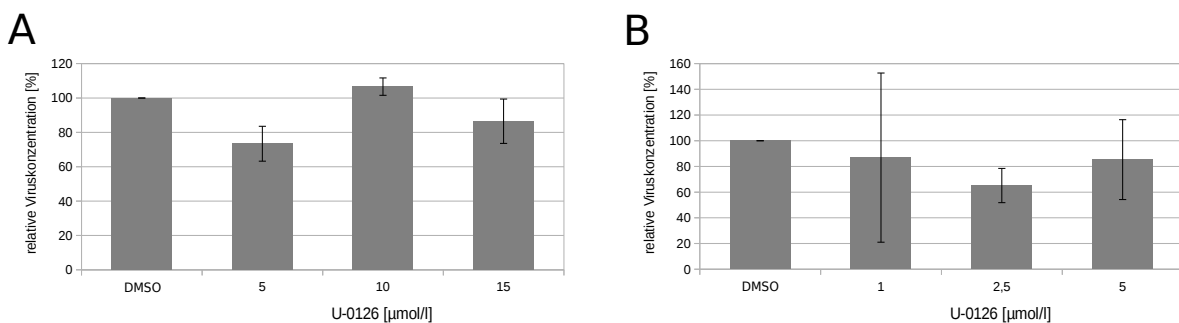


Abbildung 4.23: HSV-1-Infektion von SH-SY5Y- (A) und SK-N-LO-Zellen (B) nach Applikation von U-0126; dargestellt ist die Abhängigkeit der relativen Viruskonzentration von der U-0126-Konzentration nach 24 h Inkubation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle \pm SD.

4.4 Westernblot der viralen Thymidinkinase nach Applikation von AICAR

Die Virusreplikation von HSV-1 geht mit einer Konzentrationserhöhung viraler Proteine innerhalb der Wirtszelle einher. Unter den frühen oder β -Proteinen findet sich neben einer DNA-Polymerase und einer Helicase die virale TK. Sie stellt ein Markerprotein für die effektive HSV-1-Infektion dar, da ihre Expression erst nach Eindringen der viralen DNA in den Zellkern und Expression der *immediate early* oder α -Gene stattfinden kann. Dies beginnt ca. 4-8 h p. i. (Oxford et al. 2016). Nach Isolation und Auftrennung von Proteinproben aus mit AICAR oder Lösungsmittel vorbehandelten und infizierten Zellen beider Zelllinien wurde ein Western-Blot mit folgender NBT/BCIP-Färbung der TK und dem Kontrollprotein β -Aktin durchgeführt.

4.4.1 Einfluss von AICAR auf die Proteinexpression in HSV-1-infizierten SH-SY5Y-Zellen

In einem Western-Blot wurden Proteinproben aus einer nicht-infizierten Kontrolle, einer mit Lösungsmittel in DMEM+FBS und einer mit AICAR in DMEM+FBS vorbehandelten Zellkultur verwendet und verglichen. Im ersten Versuch wurde ein primärer AK gegen β -Aktin gewählt. Bei SH-SY5Y-Zellen (Abb. 4.24) wurden dabei im Bereich von 42 kDa eine Bande einheitlicher Färbung erhalten.

Die zugehörige Einordnung der Proteingröße wurde durch Mitführen eines Markers gewährleistet. Sowohl die nicht-infizierte-, die H₂O-Kontrolle als auch die AICAR-Probe zeigten eine vergleichbar starke Ausprägung der jeweiligen Bande.

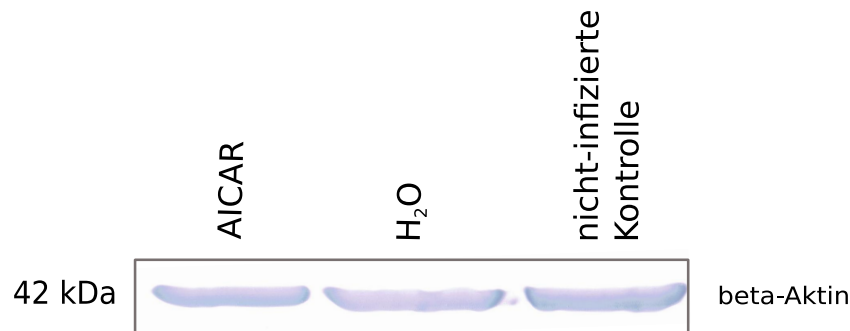


Abbildung 4.24: Western-Blot des Kontrollproteins β -Aktin bei SH-SY5Y-Zellen; dargestellt sind, von links nach rechts, die Blots der AICAR-exponierten Proben, der H₂O-Kontrolle (beide mit HSV-1 infiziert), sowie der schein-infizierten Kontrolle.

Unter Verwendung eines primären AK gegen die virale TK konnten bei 45 kDa Banden sowohl innerhalb der H₂O-Kontrolle als auch der AICAR-Probe dargestellt werden (Abb. 4.25). Diese zeigten eine Abgrenzung gegen weitere, vorliegende Banden anderer Molekularmassen. Sie wiesen untereinander keine deutlichen Intensitätsunterschiede auf. Die nicht-infizierte Kontrolle zeigte keine Bande bei 45 kDa.

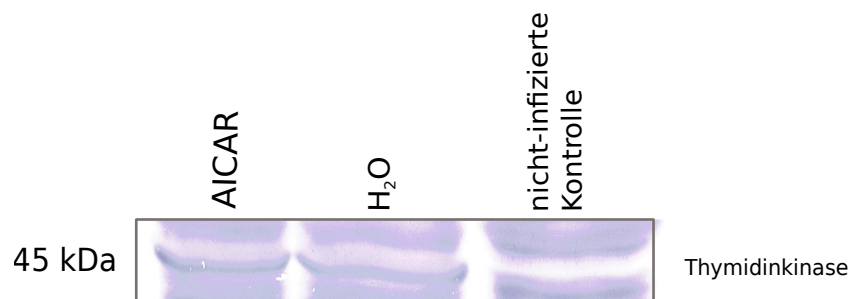


Abbildung 4.25: Western-Blot der viralen Thymidinkinase bei SH-SY5Y-Zellen; dargestellt sind, von links nach rechts, die Blots der AICAR-exponierten Proben, der H₂O-Kontrolle (beide mit HSV-1 infiziert), sowie der schein-infizierten Kontrolle.

4.4.2 Einfluss von AICAR auf die Proteinexpression bei HSV-1-infizierten SK-N-LO-Zellen

Die Darstellung des Proteins β -Aktin im Western-Blot zeigte auch bei SK-N-LO-Zellen eine vergleichbare Intensität innerhalb von nicht-infizierter- und H₂O-Kontrolle sowie AICAR-Probe. Die ausgewerteten Banden bei 42 kDa (Abb. 4.26) wiesen damit keine relevanten Unterschiede auf. Schwankende Intensität zwischen den einzelnen Blots sind auf Färbefeffekte des NBT/BCIP zurückzuführen.

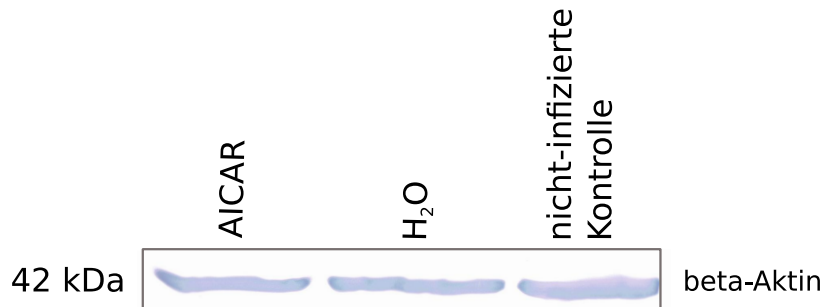


Abbildung 4.26: Westernblot des Kontrollproteins β -Aktin bei SK-N-LO-Zellen; dargestellt sind von links nach rechts die Blots der AICAR-exponierten Proben, der H₂O-Kontrolle (beide mit HSV-1 infiziert), sowie der schein-infizierten Kontrolle.

Unter Verwendung des primären AK gegen TK zeigten sich im Western-Blot Banden bei 45 kDa in der H₂O-Kontrolle sowie der AICAR-Probe (Abb. 4.27). Im Rahmen dieser Auswertung konnte kein Intensitätsunterschied zwischen beiden festgestellt werden. Die nicht-infizierte Kontrolle dagegen zeigt keine Bande im Bereich dieser Molekularmasse.

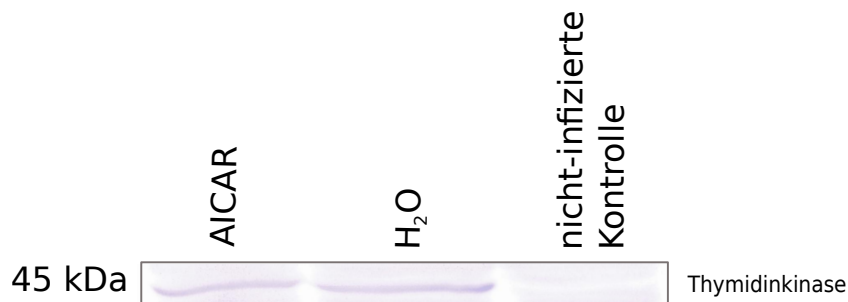


Abbildung 4.27: Westernblot der viralen Thymidinkinase bei SK-N-LO-Zellen; dargestellt sind von links nach rechts die Blots der AICAR-exponierten Proben, der H₂O-Kontrolle (beide mit HSV-1 infiziert), sowie der schein-infizierten Kontrolle.

4.5 Einfluss von AICAR bei der Fluoreszenzmarkierung viraler Proteine

In dieser Versuchsanordnung erfolgte eine Darstellung viraler Proteine, darunter ICP und späte Strukturantigene in infizierten SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen. Gegen diese Zielstrukturen gerichtete primäre, polyklonale AK wurden nach Permeabilisierung der Zellen eingebracht. Der sekundäre, Cyanin 3- (Cy3) tragende AK ermöglicht es, unter Anregung durch Licht der Wellenlänge $\lambda=555$ nm, infizierte Zellen sichtbar zu machen. Der dabei gebundene Cy3-konjugierte AK emittiert mit einer Wellenlänge von $\lambda=565$ nm im roten Bereich des Spektrums. Es erfolgten jeweils Zuordnungen zu Zellkernen und Zellen durch Hoechst-Färbung und Lichtmikroskopie.

Die dargestellten Bilder (Abb. 4.28) zeigen SH-SY5Y-Zellen der AK-Spezifitäts-Kontrolle (A), der schein-infizierten Kontrolle (B), der H₂O-Kontrolle (C) sowie mit AICAR vorbehandelten Zellen (D), wobei A, C und D mit HSV-1 infiziert wurden.

Die Spezifitätskontrolle des Cy3-konjugierten AK wurde ohne Verwendung des primären AK gegen HSV-1 durchgeführt (s. S. 38). In Abb. 4.28 A1 sind infizierte Zellen mit ZPE in der lichtmikroskopischen Darstellung sichtbar. Die Hoechst-Färbung (Abb. 4.28 A2) lässt aufgetriebene Kerne mit z. T. unregelmäßiger DNA-Verteilung erkennen. Unter Verwendung des sekundären AK und Anregung durch Licht der Wellenlänge $\lambda=555$ nm ist keine Fluoreszenz sichtbar (Abb. 4.28 A3). Abb. 4.28 B zeigt in der lichtmikroskopischen Darstellung (B1) eine noch erhaltene Struktur des Zellverbands. Veränderungen der schein-infizierten Zellen im Vergleich zum nativen Zustand (s. Abb. 3.1 A) sind präparationsbedingt. Die Zellkerne (Abb. 4.28 B2) sind hier kompakter und weisen eine gleichmäßige Verteilung der DNA auf. Unter Behandlung mit primärem und sekundärem AK (Abb. 4.28, B3) zeigt sich keine vom Hintergrund zu unterscheidende Fluoreszenz. Einzelne stärker gefärbte Objekte im Bild stellen Artefakte dar. Abb. 4.28 C zeigt infizierte Zellen unter Vorinkubation mit Aqua bidest. Die lichtmikroskopische Aufnahme weist hier ebenfalls einen deutlichen ZPE auf. Im Unterschied zu Abb. 4.28 A3 wird eine deutliche Fluoreszenz im roten Bereich des sichtbaren Lichts erkennbar. In allen Anteilen der Zellen kann diese nachgewiesen werden. Auch unter Vorinkubation mit AICAR bleibt eine vergleichbare Intensität bestehen. Weder in der lichtmikroskopischen Betrachtung (Abb. 4.28 D1) noch in der zugehörigen Zellkernfärbung (D2) und Fluoreszenzmarkierung (D3) können deutliche Unterschiede zur H₂O-Kontrolle dargestellt werden. H₂O-Kontrolle und AICAR-Probe enthalten, soweit visuell beurteilbar, ähnl-

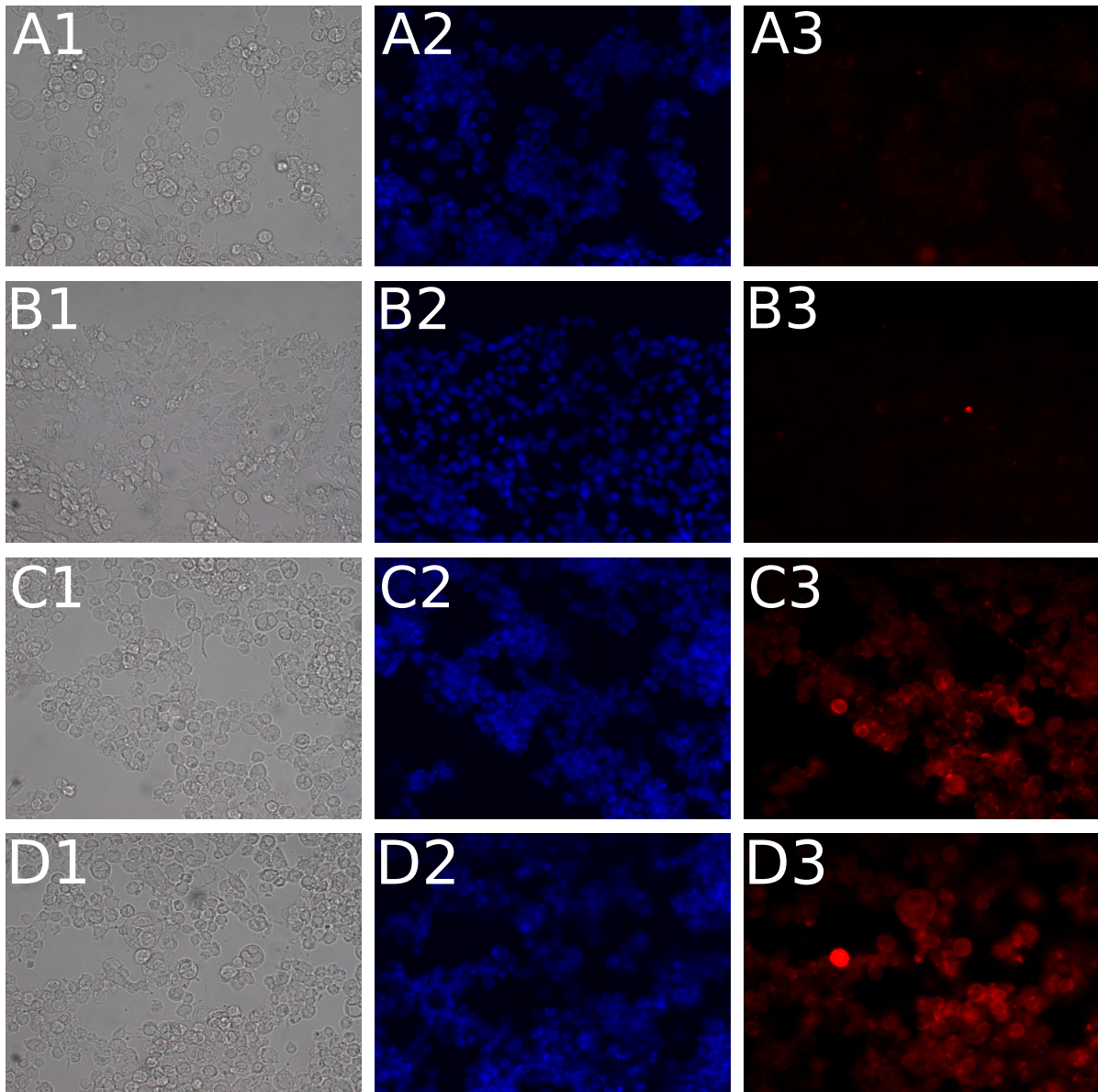


Abbildung 4.28: Fluoreszenzmarkierung der viralen ICP und später Strukturantigene bei SH-SY5Y-Zellen; dargestellt sind die lichtmikroskopischen Bilder (1), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (2) sowie Markierung der viralen Proteine mit Cy3-gekoppeltem Antikörper (3) bei einer Spezifitätskontrolle (A), der schein-infizierten Kontrolle (B), der H₂O-Kontrolle (C) sowie der Markierung nach Applikation von AICAR (D), wobei A, C und D mit HSV-1 infiziert wurden.

che Mengen viraler Proteine. Eine deutliche Hemmung der zugehörigen Proteinsynthese kann daher aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

Um in Bezug auf die AICAR-Wirkung SK-N-LO- mit SH-SY5Y-Zellen zu vergleichen,

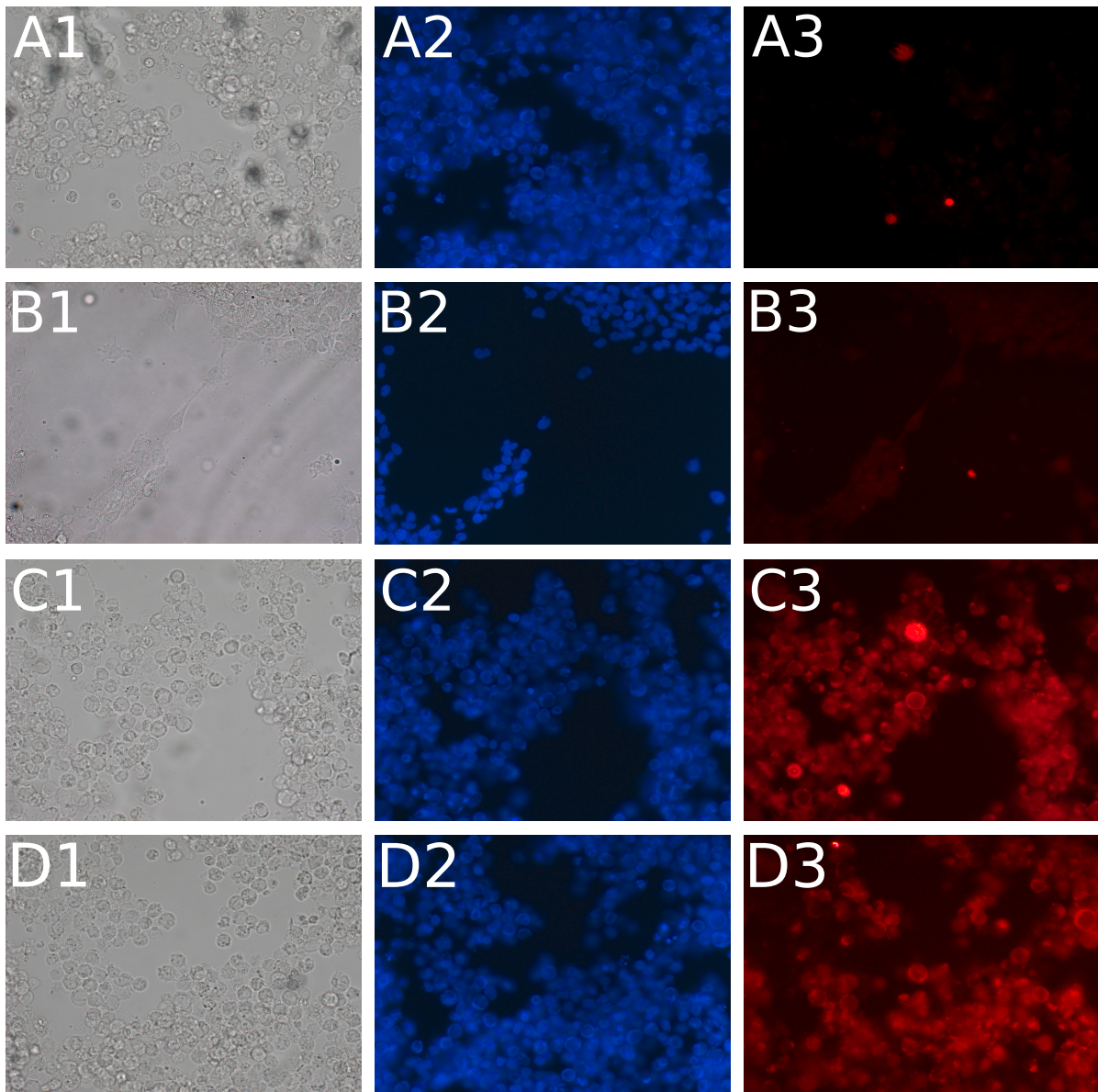


Abbildung 4.29: Fluoreszenzmarkierung der viralen ICP und später Strukturantigene bei SK-N-LO-Zellen; dargestellt sind die lichtmikroskopischen Bilder(1), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (2) sowie Markierung der viralen Proteine mit Cy3-gekoppeltem Antikörper (3) bei einer Spezifitäts-Kontrolle (A), der schein-infizierten Kontrolle (B), der H₂O-Kontrolle (C) sowie der Markierung nach Applikation von AI-CAR (D), wobei A, C und D mit HSV-1 infiziert wurden.

wurden auch mit ersterer Zelllinie Fluoreszenzmarkierungen viraler Proteine durchgeführt. Die in Abb. 4.29 dargestellten Bilder zeigen SK-N-LO-Kulturen der AK-Spezifitäts-Kontrolle (A), der schein-infizierten Kontrolle (B), einer H₂O-Kontrolle sowie mit AICAR vorbehandelte Zellen (D). Unter alleiniger Verwendung des sekundären AK wurden infizierte Zellen lichtmikroskopisch A1, unter Zellkernfärbung (A2) und unter Anregung der Wellenlänge $\lambda=555$ nm betrachtet. Hier wird ein deutlicher ZPE mit aufgetriebenen Zellkernen ohne sichtbare Fluoreszenz in A3 erkennbar. Die schein-infizierte Kontrolle zeigt unter Berücksichtigung präparationsbedingter Veränderungen, intakte Zellen mit kompakten Zellkernen und Zell-zu-Zell-Kontakten (Abb. 4.29 B1). Eine Fluoreszenz ist unter Verwendung des primären und sekundären AK hier nicht ausmachbar. Die sichtbare leichte Rotfärbung in A3 und B3 beruht auf artifizieller Bindung des sekundären AK. Im Gegensatz dazu werden in der H₂O-Kontrolle und nach Applikation von AICAR (C,D) bei ausgeprägtem ZPE und aufgetriebenen Zellkernen deutliche Anfärbungen unter Fluoreszenzanregung sichtbar (s. Abb. 4.29 C3, D3). Hier sind alle in der Hoechst-Färbung dargestellten Zellen anhand der enthaltenen Virusproteine in ihrer Struktur erkennbar.

Ein Unterschied in Fluoreszenzintensität ist auf Grundlage dieser Versuche wiederum nicht nachweisbar. Diese Fluoreszenzverteilung lässt auf Vorliegen viraler Proteine in allen Teilen der infizierten Zellen schließen.

5 Diskussion

Die Strategien, welche HSV-1 zur Etablierung und effektiven Durchführung seiner Replikation verfolgt, zielen auf wirtseigene Proteine, welche häufig Funktionen in zellulären Signalkaskaden erfüllen. Die Verwendung von spezifischen Modulatoren kann daher zu einem besseren Verständnis dieser Wege und der viralen Proteinfunktionen beitragen. Es ist bisher nur lückenhaft bekannt, welche Relevanz die einzelnen Bestandteile der Kaskaden für die Replikation und Ausbreitung des Virus haben. Diese Arbeit verfolgt daher das Konzept eines Screenings, um in Hinblick auf einen potentiellen therapeutischen Einsatz weiterführende Untersuchungen fokussiert planen zu können.

5.1 SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen als Modell für neuronale Zellen

Die *In vitro*-Untersuchung der HSV-1-Infektion bei Nervenzellen erfordert geeignete Zelllinien, welche in Zellkultur haltbar sind und idealerweise über mehrfache Passagen keine großen Variation der biochemischen Eigenschaften zeigen. Außerdem sollten sie den klinisch relevanten Zellpopulationen, darunter sensible Ganglienzellen sowie Neuronen des Temporallappens, ähnlich sein. Für die HSV-Latenz beispielsweise sind besonders pseudounipolare Nervenzellen mit Expression von GDNF family ligand receptor RET (rearranged during transfection) und Calcitonin-gene-related-peptide (CGRP) von Bedeutung (Flowerdew et al. 2013). Es handelt sich damit vorrangig um Schmerz-assoziierte Fasern.

Ausgewählt wurden SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen. Beide stellen Neuroblastomzelllinien dar, welche sich jedoch in mehreren Eigenschaften unterscheiden. SH-SY5Y-Zellen wurden ursprünglich durch 3-fache klonale Selektion aus SK-N-SH, einer 1970 etablierten Zelllinie, erzeugt (Biedler et al. 1978). In den durchgeführten Versuchen wurden sie ohne weitere Differenzierung verwendet. In diesem Zustand können sie als catecholaminerg eingeordnet werden (Encinas et al. 2000). Sie exprimieren RET in messbarer Konzentration (López-Ramírez et al. 2008) und können damit auch als Modell für die

bevorzugten Latenzorte der Viren dienen.

SK-N-LO-Zellen wurden als Vergleichszelllinie herangezogen, um einen eventuellen Einfluss der hier veränderten Apoptose- bzw. Zellzyklussteuerung herausstellen zu können. Sie zeigt im Vergleich zu SH-SY5Y-Zellen eine erhöhte Aktivität der PI3K γ sowie des Transkriptionsfaktors p53 neben einer erniedrigten Aktivität der PTEN (Madisetti et al. 2014, Spitzenberg et al. 2010). Diese Faktoren können zu einer verringerten Apoptoseneigung bei SK-N-LO-Zellen führen. Da die Expression der S1PR₁₋₅ bei beiden Zelllinien bisher nicht aufgeklärt ist, wird im Zusammenhang mit diesen Experimenten vom Expressionsmuster neuronaler Zellen ausgegangen. Für intakte dorsale Ganglien von Ratten wurde die Konzentrationsverteilung S1PR₃ \gg R₁ \approx R₂ $>$ R₅ \approx R₄ gefunden. Isolierte Neuronen dagegen zeigen S1PR₁ \gg R₃ \approx R₅ $>$ R₄ $>$ R₂ (Kays et al. 2012). Es könnte daher im Zusammenhang mit den humanen SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen eine vorrangige Relevanz der S1PR₁ und R₃ angenommen werden.

5.2 Viruskinetik in Neuroblastomzellen

Die Modulation der Sph-abhängigen Prozesse durch Vorinkubation mit spezifischen Rezeptorliganden sollte zum Zeitpunkt der maximalen Replikation den deutlichsten Effekt zeigen. Für HSV-1 konnte in Fibroblasten ein maximaler Virustiter 24 h p. i. ermittelt werden (Vastag et al. 2011). Um für die verwendeten Zelllinien den gesuchten Zeitpunkt zu finden, erfolgte die Erstellung einer Viruskinetik in den verwendeten Zelllinien SH-SY5Y und SK-N-LO. Beide ermöglichten die Virusreplikation und deren charakteristische Darstellung durch Titration nach Reed und Muench (Reed und Muench 1938). Das Maximum beider Kurven lag zwischen 24 und 36 h p. i., wobei SK-N-LO-Zellen hier einen 20-fach niedrigeren Virusertrag aufwies. Somit entspricht die in Neuroblastomzellen gefundene Kinetik im Verlauf weitgehend derer in Fibroblasten. Der Zeitpunkt 24 h p. i. konnte als allgemeiner Messzeitpunkt in den weiterführenden Versuchen festgelegt werden. Bei Verwendung von SKI-178 wurde er mehrfach variiert, um Änderungen des Effekts innerhalb der Replikationskurve besser beurteilen zu können.

5.3 Einfluss des S1P-Signalwegs innerhalb des viralen Replikationszyklus

Für mehrere virale Proteine wurde eine Einflussnahme auf die Effektoren des S1P nachgewiesen. Durch Inhibition oder Verstärkung einiger solcher Signale wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Screening über deren Relevanz für die Virusreplikation durchgeführt.

5.3.1 Einfluss von SKI-178 auf die Virusreplikation

SKI-178 ist ein spezifischer Inhibitor der SK Typ 1 ($K_i=1.33 \mu\text{M}$), durch welchen die Produktion von S1P effektiv gehemmt werden kann (Hengst et al. 2010). Unter Vorinkubation der Zellkultur mit SKI-178 über 24 h können so alle Effekte des S1P auf nachgeordnete Signalwege inhibiert werden (Abb. 5.1). In den durchgeführten Versuchen wurde dieser Einfluss unter verschiedenen Bedingungen getestet (s. S. 31 ff.). Die Messungen der Viruskonzentration 24 h p. i. zeigten uneinheitliche Ergebnisse. Bei einer SKI-178-Konzentration von $4 \mu\text{mol/l}$ auf SK-N-LO-Zellen wurde die Replikation deutlich gehemmt, was sich jedoch in den folgenden, variierten Versuchen nicht bestätigen ließ. Der Nachweis einer Reduktion von relativen HSV-1-Titern in HUVEC und HELF wurde in noch nicht publizierten Versuchen der Arbeitsgruppe bereits geführt. Bei einem anderen α -Herpesvirus, dem HCMV, konnten zwischen S1P und der erfolgreichen Infektion Assoziationen gezeigt werden (s. S. 14). Auch für die Entwicklung des EBV-assoziierten Nasopharynxkarzinoms spielt die hier stattfindende Einflussnahme des Virus auf die SK-Aktivität und S1PR-Expression eine zentrale Rolle (Lee et al. 2017). In beiden Fällen wurde jedoch keine Reduktion des relativen Virustiters gezeigt. Die SK als intrazelluläres Enzym wird jedoch durch eine Vielzahl von Faktoren in Expression und Aktivität kontrolliert (s. S. 10). Die meisten der nachgeordneten Signalwege sind zusätzlich vom Vorliegen des S1P im EZR abhängig. Zu diesem Zweck wird S1P mithilfe spezifischer Membranproteine durch die Zellmembran transportiert. Über die Expression solcher Transporter, wie z. B. spns2 in Neuroblastomzellen, ist bisher nichts bekannt. Um die erhaltenen Ergebnisse zu optimieren, wäre eine genauere Proteinexpressionscharakterisierung der Zelllinien zielführend.

In Abhängigkeit von der Zeit konnte bei keiner der Zelllinien ein hemmender Effekt auf die Virusreplikation festgestellt werden (s. S. 45). Wie bereits dargestellt, sollte der maximale Einfluss eines Inhibitors zum Zeitpunkt 24 h p. i. sichtbar werden. Diese These wurde durch die Versuche nicht bestätigt. Die maximale relative Viruskonzentration

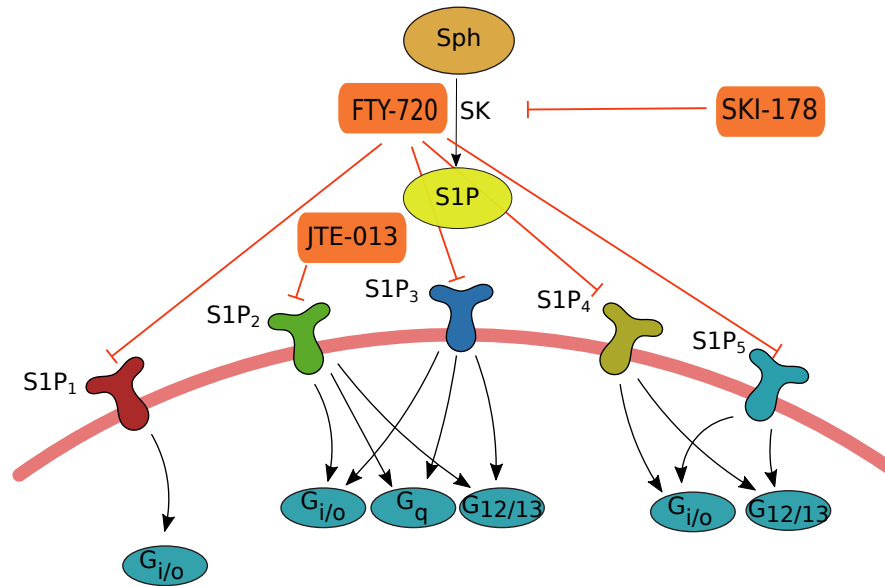


Abbildung 5.1: Extrazellulärer S1P-Signalweg mit Darstellung der verwendeten Inhibitoren (SK befindet sich intrazellulär, Darstellung zur besseren Übersichtlichkeit): Inhibition der SK durch SKI-178, Inhibition des S1PR₁ und Aktivierung des S1PR₂ durch FTY-720, Inhibition des S1PR₂ durch JTE-013.

wurde vielmehr bei beiden Zelllinien zum Zeitpunkt 24 h p. i. gefunden. Soweit bisher bekannt, werden die S1P-abhängigen Signalwege in HSV-1-infizierten Zellen vorrangig durch γ -Proteine beeinflusst (s. S. 15). Somit erscheint es unwahrscheinlich, zu frühen Zeitpunkten, wie 6 h p. i., deutliche Reduktionen der Viruskonzentration zu finden. In diesem Versuchsaufbau wird durch die relativ große SD eine deutliche Schwankung der Einzelergebnisse sichtbar.

Bei der Darstellung des Effekts von SKI-178 in Abhängigkeit von der MOI konnte ebenfalls keine Reduktion der relativen Viruskonzentration festgestellt werden. Zur Ausbreitung von HSV-1 in Neuronen tragen neben einem lytischen Replikationszyklus auch die Infektion benachbarter Zellen über Zell-zu-Zell-Kontakte bei (Dixit et al. 2008). Bei einer MOI von 5, wie sie bei den vorigen Versuchen verwendet wurde, werden 99,33% der Zellen einer Zellkultur infiziert. Es wird daher hierbei fast keine Ausbreitung über die genannten Kontakte notwendig sein. Um diesem Problem zu begegnen, wurden MOI von 0,1, 1 und 5 miteinander verglichen. Dabei entspricht 0,1 MOI einer Fraktion von ca. 9,5% und 1 MOI von ca. 63,2% Zellen, welche mit ≥ 1 Viruspartikel infiziert wurden (Flint et al. 2015). In beiden Konstellationen sollte die Ausbreitung des Virus auf o. g.

Weg ermöglicht werden. In den Versuchen von Dixit et. al wurden embryonale Karzinom (P19)-Zellen verwendet. Durch Inkubation mit Retinsäure erfolgte hier die Differenzierung der Zellen in Neurone, Astroglia und Mikroglia. Diese bilden ein deutlich anderes Milieu als das im Versuch verwendete. Dies könnte Einfluss auf die Verbreitung von HSV-1 und einen eventuellen Effekt des SKI-178 haben. Um diese These zu bestätigen, sollten weitere Experimente mit einer ausdifferenzierten Zellkultur durchgeführt werden.

Ergänzend zu den Kinetik-Versuchen mit SKI wurde die Abhängigkeit der SKI-178-Wirkung von der MOI 6 h p. i. untersucht. Hier zeigten sich reduzierende Effekte auf die relative Virusreplikation. Beide Zelllinien unterschieden sich in der jeweiligen MOI (s. S. 47 f.). Der Effekt bei SH-SY5Y-Zellen bei einer MOI von 0,1 weist darauf hin, dass hier ein Einfluss der S1P-Konzentration auf die Ausbreitung des Virus besteht, während zum späteren Zeitpunkt (24 h p. i.) kein solcher auszumachen ist. In SK-N-LO-Zellen findet sich dieser Effekt bei 1 und 5 MOI, was die Messwerte aus den Versuchen zur Zeitabhängigkeit (s. Abb. 4.7 B) nicht widerspiegelt. Es wurde hier keine reproduzierbaren Ergebnisse gefunden, somit kann für SK-N-LO-Zellen nicht von einem Effekt des SKI-178 ausgegangen werden.

5.3.2 Einfluss von FTY-720 auf die Virusreplikation

Die bereits für eine Therapie der Multiplen Sklerose (MS) zugelassene Substanz Fingolimod (FTY-720) weist in ihrer phosphorylierten Form bis zu einer Konzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ einen funktionellen Antagonismus bei den $\text{S1PR}_{1,3-5}$ auf (s. Abb. 5.1). Nach der initialen Aktivierung durch Bindung führt die Substanz zur Internalisierung der Rezeptoren. Bei höheren Konzentrationen werden sog. 'off-target'-Effekte sichtbar, welche außerhalb der Ligandenbindung stattfinden, jedoch durchaus innerhalb der S1P-Signalwege eine Rolle spielen (Patmanathan et al. 2015). Die in den Versuchen dieser Arbeit gewählten Konzentrationen entsprechen eher einem 'on-target'-Effekt des FTY-720 und können, abgesehen vom S1PR_2 , als allgemeine S1PR-Inhibition verstanden werden.

In SH-SY5Y-Zellen konnte ein hemmender Effekt auf die Viruskonzentration nach Vorinkubation mit 10 nmol/l FTY-720 nachgewiesen werden (s. S. 48). Auch bei SK-N-LO-Zellen findet sich hier eine erniedrigte Viruskonzentration, welche allerdings nicht sicher reproduziert werden konnte ($\text{SD} = \pm 36,17 \%$). Dieser Einfluss sollte v. a. auf die Funktion des FTY-720 als Rezeptorantagonist zurückzuführen sein, wobei die jeweils höheren Konzentrationen bereits Anteile der 'off-target'-Effekte zeigen könnten. Eine Inhibition der SPL (Bandhuvula et al. 2005) beispielsweise könnte fördernd auf

die Virusreplikation wirken. Für FTY-720 wurde bereits gezeigt, dass durch Applikation der Substanz HSV-1-induzierte Symptome, wie die Herpes simplex Keratitis (HSK) *in vivo* verbessert werden können, jedoch wurden die viralen Läsionen nach Absetzen der Therapie schnell apparent (Reddy et al. 2014). Die Ergebnisse dieser Versuche lassen einen vordergründigen Effekt des FTY-720 auf Immunzellen innerhalb der Entzündungsreaktion, weniger auf die Virusreplikation selbst, vermuten. Dass in den durchgeführten Versuchen dennoch eine Hemmung auf die Replikation gefunden wurde, könnte ein Hinweis auf die Relevanz der S1PR₁-nachgeordneten Signalwege für HSV-1 sein. Die Effekte des Inhibitors liefern unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten hierfür. Durch FTY-720 kann direkt die Proteinphosphatase 2A (PP2A) aus einer inaktivierenden Komplexbindung mit Phosphatase 2A Inhibitor (I2PP2A/SET) reaktiviert werden (Pippa et al. 2014). Andererseits gibt es Hinweise auf die S1PR₁-medierte Inaktivierung von PP2A via Januskinase 2 (Jak2)-PI3K γ -PKC-I2PP2A-Signalweg (Oaks et al. 2013). Eine Inaktivierung der PP2A hätte die verstärkte Aktivität der AMPK zur Folge. Da Herpesviren dieses Enzym zum eigenen Vorteil modulieren (Martin et al. 2014), könnte der Effekt des FTY-720 u. a. auf eine AMPK-Aktivierung zurückzuführen sein.

5.3.3 Einfluss von JTE-013 auf die Virusreplikation

Mit FTY-720 kann eine effektive Hemmung aller S1PR bis auf den S1PR₂ vorgenommen werden. JTE-013 stellt demgegenüber einen kompetitiven Inhibitor dieses Rezeptors dar. Einerseits liegt S1PR₂ in relevanter Konzentration in neuronalen Zellen vor und sollte daher in deren Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen (s. S. 68). Andererseits sind die ihm nachgeordneten G-Proteine auch von allen anderen S1PR beeinflusst, sodass eine selektive Hemmung des S1PR₂ möglicherweise kompensiert werden kann. In den gezeigten Ergebnissen nach Applikation von JTE-013 wurde nur in der Zelllinie SK-N-LO ein reduzierender Effekt auf die Replikation sichtbar. Diese Hemmung war bei 100 nmol/l maximal. Für SH-SY5Y-Zellen zeigte sich hier eher eine Steigerung der Replikation im Vergleich zur Kontrolle. Eine Erklärung hierfür könnte die erhöhte Expression der PI3K γ in SK-N-LO-Zellen bieten. Über den S1PR₂ wird diese aktiviert und steuert u. a. das Überleben einer Zelle. Durch die erhöhte Aktivität in SK-N-LO-Zellen könnte dieser Effekt zu einer optimalen Virusreplikation beitragen und durch die Hemmung unter JTE-013, eine frühere Apoptoseinduktion und folgende geringere Anzahl lytisch erzeugter Viren zu den dargestellten Ergebnissen führen.

konnten in ihren Versuchen mit Hep2-Zellen mit Zugabe von LY-294002 einen 5-fach erniedrigten Virusertrag feststellen. Neben der abweichenden Zelllinie wurde hier eine deutlich höhere Inhibitor-Konzentration von $75 \mu\text{mol/l}$ gewählt. Die Inkubation wurde über 2,5 h, beginnend 1 h nach Anheftung des Virus, durchgeführt. In diesem Versuchsaufbau wurde damit auf den Nachweis eventueller Zytotoxizität sowie die Titerbestimmung zum Zeitpunkt der maximalen Replikation verzichtet. Ebenfalls mit deutlich höherer Konzentration von $50 \mu\text{mol/l}$ und einer Vorinkubationszeit von 90 min wurden die Versuche bei Tiwari et al. durchgeführt. Die Darstellung eines verminderten Viruseintritts in die Wirtszelle erfolgte 4 h bzw. 6 h p. i. Zusätzlich nachgewiesen wurde eine HSV-1-induzierte Filopodienbildung 2 d p. i. Da eine Vielzahl von zellulären Prozessen mit der Aktin-Reorganisation im Zusammenhang stehen, erscheint es nicht verwunderlich, dass Herpesviren, zur Optimierung des Replikationszyklus, darauf Einfluss nehmen (Roberts und Baines 2011). Durch die erzeugte Oberflächenvergrößerung könnte der Übertritt in benachbarte Zellen für HSV-1 erleichtert werden. Die verwendeten Zellen (retinal pigment epithelial cells, HeLa-Zellen, corneal fibroblasts) haben epithelialen Charakter und weichen daher in verschiedenerlei Hinsicht von den Neuroblastomzellen der eigenen Versuche ab. Allerdings konnte der Einfluss von HSV-1 auf die Aktin-Reorganisation auch bei neuronalen SK-N-SH-Zellen gezeigt werden. Das Virus ist hierbei in der Lage, durch Bindung an zelluläre Rezeptoren eine initiale schnelle Aktin-Polymerisation und folgende Depolymerisation zur Gewährleistung von effektiver Bindung an die Zellmembran sowie Eintritt ins Zytoplasma zu induzieren. Diese Steuerung findet ihre Fortsetzung in den Signalwegen der MAPK/ERK 1/2 sowie der ROCK (Zheng et al. 2014).

Übermäßig stark ausgeprägte Filopodien fanden sich auch im Fall von SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen. Sie gelten in sich entwickelnden Neuronen als Vorläufer von Dendriten und spielen für die Ausprägung synaptischer Kontakte eine wichtige Rolle (Pacheco und Gallo 2016). Durch mikroskopische Auswertung infizierter SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen nach Vorinkubation mit LY-294002 konnte jedoch keine Reduktion der Ausbildung solcher Kontakte festgestellt werden.

Eine verminderte Internalisierung von HSV-1 bei Zugabe von LY-294002 wies auch Zheng et al. nach. Hier erfolgte die Inkubation mit dem Inhibitor bei einer Konzentration von $50 \mu\text{mol/l}$. Der Effekt wurde fluoreszenzmikroskopisch 1 h p. i. gezeigt.

Alle derart in der Literatur beschriebenen Versuche wurden mit LY-294002-Konzentrationen durchgeführt, welche für die neuronalen Zellen toxisch sind. In Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz bei HSV-1-Infektionen muss jedoch neben der Suche nach einer hemmenden Wirkung auf das Virus eine möglichst geringe Schädigung

der exponierten Gewebe gewährleistet werden. Ein hemmender Effekt auf die Replikation konnte nun unter deutlich geringeren, nicht-toxischen Konzentrationen nachgewiesen werden. Dies spricht für eine hohe Relevanz der PI3K-Signalwege innerhalb des viralen Replikationszyklus. Da ausgehend von der PI3K multiple Wirkungen auf Metabolismus, Überleben und Motilität einer Zelle möglich sind, kann eine kausale Verbindung mit expliziten Signalkaskaden zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht postuliert werden.

Obwohl bei SK-N-LO-Zellen höhere Konzentrationen von LY-294002 anwendbar waren, konnte hier kein Effekt gezeigt werden. Die Zelllinie zeigt im Vergleich zu SH-SY5Y-Zellen eine gesteigerte PI3K γ -Aktivität, welche von dem verwendeten Inhibitor nicht gehemmt wird. Somit könnte die Aktivierung derselben durch HSV-1 trotz Inhibition der anderen PI3K-Subtypen effektiv stattgefunden haben.

Zusammenfassend lässt sich auf Basis der durchgeführten Experimente ein relevanter Einfluss der PI3K-Subtypen α , β und δ auf die Virusreplikation vermuten. Um vergleichend auch die PI3K γ -Aktivität zu erfassen, sowie die Spezifität zu erhöhen, könnten ähnliche Anordnungen unter Verwendung des PI3K-Inhibitors PI828 durchgeführt werden (Gharbi et al. 2007).

5.3.5 Einfluss von NSC-23766 auf die Virusreplikation

Das kleine G-Protein Rac1 ist ein Effektor der PI3K (s. Abb. 5.2) und steuert die Ausprägung von Zell-zu-Zell-Kontakten in Form von Lamellipodien (Heinrich et al. 2014). Auch diese Form der Oberflächenvergrößerung könnte für eine erfolgreiche Virusausbreitung von Bedeutung sein (Dixit et al. 2008). Neben Cdc42 und RhoA nimmt damit auch Rac1 Einfluss auf die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. HSV-1 aktiviert während früher Phasen einer Infektion von Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-II-Zellen Rac1 und Cdc42. So konnte 30 min p. i. ein Anstieg von Rac1 auf das Vierfache sowie 120 min p. i. auf eine vergleichbare Konzentration gezeigt werden. Dauerhaft aktiviertes Rac1 bzw. Cdc42 führte zu sinkender Infektiosität; dagegen hatte inaktiviertes Rac1 keinen Effekt. Möglicherweise spielt inaktives Rac1 als Guanosin-Austauschfaktor (GEF) eine wichtige Rolle in der Virusreplikation (Hoppe et al. 2006).

Zu einem ähnlichen Ergebnis führten Versuche mit dem avianen Marek's disease Virus (MDV), einem weiteren α -Herpesvirus, welches bei Hühnern zu einem malignen T-Zell-Lymphom führen kann (Richerieux et al. 2012). Eine Inhibition von Rac1 in chicken embryo skin cells (CESC) mithilfe von NSC-23766 führte hier zu einer Vergrößerung viraler Plaques um 40%. Dagegen konnte bei Rac1-Aktivierung durch S1P eine Reduktion dieses Maßes um 54% festgestellt werden, welche durch Inhibition mit IPA-3

nicht vollständig ausgleichbar war. Richerieux et al. zeigten in Ihrer Arbeit, dass neben 'off-target'- Effekten der Rac1-Effektor Pak1 für die Förderung der viralen Infektosität verantwortlich sein könnte.

In den jetzt durchgeführten Versuchen wurden uneinheitliche Ergebnisse erhalten. Ein hemmender Effekt auf die Virusreplikation konnte nur bei SK-N-LO-Zellen unter der geringsten, dort verwendeten NSC-23766- Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ festgestellt werden. Alle weiteren Ergebnisse zeigen eine große SD und können somit nicht mit Sicherheit als Effekt auf die Virusreplikation angenommen werden. Bei SH-SY5Y-Zellen jedoch liegen alle Werte der relativen Viruskonzentration über der Kontrolle. Wie in den vorigen Untersuchungen wurde auch für NSC-23766 eine Vorinkubationszeit von 24 h gewählt und im Folgenden eine Infektion durchgeführt. In SH-SY5Y-Zellen konnten Ergebnisse aus der Literatur, nach welchen eine dauerhafte Rac1-Inhibition die Virusreplikation fördert, bestätigt werden. HSV-1 scheint in der Kontrolle seiner Wirtszelle v. a. in der frühen Phase (15 bis 30 min p. i.) das G-Protein Rac1 zu aktivieren. Eventuell sollte zur Klärung eines möglichen, hemmenden Effekts des verwendeten Inhibitors ebenfalls dieses Intervall genutzt werden. Zusätzlich ergibt sich, aufbauend auf den Erkenntnissen bei MDCK- und CES-Zellen, die Möglichkeit, zu späteren Zeitpunkten der Infektion eine konstitutive Aktivierung von Rac1 herzustellen. Eine solche Intervention wäre beispielsweise unter Anwendung von S1P (Andor et al. 2001) oder Rac1/Cdc42 activator II (Wan et al. 2013) denkbar.

5.3.6 Einfluss von Y-27632 auf die Virusreplikation

Die Morphologie des Zytoskeletts wird neben den bereits dargestellten Signalproteinen auch durch den RhoA-ROCK-, sowie den ERK1/2-ROCK-Signalweg beeinflusst. Das G-Protein RhoA steuert in Fibroblasten bei Aktivierung die Bildung zellulärer Stressfasern, die Reifung von Fokalkomplexen zu Fokalkontakten, sowie die Ausprägung von Adhärens-Kontakten (Kaverina et al. 2002, Miyake et al. 2006). Richerieux et al. zeigten einen hemmenden Einfluss des ROCK-Inhibitors Y-27632 auf die Plaquegröße bei MDV-infizierten CESC. Unter einer Vorinkubation mit Y-27632 (80 $\mu\text{mol/l}$) über 4 Tage wurden neben den Effekten auf die Virusausbreitung auch ein Verlust von Stressfasern und eine Verlängerung von Zellfortsätzen beobachtet. Die gemessenen Plaques wiesen bei Behandlung mit der Substanz eine Reduktion der Plaquegröße von 65% auf.

Die dargestellten Ergebnisse für die relative Viruskonzentration nach Vorinkubation mit Y-27632 (s. S. 57) zeigen bei einer großen SD reduzierende Effekte auf die Virusreplikation. Deren Nachweis gelang bei beiden verwendeten Zelllinien. Die minimale relative

Viruskonzentration wurde mit $10 \mu\text{mol/l}$ erhalten. Obwohl es in der Literatur keinen Nachweis über Senkung der Viruskonzentration bei Anwendung von Y-27632 gibt, entsprechen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse in Ihrer Tendenz den von Riche-rioux et al. gefundenen Effekten. In der Arbeit von Zheng et al. konnte unter $100 \mu\text{mol/l}$ Y-27632 eine verminderte Internalisierung von HSV-1 festgestellt werden. Auch diese Ergebnisse sind mit den jetzt gefundenen verringerten Virustitern vereinbar.

ROCK ist als Effektor von RhoA und ERK1/2 für die Assemblierung von Actomyosin und die Phosphorylierung von Myosin-Leichtketten (MLC) verantwortlich (Riento und Ridley 2003) und stellt damit in gewisser Weise einen Gegenspieler zu Pak1 dar, welche durch Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) die Actomyosin-Assemblierung reduziert (Sanders et al. 1999). Ein nachgewiesener Effektor der ROCK stellt die LIM-Kinase (LIMK) dar. Sie ist für die Inaktivierung von Cofilin und damit für die Aktin-Polymerisation zuständig (Mizuno 2013). Für HSV-1 könnte es von Nutzen sein, die Assemblierung von Aktin und Actomyosin zu steuern und damit für eine Zell-zu-Zell-Ausbreitung die notwendige Oberflächenvergrößerung und Fusionserleichterung zu schaffen.

5.3.7 Einfluss von AICAR auf die Virusreplikation

Stellt sich die PI3K als Signalprotein mit vielfältiger Funktion, u. a. in Motilität, Morphologie- sowie Apoptosesteuerung dar, so agiert auf dem Gebiet des Überlebens und der metabolischen Kontrolle die AMPK als weiterer wichtiger Effektor. Wie bereits ausgeführt, wird die AMPK auf einem Signalweg, ausgehend von S1P, über das $G_{i/o}$ -Protein und die PPA2 gehemmt. Weiterhin unterliegt sie dem AMP/ATP-Quotienten der jeweiligen Zelle. HSV-1 beeinflusst die AMPK nicht während des gesamten Replikationszyklus auf die selbe Art und Weise. Es konnte gezeigt werden, dass es während der frühen Infektion zu einer Hemmung der AMPK kommt, möglicherweise um die effektive Translation viraler Proteine zu gewährleisten. In späteren Phasen wird das Enzym reaktiviert. So kann das ausreichend lange Überleben der Zelle bis zur Entlassung neuer Viren sichergestellt werden (Leyton et al. 2015).

Durch die Vorinkubation der SH-SY5Y- und SK-N-LO-Kulturen mit dem AMPK-Aktivator AICAR könnte die initiale Hemmung des Signalproteins durch HSV-1 kompensiert worden sein. Die hier durchgeführten Experimente zeigten einen reduzierenden Effekt von AICAR auf die Virusreplikation (s. S. 55). Deutlich gesenkt werden konnte der TCID_{50} unter den jeweils maximalen Konzentrationen. Bei murinen, neuronalen hippocampalen (HT22) Zellkulturen konnte bei Anwendung von AICAR (1 mmol/l) bei

einer Vorinkubationsdauer von 1 h und fortwährender Einwirkung während der Infektion eine Reduktion der Viruskonzentration festgestellt werden (Leyton et al. 2015). Auch eine dauerhafte Inaktivierung der AMPK durch Anwendung von Compound C ($5 \mu\text{mol/l}$) (Merck Millipore) hemmt die Virusreplikation bei den genannten Zellen. Weiterhin wurde hier gezeigt, dass die initiale AMPK-Hemmung durch HSV-1 etwa 2 h p. i. stattfindet. Basierend auf diesen Erkenntnissen sollten zur weiteren Hemmung der Replikation in Neuroblastomzellen eine sequentielle AMPK-Aktivierung und folgende Inhibition während späterer Zeitpunkte der Infektion durchgeführt werden.

Um den dargestellten Effekt von AICAR auch in Hinblick auf die virale Proteinbiosynthese hin zu untersuchen, wurden spezifische Kontroll- sowie Virusproteine infizierter Zellen in einem Westernblot dargestellt (s. S. 60). Durch Heranziehen der Bradford-Methode, mit welcher alle Proteinproben auf die gleiche Gesamtkonzentration gebracht werden konnten, ist es möglich, die zugehörige Auswertung der Bandenintensität im Westernblot als semiquantitativ zu betrachten. Als Positiv-Kontrolle wurde β -Aktin sichtbar gemacht, zur Untersuchung des AICAR-Effekts diente die Markierung der viralen TK. Es wurden hierbei keine Konzentrationsunterschiede zwischen den mit AICAR vorbehandelten Zellen und der Kontrolle festgestellt. Leyton et al. zeigten in einem Versuchsaufbau mit HT22-Zellen unter Vorinkubation mit AICAR eine Reduktion von ICP27, UL30 und ICP5 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Diese Nachweise wurden mithilfe quantitativer PCR qPCR der betreffenden cDNA sowie Westernblot-Analysen mit AK-Darstellung geführt. Um auch im Fall der hier verwendeten Zelllinien quantitative Ergebnisse zu erhalten, sollten qPCR-Untersuchungen der über reverse Transkription gewonnenen cDNA viraler RNA sowie eine Bestimmung weiterer VPs im Westernblot folgen.

Eine Möglichkeit, Viren direkt sichtbar zu machen, besteht in der Fluoreszenzmarkierung viraler Proteine innerhalb infizierter Zellen. So konnten in den durchgeführten Versuchen mehrere ICPs sowie späte Strukturantigene von HSV-1 für eine solche Darstellung verwendet werden. Die Markierung mit dem Cy3-konjugierten AK ermöglicht jedoch keine Unterscheidung in frühe oder späte Genprodukte. Außerdem erfolgte die Untersuchung nur zum Zeitpunkt der maximalen Virusreplikation 24 h p. i. Die alleinige Anwendung dieser Methode erlaubt keine quantitative Auswertung im Hinblick auf Proteinkonzentrationen, jedoch zeigt sie deutlich die Lokalisation der viralen Genprodukte in allen Teilen der infizierten Zelle. Bei Applikation von AICAR konnte hier bei mikroskopischer Betrachtung keine Änderung der Fluoreszenzintensität festgestellt werden. Beide Ergebnisse, aus Westernblot und Fluoreszenzmikroskopie legen nahe, dass

unter AICAR keine deutliche Hemmung der Translation viraler RNA stattfindet. Einer o. g. sequentiellen AICAR-Applikation sollte dahingehend auch eine quantitative Proteinbestimmung bzw. qPCR der zugehörigen cDNA folgen.

5.3.8 Einfluss von U-0126 auf die Virusreplikation

Ein Einfluss der HSV-1-Infektion auf die Phosphorylierung der ERK wurde in mehreren Untersuchungen bereits gezeigt (Qin et al. 2011, Torres et al. 2012). Wichtig für diese Steuerung scheint wiederum die virale U₃-Proteinkinase zu sein (Chuluunbaatar et al. 2012). Die aktivierte MAPK/ERK hat dabei eine eminente Bedeutung für eine erfolgreiche Replikation. Eine Inhibition durch U-0126 führte bei Infektion von Verozellen in den Versuchen von Torres et al. zu einer Senkung der Viruskonzentration um bis zu 5 log-Stufen. Es konnte neben der Reduktion viraler Proteinkonzentrationen auch eine Verminderung des ZPE dargestellt werden. Dabei wurden, im Vergleich zu den eigenen Versuchen, deutlich höhere U-0126-Konzentrationen verwendet (50 $\mu\text{mol/l}$), welche zumindest bei SK-N-LO-Zellen toxisch gewesen wären. Von besonderer Bedeutung für den gezeigten Effekt könnte die virale Steuerung der Zellzyklusprogression einer Wirtszelle sein. Colao et al. zeigten in ihren Experimenten u. a., dass es während einer HSV-1-Infektion von Hep-2-Zellen zur zeitlich gesteuerten Rekrutierung der phosphorylierten MAPK/ERK in Zytoplasma bzw. Zellkern kommt. Abhängig davon akkumuliert Cyclin E, welches v. a. im Übergang von G1- zu S-Phase relevant ist (Püschel et al. 2011). Hier konnte durch Inkubation der Zellen mit U-0126 eine Senkung der VP-Expression, der Viruskonzentration sowie der Cyclin E-Akkumulation festgestellt werden. Der ERKK-Inhibitor wurde in diesem Fall 1 h vor der Infektion zur Zellkultur gegeben und in einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ verwendet. Entsprechend dieser Methodik wurde auch in den eigenen Versuchen verfahren.

Auch für andere Vertreter der *Herpesviridae*, wie das Humane Herpesvirus 8, konnte einerseits die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs, andererseits die Hemmung dessen Replikation durch Verwendung von U-0126 nachgewiesen werden (Naranatt et al. 2003). In dieser Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass bei Infektion eine Aktivierung der PKC erfolgt, welche Ras und nachfolgend die ERKK 1/2 aktivieren kann (s. Abb. 5.2). In den eigenen Versuchen konnte die Inhibition der Virusreplikation von HSV-1 bei den beiden neuronalen Zelllinien SH-SY5Y und SK-N-LO bestätigt werden. Es ist in diesem Zusammenhang jedoch nicht eindeutig geklärt, ob der Haupteffekt der Replikationshemmung auf dem Weg der Zellzyklussteuerung zu suchen ist. In neuronalen Zellen findet eine gegenseitige Hemmung von ERK und ROCK statt (Hensel et al. 2014). Damit

könnte ein Teil des erhaltenen Effekts auf Modulation von Motilität und Morphologie infizierter Zellen zurückzuführen sein. Die bereits dargestellten Ergebnisse der ROCK-Inhibition durch Y-27632 konnten diese These jedoch nicht stützen. So ist, basierend auf beiden Versuchsreihen, eher von einer im Vergleich höheren Relevanz des direkten ERK-Signalwegs auszugehen. Bei Vorinkubation mit U-0126 in den eigenen Versuchen war der deutliche ZPE im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle unverändert. Eine Unterdrückung desselben wie in den Experimenten von Torres et al. konnte damit nicht gezeigt werden. Um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, sollte die virale Proteinexpression nach Hemmung der ERKK 1/2 durch Darstellung im Westernblot quantifiziert werden.

5.4 Ausblick

Ausgehend von den übergeordneten Signalen des S1P wurden in dieser Arbeit mehrere subsequente Signalwege auf ihre Relevanz für die Replikation von HSV-1 hin getestet. Die Einflussnahme erfolgte jeweils allein durch Vorinkubation mit den genannten Modulatoren. Während der Infektion und der folgenden Replikation wurde kein Modulator zugesetzt. Somit wurden zelluläre Signalwege bei gesunden Zellen verändert. Um vollständige Ergebnisse über die Wirksamkeit der verwendeten Substanzen zu erhalten, sollten weitere Versuche mit Modulation während der Anheftungszeit und Replikation durchgeführt werden.

6 Schlussfolgerungen

Bei Verwendung unterschiedlicher Modulatoren des S1P-Signalwegs zeigten sich in den durchgeführten Versuchen Effekte auf die Virusreplikation von HSV-1. Am deutlichsten waren diese bei SH-SY5Y-Zellen bei Verwendung von FTY-720, LY-294002, U-0126 sowie AICAR. Weniger deutliche Effekte, bzw. solche mit größerer Unsicherheit aufgrund der dargestellten SD zeigten sich bei dieser Zelllinie mit Y-27632. Werden diese Ergebnisse isoliert und bezogen auf das Modell der S1P-Signaltransduktion betrachtet, so ergibt sich als wichtigster Weg für die HSV-1-Replikation jener ausgehend von den S1PR_{1,3} über die PI3K und PKB zur Steuerung des zellulären Überlebens. In diesen Entwurf passen ebenso die gefundenen Effekte mit AICAR und U-0126, da AMPK und ERKK gleichfalls Einfluss auf diese Prozesse nehmen. Die weiteren Ergebnisse weisen zumindest in Bezug auf die Filopodiensteuerung eine gewisse Relevanz auf. Allerdings scheint dieser Teil der S1P-Signale in Neuroblastomzellen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Die insgesamt verminderte Apoptoseneigung von SK-N-LO-Zellen könnte in den Versuchen mit dieser Zelllinie dafür verantwortlich sein, dass es allein bei Anwendung von AICAR zu deutlichen Effekten auf die Virusreplikation kam. Bei Überexpression der PI3K γ scheint die S1P-Signalweiterleitung, wie sie bei SH-SY5Y-Zellen am deutlichsten hervortritt, eine geringere Rolle zu spielen. Da die AMPK unabhängig vom PI3K-Weg moduliert wird, könnte jedoch auch hier die virale Überlebenssteuerung einer Wirtszelle als wichtigste Optimierungsstrategie von HSV-1 gewertet werden.

Literaturverzeichnis

- Aktories K. 2009. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10te Aufl. München ; Jena : Elsevier, Urban & Fischer.
- Andor A, Trülzsch K, Essler M, Roggenkamp A, Wiedemann A, Heesemann J, Aepfelbacher M. 2001. YopE of Yersinia, a GAP for Rho GTPases, selectively modulates Rac-dependent actin structures in endothelial cells. *Cell Microbiol*, 3:301–310.
- Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamashita K. 2007. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis, Kap 6. Cambridge University Press.
- Bachmann VA, Bister K, Stefan E. 2013. Interplay of PKA and Rac: fine-tuning of Rac localization and signaling. *Small GTPases*, 4:247–251.
- Bandhuvula P, Tam YY, Oskouian B, Saba JD. 2005. The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity. *J Biol Chem*, 280:33697–33700.
- Belongia EA, Goodman JL, Holland EJ, Andres CW, Homann SR, Mahanti RL, Mizener MW, Erice A, Osterholm MT. 1991. An outbreak of herpes gladiatorum at a high-school wrestling camp. *N Engl J Med*, 325:906–910.
- Benetti L, Roizman B. 2006. Protein kinase B/Akt is present in activated form throughout the entire replicative cycle of deltaU(S)3 mutant virus but only at early times after infection with wild-type herpes simplex virus 1. *J Virol*, 80(7):3341–3348.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33:2643–2652.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*, 38:3751–3757.

- Blackwelder WC, Dolin R, Mittal KK, McNamara PM, Payne FJ. 1982. A population study of herpesvirus infections and HLA antigens. *Am J Epidemiol*, 115:569–576.
- Blaho VA, Hla T. 2014. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res*, 55:1596–1608.
- Blondeau N, Lai Y, Tyndall S, Popolo M, Topalkara K, Pru JK, Zhang L, Kim H, Liao JK, Ding K, Waeber C. 2007. Distribution of sphingosine kinase activity and mRNA in rodent brain. *J Neurochem*, 103:509–517.
- Brinkmann V. 2007. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther*, 115(1):84–105.
- Bruchelt G, Buck J, Burdach SE, Treuner J. 1985. [Effect of lithium on the proliferation of fibroblasts and tumor cell lines in vitro]. *Klin Padiatr*, 197:249–252.
- Carpenter D, Hsiang C, Jiang X, Osorio N, BenMohamed L, Jones C, Wechsler SL. 2015. The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcript (LAT) protects cells against cold-shock-induced apoptosis by maintaining phosphorylation of protein kinase B (AKT). *J Neurovirol*, 21:568–575.
- Chuluunbaatar U, Roller R, Mohr I. 2012. Suppression of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity in Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells by the Us3 Protein Kinase. *J Virol*, 86:7771–6.
- Claoué C, De Cock R. 1996. The spectrum of herpes simplex virus disease of the anterior segment in the 1990s. *Acta Ophthalmol Scand*, 74(4):407–410.
- Colao I, Pennisi R, Venuti A, Nygårdas M, Heikkilä O, Hukkanen V, Sciortino MT. 2017. The ERK-1 function is required for HSV-1-mediated G1/S progression in HEP-2 cells and contributes to virus growth. *Sci Rep*, 7:9176.
- Cooray S. 2004. The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. *J Gen Virol*, 85:1065–1076.
- Corey L, Spear PG. 1986. Infections with herpes simplex viruses (2). *N Engl J Med*, 314:749–757.

- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S. 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 381:800–803.
- Dillmann C, Mora J, Olesch C, Brüne B, Weigert A. 2015. S1PR4 is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. *Biol Chem*, 396:775–782.
- Dixit R, Tiwari V, Shukla D. 2008. Herpes simplex virus type 1 induces filopodia in differentiated P19 neural cells to facilitate viral spread. *Neurosci Lett*, 440:113–118.
- Djuric M, Pavlica D, Jankovic L, Milasin J, Jovanovic T. 2007. Presence of herpes simplex virus on the oral mucosa in patients undergoing chemotherapy. *Scott Med J*, 52:28–31.
- Douglas R Jr, Couch RB. 1970. A prospective study of chronic herpes simplex virus infection and recurrent herpes labialis in humans. *J Immunol*, 104(2):289–295.
- Eaton HE, Saffran HA, Wu FW, Quach K, Smiley JR. 2014. Herpes simplex virus protein kinases US3 and UL13 modulate VP11/12 phosphorylation, virion packaging, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling activity. *J Virol*, 88(13):7379–7388.
- Encinas M, Iglesias M, Liu Y, Wang H, Muhaisen A, Ceña V, Gallego C, Comella JX. 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*, 75:991–1003.
- Flint J, Racaniello V, Rall G, Skalka A. 2015. *Principles of Virology*, Bd 1. Vierte Aufl. ASM Press. S. 50.
- Flowerdew SE, Wick D, Himmelein S, Horn AKE, Sinicina I, Strupp M, Brandt T, Theil D, Hüfner K. 2013. Characterization of neuronal populations in the human trigeminal ganglion and their association with latent herpes simplex virus-1 infection. *PloS one*, 8:e83603.
- Freeman ML, Sheridan BS, Bonneau RH, Hendricks RL. 2007. Psychological stress compromises CD8+ T cell control of latent herpes simplex virus type 1 infections. *J Immunol*, 179:322–328.
- Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF, Waterfield MD. 2007. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J*, 404:15–21.

- Hagen N, Van Veldhoven PP, Proia RL, Park H, Merrill AH, van Echten-Deckert G. 2009. Subcellular origin of sphingosine 1-phosphate is essential for its toxic effect in lyase-deficient neurons. *J Biol Chem*, 284:11346–11353.
- Hanley DF, Johnson RT, Whitley RJ. 1987. Yes, brain biopsy should be a prerequisite for herpes simplex encephalitis treatment. *Arch Neurol*, 44:1289–1290.
- Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. 2014. *Biochemie und Pathobiochemie*. 9te Aufl. Springer. S. 176.
- Hengst JA, Wang X, Sk UH, Sharma AK, Amin S, Yun JK. 2010. Development of a sphingosine kinase 1 specific small-molecule inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett*, 20:7498–7502.
- Hensel N, Stockbrügger I, Rademacher S, Broughton N, Brinkmann H, Grothe C, Claus P. 2014. Bilateral crosstalk of rho- and extracellular-signal-regulated-kinase (ERK) pathways is confined to an unidirectional mode in spinal muscular atrophy (SMA). *Cell Signalling*, 26(3):540–548.
- Herold G. 2015. *Innere Medizin*. Köln: Herold, Gerd.
- Hisano Y, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. 2012. Mouse SPNS2 functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells. *PloS one*, 7:e38941.
- Hoppe S, Schelhaas M, Jaeger V, Liebig T, Petermann P, 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*, 87:3483–3494.
- Hudson SJ, Dix RD, Streilein JW. 1991. Induction of encephalitis in SJL mice by intranasal infection with herpes simplex virus type 1: a possible model of herpes simplex encephalitis in humans. *The Journal of infectious diseases*, 163:720–727.
- Jerome KR, Chen Z, Lang R, Torres MR, Hofmeister J, Smith S, Fox R, Froelich CJ, Corey L. 2001. HSV and glycoprotein J inhibit caspase activation and apoptosis induced by granzyme B or Fas. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 167:3928–3935.
- Kato A, Ando T, Oda S, Watanabe M, Koyanagi N, Arie J, Kawaguchi Y. 2016. Roles of Us8A and Its Phosphorylation Mediated by Us3 in Herpes Simplex Virus 1 Pathogenesis. *Journal of virology*, 90:5622–5635.

- Kaverina I, Krylyshkina O, Small JV. 2002. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34:746–761.
- Kays JS, Li C, Nicol GD. 2012. Expression of sphingosine 1-phosphate receptors in the rat dorsal root ganglia and defined single isolated sensory neurons. *Physiological genomics*, 44:889–901.
- Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ. 2009. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus research*, 145:173–186.
- King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tschlis PN, Brugge JS. 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Molecular and cellular biology*, 17:4406–4418.
- Klein RS. 2016. Epidemiology of herpes simplex virus type 1 infection; <https://www-1uptodate-1com-1002e02ds045b.han.ulb.uni-jena.de/contents/epidemiology-of-herpes-simplex-virus-type-1-infection>.
- Klein RS. 2017. Herpes simplex virus type 1 encephalitis; <https://www-1uptodate-1com-1002e02ds045b.han.ulb.uni-jena.de/contents/herpes-simplex-virus-type-1-encephalitis>.
- Knipe DM, Howley PM. 2013. *Fields Virology*. Lippincott Williams&Wilki.
- Lee HM, Lo KW, Wei W, Tsao SW, Chung GTY, Ibrahim MH, Dawson CW, Murray PG, Paterson IC, Yap LF. 2017. Oncogenic S1P signalling in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma activates AKT and promotes cell migration through S1P receptor 3. *J Pathol*, 242:62–72.
- Leyton L, Hott M, Acuña F, Caroca J, Nuñez M, Martin C, Zambrano A, Concha MI, Otth C. 2015. Nutraceutical activators of AMPK/Sirt1 axis inhibit viral production and protect neurons from neurodegenerative events triggered during HSV-1 infection. *Virus Res*, 205:63–72.
- Li S, Carpenter D, Hsiang C, Wechsler SL, Jones C. 2010. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript inhibits apoptosis and promotes neurite sprouting in neuroblastoma cells following serum starvation by maintaining protein kinase B (AKT) levels. *J Gen Virol*, 91:858–866.

- Liu X, Cohen JI. 2015. The role of PI3K/Akt in human herpesvirus infection: From the bench to the bedside. *Virology*, 479-480:568–577.
- López-Ramírez MA, Domínguez-Monzón G, Vergara P, Segovia J. 2008. Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling. *Int J Dev Neurosci*, 26:497–503.
- Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. 2002. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, 1585:193–201.
- Machesky NJ, Zhang G, Raghavan B, Zimmerman P, Kelly SL, Merrill AH, Waldman WJ, Van Brocklyn JR, Trgovcich J. 2008. Human cytomegalovirus regulates bioactive sphingolipids. *J Biol Chem*, 283:26148–26160.
- Madishetti S, Schneble N, König C, Hirsch E, Schulz S, Müller JP, Wetzker R. 2014. PI3K γ integrates cAMP and Akt signalling of the μ -opioid receptor. *Br J Pharmacol*, 171:3328–3337.
- Malvy D, Halioua B, Lançon F, Rezvani A, Bertrais S, Chanzy B, Daniloski M, Ezzedine K, Malkin JE, Morand P, De Labareyre C, Hercberg S, El Hasnaoui A. 2005. Epidemiology of genital herpes simplex virus infections in a community-based sample in France: results of the HERPIMAX study. *Sex Transm Dis*, 32:499–505.
- Martin C, Leyton L, Arancibia Y, Cuevas A, Zambrano A, Concha MI, Otth C. 2014. Modulation of the AMPK/Sirt1 axis during neuronal infection by herpes simplex virus type 1. *J Alzheimers Dis*, 42:301–312.
- Masuhr KF, Masuhr F, Neumann M. 2013. *Neurologie*. Thieme Stuttgart.
- Mitroi DN, Deutschmann AU, Raucamp M, Karunakaran I, Glebov K, Hans M, Walter J, Saba J, Gräler M, Ehninger D, Sopova E, Shupliakov O, Swandulla D, van Echten-Deckert G. 2016. Sphingosine 1-phosphate lyase ablation disrupts presynaptic architecture and function via an ubiquitin- proteasome mediated mechanism. *Sci Rep*, 6:37064.
- Miyake Y, Inoue N, Nishimura K, Kinoshita N, Hosoya H, Yonemura S. 2006. Actomyosin tension is required for correct recruitment of adherens junction components and zonula occludens formation. *Exp Cell Res*, 312:1637–1650.

- Mizuno K. 2013. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell Signalling*, 25:457–469.
- Modrow S, Falke D, Truyen U. 2010. *Molekulare Virologie*. Dritte Aufl. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Nakada M, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Teng L, Pyko IV, Hamada JI. 2011. Aberrant signaling pathways in glioma. *Cancers*, 3:3242–3278.
- Naranatt PP, Akula SM, Zien CA, Krishnan HH, Chandran B. 2003. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Induces the Phosphatidylinositol 3-Kinase-PKC- ζ -MEK-ERK Signaling Pathway in Target Cells Early during Infection: Implications for Infectivity. *J Virol*, 77:1524–39.
- Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, Roof S, Harb JG, Ferenchak G, Eisfeld AK, Van Brocklyn JR, Briesewitz R, Saddoughi SA, Nagata K, Bittman R, Caligiuri MA, Abdel-Wahab O, Levine R, Arlinghaus RB, Quintas-Cardama A, Goldman JM, Apperley J, Reid A, Milojkovic D, Ziolo MT, Marcucci G, Ogretmen B, Neviani P, Perrotti D. 2013. Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies. *Blood*, 122:1923–1934.
- Olivera A, Spiegel S. 1993. Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature*, 365:557–560.
- Oxford J, Kellam P, Collier L. 2016. *Human Virology*. Fünfte Aufl. Oxford University Press.
- Pacheco A, Gallo G. 2016. Actin filament-microtubule interactions in axon initiation and branching. *Brain Res Bull*, 126:300–310.
- Patmanathan SN, Yap LF, Murray PG, Paterson IC. 2015. The antineoplastic properties of FTY720: evidence for the repurposing of fingolimod. *J Cell Mol Med*, 19:2329–2340.
- Patterson M. 2016. Overview of Niemann-Pick disease; <https://www-1uptodate-1com-1002e02ds045b.han.ulb.uni-jena.de/contents/overview-of-niemann-pick-disease>.
- Pippa R, Dominguez A, Christensen DJ, Moreno-Miralles I, Blanco-Prieto MJ, Vitek MP, Odero MD. 2014. Effect of FTY720 on the SET-PP2A complex in acute myeloid leukemia; SET binding drugs have antagonistic activity. *Leukemia*, 28:1915–1918.

- Püschel GP, Kühn H, Kietzmann T, Höhne W. 2011. Taschenlehrbuch Biochemie. Thieme Georg Verlag.
- Pyne NJ, McNaughton M, Boomkamp S, MacRitchie N, Evangelisti C, Martelli AM, Jiang HR, Ubhi S, Pyne S. 2016. Role of sphingosine 1-phosphate receptors, sphingosine kinases and sphingosine in cancer and inflammation. *Adv Biol Regul*, 60:151–159.
- Qin D, Feng N, Fan W, Ma X, Yan Q, Lv Z, Zeng Y, Zhu J, Lu C. 2011. Activation of PI3K/AKT and ERK MAPK signal pathways is required for the induction of lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by herpes simplex virus type 1. *BMC Microbiol*, 11:240.
- Reddy PBJ, Sehrawat S, Suryawanshi A, Rajasagi NK, Khatri M, Rouse BT. 2014. An approach to control relapse of inflammatory lesions after discontinuation of primary therapy. *PloS one*, 9:e98051.
- Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, 27(3):493–497.
- Remeijer L, Maertzdorf J, Doornenbal P, Verjans GM, Osterhaus AD. 2001. Herpes simplex virus 1 transmission through corneal transplantation. *Lancet*, 357:442.
- Renneberg R. 2007. *Biotechnologie für Einsteiger*. Zweite Aufl. Elsevier GmbH München.
- Richerieux N, Blondeau C, Wiedemann A, Rémy S, Vautherot JF, Denesvre C. 2012. Rho-ROCK and Rac-PAK signaling pathways have opposing effects on the cell-to-cell spread of Marek's Disease Virus. *PloS one*, 7:e44072.
- Riento K, Ridley AJ. 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:446–456.
- Roberts KL, Baines JD. 2011. Actin in herpesvirus infection. *Viruses*, 3:336–346.
- Rochat RH, Hecksel CW, Chiu W. 2014. Cryo-EM techniques to resolve the structure of HSV-1 capsid-associated components. *Methods Mol Biol*, 1144:265–281.
- Rodriguez M, Zachary KC. 2017. Cidofovir: An overview: <https://www-1uptodate-1com-1002e023x0485.han.ulb.uni-jena.de/contents/cidofovir-an-overview>.

- Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM, de Lanerolle P. 1999. Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science*, 283:2083–2085.
- Scalia P, Heart E, Comai L, Vigneri R, Sung CK. 2001. Regulation of the Akt/Glycogen synthase kinase-3 axis by insulin-like growth factor-II via activation of the human insulin receptor isoform-A. *J Cell Biochem*, 82:610–618.
- Schuchman EH, Wasserstein MP. 2015. Types A and B Niemann-Pick disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29:237–247.
- Sehrawat S, Rouse BT. 2008. Anti-inflammatory effects of FTY720 against viral-induced immunopathology: role of drug-induced conversion of T cells to become Foxp3+ regulators. *J Immunol*, 180:7636–7647.
- Spiegel S, Milstien S. 2002. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J Biol Chem*, 277:25851–25854.
- Spiegel S, Milstien S. 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4:397–407.
- Spitzenberg V, König C, Ulm S, Marone R, Röpke L, Müller JP, Grün M, Bauer R, Rubio I, Wymann MP, Voigt A, Wetzker R. 2010. Targeting PI3K in neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136:1881–1890.
- Spruance SL, Overall J Jr, Kern ER, Krueger GG, Pliam V, Miller W. 1977. The natural history of recurrent herpes simplex labialis: implications for antiviral therapy. *N Engl J Med*, 297(2):69–75.
- St-Cyr Giguère F, Attiori Essis S, Chagniel L, Germain M, Cyr M, Massicotte G. 2017. The sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist SEW2871 reduces Tau-Ser262 phosphorylation in rat hippocampal slices. *Brain Res*, 1658:51–59.
- Stanberry LR, Floyd-Reising SA, Connelly BL, Alter SJ, Gilchrist MJ, Rubio C, Myers MG. 1994. Herpes simplex viremia: report of eight pediatric cases and review of the literature. *Clin Infect Dis*, 18:401–407.
- Stoffel W, Assmann G. 1970. Metabolism of sphingoid bases, XV. Enzymatic degradation of 4t-sphingenine 1-phosphate (sphingosine-1-phosphate) to 2t-hexadecen-1-al and ethanolamine phosphate. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 351(8):1041–9.

- Strunk U, Ramos DG, Saffran HA, Smiley JR. 2016. Role of Herpes simplex virus 1 VP11/12 tyrosine-based binding motifs for Src family kinases, p85, Grb2 and Shc in activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *Virology*, 498:31–35.
- Takuwa Y, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa N. 2012. Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases. *Biofactors*, 38:329–337.
- Terai K, Soga T, Takahashi M, Kamohara M, Ohno K, Yatsugi S, Okada M, Yamaguchi T. 2003. Edg-8 receptors are preferentially expressed in oligodendrocyte lineage cells of the rat CNS. *Neuroscience*, 116:1053–1062.
- Tiwari V, Shukla D. 2010. Phosphoinositide 3 kinase signalling may affect multiple steps during herpes simplex virus type-1 entry. *J Gen Virol*, 91:3002–3009.
- Torres NI, Castilla V, Bruttomesso AC, Eiras J, Galagovsky LR, Wachsmann MB. 2012. In vitro antiviral activity of dehydroepiandrosterone, 17 synthetic analogs and ERK modulators against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res*, 95(1):37–48.
- Tyler KL, Tedder DG, Yamamoto LJ, Klapper JA, Ashley R, Lichtenstein KA, Levin MJ. 1995. Recurrent brainstem encephalitis associated with herpes simplex virus type 1 DNA in cerebrospinal fluid. *Neurology*, 45:2246–2250.
- Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD. 2001. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem*, 70:535–602.
- Vastag L, Koyuncu E, Grady SL, Shenk TE, Rabinowitz JD. 2011. Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. *PLoS Pathog*, 7:e1002124.
- Waeber C, Blondeau N, Salomone S. 2004. Vascular sphingosine-1-phosphate S1P1 and S1P3 receptors. *Drug News Perspect*, 17:365–382.
- Wan Q, Cho E, Yokota H, Na S. 2013. Rac1 and Cdc42 GTPases regulate shear stress-driven β -catenin signaling in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 433:502–507.
- Wozniak MA, Shipley SJ, Combrinck M, Wilcock GK, Itzhaki RF. 2005. Productive herpes simplex virus in brain of elderly normal subjects and Alzheimer's disease patients. *J Med Virol*, 75(2):300–306.

- Yang L, Han Z, Tian L, Mai P, Zhang Y, Wang L, Li L. 2015. Sphingosine 1-Phosphate Receptor 2 and 3 Mediate Bone Marrow-Derived Monocyte/Macrophage Motility in Cholestatic Liver Injury in Mice. *Sci Rep*, 5:13423.
- Yu X, He S. 2016. The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways. *Virology*, 13:77.
- Zheng K, Xiang Y, Wang X, Wang Q, Zhong M, Wang S, Wang X, Fan J, Kitazato K, Wang Y. 2014. Epidermal growth factor receptor-PI3K signaling controls cofilin activity to facilitate herpes simplex virus 1 entry into neuronal cells. *MBio*, 5(1):e00958–e00913.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

1.1	HSV-1, schematisch	3
1.2	Infektionszyklus HSV-1	8
1.3	Gleichgewicht Sphingosin Ceramid S1P	11
1.4	Signaltransduktion S1PR	12
1.5	Signaltransduktion GPCR	13
3.1	SH-SY5Y- und SK-N-LO-Zellen vor Infektion	25
3.2	WST-1-Reaktion (Roche)	30
4.1	HSV-1 Kinetik	40
4.2	ZPE bei SH-SY5Y	42
4.3	ZPE bei SK-N-LO	43
4.4	ZPE bei Verozellen	43
4.5	WST-1 SKI-178	44
4.6	SKI-178 24 h Konzentrationsabhängigkeit	45
4.7	SKI-178 4 μ M Zeitabhängigkeit	46
4.8	SKI-178 4 μ M MOI-Abhängigkeit	46
4.9	SKI-178 6 h MOI-Abhängigkeit	47
4.10	WST-1 FTY-720	48
4.11	FTY-720 Konzentrationsabhängigkeit	49
4.12	WST-1 JTE-013	50
4.13	JTE-013 Konzentrationsabhängigkeit	51
4.14	WST-1 LY-294002	52
4.15	LY-294002 Konzentrationsabhängigkeit	52
4.16	WST-1 NSC-23766	53
4.17	NSC-23766 Konzentrationsabhängigkeit	54
4.18	WST-1 AICAR	55
4.19	AICAR Konzentrationsabhängigkeit	56
4.20	WST-1 Y-27632	57

4.21	Y-27632 Konzentrationsabhängigkeit	58
4.22	WST-1 U-0126	58
4.23	U-0126 Konzentrationsabhängigkeit	59
4.24	SH-SY5Y Western-Blot des beta-Aktin	61
4.25	SH-SY5Y Western-Blot der viralen Thymidinkinase	61
4.26	SK-N-LO Westernblot des beta-Aktin	62
4.27	SK-N-LO Westernblot der viralen Thymidinkinase	62
4.28	SH-SY5Y Fluoreszenzmarkierung von HSV-1	64
4.29	SK-N-LO Fluoreszenzmarkierung von HSV-1	65
5.1	S1PR-Signalwege mit Inhibitoren	70
5.2	S1P-GPCR-Signalwege mit Inhibitoren	73

Danksagung

Für eine ausgezeichnete Betreuung in allen Teilen der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Andreas Henke, der mir in jeder schwierigen Situation der Promotion weiterhelfen konnte. Ich sammelte in seiner Arbeitsgruppe vielfältige wissenschaftliche Erfahrung und hatte die Möglichkeit, wichtige Methoden der Virologie erlernen. Ganz besonders produktiv und inspirierend waren unsere Gespräche während der Diskussion der erhaltenen Ergebnisse sowie in der Arbeit mit Themen des Sektions-eigenen Journal-Clubs.

Für die geduldige Einweisung in alle praktischen Tätigkeiten zu Beginn der Arbeit danke ich Herrn Dipl. Biol. Christian Rien, der viel Zeit mit mir im Labor verbrachte.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Sektion experimentelle Virologie bedanken, die mir bei praktischen Problemen immer weiterhelfen konnten und für eine herzliche und offene Arbeitsatmosphäre sorgten.

Für die fachliche und finanzielle Unterstützung während der Promotionszeit danke ich dem IZKF des Universitätsklinikums Jena.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Andreas Henke
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 17. Dezember 2017

Henrik Schanbacher, Verfasser