

Zelluläre DNA-Reparaturmechanismen
in virusinfizierten Zellen:
Bedeutung und Funktion des Proteins PR130 während
der Replikation von Herpes-simplex-Virus Typ 1
(HSV-1)

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

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

Von Christoph Friedemann Jacob
geboren am 30.08.1994 in Halle / Saale

Gutachter

1. Herr Prof. Dr. Andreas Henke, Institut für Medizinische Mikrobiologie,

Sektion Experimentelle Virologie, Universitätsklinikum Jena

2. Herr Prof. Dr. Oliver Krämer, Institut für Toxikologie, Universitätsklinikum Mainz

3. Herr Priv. Doz. Dr. Andi Krumbholz, Institut für Infektionsmedizin,

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.07.2021

Staatsexamen: 15.11.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
Zusammenfassung	1
I. Einleitung	2
1.1 Die Geschichte des Herpesvirus	2
1.2 Humane Herpesviren	3
1.3 Herpes-simplex-Virus	4
1.3.1 Morphologie und Genomstruktur.....	5
1.3.2 Pathogenese und Replikation	6
1.3.3 Übertragung und Epidemiologie.....	11
1.3.4 Ätiologie	12
1.3.5 Klinische Ausprägung.....	13
1.3.6 Therapie.....	14
1.4 Die Proteinphosphatase PP2A	15
1.4.1 Die Struktur von PP2A	16
1.4.2 Die regulatorische Untereinheit PR130 von B“	19
1.5 Die Interaktionen von PP2A mit Viren	23
1.6 DNA-Reparaturmechanismen in HSV-1-infizierten Zellen.....	25
II. Ziele der Arbeit	27
III. Material & Methoden	28
3.1 Geräte und Material	28
3.1.1 Geräte / Verbrauchsmaterial	28
3.1.2 Verwendete primäre & sekundäre Antikörper	29
3.1.3 Zellen	30
3.1.4 Viren.....	31
3.1.5 Inhibitoren	31
3.1.6 Gebrauchsfertige Testsysteme und Produkte	31
3.1.7 Chemikalien	32
3.1.8 Kulturmedien, Puffer & Lösungen	33
3.2 Methoden	34
3.2.1 Zellkultur	34
3.2.2 Anlage eines Virusstocks, HSV-1/Kos, HSV-1/E70K/EGFP	36
3.2.3 Bestimmung des Virustiters von HSV-1 mittels TCID ₅₀ -Test.....	37
3.2.4 Viruskinetik	38
3.2.5 DNA-Fragmentation.....	39

3.2.6	Metabolische Aktivität/ WST-1-Test.....	40
3.2.7	Inhibition der Histon-Deacetylase 1 & 2 durch MS-275.....	42
3.2.8	Nachweis der Replikation von HSV-1 in HCT116 Zellen mittels Flowzytometrie ...	44
3.2.9	Zellintegrität von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen.....	45
3.2.10	Nachweis der Apoptose-Induktion von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	46
3.2.11	Überprüfung des Zellzyklus von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	47
3.2.12	Nachweis der Replikation von HSV-1 in HCT116 Zellen mittels Fluoreszenz.....	48
3.2.13	qPCR von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen.....	49
3.2.14	Western-Blot von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen.....	50
3.2.15	Statistische Analyse	51
IV.	Ergebnisse	52
4.1	Replikationskinetik von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen.....	52
4.2	Metabolische Aktivität (WST-1)	53
4.3	Quantitative PCR (qPCR) von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen.....	54
4.4	Immunfluoreszenz von HSV-1/E70K/EGFP-infizierten HCT116 Zellen	55
4.5	Messung HSV-1/E70K/EGFP in HCT116 Zellen mittels Flowzytometrie	58
4.6	Apoptose von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen.....	59
4.6.1	DNA-Fragmentation in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	59
4.6.2	Nachweis der aktivierten Caspase-3 und PARP-Spaltung in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen.....	60
4.7	Nachweis der Zellintegrität von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	63
4.8	Western Blots von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	64
4.9	HDAC-Inhibition in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	68
4.9.1	MS-275 (Entinostat).....	68
4.9.2	FK-228 (Romidepsin)	70
4.10	ATM/ATR Inhibition in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	71
4.10.1	VE-821	71
4.10.2	VE-822	72
4.11	CHK1 Inhibition durch MK-8776 in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen.....	73
4.12	Zellzyklus von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	74
V.	Diskussion	77
5.1	Therapieoptionen bei HSV-1 Infektion	77
5.2	Die Rolle von PP2A/PR130 bei HSV-1 Infektion	78
5.3	Zellüberleben und Apoptose der HCT116 Zellen.....	79
5.4	DNA-Reparaturmechanismen in HSV-1-infizierten Zellen.....	83
5.5	Rolle des Zellzyklus für HSV-1	86

5.6 Bedeutung der HDACs in HSV-1-infizierten Zellen.....	88
VI. Schlussfolgerung.....	93
VII. Anhang.....	94
Abbildungsverzeichnis.....	94
Tabellenverzeichnis.....	96
Ehrenwörtliche Erklärung.....	97
Danksagung.....	98
Literaturverzeichnis.....	99

Abkürzungsverzeichnis

ASBD	= A subunits binding domains
AS	= Aminosäuren
ATM	= ataxia teleangiectasia mutated
ATR	= ataxia teleangiectasia and Rad3-related CDK = cyclin-dependent kinase
Bad	= Bcl2 antagonist of cell death
Bcl2	= B-cell lymphoma 2
cdc25	= cell division cycle 25
CG-NAP	= <u>c</u> entrosome and <u>g</u> olgi localized <u>PKN</u> <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein
c-Myc	= <u>c</u> ellular <u>M</u> yelocytomatosis
CHK	= Checkpoint-Kinase
DBS	= Doppelstrangbruch
ddH₂O	= doppelt destilliertes H ₂ O
DDR	= DNA damage response
DNA-Pkcs	= Dexoxyribonukleinsäure-dependent protein kinase
dNTP	= Desoxynukleotid-Triphosphat
dsDNA	= doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
E4orf4	= Adenovirus early region open reading frame 4
EBV	= Epstein-Barr-Virus
EBNA-LP	= Epstein-Barr-virus encoded leader protein
EGF	= epidermal growth factor
et al.	= und andere
FCP1	= TFIIIF-assoziierende CTD-Phosphatase
FOXO	= Forkhead-Box-Proteine
GAG	= Glykosaminoglykane
GTP	= Guanosin-Triphosphat
(g)G	= Hüllglykoprotein
HBV	= Hepatitis-B-Virus
HCF	= host cell factor 1
HCMV	= Humanes Cytomegalievirus
HDAC	= Histon-Deacetylase
HeLa	= nach Henrietta Lacks (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms)
HSV	= Herpes-simplex-Virus
HSVE	= Herpes-simplex-Virus Enzephalitis
HveM-Proteine	= Herpesvirus entry mediator-Proteine

HveA	= Tumor-Nekrose-Faktor Alpha Rezeptorfamilie
HveB	= Nectin-2
HveC	= Nectin-1
ICLs	= inter-strand DNA cross-links
ICP	= infected cell protein
IE	= immediate early, E = early, L = late
ISG	= interferon-stimulated genes
IFN-α	= Interferon alpha/ IFN-γ = Interferon gamma
INM	= inner nuclear membrane
ISG15	= IFN-stimulated gene 15
IR_L	= internal repeat long region (interne Wiederholung der langen Region)
IR_s	= internal repeat short region (interne Wiederholung der kurzen Region)
kpb	= Kilobasenpaare
LAT	= latency associated transcript
LPP	= LIM (<u>L</u> in11, <u>I</u> sl-1, <u>M</u> ec-3) protein lipoma-preferred partner
LSD1	= lysine-specific histone demethylase 1A
MAP	= mitogen-activated protein
Mre11	= meiotic recombination 11
mRNA	= messenger Ribonukleinsäure
NADH	= Nicotinamidadenindinukleotid
Nbs1	= Nijmegen breakage syndrome 1
NEC	= nuclear egress complex protein
NHEJ	= non-homologous end joining
Nkd	= naked cuticle
NPC	= nukleärer Porenkomplex
Oct-1	= octamer-binding protein 1
OH	= Hydroxy-(Gruppe)
Ori	= origin of replication
ONM	= outer nuclear membrane
p21	= cyclin-dependent kinase inhibitor
p53	= Tumorsuppressor Protein 53
PARP	= (Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase)
PCR	= Polymerase-Kettenreaktion
PEV	= primary enveloped virion
p. i.	= post infectionem (nach Infektion)

PIKKs	= Phosphatidylinositol-3-kinase-like-kinases
PKN	= Protein Kinase N
PoI II	= RNA-Polymerase II (Wirtsprotein)
PPP	= Protein-Phosphoprotein-Phosphatasen
PP2A	= Protein Phosphatase 2A
PRRs	= pattern recognition receptors
PTPA	= Protein Phosphatase 2 Phosphatase Activator
Rb	= Retinoblastom-Gen (p = phosphoryliert)
REST	= repressor element 1 silencing transcription factor
RIG-I	= retinoic acid-inducible gene I
RLRs	= RIG-I like receptors
RNA	= Ribonukleinsäure
RyR2	= Ryanodin-Rezeptor 2
Scp1	= small C-terminal domain phosphatase 1
SD	= standard deviation
SH2	= Src homology 2
SHIP2	= SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 2
siRNA	= short interfering Ribonukleinsäure
SSB	= single-stranded DNA-binding-protein
STAT1	= signal-transducer and activator of transcription 1
STING	= stimulator of interferon genes
SV40ST	= simian virus 40 small t Onkoprotein
TCID₅₀	= Tissue Culture Infection Dose 50
TIF	= α -trans-inducing factor
TR_L	= terminal repeat long region (endständige Wiederholung der langen Region)
TR_s	= terminal repeat short region (endständige Wiederholung der kurzen Region)
UL-9	= origin-binding protein
U_L	= long unique region (lange einmalige Region)
U_s	= short unique region (kurze einmalige Region)
VHS	= virus-host-shutoff protein
VP	= virion protein, VP 1/2 = Tegumentprotein U _L 36
WEE1	= nukleäre Serin/Threonin-Kinase
Wnt	= <u>W</u> ingless + <u>I</u> nt-1
ZNS	= Zentrales Nervensystem
ZPE	= Zytopathischer Effekt

Einheiten:

h	= Stunden	°C	= Grad Celsius
kDa	= Kilodalton	MOI	= multiplicity of infection
mg	= Milligramm	mol	= Mol
min	= Minute	V	= Volt
ml	= Milliliter		
nm	= Nanometer		
ng	= Nanogramm		
sec	= Sekunde		
U	= Umdrehungen		
µg	= Mikrogramm		
µl	= Mikroliter		
µm	= Mikrometer		

Zusammenfassung

Infektionen mit Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1), die bei Patienten unter Immunsuppression, im Verlauf septischer Ereignisse oder altersbedingt reaktiviert werden können, sind mit einer gesteigerten Mortalität und Morbidität verbunden. Als Therapie stehen Virostatika zur Verfügung, deren Verwendung zunehmend durch die Entstehung resistenter Virusvarianten eingeschränkt ist, weshalb neue antivirale Konzepte notwendig sind.

DNA-Viren versuchen auf spezifische Art und Weise Wirtsstrukturen auszunutzen und z. B. via Protein Phosphatase 2A (PP2A) zu deregulieren. Virale Proteine können stabile Komplexe mit PP2A-Holoenzymen oder mit den PP2A-interagierenden Proteinen eingehen. Die Funktion der Protein Phosphatase ist oft wesentlich für die Vollendung des viralen Replikationszyklus. Beispiele hierfür sind das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder das Ebola Virus. Eigene Untersuchungen belegen den Zusammenhang der regulatorischen Untereinheit PR130 von PP2A und HSV-1. PR130 wird durch Histon-Deacetylasen der Klasse 1 und 2 (HDAC1&2) reguliert und steuert die Signaltransduktion von Checkpoint-Kinasen (CHK), den Zellzyklus-Arrest und das Zellüberleben. Die Rolle der regulatorischen Untereinheit PR130 von PP2A und deren Signaltransduktion im Verlauf einer HSV-1 Infektion ist bisher nicht in der Literatur beschrieben und experimentell charakterisiert worden. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass PR130 für die Replikation von HSV-1 von Bedeutung ist und das Eliminieren von PR130 durch CRISPR-Cas9 zu höheren Viruskonzentrationen, veränderten Zellzyklus-Phasen und antiapoptotischen Signalkaskaden führt. Zusammenfassend begünstigen diese Faktoren die Replikation von HSV-1 und unterstützen die Hypothese, dass PR130 zur Limitierung von Virusinfektionen von der Wirtszelle benötigt wird. Somit stellt PR130 ein therapeutisches Target für die Modulation von Virusinfektionen dar.

I. Einleitung

1.1 Die Geschichte des Herpesvirus

Die Bezeichnung Herpes entspringt dem altgriechischen Wort ἕρπειν (*herpein*) und bedeutet in etwa „kriechen“ oder „schleichen“. Zurückzuführen ist die Namensgebung auf die langsame Ausbreitung der Infektion, bei der sich die Herpesbläschen in den Schleimhäuten entwickeln und Läsionen verursachen. Beschrieben wurde die Erkrankung bereits im antiken Griechenland, wobei Gelehrte, allen voran der wohl Bekannteste, Hippokrates, sie in seinem Werk *De mulierum affectibus*, prägten (Littré 1853).

Die erste Beschreibung von dem, was heute als Herpes bezeichnet wird, schilderte Aulus Cornelius Celsus 30 v. Chr. in seinem Werk *De Medicina*. Galenos von Pergamon fand heraus, dass die Bläschen immer wieder auf ein und der derselben Körperhälfte auftraten. Die Bezeichnung *Herpes labialis* als orale Form des Herpes wurde 100 v. Chr. vom römischen Arzt Herodotus eingeführt (Wildy 1973).

Seitdem fand Herpes Eingang in diverse medizinische und literarische Texte, ein Beispiel des 16. Jahrhunderts ist William Shakespeares Tragödie „Romeo und Julia“ (1. Akt, 4. Szene). Im 18. Jahrhundert war Herpes bei Prostituierten sogar so bekannt, dass sie schlicht als „Berufskrankheit“ bezeichnet wurde (Taylor 2014). Im Jahr 1736 unterschied der französische Arzt Jean Astruc das Krankheitsbild des *Herpes genitalis* von der *Gonorrhoe* bzw. *Syphilis*. Zuvor war dieses lediglich als eine Variante der beschriebenen Geschlechtskrankheiten angenommen worden (Astruc 1754).

Die Assoziation und Häufigkeit dieser Krankheitsbilder wurde dann 1883 von dem deutschen Dermatologen Paul Gerson Unna beschrieben (Unna 1883). Aus Bläscheninhalt eines Patienten gelang die erstmalige Isolierung und Charakterisierung von Herpes-simplex-Viren (HSV) durch Slavin und Gavett (Slavin und Gavett 1946). Die direkte elektronenmikroskopische Darstellung erarbeiteten Coriell und Rake 1950 (Coriell und Rake 1950). Dennoch dauerte es bis 1971 ehe Nahmias und Schneweis entdeckten, dass die Virusinfektionen durch zwei verschiedene Virusspezies verursacht werden, die sich wiederum in ihrer Antigenität unterscheiden (HSV-1 & HSV-2) (Schneweis und Nahmias 1971).

1.2 Humane Herpesviren

HSV gehört zur Familie der *Herpesviridae*. Die Erreger dieser Familie nutzen eine Vielzahl von Wirtsorganismen, welche von Vögeln, Reptilien und Pilzen bis zum Menschen (*Homo sapiens*) reichen. Etwa 100 Herpesviren sind säugerspezifisch und nur 9 davon haben den Menschen als primären Wirtsorganismus, sind also humanpathogen (Lefkowitz et al. 2018). Die Herpesvirus Study Group des International Committee on the Taxonomy of Viruses teilt die *Herpesviridae* in drei Subfamilien ein: α -, β - und γ -*Herpesvirinae*. Bei diesen Unterfamilien unterscheiden die biologischen Eigenschaften die Viren voneinander; Kriterien sind beispielsweise die infizierten Zelltypen oder der Ort der Latenzentwicklung. Grundsätzlich sind sämtliche humanpathogenen Herpesviren fähig, ihren Wirt latent zu infizieren und im Zuge gewisser pathophysiologischer Bedingungen eine Reaktivierung und erneute akute Erkrankung des Wirts hervorzurufen (Arvin et al. 2007).

Zu den *Alphaherpesvirinae* gehört neben Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2 (HSV-1 & HSV-2) auch das Varizella-Zoster-Virus (VZV, bzw. Humanes Herpes-Virus 3 (HHV-3)). Sie sind durch eine variable Wirtsspezifität und einen schnellen Replikationszyklus charakterisiert und verbleiben nach der Primärinfektion latent in sensorischen Ganglien. Die *Betaherpesvirinae* breiten sich im Gewebe langsamer aus und weisen ein enges Wirtsspektrum auf. Zu ihnen gehören die humanen Cytomegalieviren (HCMV, bzw. HHV-5) und die humanen Herpesviren 6A, 6B und 7 (HHV-6A, -6B & -7). Deren Ort der Latenz ist vorrangig in sekretorischem Nieren- und Drüsengewebe, sowie in lymphoretikulären Zellen lokalisiert.

Die dritte Unterfamilie, die *Gammaherpesvirinae*, schließen das Epstein-Barr-Virus (EBV, bzw. HHV-4) und das Kaposi-Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSH-V, bzw. HHV-8) mit ein. Ihr Replikationszyklus ist dem der β -*Herpesvirinae* ähnlich; langsam und im Wirtsspektrum eingeschränkt. Die Vermehrung und Latenz findet zumeist spezifisch in B- und T-Zellen statt, weshalb auch von Lymphtropie die Rede ist (Fields et al. 2013).

Abgesehen von den neun humanpathogenen Viren können Infektionen des Zentralen Nervensystems (ZNS) zudem durch das Herpesvirus simiae (SHV-1), ein Herpesvirus der Rhesusaffen, ausgelöst werden, wenn Kontakt mit Speichel z.B. nach Bissen stattfand (Benson et al. 1989). Einen Überblick über die humanpathogenen Herpesviren bietet die Tabelle 1.

Humanpathogene Herpesviren	Subfamilie	Genomgröße (kb)	Virusassoziierte Erkrankungen
Herpes-simplex-Virus Typ 1	α	152	Herpes labialis, Temporallappenzephalitis, Keratitis
Herpes-simplex-Virus Typ 2	α	152	Herpes genitalis, Herpes neonatorum
Varizella-Zoster-Virus	α	125	Windpocken, Herpes zoster
Epstein-Barr-Virus	γ	172	Mononukleose, Burkitt-Lymphom, Nasopharyngealkarzinom
Cytomegalie-Virus	β	229	generalisierte Infekte Neugeborener & immunsupprimierter Personen
Humanes Herpesvirus 6 Typ A Typ B	β	162	bis dato unklar Exanthema subitum, Enzephalitis
Humanes Herpesvirus 7	β	145	Exanthema subitum
Humanes Herpesvirus 8	γ	ca. 230	Kaposi-Sarkom

Tabelle 1: Übersicht humanpathogener Herpesviren, ihre zugehörige Unterfamilie, Größe des viralen Genoms in Kilobasen (kb) und assoziierte Infektionserkrankungen.

1.3 Herpes-simplex-Virus

HSV werden in zwei Serotypen unterteilt: HSV-1 & HSV-2. Die Unterschiede fallen gering aus, da die Basenpaare bei 73 von 74 Genen zu 67 bis 97% identisch sind. Lediglich das für die Diagnostik relevante Hüllglykoprotein (g)G von HSV-2 beinhaltet circa 500 Aminosäuren (AS), welche HSV-1 nicht aufweist. Zur Differenzierung beider Serotypen ist ein wichtiges Unterscheidungskriterium daher die Lokalisation, der von den Viren verursachten charakteristischen, ulzerierenden Bläschen. Die Infektion mit HSV-1 löst meist Infektionen im orofazialen Bereich (*Herpes labialis*) aus, während HSV-2 überwiegend die Schleimhäute des Genitaltrakts infiziert (*Herpes genitalis*) (Schneweis 2001). Im Zuge dieser Arbeit liegt der Fokus auf HSV-1.

1.3.1 Morphologie und Genomstruktur

Das Virion setzt sich im Inneren aus der linearen, doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure (dsDNA), umgeben von einem ca. 100 nm großen ikosaedrischen Nucleokapsid, zusammen. Dieses besteht aus 162 tubulären Kapsomeren (150 Hexone und 12 Pentone) und jedes Kapsomer wird aus 6 Hauptkapsidproteinen gebildet, welche per Disulfidbrücken mit Virusproteinen und ihrerseits mit der DNA verbunden sind (Modrow et al. 2010). Das Kapsid wird nochmals von einem amorphen Tegument umgeben, welches 20 für die Replikation wichtige Proteine, wie z. B. den α -trans-inducing factor (TIF) oder das virus-host-shutoff (VHS) Protein, enthält (Kelly et al. 2009). Das TIF (auch virales Protein 16, VP16) ist im Zellkern der infizierten Wirtszelle für die Verstärkung der Expression der viralen immediate early (IE-) Gene verantwortlich. Das VHS Protein ist sowohl bei der Hemmung der Proteinsynthese der Wirtszelle von Bedeutung als auch bei der Initiation der viralen Replikation. Das Tegument bildet die Verbindung zur Virushülle (envelope), einer Lipidmembran mit einer Vielzahl an Glykoproteinen, die sich elektronenmikroskopisch nach außen gerichtet darstellen (Kelly et al. 2009). Die Lipidmembran ist eine Lipiddoppelschicht, welche von der Wirtszelle abstammt. Dies ist schematisch in der Abbildung 1 zu sehen.

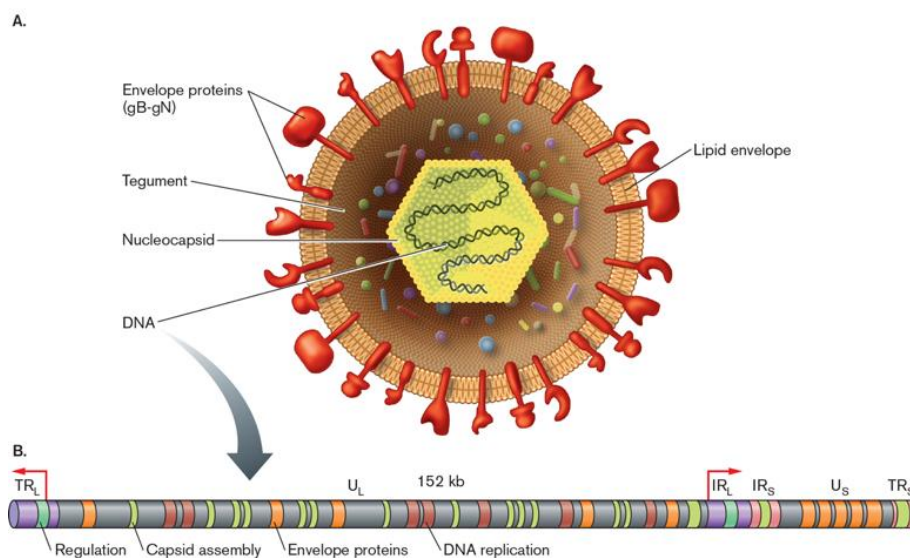


Abbildung 1:

A) Schematischer Aufbau des HSV-1 (nach Aryal 2018), die Virus-DNA wird vom Nucleokapsid und Tegument umgeben, in die Lipidmembran sind Hüllproteine (gB, gN) eingelassen.

B) Schematischer Aufbau des HSV-Genoms, in der U_L-Region befinden sich Abschnitte für den Kapsidaufbau, die Hüllproteine und die DNA-Replikation, Abkürzungen: U_L (long unique region), U_S (short unique region), TR_L (terminal repeat long region), IR_L (internal repeat long region), IR_S (internal repeat short region), TR_S (terminal repeat short region).

Die eingebauten Glykoproteine dienen zum Eindringen des Virus z. B. durch Adsorption an die Wirtszelle und anschließende Penetration (Modrow et al. 2010). Im Viruspartikel liegt eine lineare, doppelsträngige DNA, bestehend aus 152 Kilobasen (kb), vor. Sie codiert für 80 Gene und wird in zwei kovalent verbundene Sektionen unterteilt: unique long (U_L) und unique short (U_S) Region (McGeoch et al. 1986, McGeoch et al. 1988). Erstere macht 82 % der Basenpaare aus und beinhaltet hochkonservierte Genregionen, welche auch für Strukturproteine codieren und in den anderen Unterfamilien Homologe zeigen. Die Gene der U_S -Region hingegen machen 18 % der Basenpaare aus und beinhalten *Alphaherpesvirinae*-spezifische Abschnitte, welche oftmals für Nicht-Strukturproteine codieren. Im Zuge der Infektion und Übernahme zellulärer Funktionen sind sie von maßgebender Bedeutung. Diese Segmente werden von invertierten, repetitiven Sequenzen flankiert, den terminal repeat long (TRL) und terminal repeat short (TRS) Regionen. Als Verknüpfungselemente zwischen den beiden Subregionen dienen repetitive Sequenzen, internal repeat long region (IRL) und internal repeat short region (IRS). Die U_L wird daher, wie in der Abbildung 1 zu sehen, von TRL und IRL umrahmt und die U_S von IRS und TRS (Colgrove et al. 2016). Während der Replikation des Virus begünstigen die Wiederholungssequenzen die Rekombination der identisch invertierten Elemente, sodass sich vier isomere Genprodukte ergeben, in welchen die U_L - und die U_S -Segmente zueinander variable orientiert sind. Allerdings unterscheiden sich die resultierenden Genabschnitte nur in der Orientierung dieser Segmente und nicht in ihrem Informationsgehalt. In jedem Virion liegen die vier in äquimolarer Konzentration vor, alle sind infektiös und replikationsfähig (Modrow et al. 2010). Virale Gene und deren Proteinprodukte sind generell nach der relativen Position von links nach rechts in der U_L oder U_S Region (z. B. U_L1 , U_L2 , U_S1 , U_S2) benannt. Trotzdem werden viele viralen Proteine auch nach ihrer Funktion, Infected cell protein (ICP) Anzahl, Virion Protein (VP) Anzahl oder molekularem Gewicht bezeichnet (Taylor et al. 2002).

1.3.2 Pathogenese und Replikation

HSV-1 wird als pantrop bzw. fakultativ neurotrop bezeichnet; bevorzugt infiziert es jedoch Haut und Schleimhäute. Eine Erkrankung kann entweder als Primärinfektion oder aber auch nach Reaktivierung aus den in Ganglienzellen persistenten Viren

ausbrechen. Unterschieden wird die Virusreplikation in eine lytische und eine latente Phase.

1.3.2.1 Lytische Phase

Im Fall einer Reaktivierung von HSV-1 kommt es zur Bindung an die Wirtszelle, z. B. Epithelzellen und Keratinozyten. Wichtig sind hierfür Glykoproteine (g) auf der Oberfläche von HSV-1, welche der Adsorption und Penetration dienen, sowie später eine Immunantwort mit Antikörpern durch den Wirtsorganismus auslösen. Auf der Wirtszelle hingegen befinden sich Glykosaminoglykane (GAG) und Nectine, mit welchen diese viralen Glykoproteine interagieren. Drei bekannte so genannte Herpes-virus-entry-mediator(HveM)-Proteine sind hierbei HveA (Tumor-Nekrose-Faktor Alpha Rezeptor-Familie) und HveB (Nectin-2) bzw. HveC (Nectin-1) aus der Superfamilie der Immunglobulin (Ig) (Cocchi et al. 2000, Spear et al. 2000).

Der initialen Bindung von viralem gC oder gB an 3-O-sulfatiertes Heparansulfat folgt die Interaktion von HveA-C mit gD zur Stabilisierung der Adsorption. Die anschließende Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran wird mittels gB und dem Heterokomplex gH und gL gesteuert. Diese werden von gD rekrutiert, um eine optimale Interaktion mit GAG zu ermöglichen (Leoni et al. 2012, Avitabile et al. 2009). Neben diesem rezeptorvermittelten Eintritt kann das Virus, auch unabhängig vom pH-Wert, durch Endozytose von der Wirtszelle aufgenommen werden (Nicola et al. 2005, Milne et al. 2005). Nach der Fusion liegt das Kapsid im Zytoplasma vor und wird mit Hilfe von Tegumentproteinen und dem Motorprotein Dynein entlang der Mikrotubuli zum Zellkern transportiert (Dohner et al. 2002). Dort bindet das Nukleokapsid an den nukleären Porenkomplex (NPC) und setzt die virale DNA mit Hilfe des Tegumentprotein UL36 (VP1/2) in den Zellkern frei. Hier folgt nun die Zirkularisierung des zuvor linearen Genoms durch direkte Ligation der Enden. Nach Einschleusen der viralen DNA in den Zellkern formieren sich hemmende Strukturen, um die Genexpression zu inhibieren. Diesem Widerstand der Wirtszelle wirken das Infected Cell Protein 0 (ICP0) und das Tegumentprotein VP16 und weitere virale Proteine entgegen (Zhu et al. 2014). Beispielsweise sorgt das Tegumentprotein VHS für die Degradierung von Wirtszell-mRNA und somit für den Stopp der zellulären Proteinsynthese (Rutkowski et al. 2015). VP16 kann über Kerntransportsignale das Nukleoplasma erreichen, bildet einen Komplex mit dem Wirtsprotein host cell factor 1 (HCF), der RNA-Polymerase II (Pol II) und dem octamer binding protein 1 (Oct-1) und induziert die α -Gentranskription (Fields et al. 2013). Dies ist der Start einer

kaskadenartig regulierten Proteinsynthese bei welcher 5 Genabschnitte eine Vielzahl viraler Proteine codieren. Der Ablauf des lytischen Replikationszyklus wird schematisch in der Abbildung 2A dargestellt.

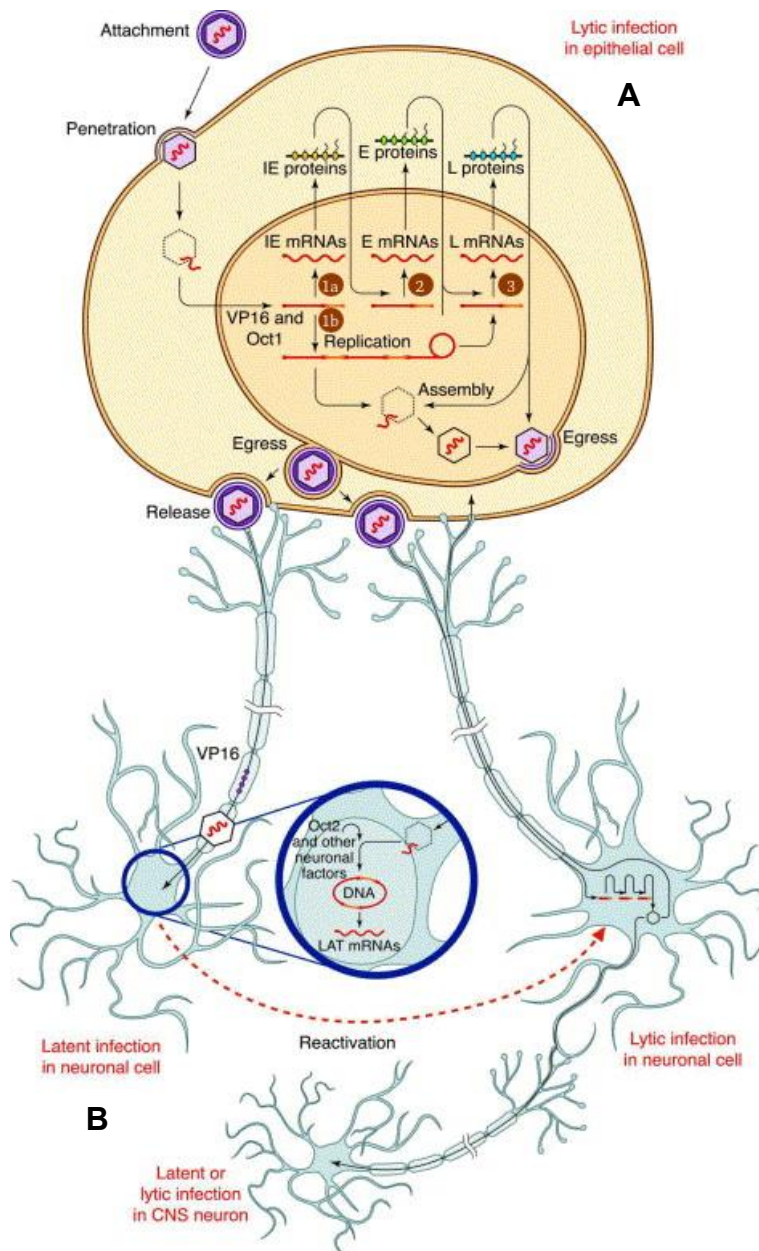


Abbildung 2:

A) Schematische Darstellung des lytischen Replikationszyklus von HSV-1 (nach Simonato et al. 2000); (IE = immediate early; E= early; L = late; VP16 = virus protein 16; Oct1/2 = octamer binding protein 1/2; LAT = latency associated transcript; CNS = central nerve system); 1a = im Zellkern beginnt die Transkription der IE mRNA und daraufhin die Translation in IE-Proteine, 1b = nach der Expression von β -Genen startet die Replikation von viraler DNA nach dem Prinzip des rolling circles, 2 = die IE Proteine stimulieren die Transkription von E mRNA, 3 = die E Proteine regulieren die Transkription der L mRNA, wobei deren translatierte Produkte, vor allem Virusstrukturproteine, anschließend zusammen mit HSV-Genomabschnitten zu neuen Virionen assembliert werden.

B) Schema der Latenzentwicklung und Reaktivierung; in der latenten Phase verbleibt das virale Genom als zirkuläre, extrachromosomale DNA. LATs (mRNA) halten die Latenz aufrecht, zelluläres Oct-2 unterdrückt die Expression des IE Promoters. Die Reaktivierung kann durch zellulären Stress oder UV-Strahlung in den Zellen induziert werden.

Die α -Gene sind die ersten exprimierten Gene im Replikationszyklus. Deren Produkte enthalten die α - und immediate early Proteine ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 und US1.5. Im Zeitraum von 2-4 Stunden post infectionem (p. i.) ist das Expressionsmaximum. Die immediate early Proteine wiederum steuern die Transkription von β -Genprodukten (β -Proteine oder early Proteine) welche die DNA-

Polymerase, die virale Thymidinkinase und nukleinsäurebindende Polypeptide wie z. B. das origin-binding protein (UL-9) oder das single-stranded DNA-binding-protein (SSB) einschließen. Die Expression findet etwa 5 - 7 h p. i. statt. Im letzten Schritt ca. 12 - 18 h p. i. werden die γ -Gene (late genes) transkribiert. Die Unterteilung erfolgt hierbei nochmals in späte (late) bzw. sehr späte (very late) Gene. Bei ihren Produkten handelt es sich um Virusstrukturproteine, wie das Hauptkapsidprotein oder Glykoproteine. Mit ihnen kommt es final zur Assemblierung neuer Virionen, jedoch ist ihre Transkription von der Replikation der Virus-DNA abhängig und wird durch die Transaktivierung anhand von α -Proteinen gesteuert. Nach der Expression von β -Genen beginnt die Replikation von viraler DNA. Diese beginnt mit dem Entwinden der Replikationsursprünge (origin of replication) ori_L und ori_S der DNA-Doppelhelix. Die Replikation folgt dem rolling circle-Prinzip d. h. die DNA-Polymerase kann am Minus-Strang wie an einem Ring entlanggleiten und den Plus-Strang verdrängen. Das virale Replisom besteht aus DNA Polymerase, dem single-stranded DNA binding Protein ICP8 und dem Helicase-Primase Komplex. Es entsteht eine lange, konkatamer angeordnete DNA-Sequenz, welche beim Zusammenbau des Nukleokapsids in HSV-Genomäquivalente geschnitten und in das Viruskapsid eingeschleust wird. Die Konstruktion des Viruskapsids geschieht im Nukleus und einige Tegument-Proteine wie VP16 und VP22 werden bereits dort hinzugefügt (Fields et al. 2013). Nun folgt der Austritt des DNA-haltigen Nukleokapsids aus dem Zellkern (Granzow et al. 2001). Dies geschieht wahrscheinlich durch Abknospen durch die innere Kernmembran (inner nuclear membrane, INM), wobei es von nukleären Proteinen (nuclear egress complex protein, NEC) ummantelt wird. Die Primärhülle (primary enveloped virion, PEV) fusioniert dann mit der äußeren Kernmembran (outer nuclear membrane, ONM) und gibt das Tegument-umhüllte Kapsid in das Zytosol frei (Newcomb et al. 2017). In Epithelzellen wird das Kapsid mittels Kapsidproteinen (UL₃₆ & UL₃₇) entlang der Mikrotubuli zu dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem Trans-Golgi-Apparat befördert. Dort erhält es seine endgültige, mit Glykoproteinen integrierte, Hülle (Sandbaumhuter et al. 2013, Mettenleiter et al. 2009). Das behüllte Virus gelangt nachfolgend als Vesikel zur Plasmamembran und kann mittels Exozytose in den extrazellulären Raum austreten. Hierbei verschmilzt das Vesikel mit seiner von ER und Golgi modifizierten Membran mit der Plasmamembran der Wirtszelle (Mettenleiter 2004). An dieser Stelle kann es auch zur Lyse der Zelle kommen. Insgesamt dauert

der Replikationszyklus von HSV-1 in einer Epithelzelle ca. 18 - 20 h (Kukhanova et al. 2014).

1.3.2.2 Latenzbildung

Nach einer Primärinfektion kann HSV-1 einen Zustand der Latenz in sensorischen Ganglienzellen etablieren. Nach einer okularen bzw. labialen Infektion handelt es sich zumeist um das *Ganglion trigeminale*, wobei auch eine mögliche Latenzbildung im ZNS diskutiert wird (Li et al. 2016).

Wie der Abb. 2 B zu entnehmen ist, gelangen die Viren über infizierte Epithelzellen zu den sensiblen Nervenendigungen. Dort wird das virale Nukleokapsid retrograd mittels Dynein entlang der Axone in die Zellkerne sensorischer Neurone transportiert. Das Stadium der Latenz unterscheidet sich von einer persistierenden Infektion dadurch, dass keine infektiösen Viruspartikel gebildet werden und nur geringfügig virale Transkription detektierbar ist. Während der Latenz verbleibt das Virusgenom intrazellulär als zirkuläre, extra-chromosomale DNA, welche als Episom bezeichnet wird. Pro Zelle sind zwischen 10 und 100 Episomen zu finden (Modrow et al. 2010). Die stattfindende Transkription ist auf einige bekannte Moleküle beschränkt. So ist z. B. virale RNA, welche als latency-associated transcripts (LATs) bezeichnet wird, nachweisbar. Diese stellt nicht kodierende RNA dar und ist ein Vorläufer von microRNAs (miRNAs). Ihre Aufgabe ist die Aufrechterhaltung der Latenz, das Unterdrücken der Transkription lytischer Genprodukte und die Regulierung antiapoptotischer Prozesse in den infizierten Ganglienzellen (Umbach et al. 2008). Der genaue Prozess der Latenzentwicklung ist noch nicht verstanden, jedoch ist ein Zusammenspiel zwischen Virus, der Wirtszelle und dem Immunsystem des Wirts unabdingbar. Sowohl *In vivo*-, als auch *In vitro*-Modelle haben zur Aufklärung vieler zellulärer Prozesse beigetragen (Nicoll et al. 2012). Im Fokus stehen derzeit epigenetische Modifikationen der viralen DNA, z. B. die Promotoren der lytischen Gene und ihre Acetylierung (Bloom et al. 2010). Diskutiert wurde auch, ob der ineffiziente Transport von VP16 entlang der Axone von Neuronen zu einer fehlenden Genexpression von IE-Genen führt und die Virusreplikation nicht aktiviert wird, da virale IE-Proteine für die lytische Replikation unverzichtbar sind (Hafezi et al. 2012). Ferner spielen Wirtsfaktoren wie HCF eine wichtige Rolle. In Neuronen liegt HCF, im Gegensatz zu Epithelzellen, ausschließlich im Zytoplasma vor. Hierdurch könnte auch die Initiierung der IE-Gentranskription verhindert werden (Nicoll et al. 2012, Fields et

al. 2013). Dennoch sind viele Fragen bezüglich der Latenzentwicklung noch offen, nicht zuletzt seitdem bekannt ist, dass auch in der latenten Phase die Expression von Proteine durch lytische Promotoren angetrieben wird (Russell und Tschärke 2016).

1.3.3 Übertragung und Epidemiologie

HSV-1 ist verantwortlich für weltweit verbreitete Infektionserkrankungen. Die hohe Durchseuchungsrate lässt sich auf den frühen Kontakt mit virushaltigem Bläscheninhalt und Sekreten der Mundhöhle im Kindesalter zurückführen (Tröpfcheninfektion). Daher haben global Kinder und Jugendliche bis 19 Jahre bereits eine Durchseuchungsrate von 71 % (Looker et al. 2015). Der erste Kontakt verläuft oft ohne oder nur mit milder klinischer Symptomatik, die asymptomatischen Träger wirken jedoch an der Verbreitung des Virus mit (Sauerbrei und Wutzler 2007).

Die Seroprävalenz hat sich in den vergangenen 30 Jahren unterschiedlich entwickelt, denn die Durchseuchung hängt vom Alter, Geschlecht, dem sozioökonomischen Status, der Ethnie und der geographischen Region ab (Fatahzadeh und Schwartz 2007). Darüber hinaus liegt die Herausforderung epidemiologischer Studien darin, die hohe Anzahl subklinischer Infektionen, die Unterscheidung von primären und wiederkehrenden Erkrankungen, Koinfektionen von HSV-1 und HSV-2, sowie die Infektion mit unterschiedlichen Stämmen in der latenten Phase zu erfassen bzw. zu unterscheiden (Oxford und Öberg 1985). Neuere Untersuchungen aus den USA legen nahe, dass die Prävalenz von HSV-1 bei Personen zwischen 14 - 49 Jahren bei 47,8% liegt und die von HSV-2 bei 11,9 %. Die Daten wurden 2015 - 2016 von US Centers for Disease Control und Prevention's National Center for Health Statistics erhoben. Weiterhin ist auch von einem Rückgang der Prävalenz zwischen den Jahren 2000 und 2015 auszugehen. Hier reduzierte sie sich von 59,4 % auf 47,8%. Gleiches gilt für HSV-2, welches eine Reduktion um 5,9 % verzeichnete. In allen Ethnien zeigte sich alters-standardisiert für beide Serotypen ein signifikanter Rückgang (McQuillan et al. 2018). In Deutschland lässt sich ein ähnlicher Trend beobachten: Im Vergleich der Jahre 1997 - 1999 mit 2008 - 2011 ging die Seroprävalenz von HSV-1 von 82,1 % auf 78,4 % zurück. In derselben Zeitspanne ließ sich dieser Effekt auch bei HSV-2 verzeichnen, hier lagen die Daten erst bei 13,3 % und abschließend bei 9,4 %. Generell ist jedoch festzustellen, dass mit zunehmendem Alter die Prävalenz von HSV-1 ansteigt. Bei Personen > 65 Jahren liegt sie in Teilen Deutschlands bei 96 % (Korr et al. 2017). Innerhalb Europas ist die Situation ähnlich, wenn die Daten der

Niederlande, England und Wales verglichen werden (Woestenberg et al. 2016, Vyse et al. 2000).

Außerhalb der Industrienationen zeichnet sich ein anderes Bild ab. Eine Meta-Analyse basierend auf Cochrane Collaboration Guidelines zeigte für den afrikanischen Kontinent eine Durchseuchung mit HSV-1 von 96 % in Erwachsenen und 67 % bei Kleinkindern. Vor dem Alter von 15 Jahren sind 90 % der Kinder seropositiv für HSV-1 (Harfouche et al. 2019). Es ist folglich davon auszugehen, dass sich die Infektion in den Industrienationen eher in das Jugend- und Erwachsenenalter verschiebt, wohingegen die Menschen in Entwicklungs- bzw. Schwellenländer eine Durchseuchung mit HSV-1 bereits in frühen Phasen der Kindheit erfahren (Ayoub et al. 2019).

1.3.4 Ätiologie

Der weitaus größte Teil der Infektionen mit HSV-1 verläuft asymptomatisch. Die häufigste Transmission geschieht durch Tröpfcheninfektionen, da der Kontakt mit dem Bläscheninhalt und Speichel des Trägers das Eindringen des Virus in die Epidermis, Dermis und schließlich die sensorischen Nervenendigungen des potentiellen Wirts ermöglicht. Kommt es zu einer Infektion, so liegt die mittlere Inkubationszeit bei 3 - 9 Tagen. Im Falle eines symptomatischen Krankheitsverlaufes des *Herpes labialis* ist der Virustiter im Sputum 100 - 1000fach höher als während asymptomatischer Phasen (Corey und Spear 1986). Besonders beim gemeinsamen Nutzen von Gebrauchsgegenständen des täglichen Lebens oder dem Teilen von Essen besteht hierbei Gefahr (Ramchandani et al. 2016). Verbleibt die Erstinfektion asymptomatisch, so kann es bei einer Latenz im *Ganglion trigeminale* dennoch zum späteren Ausbruch der Erkrankung kommen. Die Reaktivierung kann durch Faktoren wie lokales Trauma, UV-Belastung (vermehrte Sonneneinstrahlung), Stress, erhöhte Körpertemperatur, Infektionen und auch hormonelle Veränderung erfolgen (Sawtell und Thompson 1992, Wilson und Mohr 2012, Grinde 2013).

Darüber hinaus kann HSV-1 auch durch Sexualkontakt (während der symptomatischen oder asymptomatischen Ausprägung) oral-genital (85%) oder genital-genital (15%) übertragen werden (Ayoub et al. 2019). Jedoch ist es für Personen, die bereits eine orale HSV-1 Infektion hatten, unwahrscheinlich, nachfolgend eine Infektion im Genitalbereich zu erleiden. In seltenen Fällen kann auch unter der Geburt eine Transmission von HSV-1 auf das Kind erfolgen, in den meisten

Fällen handelt es sich hierbei allerdings um HSV-2 bei bestehendem *Herpes genitalis* der Mutter. Die volle Ausprägung der generalisierten, disseminierten Infektion wird als *Herpes neonatorum* bezeichnet und betrifft sowohl Haut, innere Organe als auch das ZNS (Sauerbrei und Wutzler 2007). Bei der Entwicklung einer Herpes-Virus-Enzephalitis (HSVE) erfolgt die Infektion meist über die Nasenschleimhaut und die *Fila olfactoria* des *Nervus olfactorius*. In den Neuronen gelangt das Virus durch retrograden Transport in den Frontallappen und sekundär in den Temporallappen. Durch kontinuierliche Ausbreitung in den Nervenzellen können auch das *Limbische System*, *Thalamus* und schließlich *Pons* und *Medulla oblongata* infiziert und zerstört werden. Kommt es zu einer Ausbreitung bis hin zum *Rhombenzephalon*, ist eine meist tödlich verlaufende *Rhombenzephalitis* nicht unwahrscheinlich (Studahl et al. 2013). Überdies kann die Entzündung des Kortex bei Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten durch virämische Ausbreitung geschehen (Stanberry et al. 1994).

1.3.5 Klinische Ausprägung

Die Infektion mit HSV-1 kann zu unterschiedlichen Krankheitsbildern mit stark variierenden Ausprägungen führen. Die bekannteste und häufigste beobachtete Form ist *Herpes labialis*, welche charakteristisch gruppierte Bläschen (*Vesiculae*) im Bereich des Innervationsgebiets des *Nervus trigeminus* aufweist. Der intrazelluläre Erreger schädigt die Keratinozyten. Durch Aufkratzen der juckenden, schmerzhaften *Vesiculae* entstehen Sekundäreffloreszenzen wie Krusten oder Papeln. Infolgedessen können bakteriellen Superinfektionen mit *Streptococcus pyogenes* oder *Staphylococcus aureus* resultieren. Aufgrund der Fähigkeit von Herpesviren eine Latenz innerhalb der sensorischen Ganglien zu entwickeln, kann es zu wiederkehrenden Episoden des Ausbruchs kommen. Die Erstinfektion äußert sich bei Säuglingen häufig durch multiple, ausgestanzt wirkende, konfluierende *Vesiculae* und Allgemeinsymptome wie Fieber und Erschöpfung. Dazu ist die Assoziation mit einer bevorstehenden atopischen Dermatitis bekannt, die als *Ekzema herpeticatum* bezeichnet wird. Charakteristisch hierfür ist ein disseminierter Verlauf mit flächenhafter Infektion der Haut (Wollenberg et al. 2003). Eine schwerwiegende Manifestationsform der HSV-1 Infektion ist die *Stomatitis aphthosa* (*Gingivostomatitis herpetica*, „Mundfäule“), wo sich Bläschen und Erosionen entlang der Mundschleimhaut und am Gaumen ausbilden. Ein stark reduziertes Allgemeinempfinden mit hohem Fieber kann sich anschließen, Sprechen und Nahrungszufuhr sind oft eingeschränkt (Amir 2001). Ein

weiteres Krankheitsbild stellt die *Herpes-simplex Keratitis* dar, primär eine Entzündung der Hornhaut des Auges (*Kornea*). Hierbei handelt es sich je nach klinischem Vorkommen um eine Entzündung des *Epithels*, des *Stroma* oder des *Endothels*. Wobei die epitheliale Entzündung (*Keratitis dendritica*) die häufigste Form ist. Typische Symptome sind Schmerzen, Photophobie und Fremdkörpergefühl im Auge. In den Industrienationen macht die *Herpes-simplex Keratitis* eine der Hauptursachen für Erblindung aus (Tsatsos et al. 2016).

Die schwerwiegendste Komplikation einer HSV-1 Infektion stellt die HSVE dar. Sie ist global die häufigste Form der sporadischen Enzephalitis mit letalem Ausgang (Studahl et al. 2013). Klinisch äußert sie sich zunächst in einem Prodromalstadium mit hohem Fieber und Kopfschmerzen. Diesem schließen sich diffuse und fokale neurologische Komplikationen an (Kennedy 1988). Auch psychotische Störungen wie Persönlichkeitsveränderung können auftreten (Wilson 1976). Interessanterweise sind Herpesbläschen hingegen nicht häufiger bei HSVE-Patienten (Whitley et al. 1982). Im Verlauf breiten sich die Krämpfe aus und die epileptischen Symptome können in einen komatösen bzw. soporösen Zustand enden. Lethal ist schließlich der erhöhte Hirndruck, welcher zu einer Einklemmung lebenswichtiger Hirnareale wie der *Medulla oblongata* führt. Unbehandelt ist eine HSVE fast immer tödlich, unter antiviraler Behandlung liegt die Sterblichkeit bei 8 % bei Erwachsenen und 4 - 14 % bei Kindern. Folgeschäden sind bei ca. 69 % der Erwachsenen und Kindern vorhanden (Sili et al. 2014, Engman et al. 2008).

1.3.6 Therapie

HSV-1 entzieht sich durch seine Latenz in Neuronen dem Zugriff des Immunsystems und lässt sich somit nur schwierig medikamentös therapieren. Bis dato ist es nicht gelungen, einen Wirkstoff zu entwickeln, der HSV-1 vollständig aus dem menschlichen Körper entfernt. Auch die Entwicklung von präventiven Impfstoffen ist trotz größter Bemühungen noch nicht geglückt (Johnston et al. 2016). Stattdessen sind die seit langer Zeit auf dem Markt erhältlichen Nucleosid-Analoga das Mittel der Wahl, wozu Aciclovir, Valaciclovir und Famciclovir gehören. Aciclovir wird durch die virale Thymidinkinase in seine aktive Triphosphat-Form überführt und anschließend anstelle von Guanosintriphosphat (GTP) durch die DNA-Polymerase zur DNA-Synthese verwendet. Bei Acyclo-GTP ist keine 3'-OH-Gruppe vorhanden, an welche nachfolgend Desoxynucleosid-Triphosphat (dNTP) angehängt werden könnte,

wodurch es zum Kettenabbruch kommt (King 1988). Bei Valaciclovir handelt es sich um das Prodrug von Aciclovir. Famciclovir ist ein Analogon der Nukleinbase 2-*Aminopurin*, welches nach oraler Aufnahme metabolisiert und zu Penciclovir umgewandelt wird. Dieses wird ebenso wie Aciclovir von der viralen Thymidinkinase verarbeitet und führt zum Abbruch der DNA-Synthese.

Für Patienten mit Nucleosid-Analoga resistenten HSV-Stämmen stehen Alternativen wie Foscarnet zur Verfügung. Foscarnet ist ein Pyrophosphat-Analogon, welches die Phosphatbindungsstelle der DNA-Polymerase und der Reversen Transkriptase blockiert und somit selektiv die virale Replikation inhibiert (Oberg 1989). Die Verwendung der genannten medikamentösen Präparate wird zunehmend durch die Entstehung resistenter Virusvarianten eingeschränkt, weshalb neue antivirale Konzepte notwendig sind. Im nachfolgenden Abschnitt wird erläutert, in welchem Zusammenhang die Proteinphosphatase PP2A mit effektiver Virusreplikation steht und welche therapeutischen Optionen sich hieraus ergeben.

1.4 Die Proteinphosphatase PP2A

Nahezu alle wichtigen physiologischen Prozesse beinhalten Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Proteinen, ausgeführt von Kinasen und Phosphatasen. Hierbei handelt es sich um eine der wichtigsten post-translationalen Modifikationen, neben der Methylierung und der Ubiquitinierung. Zunächst wurde den Kinasen die Schlüsselfunktion zur Regulierung zellulärer Prinzipien zugesprochen, doch in den vergangenen Jahren hat sich herausgestellt, dass Phosphatasen ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Ohne ihre Funktion ist eine gerichtete Signaltransduktion nicht möglich, sodass sie nun vermehrt im Fokus aktueller Forschung stehen (Westermarck 2018). Die bedeutendste und häufigste vorhandene Phosphatase stellt die Serin-Threonin-Protein-Phosphatase PP2A dar. Sie ist hochkonserviert, ubiquitär präsent, vielfältig und macht ca. 1 % der gesamten zellulären Proteine aus. PP2A hat eine Vielzahl von Substraten, weshalb sie einen Hauptakteur in der Steuerung des Zellmetabolismus darstellt. PP2A reguliert die Aktivität von mehr als 30 verschiedenen Kinasen welche den Zellzyklus (*cdc25*, *WEE1*, *pRb*), die Apoptose (*Bcl2*, *Bad*, *FOXO*) oder die zelluläre DNA-Reparaturprozesse (*p53*, *ATM*, *CHK*) beeinflussen (Janssens et al. 2005, Meeusen und Janssens 2018). Ebenso wird die fehlerhafte Regulierung von PP2A mit Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert, sodass von

einer zentralen Stellung ausgegangen werden kann (Baskaran und Velmurugan 2018). Der Mechanismus der Dephosphorylierung geschieht durch Abspaltung der Phosphat-Gruppe in Anwesenheit von H₂O. Hierdurch wird Phospho-Serin/Threonin, ohne die Formierung eines Phosphoenzym-Zwischenprodukts, hydrolysiert.

1.4.1 Die Struktur von PP2A

Drei wichtige Aminosäure-Substrate für Proteinphosphorylierung sind Serin, Threonin und Tyrosin. Ihre Dephosphorylierung wird von Enzymen katalysiert, welche sich in zwei Hauptgruppen bzw. Superfamilien einteilen lassen: Zum einen die Protein Serin-Threonin-Phosphatasen (PST), zum anderen die Protein-Tyrosin Phosphatasen (PT). Die PST-Superfamilie teilt sich wiederum in drei Familien:

- 1) Protein-Phosphoprotein Phosphatasen (PPP), z. B. PP1, PP2A oder PP2B
- 2) Magnesium-(Mg²⁺) oder Mangan-(Mn²⁺) abhängigen Protein Phosphatasen (PPM), z. B. PP2C
- 3) Aspartat-basierte Phosphatasen, z. B. Fcp1 (essentielle C-terminal-domain (CDT) Phosphatase) oder Scp1 (small C-terminal domain phosphatase 1)

Die Phosphoprotein Phosphatase Familie ist die Vielfältigste mit 5 Subfamilien, wovon PPP2 die Protein Phosphatase PP2A, Ca²⁺-abhängige Calcineurin PP2B oder Mg²⁺-abhängige PP2C beinhaltet. Strukturell existiert PP2A sowohl als Dimer (nur katalytische und regulatorische Untereinheit) als auch als holoenzymatische heterotrimere Form. Letztere umfasst jeweils eine Struktur (scaffold) Untereinheit A (65 kDa A subunit, PR65), eine von vier regulatorischen Untereinheiten B (B/PR55, B'/PR61, B''/PR72 und B''') und eine katalytische Untereinheit C (36 kDa C subunit). Die B-Untereinheiten können in verschiedenen generierten Kombinationen mit den A- & C-Untereinheiten auftreten, sodass mehr als 75 unterschiedliche heterotrimere PP2A Holoenzyme gebildet werden können (Janssens und Goris 2001). Diese Entstehung der Phosphatasen ist ein genau regulierter Prozess, um die Formierung katalytisch aktiver Enzyme ohne Substratspezifität zu verhindern (Sents et al. 2013). In der Abbildung 3 ist die schematische Struktur von PP2A und ihre zellulären Signalkaskaden zu entnehmen.

Der Phosphotyrosyl Phosphatase Activator (PTPA), auch PP2A Phosphatase Aktivator genannt, kann inaktives PP2A reaktivieren, indem er als Chaperon die Bildung spezifischer Strukturen mit ATP verursacht und eine Konformationsänderung

auslöst. Hierdurch wird das effiziente Beladen mit Mg^{2+} -Ionen möglich, welche für die Formierung von enzymatisch aktiven trimeren Holoenzymen benötigt werden (Jordens et al. 2006, Guo et al. 2014).

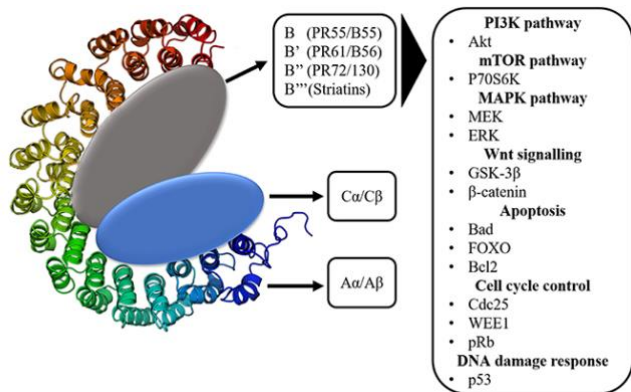


Abbildung 3: Die Struktur der Protein Phosphatase PP2A. Drei Untereinheiten können unterschieden werden: Die strukturelle Untereinheit A ($A\alpha / A\beta$), die katalytische Untereinheit C ($C\alpha / C\beta$) und die vier Klassen der regulatorische Untereinheit B (B, B', B'', B'''). Die B Untereinheiten können mit einer Vielzahl zellulärer Signalkaskaden interagieren, eine Übersicht wichtiger Interaktionen bietet die Tabelle; (nach Remmerie und Janssens 2019).

1.4.1.1 Die katalytische Untereinheit C von PP2A

Molekulare Untersuchungen haben gezeigt, dass der Aufbau von PP2A womöglich eine der konserviertesten Enzymstrukturen der Evolution darstellt. Die Expression der katalytischen Untereinheit wird auf translationaler Ebene reguliert und die Konzentrationen innerhalb der Zelle sind weitestgehend konstant. Die Strukturanalyse der Untereinheit C enthüllte seine kugelförmige Zusammensetzung mit zwei Metallionen (Mangan) im katalytischen Kern des aktiven Zentrums (Xing et al. 2006). Auch von der katalytischen Untereinheit gibt es zwei Isoformen: C- α (Gen: PPP2CA, Synonym: PP2A- α) und C- β (Gen: PPP2CB, Synonym: PP2A- β) (Arino et al. 1988). Beide werden von verschiedenen Genen mit jeweils sieben Exons und sechs Introns codiert und bestehen aus 309 Aminosäuren. C- α befindet sich eher in der Plasmamembran, während C- β vorrangig im Zytoplasma und Zellkern zu finden ist (McCright et al. 1996, Götz et al. 2000). Die Aktivität von PP2A wird durch die Modifizierung von C oder die Verbindung von A- und B-Untereinheiten mit ihr gesteuert. Zudem kann die katalytische Untereinheit auch durch Phosphorylierung spezifischer Threonin- bzw. Tyrosin-Stellen inaktiviert bzw. durch Autodephosphorylierung reaktiviert werden (Liu und Wang 2009, Guo et al. 1993). Die reversible Methylierung stellt darüber hinaus eine Regulierung im Zusammenspiel mit den regulatorischen Untereinheiten B dar (Longin und Goris 2006).

1.4.1.2 Die strukturelle Untereinheit A von PP2A

Zwei verschiedene Gene codieren für die zwei Isoformen der strukturellen Untereinheit A: PPP2R1A ($A\alpha$) und PPP2R1B ($A\beta$). Beide werden ubiquitär exprimiert und sind sich in 86 % ihrer Sequenzen ähnlich. Ihre Häufigkeit unterscheidet sich dabei deutlich: PP2A α stellt das Hauptgerüst in 90 % aller PP2A Holoenzyme und macht 0,1 % des gesamten zellulären Proteins aus. Die Regulierung wird vor allem durch die α -Isoform gesteuert, indem sie die $A\beta$ -Proteine stabilisiert, selbst nach dem kompletten experimentellen Knock-out von $A\alpha$ (O'Connor et al. 2019). Dem gegenüber macht PP2A β nur 10 % aller PP2A-Proteine aus, jedoch wurde bereits publiziert, dass $A\beta$ als Tumorsuppressor agiert und Mutationen im Gen von $A\beta$ zu Lungen- oder Colon-Tumoren führen können (Wang et al. 1998, Zhang et al. 2016). Ferner verursachen Mutationen im Erbgut von $A\alpha$ Tumoren des Endometriums und Ovars und Veränderungen der Genexpression werden ebenso mit der Pathogenese der Alzheimer-Demenz in Verbindung gebracht (Haines und Huang 2019, Miron et al. 2019).

1.4.1.3 Die regulatorische Untereinheit B von PP2A

Die größte Vielfalt findet sich bei den regulatorischen Untereinheiten in PP2A. Im humanen Genom codieren 15 Gene für eine Vielzahl unterschiedlicher Formen. Die Spezifität des Holoenzym hängt von PP2A-B ab, welches die Schlüsselrolle in der Modulierung der verschiedenen Formen einnimmt. Die Klassifizierung erfolgt in vier Untereinheiten: PR55 (oder B), PR61 (oder B'), PR72 (oder B'') und PR93/110 (oder B'''). Die Proteine sind gewebespezifisch und werden nach den verschiedenen Stadien der Entwicklung exprimiert.

Protein PR55 (B) codiert von PPP2R2

Das Protein PR55 existiert in vier verschiedenen Isoformen namens α , β , γ und δ . Die γ Isoform ist nach der Geburt meistens vermehrt vorhanden, während die β Isoform allmählich abnimmt. Beide werden abhängig von Entwicklungsstufen reguliert (Dagda et al. 2003). Weiterhin spielt das Protein eine Rolle in der Zellteilung und in der Differenzierung des Zytoskeletts. Eine Beeinträchtigung der Funktion der verschiedenen Isoformen führt häufig zu Anomalien innerhalb der Zelle (Schmidt et al. 2002).

Protein PR61/B56 (B') codiert von PPP2R5

Das Protein PR61 (bzw. auch B56) ist in fünf verschiedenen Isoformen vorhanden: α , β , γ , δ und ε . Sie teilen fast 80 % ihrer Sequenzen miteinander und lassen sich anhand ihrer terminalen Amino- und Carboxyl-Sequenzen unterscheiden. Diese sind auch für die gewebespezifische Expression verantwortlich. Die α -Isoform von PR61/B56 ist z. B. in der G1-Phase des Zellzyklus von Bedeutung, wo sie auf Cyclin G einwirkt und p53 reguliert (Martens et al. 2004). Interessant ist auch die Interaktion von B56 mit dem viral transcription factor VP30 des Ebola Virus, dessen Aktivierung und Transkription hiervon abzuhängen scheint (Kruse et al. 2018).

Protein PR72/130 (B'') codiert von PPP2R3

Die PR72 Familie bestand zunächst aus zwei Isoformen: PR72 und PR130. Sie entstehen durch alternatives Splicen und variieren in ihren amino-terminalen Regionen. Auch sie sind gewebespezifisch, wobei PR72 hauptsächlich in der Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert wird, PR130 hingegen in allen Geweben des Körpers. Die Interaktion von PR72 mit der Struktureinheit PR65 ist Calcium-abhängig und bisher ist bekannt, dass, im Falle einer Schädigung der DNA das Fortschreiten des Zellzyklus verhindert wird (Zwaenepoel et al. 2010). Inzwischen wurden vier codierende Gene und zudem noch vier weitere Proteine dieser Familie identifiziert: PR70 α , PPP2R3L (PR70 β), G5PR und mPR59, welche zwei konservierte A subunits binding domains (ASBD) teilen und wichtig für die Bindung von PP2A_D sind (Zwaenepoel et al. 2008).

Protein PR93/110 (B''' oder Striatin)

Die PR93/110 Familie spielt eine Rolle in der Signaltransduktion von Calcium und Calmodulin. Das Splicen der Gene resultiert in 8 Varianten, von denen nur 4 Proteine formen. Für seine auto-katalytische Aktivität ist das Protein zudem abhängig von ATP und Mg²⁺. Die Namensgebung der Familie „Striatin“ stammt von der Lokalisation der Entdeckung in post-synaptischen Membranen des Striatums (Moreno et al. 2000). Ihre vorrangige Funktion wird in der Reifung und Entwicklung von Neuronen gesehen (Li et al. 2018).

1.4.2 Die regulatorische Untereinheit PR130 von B''

Im Jahr 1993 wurde erstmals die Aminosäure Sequenz aus Kaninchen-Hirn von Hendrix et al. isoliert, welche für ein Protein mit der molekularen Masse von 130 kDa codiert (Hendrix et al. 1993). Dieses Protein besitzt die exakt gleiche C-terminale

Proteinsequenz (468 AS) wie die PR72 Untereinheit und zusätzlich je eine spezifische N-terminale Domäne (Extension) von 45 und 664 Aminosäuren (Stevens et al. 2003). Daher kam bereits zu diesem Zeitpunkt die Hypothese von einem codierenden Gen (PPP2R3A) und alternativem Splicen auf. Der gemeinsame C-Terminus von PR72 und PR130 beinhaltet zwei A-subunit-interaction domains, ein konserviertes hydrophobes Motiv und Ca²⁺-binding-EF-hands (Strukturmotiv: E- und F-Helix), deren Integrität für die Interaktion mit PR65/A und die Ca²⁺-abhängige Stimulation der Phosphatase-Aktivität benötigt wird (Janssens et al. 2003, Davis et al. 2008, Li und Virshup 2002). PR130 mRNA konnte in Herz, Gehirn, Lunge, Plazenta, Niere und Muskeln detektiert und folgend auch verifiziert werden (Zwaenepoel et al. 2008). Die schematische Darstellung von PP2A und die Domänenstruktur von PR130 ist der Abbildung 4 zu entnehmen.

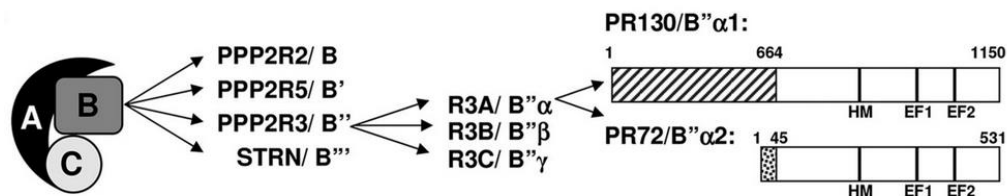


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Holoenzymstruktur von PP2A und die Domänenstruktur von PR130/B''α1 und PR72/B''α2, zwei Splicingvarianten, codiert von PPP2R3A, (nach Janssens et al. 2016); (HM = hydrophobes Motiv, EF = E- und F-Helix Strukturmotiv).

Das Holoenzym PP2A mit der regulatorische Untereinheit PR130 ist auch für die Interaktion mit der Protein-Kinase PKN sowie mit dem centrosome and golgi localized PKN associated protein (CG-NAP) durch PR130 bekannt. CG-NAP ist ein Gerüstprotein, welches Proteinkinasen (PKN, PKA) und Protein Phosphatasen (PP1, PP2A_{T130}) am Centrosom und Golgi-Apparat zusammenbaut (Takahashi et al. 1999). Mit der Charakterisierung von PR130 in *Xenopus laevis* Oozyten konnte ein experimentelles Modell geschaffen werden, um den Einfluss von PP2A und seine substratspezifischen Untereinheiten besser untersuchen zu können (Stevens et al. 2003).

Die Substratspezifität spielt auch bei der Regulierung des Ryanodin-Rezeptors 2 (RyR2, ein Herz-spezifischer Ca²⁺-Kanal) eine Rolle, wo PR130 via Leucin-Zipper-Motiven (auf RyR2) interagiert und es deshalb zu einer Ca²⁺ Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum des Herzens kommt (Bers 2004). Dieser Kanal ist bei manchen Patienten mit Herzinsuffizienz hyperphosphoryliert (Marx et al. 2001).

Weiterhin zeigen Untersuchung von PR130 in Herzmuskelzellen von Zebrafischen den Einfluss auf die Entwicklung von Kardiomyozyten. Ein Knock-out von PR130 führt zu Entwicklungsdefekten, wie der Abnahme von Myozyten, der fehlerhaften Organisation der Myokardstruktur, Verminderung der Kontraktilität und vermehrter Apoptose (Yang et al. 2016).

Bedeutend ist die Entdeckung, dass PR130 als Aktivator des Wingless + Int-1 (Wnt) Signalwegs fungiert, indem es die Funktion von naked cuticle (Nkd), einem Wnt-Inhibitor, hemmt und das PP2A Holoenzym rekrutiert. Infolgedessen kann es, bei einem Knock-out von PR130, zu Fehlbildungen in der Somitogenese bzw. zu embryonaler Unterentwicklung kommen (Creyghton et al. 2006). Auch mit der DNA-Reparatur steht PR130 in Zusammenhang, so ist beispielsweise die Phosphorylierung durch die Checkpoint-Kinase 1 & 2 (CHK1, CHK2) nachgewiesen. Dies wird als negative Regulation des Zellzyklus und Zellwachstums interpretiert (Kim et al. 2007a). PR130 befindet sich hauptsächlich im Zellkern (nukleär) und alle B⁺-Untereinheiten können einen G1/S-Zellzyklus-Arrest verursachen, unabhängig von ihrer Lokalisation. Womöglich liegt dies an der Interaktion mit der DNA-Replikation oder einem dominant-negativen Effekt, also der Konkurrenz zwischen freiem B⁺ und trimeren B⁺ (Zwaenepoel et al. 2008).

Eine weitere wichtige Interaktion des Holoenzym PP2A-PR130/B⁺ ist die Komplexbildung mit Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 2 (SHIP2). In unbehandelten HeLa- (Henrietta Lacks) Zellen kolokalisieren PR130 und SHIP2 und translozieren zur Zellmembran nach Stimulation des epidermal growth factor (EGF). Gleichzeitig kommt es auch zur Interaktion von EGF mit dem EGF Rezeptor (EGFR). Durch RNA-Interferenz vermitteltes Knock-down von PR130 resultiert in einem verstärkten EGF-induzierten, proteasomalen EGFR-Abbau und Rezeptor-Desensibilisierung. Zusätzlich werden die intrinsische EGFR-Kinase-Aktivität (phospho-Tyr-1068), Protein Kinase B und durch extrazelluläre Signale regulierte Mitogen-activated protein kinase Signalwege schneller inaktiviert. Diesen Experimenten zu Folge ist davon auszugehen, dass PR130 die EGF-Signaltransduktion positiv unterstützt. Diese Mechanismen könnten auch für die Krebsforschung klinisch relevant sein, da die EGF-Signalkaskade in verschiedenen Tumoren dysreguliert ist (Zwaenepoel et al. 2010).

Ebenso ist die Zelltransformation abhängig von PR130. Die Suppression von PR130 führt zur Transformation des Phänotyps, Steigerung der Expression von cellular

Myelocytomatosis (c-Myc) um das Zweifache und zur Abnahme der Expression von β -Catenin (intrazellulärer Signal Transducer des Wnt-Signalwegs). Das simian virus 40 small t (SV40ST) Onkoprotein interagiert mit den regulatorischen Untereinheiten von PP2A und insbesondere auch mit PR130. Diese Interaktion ist essentiell für die Transformation der Zellen durch SV40ST (Sablina et al. 2010). Im Zusammenhang mit dem Aufbau des Zytoskeletts, der Zelladhäsion, -migration oder -invasion stellt PR130 eine weitere Schlüsselrolle dar. Die Bindung von LIM protein lipoma-preferred partner (LPP) durch ein konserviertes Zn^{2+} -Finger-like-motif resultiert in einem katalytisch aktiven Komplex, welcher an fokalen Adhäsionen kolokalisiert. Das Knock-down von PR130 wiederum erhöht die Adhäsion und vermindert die Migration (Janssens et al. 2016). Interessanterweise ist Calpain ein Regulator der Dynamik fokaler Adhäsionen (Storr et al. 2011). Hierbei handelt es sich um eine Ca^{2+} -abhängigen Protease, welche PR130 an seiner spezifischen N-terminalen Domäne spaltet. Die Möglichkeit der Regulierung von PR130 besteht folglich in der Verwendung von Calpain, welches PR72 und PR130 in 45-46 kDa große Fragmente trennt und die Holoenzym-Interaktion, sowie deren Phosphatase-Aktivität verändert (Janssens et al. 2009).

Neueste Untersuchungen zeigen, dass PR130 durch Histon-Deacetylasen der Klasse 1 & 2 (HDAC1 & 2) supprimiert wird und somit die Signaltransduktion von Checkpoint-Kinasen, den Zellzyklus-Arrest und das Zellüberleben steuert. HCT116 Zellen, die mit MS-275 (HDAC1/2 Inhibitor) und Hydroxycarbamid behandelt werden, zeigen hochregulierte PPP2R3A mRNA. Dieser Prozess ist zeitlich verzögert. Je mehr PR130 in Zellen kumuliert, desto mehr wird die CHK-Phosphorylierung reduziert.

Die genaue Regulation geschieht wahrscheinlich auf transkriptionaler Ebene und HDAC1/2 werden an den PPP2R3A-Promoter rekrutiert. Alle bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass PR130 CHK1/2 und ataxia teleangiectasia mutated (ATM) dephosphoryliert. Indem HDAC1/2 die Expression von PR130 inhibieren, halten sie die Phosphorylierung der Checkpoint-Kinasen aufrecht.

Weiterhin gilt PR130 als Upstream-Regulator von pCHK1, WEE1 (nukleäre Ser/Thr-Kinase)/ p-CDK (phosphorylierte Cyclin-dependent kinase) und p21 (Cyclin-dependent kinase inhibitor) und damit als Zellzyklus-Modulator bei replikativem Stress. Der Verlust von PR130 führt zu einem frühen Arrest in der S-Phase, vermehrtem replikativem Stress und erhöhter Sensitivität für MS-275 (Goder et al. 2018).

1.5 Die Interaktionen von PP2A mit Viren

Die Schlüsselrolle von PP2A in vielen zellulären Signaltransduktionsketten lässt auf Interaktionen mit viralen Proteinen schließen. DNA-Viren bis hin zu Retroviren versuchen auf spezifische Art und Weise, die Wirtsstrukturen auszunutzen bzw. via PP2A zu deregulieren. Virale Proteine können stabile Komplexe mit PP2A-Holoenzymen oder mit den PP2A interagierenden Proteinen eingehen. Die Funktion der Protein Phosphatase ist oft wesentlich für die Vollendung des viralen Replikationszyklus. Eine Auswahl relevanter Beispiele sind im Folgenden aufgeführt:

Aus der Unterfamilie der *Betaherpesvirinae* ist bekannt, dass HCMV ein zelluläres PP2A Holoenzym trägt, welches wahrscheinlich am Abschalten von Phosphorylierungs-Prozessen der Wirtszelle beteiligt ist (Michelson et al. 1996). Das EBV nutzt das Epstein-Barr virus encoded leader protein (EBNA-LP) zur Aktivierung der Transkription viraler Gene. Die verkürzte Version (truncated) des EBNA-LP inaktiviert PP2A und hemmt somit die Caspase-abhängige Apoptose. Dies könnte ein Mechanismus für die EBV-Persistenz in infizierten Zellen darstellen (Garibal et al. 2007).

Durch das Hepatitis B Virus (HBV), welches akute und chronische Hepatitis und Hepatocarcinogenese verursacht, kann in Hepatozyten das Hochregulieren von PP2Ac induziert werden, welches wiederum mit der Hemmung von Interferon alpha (IFN- α) zusammenhängt (Christen et al. 2007).

Viren aus der Familie der *Polyomaviridae* können nach Infektion zu einer onkogenen Zelltransformation führen und nutzen hierfür die Dysregulierung der Protein Phosphorylierung. Das Polyoma virus small-Tumor (sT) Antigen bildet einen Komplex mit PP2A, genauer der PR65 Untereinheit, und erhöht die Tyrosin-Phosphatase Aktivität von PP2A, was zur Veränderung der Wirtszellstruktur führt (Cayla et al. 1993). Das zu dieser Familie dazugehörige Simian Virus 40 (SV40) exprimiert bei einer lytischen Infektion ein transformierendes Protein namens SV40 small tumor antigen. Dieses bindet direkt an das AC-Dimer (strukturelle und katalytische Untereinheit), verdrängt die regulatorische Untereinheit B' (R2) und hemmt damit die PP2A Aktivität. Die Kontrolle über PP2A durch small-t verändert das Zellwachstum und die Transkription zugunsten des Virus durch verstärkte MAP Kinase Signaltransduktion (Yang et al. 1991, Sablina et al. 2010). Die B-Untereinheiten sind für eine Vielzahl weiterer Viren für eine effektive Replikation wesentlich, ein Beispiel ist das Adenovirus

early region open reading frame 4 (E4orf4)-Gen, welches vom E4 Promoter humaner Adenoviren transkribiert wird. Während der viralen Replikationsphase kann das Virus eine p53-unabhängige Apoptose aktivieren, welche zur Verbreitung der produzierten Viren führt. Das E4orf4-Protein induziert diesen Prozess durch Interaktion mit der regulatorischen B55 α -Untereinheit des trimeren PP2A₁ Holoenzym in infizierten Zellen (Shtrichman et al. 1999). Studien haben auch gezeigt, dass die Bindung von E4orf4 die Aktivität von PP2A/B55 Holoenzymen reduziert und die resultierende Toxizität für die Wirtszelle aus insuffizienter Dephosphorylierung von Substraten des Zellzyklus erfolgt (Li et al. 2009). Interessanterweise ist die Anfälligkeit für den programmierten Zelltod durch das E4orf4 Protein bei Tumorzellen höher als bei normalen, nicht entarteten Zellen. Hierdurch könnte es als therapeutische Intervention bei malignen Erkrankungen dienen (Kleinberger 2015).

Das Ebola Virus wurde 2014 weltweit durch den Ausbruch einer Ebolafieber-Epidemie in Westafrika bekannt. Es gehört zur Familie der *Filoviridae* und besitzt ein einzelsträngiges RNA Genom mit negativer Polarität. Die Transkription dieses Genoms hängt vom viral transcription factor VP30 in seiner nicht-phosphorylierten Form ab. Das Ebola Virus Nukleoprotein (NP) bindet mittels viralen LxxIxE-Motivs an die Untereinheit B56 α und rekrutiert somit das Holoenzym PP2A-B56 α . Dieses wiederum ist essentiell für die Dephosphorylierung von VP30 und die Interaktion ermöglicht somit die effiziente Replikation des Ebola Virus (Kruse et al. 2018).

Die genannten Beispiele belegen anschaulich, dass die regulatorischen Untereinheiten B von PP2A eine wesentliche Rolle in der Replikation von Viren verschiedener Familien spielen und sich als pharmakologische Targets zur Therapie eignen. Weiterhin liefern sie einen Ausblick auf noch nicht identifizierte Virus-Wirtszellen Interaktionen, die in zukünftigen Experimenten aufgezeigt werden können. Bezüglich der Rolle von PP2A bzw. ihrer regulatorischen Untereinheiten während der Infektion von HSV-1 ist bisher wenig bekannt. In humanen Leberzellkarzinom Zellen (Huh7, human hepatocyte-derived carcinoma cell line) konnte die Aktivierung von PP2A im Verlauf einer HSV-1 Infektion nachgewiesen werden. Dies führt zur Dephosphorylierung und Inaktivierung von mitogen-activated protein (MAP) kinase Signalwegen (MEK1/2, ERK1/2) und zur Aktivierung des pro-apoptotischen Bad durch Dephosphorylierung von Serin-112 (Santamaria et al. 2009). Hierbei wurde zwar nur die PP2A 65 kDa regulatorische Untereinheit A β Isoform analysiert, jedoch zeigen die

Untersuchungen bereits eine antivirale Rolle von PP2A durch Induktion von pro-apoptotischen Prozessen.

1.6 DNA-Reparaturmechanismen in HSV-1-infizierten Zellen

Wie bereits beschrieben, bestehen verschiedene Interaktionen zwischen PP2A/PR130 und den zellulären DNA-Reparaturproteinen. Im Falle von DNA-Schäden kommt es zu einer Kaskade von physiologischen Reaktionen, die einen Eintritt in die Mitose mit Mutationen des Genoms verhindern sollen.

In Säugetierzellen sind die ATM, ATR (ataxia teleangiectasia and Rad3-related) und DNA-Pkcs (DNA-dependent protein kinase) Kinasen, die weitesten vorgeschalteten Kinasen, welche zur Familie der Phosphatidylinositol-3-kinase-like-kinases (PIKKs) gehören. Als Reaktion auf einen DNA-Schaden werden hunderte von Proteinen an Ser/Thr-Glu Motiven phosphoryliert, welche zum DNA damage desponse (DDR) gehören (Matsuoka et al. 2007). Beispielsweise werden Doppelstrangbrüche (DSBs) von dem MRN-Komplex, bestehend aus Mre11 (meiotic recombination 11), Rad50 und Nbs1 (Nijmegen breakage syndrom), erkannt und dieser rekrutiert daraufhin ATM. Es resultiert die Phosphorylierung von Histon H2AX und die Akkumulation von Chromatin entlang der Bruchstelle des DNA-Doppelstrangs. Nachgeschaltet kommt es zur Aktivierung der Checkpoint Kinase 2 und von p53. Infolgedessen stehen die Möglichkeiten der DNA-Reparatur, des Zellzyklusarrest oder der Apoptose zur Verfügung (Lee und Paull 2004).

ATR wiederum wird nicht nur nach DSBs aktiviert, sondern zudem bei Vorliegen von einzelsträngiger (single strand, ss) DNA im Zellkern. Dies aktiviert im Verlauf CHK1 durch Phosphorylierung (Zou und Elledge 2003).

Der ATM/ATR Signalweg wird im Zuge einer HSV-1 Infektion gewissermaßen vergleichbar wie bei einem DSB ausgelöst (Lilley et al. 2005, Edwards et al. 2018). Der Zusammenhang von DNA-Reparaturmechanismen und HSV-1 Replikation wurde umfangreich erarbeitet. So kann beispielsweise ICP0 einen Stopp der nicht-homologen Endverknüpfung (non-homologous end joining, NHEJ) hervorrufen, indem es den proteasomalen Abbau der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase C in Gang setzt. Infolgedessen profitiert das Virus von einer verstärkten Replikation (Parkinson et al. 1999, Lees-Miller et al. 1996). Außerdem kann ICP0 die zelluläre CHK2 per ATM-abhängiger Phosphorylierung aktivieren. Hierdurch wird der Zellzyklus in der G2/M-Phase arretiert. Dieser Prozess scheint ebenso die Umstände

für die Virusreplikation zu optimieren, denn bei ATM- und CHK2-defizienten Zellen ist HSV-1 in seiner Virulenz vermindert (Li et al. 2008). Vermutlich sind auch ATR und CHK1 für HSV-1 essentiell, eine Inhibition ihres Signalwegs führt zur verlangsamten Ausbildung der Replikationszentren (Edwards et al. 2018).

Weitere wichtige Interaktionen finden mit Histon-Deacetylasen statt. Diese entfernen als epigenetische Modifikatoren die Acetylreste von zellulärer und viraler DNA. ICP0 besitzt in seiner C-terminalen Sequenz eine Region, welche strukturell dem zellulären Corepressor des Transkriptionsrepressors REST (repressor element 1 silencing transcription factor) (coREST) ähnelt. Tatsächlich konnte die Interaktion zwischen HSV-1 und dem coREST/REST/HDAC-Komplex nachgewiesen werden. Im Verlauf einer HSV-1 Infektion dissoziieren die HDACs vom coREST/REST-Komplex durch ICP0 (Gu und Roizman 2009). Je nach Wildtyp oder mutiertem REST spielen in sensorischen Neuronen HDACs und der Repressorkomplex eine kritische Rolle in der Entscheidung zwischen lytischem Zyklus und der Etablierung der viralen Latenz (Zhou et al. 2013).

Die Inhibition bestimmter HDACs hat sich auch in der onkolytischen Tumorthherapie bisher als überzeugend erwiesen, z. B. konnte die virale Replikation nach Hemmung von HDAC6 signifikant erhöht werden (Nakashima et al. 2015).

II. Ziele der Arbeit

Auf Basis eigener Vorarbeiten lautet die Hypothese, dass die regulatorische Untereinheit PR130 einen hemmenden Einfluss auf die Replikation von HSV-1 besitzt. Zur genauen Untersuchung wurden der Arbeitsgruppe HCT116 Zellen zur Verfügung gestellt, in denen mit Hilfe von CRISPR-Cas9-Technologie die DNA von PR130 (CRISPR-HCT116^{ΔPR130}) eliminiert wurde. Nachfolgend konnten diese Zellen mit HSV-1 infiziert und die zelluläre Signaltransduktion analysiert werden. Viren sind auf die infizierte Wirtszelle angewiesen, um sich effizient replizieren zu können (Colao et al. 2017, Edwards et al. 2018). Daher scheint es sinnvoll, die DNA-Reparaturmechanismen, als integraler Bestandteil des Replikationszyklus, eingehend zu analysieren, um hieraus eine potentielle Modulation im Sinne der Wirtszelle zu entwickeln. Außerdem zeigen Beispiele wie EBV oder das Ebola Virus anschaulich, dass die regulatorischen Untereinheiten B von PP2A eine Rolle in der Replikation von Viren verschiedener Familien spielen und sich als pharmakologische Targets zur Therapie eignen. Weiterhin liefern sie einen Ausblick auf noch nicht identifizierte Virus-Wirtszellen Interaktionen, die in zukünftigen Experimenten aufgezeigt werden können. In dieser Arbeit wird zunächst die Replikationskinetik von HSV-1 in Knock-out Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen bestimmt und mittels Immunfluoreszenz visualisiert. Im Anschluss werden mit molekularbiologischen Methoden, wie z. B. Westernblot, die Veränderung von Phosphorylierungsprofilen demonstriert. Auch die pharmakologische Inhibition von Proteinen wie HDAC1/2, ATM, ATR oder CHK-1 wird genutzt, um die Replikation von HSV-1 näher zu charakterisieren.

Die erhaltenen Daten könnten weiterhin dazu beitragen, die Frage zu klären, wieso Tumorpatienten mit entzündlichen Erkrankungen unter Therapie mit HDAC-Inhibitoren trotz einer Hemmung der Interferon-STAT-Transduktion keine erhöhte Infektanfälligkeit aufweisen (Wieczorek et al. 2012).

III. Material & Methoden

3.1 Geräte und Material

3.1.1 Geräte / Verbrauchsmaterial

Geräte / Material	Modell	Hersteller
Biologische Sicherheitswerkbank	HS 12	Heraeus
Cell Counter	Countess™ II	Thermo Fisher Scientific
Beleuchtungseinrichtung (Observer. Z1)	HXP 120 V	Carl Zeiss AG
Stromversorgung (Observer. Z1)	Power Supply 231	Carl Zeiss AG
Energieversorgung	Consort EV202	Consort bvba
Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	BD FACS Lyric®	Becton, Dickinson & Company BD Bioscience
Gefrierschrank (-20°C)	Öko Super	Liebherr GmbH
Gefrierschrank (-80°C)	Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific Inc.
Inkubationsschrank	BBD 6220	Heraeus CellStar
Kühlschrank	LabEx 450EX	National Lab GmbH
Flockeneisbereiter	AF 200	Scotsman
Kamera	AxioCam Erc5s	Carl Zeiss AG
Kamera	AxioCam mono 503	Carl Zeiss AG
Fluoreszenzmikroskop	Observer. Z1	Carl Zeiss AG
Lichtmikroskop	AxioVert. A1	Carl Zeiss AG
Microplate Reader	FLUOstar Omega	BMG Labtech
Transilluminator (UV)	GV4M20X20	Syngene
Fluoreszenz Box	G:BOX iChemi XR	Syngene
Mischer	MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Vortex	Vortex-Mixer 7-2020	neoLab Migge
8-fach Multipipette	200 µl	Eppendorf
Pipette	1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl, 2,5 µl	Eppendorf
Filterpipettenspitzen	Tip One 1000 µl, 200 µl, 10 µl	CytoOne StarLab
Auslaufpipette	5ml, 10ml, 25ml	Greiner

Pipettierhilfe	CellMate II	Matrix Technologies
SDS-PAGE- & Blot-Apparatur	Mini Protean	Biorad
Stage-Controller (Observer. Z1)	MCU 2008	Carl Zeiss AG
Spektrophotometer	NanoDrop™ 1000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Röhrchen mit Stehrand	50 ml	Corning Falcon
Verdünnungsröhrchen	15 ml	Corning Falcon
Reagiergefäß	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Sarstedt AG
Spitzen für Eppendorf Pipetten	1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl	CytoOne Star Lab
Well-Platten mit Deckel, steril	12-Well, 24-Well, 96-Well	Greiner
Thermomixer	5436	Eppendorf
Zellkulturflasche CELLSTAR®	50 ml, 25 cm ² 250 ml, 75 cm ² 550 ml, 175 cm ²	Greiner
Cryoröhrchen	1,0 ml	VWR
Zentrifuge	5418R	Eppendorf
Zentrifuge	Biofuge stratus	Heraeus
Real-Time PCR System	PikoReal 96 Cycler	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.1.2 Verwendete primäre & sekundäre Antikörper

Antigen	Charakterisierung	Ursprung	Hersteller
PR130 (PPP2R3A)	polyklonal, IgG, primär	Kaninchen	Novus Biologicals
CHK 1	monoklonal, IgG ₁ , primär	Maus	Cell Signaling Technology
Phospho-CHK 1 (Ser296)	polyklonal, IgG, primär	Kaninchen	Cell Signaling Technology
CHK 2	polyklonal, primär	Kaninchen	Cell Signaling Technology
Phospho-CHK 2 (Thr68)	polyklonal, primär	Kaninchen	Cell Signaling Technology

Kaninchen	polyklonal, IgG (H+L), sekundär, konjugiert mit Cy5	Ziege	dianova
Active Caspase 3	monoklonal, IgG, primär, konjugiert mit R-PE	Kaninchen	BD-Pharmingen™
Cleaved PARP (Asp214)	monoklonal, IgG ₁ , κ, primär, konjugiert mit R-PE	Maus	BD-Pharmingen™

3.1.3 Zellen

Zelllinie	Charakterisierung	Herkunft	Bezugsquelle
Vero-Zellen	adhärentes Wachstum mit epithelialer Morphologie	Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze	Institut für Medizinische Mikrobiologie Jena, Sektion Experimentelle Virologie
HCT-116 ^{Wildtyp}	adhärentes, epitheliales Wachstum	humane Colon- Karzinom-Zellen	Institut für Toxikologie, Universitätsklinikum Mainz
HCT116 ^{ΔgDNA}	adhärentes, epitheliales Wachstum	humane Colon- Karzinom -Zellen	Institut für Toxikologie, Universitätsklinikum Mainz
HCT116 ^{APR130}	adhärentes, epitheliales Wachstum	humane Colon- Karzinom -Zellen	Institut für Toxikologie, Universitätsklinikum Mainz

3.1.4 Viren

Virus	Charakterisierung	Stock	Herkunft
HSV-1/Kos	doppelsträngiges DNA-Virus	6,66 x 10 ⁶ / ml	Sektion Experimentelle Virologie, Jena
HSV-1/E70K/EGFP	doppelsträngiges DNA-Virus	2 x 10 ⁷ / ml	Sektion Experimentelle Virologie, Jena

3.1.5 Inhibitoren

Inhibitor	Konzentration [mmol/l]	Lösungsmittel	Hersteller
FK-228	1	DMSO	Selleckchem
KU-60019	1	DMSO	Selleckchem
MS-275	5	DMSO	Selleckchem
MK-8776	1	DMSO	Selleckchem
VE-821	1	DMSO	Selleckchem
VE-822	5	DMSO	Selleckchem

3.1.6 Gebrauchsfertige Testsysteme und Produkte

Name	Verwendung	Hersteller
Accutase®-Lösung	Ablösen von Zellen	Sigma-Aldrich
BSA (Bovines Serumalbumin)	Waschmedium	Sigma-Aldrich
Cell Proliferation Reagent (WST-1)	Zytotoxizitätstest / Zellüberleben	Roche
Goat Serum	Fluoreszenzmarkierung	Santa Cruz
Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)	Zellkultur	Lonza
Eagle's minimal essential medium (EMEM)	Zellkultur	Sigma-Aldrich
DPBS (mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Waschmedium	Lonza
Fetales Kälberserum	Zellkultur	Merck

Hoechst-33342	Immunfluoreszenzmarkierung	Thermo Scientific
IS-Antifading-Medium	Immunfluoreszenzmarkierung	dianova
QIAGEN-DNA-Test-Kit Mini	DNA Aufreinigung	QIAGEN
Propidium Iodid (PI)	DNA Färbung	BD-Pharmingen
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	Apoptose Nachweis	BD-Pharmingen
BD Cytofix / Cytoperm Fixation/Permeabilisations Kit	Zellfixierung	BD-Pharmingen
Staurosporin	Apoptose Induktion	Sigma
BD Perm/Wash buffer	Waschpuffer	BD-Pharmingen
RNaseA	RNA-Degradation	Macherey-Nagel
Immersionsöl	Immersion	Carl-Zeiss AG
BD Horizon™ Fixable Viability Stain 660	Nekrose-Nachweis	BD-Pharmingen
PCR Mykoplasma Test Kit I/C	Mykoplasmenachweis	PromoKine
GelRed™	Färbung von DNA / RNA	Biotium
DNA-Ladder (1kbp)	Komigrationsstandard	MBI Fermentas
Protease	Enzym zur Proteinspaltung	QIAGEN
Puffer AVE	Viraler Lyse Puffer	QIAGEN
PCR Kit	QuantiTectSYBR Green	QIAGEN

3.1.7 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth GmbH
Agarose	Roth GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva
EDTA - Di-Sodium	Serva
Ethanol (99,9 %)	Roth GmbH
Methanol (99,5 %)	Roth GmbH
Paraformaldehyd (4 %)	Morphisto
Triton X-100	Serva
Trypsin-Chelat-Lösung	Biochrom / interne Herstellung
Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Serva

Natriumphosphat (Na_2HPO_4)	Aldrich-Chemie
Natriumhydroxid (NaOH)	Chemapol AG
Ethidiumbromid	Serva
Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate)	BIO-RAD, Inc.
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma
Sucrose	Fritz Leidholdt, Biochemie
Guanidinhydrochlorid	Sigma

3.1.8 Kulturmedien, Puffer & Lösungen

Medium / Lösung	Zusammensetzung
Wachstumsmedium für HCT116 Zellen	EMEM + 10 % FKS
Wachstumsmedium für Vero-Zellen	EMEM + 10 % FKS
Phosphat-Buffered Saline (PBS)	40 g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH_2PO_4 , 5,7 g Na_2HPO_4 (wasserfrei), pH = 7,4
Stain Buffer	490 ml PBS, 10 ml FKS, 450 mg Natriumazid
TBE-Puffer	5x TBE-Puffer (pH 8,1): 54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 4,65 g EDTA auf 1 l mit dest. H_2O auffüllen
Puffer C1	438,14 g Sucrose; 4,06 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 4,84 g Tris-Base in 700 ml ddH_2O + 200 μl 20 %-ige Triton X-100 Lösung, pH auf 7,5 mit HCl einstellen und auf 1000 ml mit ddH_2O auffüllen
Puffer G2	76,42 g Guanidin-HCl; 11,17 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 3,63 g Tris-Base in 600 ml ddH_2O plus 250 ml 20 %-ige Tween-20 Lösung und 50 ml 10 %-ige Triton X-100 Lösung
Agarosegel (1,5 %)	0,75 g Agarose, 50 ml TBE-Puffer, 4 μl GelRed™

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Vero-Zellen (ATCC: CCL-81)

Vero-Zellen sind eine etablierte Zelllinie mit epithelialer Morphologie welche zunächst in einer T75-Flasche in 20 ml EMEM + 10 % FKS kultiviert wurden bis sie weitestgehend konfluent waren. Bei der Umsetzung der Zellen erfolgte das Ablösen enzymatisch durch Zugabe von 3 ml einer chelatierten Trypsin-Lösung und Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ für 10 Minuten. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in 7 ml serumhaltigem Nährmedium (EMEM + 10 % FKS) aufgenommen und unter dem Mikroskop auf eine Einzelsuspension hin überprüft. Für eine Umsetzung im Verhältnis 1:3 wurden 7,5 ml der Zellsuspension in eine T175-Flasche überführt und das Restvolumen von 2,5 ml in der T75-Flasche belassen. Beide Flaschen wurden erneut mit angesetztem EMEM + 10 % FKS aufgefüllt, die Volumina hierfür betragen 20 ml für T75- bzw. 30 ml für T175-Flaschen. Die weitere Inkubation erfolgte unter 37°C und 5 % CO₂. Nach ca. 3-4 Tagen war ein erneutes Umsetzen bzw. Ansetzen eines Experimentes mit den Zellen möglich.

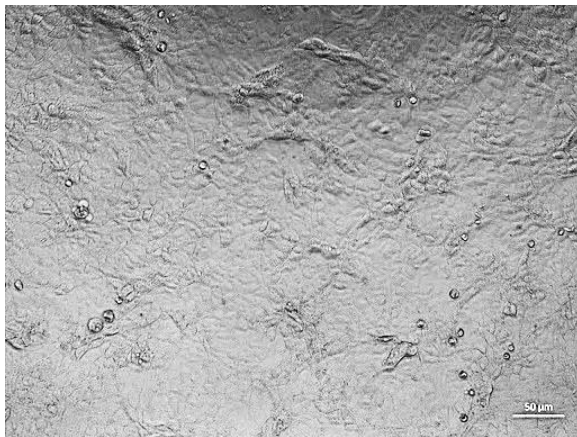


Abbildung 5:

Konfluenter Zellrasen von unbehandelten Vero-Zellen, Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

3.2.1.2 HCT116 Zellen (ATCC: CCL-247)

HCT116 Zellen sind Humane Kolorektale-Adenokarzinom-Zellen, welche erstmals 1981 von Brattain et al. etabliert wurden (Brattain et al. 1981). Die verwendete Zelllinie ist eine von 3 Isolaten, welche aus einem Mann mit Colon-Karzinom gewonnen wurden. HCT116 eignen sich besonders zur Untersuchung von Krebstherapien und stellen ein geeignetes Modell zur Generierung von Knock-out Zellsystemen dar (Conn 2008). Das Zellkultursystem wurde von Prof. Dr. Krämer zur Verfügung gestellt. Zur

Eliminierung von PPP2R3A (PR130) wurde die CRISPR-Cas9-Technologie genutzt, mit welcher mehrere PR130-defiziente Klone (HCT116^{ΔPR130}) und PR130-positive Klone (HCT116^{ΔgDNA}) mit dem entsprechenden leeren Vektor erzeugt wurden. Das Schema des Genabschnitts von PPP2R3A ist in Abbildung 6 dargestellt. Weiterführende Experimente wurden mit HCT116^{ΔPR130} Klon #16, HCT116^{ΔgDNA}, sowie HCT116^{Wildtyp} Zellen durchgeführt.

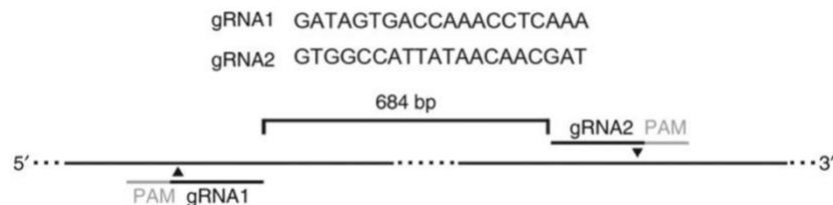


Abbildung 6: Schema des Genabschnitts von PPP2R3A und Modifizierung mittels CRISPR-Cas9 Technologie (nach Goder et al. 2018); gRNA = guiding RNA, PAM = protospacer adjacent motif, G = Guanin, A= Adenin, T = Thymin, C = Cytosin.

Humanisierte *S. pyogenes* Cas9 nuclease wurde in HCT116 Zellen mit zwei *guide RNAs* (gRNA) exprimiert, um zwei Doppelstrangbrüche in das PPP2R3A Gen (684 Basenpaare voneinander entfernt) einzuführen. Das pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 Plasmid wurde von Dr. Feng Zhang (erhältlich bei Addgene, Plasmid # 42230) zur Verfügung gestellt. Beide gRNAs gegen spezifische Sequenzen innerhalb des PPP2R3A Gens wurden mit Hilfe des Online CRISPR Design Tool designt, welches vom Zhang Lab (http://www.genome-engineering.org/crispr/?page_id=41) bereit gestellt wird. Oligonucleotide (Sigma) wurden annealed und in den Vektor ligiert. Die HCT116 Zellen wurden mit beiden Plasmiden (jeweils 0,45 µg) co-transfiziert und zusätzlich mit einem Plasmid mit Puromycin Resistenz (0,1 µg). Hierfür wurde das Transfektions-Reagenz "TurboFect" (ThermoFisher Scientific) und dessen Herstellerprotokoll genutzt. Als Kontrollzellen erhielten HCT116 Zellkulturen den pX330 Vektor ohne gRNA. Die Zellen wurden für eine Woche unter antibiotischer Selektion kultiviert. Die Analyse der chromosomalen Integrität in Metaphase-Margen zeigten, dass diese Zellkulturen eine vergleichbare Chromosomen-Anzahl und keine groben Abnormitäten aufwiesen (Goder et al. 2018). In der Abbildung 7 sind unbehandelte HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA}, HCT116^{ΔPR130} Zellen unter dem Mikroskop zu sehen.

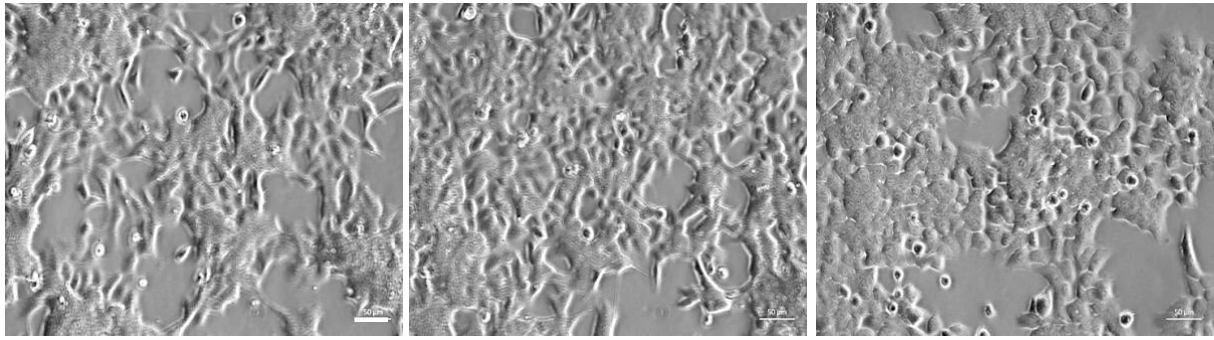


Abbildung 7: Zellrasen unbehandelter HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA}, HCT116^{ΔPR130} Zellen (von links nach rechts), Maßstabsbalken entspricht 50 μm.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in jeweils einer T75-Flasche in 20 ml EMEM + 10 % FKS. Das Umsetzen der Zellen wurde analog der Vorgehensweise bei den Vero-Zellen durchgeführt. Der Ausschluss von Mykoplasmen, welche eine Kontamination von etablierten Zelllinien darstellen, geschah mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ist im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

3.2.1.3 Überprüfung von HCT116 Zellen auf Mykoplasmen-Kontamination

Zum Ausschluss einer Kontamination mit Mykoplasmen wurde das kommerziell erhältliche PCR Mykoplasma Test Kit I/C von Promokine verwendet. Hierfür wurde die DNA aus Proben der drei Zelllinien HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} mit dem QIAGEN-DNA-Test-Kit nach dem Herstellerprotokoll isoliert und dann für die PCR weiterverwendet. Das Promokine-Set enthält einen Master-Mix (internale Kontroll-DNA, Nukleotide, Primer, Hot-Start Taq DNA Polymerase) und eine inerte Gel-Loading-Farbe für die Gelelektrophorese. Zugegeben wird lediglich ein Rehydrations Buffer. Das Positiv-Kontroll-Set enthält einen lyophilized Master-Mix (Primer, Nukleotide, Hot-Start Taq DNA Polymerase, DNA-Fragmente vom *Mycoplasma orale* Genom und eine internale Kontroll-DNA). Das Primer-Set vervielfältigt eine DNA-Sequenz innerhalb der hoch konservierten 16S rRNA Operon Kodierungsregion. Für die Analyse wurde ein 1,5 % Agarosegel gegossen, pro Spur 8 μl jeder PCR-Reaktion pipettiert und das Gel in der Elektrophorese-Kammer 25 min bei 100 V kultiviert.

3.2.2 Anlage eines Virusstocks, HSV-1/Kos, HSV-1/E70K/EGFP

Das bei -80 °C tiefgefrorene Virus (HSV-1) wurde langsam auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurde das Medium der konfluent gewachsenen Vero-Zellen einer T75-Flasche abpipettiert und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Die Virussuspension

wurde gevortext, in 3 ml serum-freien EMEM verdünnt und anschließend auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ für eine Stunde, wobei die Flasche alle 10 Minuten mehrfach geschwenkt wurde. Nach dieser Zeit wurde das Inokulum entfernt und die T75-Flasche auf 20 ml mit EMEM + 10 % FKS aufgefüllt. Zur Kultivierung wurden die infizierten Zellen 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei sichtbar ausgeprägtem zytopathischen Effekt (ZPE) wurde die T75-Flasche anschließend bei -80 °C für mindestens eine Stunde eingefroren. Nach erneutem Auftauen waren die Zellen vollständig vom Boden der Flasche abgelöst, sodass sich eine Zellsuspension gebildet hatte. Diese wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dieses wurde bei 5000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand zu je 1 ml in Kryo-Röhrchen pipettiert. Dieser neu generierte Virusstock wurden bei -80 °C eingefroren und pro Charge mindestens drei Tissue Culture Infection Dose 50 (TCID₅₀) Titrationen zur Bestimmung des Virustiters durchgeführt.

3.2.3 Bestimmung des Virustiters von HSV-1 mittels TCID₅₀-Test

Für die Virustitration wurde zunächst eine Einzelzellsuspension von Vero-Zellen mit der Konzentration 12×10^4 Zellen/ ml hergestellt. Dies erfolgte methodisch wie bereits beschrieben durch enzymatisches Ablösen und die Resuspension in EMEM + 10 % FKS. Die Zellzahl wurde sowohl manuell als auch mittels automatischem Zellzähler bestimmt. In jede Einheit einer 96-Well-Platte wurden 100 µl der Vero-Zellsuspension pipettiert, anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Von drei Proben des Virusstocks wurden Verdünnungsreihen von jeweils 10^{-1} bis 10^{-9} angelegt. Zunächst wurden hierfür auf einer 96-Well-Platte 225 µl Wachstumsmedium je Einheit vorgelegt und anschließend in die Reihe der ersten Verdünnungsstufe 25 µl des infektiösen Mediums zugegeben. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurde die Viruslösung mit einem Volumen von 25 µl weiter verdünnt. Jede Probe lag im Triplet vor und wurde jeweils noch viermal aufgetragen. Von jeder Probe wurden nach der Anfertigung der Verdünnung je 50 µl in vier Wells der 96-Well-Platte ausgesät und zu inkubierten Vero-Zellen gegeben. Die Platten wurden 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und dann auf den ZPE mikroskopisch untersucht. Der Virustiter wurde über die Endpunktmethode nach Reed & Muench bestimmt (Reed und Muench 1938). Die Formel ist dem nachfolgenden Abschnitt zu entnehmen:

$$PA = \frac{(\% \text{ infizierte Testeinheiten über } 50 \%) - 50 \%}{(\% \text{ infizierte Testeinheiten über } 50 \%) - (\% \text{ infizierte Testeinheiten unter } 50 \%)}$$

$$TCID_{50} = (\log \text{ Verdünnung über } 50 \%) + (\text{proportionaler Abstand} \times \log \text{ Verdünnungsfaktor})$$

Anhand des mikroskopisch detektierbaren ZPE lässt sich feststellen, welche Virusverdünnung eine Infektion von 50 % der Testeinheiten erzielt. Hieraus resultierend wird die $TCID_{50}$ nach der dargestellten Formel berechnet.

3.2.4 Viruskinetik

Um die Replikation von HSV-1/Kos in den modifizierten HCT116 Zellen zu charakterisieren, wurde zunächst eine Viruskinetik der drei Zelllinien HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} bestimmt. Hierfür wurden drei 24-Well-Platten mit Zellen angelegt. Für die geeignete Konzentration von 300.000 Zellen/ 500 µl/ Well wurde eine Zellsuspension von 6×10^5 Zellen/ ml durch Ablösen und Verdünnen aus je einer konfluent bewachsenen T75-Flasche gewonnen. Um zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 36, 48, 72 h eine dreifache Messung zu gewährleisten und jeweils zwei Zellkontrollen und eine Zellzahlkontrolle mitzuführen, wurden in alle 24 Einheiten der Platten die Zellen in entsprechender Konzentration ausgesät. Vor der Infektion wurden die Platten 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um einen weitestgehend konfluenten Zellrasen zu erlangen. Die Infektion erfolgte mit einer Infektionsdosis von 5 MOI (multiplicity of infection), wobei ein Inokulationsvolumen von 200 µl/ well verwendet wurde und die Inkubationszeit 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ betrug. Anschließend wurde das Inokulum abpipettiert und in jede Kavität 500 µl EMEM + 10 % FKS gefüllt. Im Falle des Zeitpunkts 0 h der Viruskinetik erfolgte die unmittelbare Abnahme des Volumens und der Zellen am Boden des Wells und die Überführung in zwei 1,5 ml Eppendorf-Cups.

Die Probennahme geschah durch separate Abnahme (500 µl in 1,5 ml Eppendorf-Cups) und Zentrifugation des Überstandes (5 min/ 3000 U/min), Übertragung des Überstandes in neue Eppendorf-Cups (1,5 ml) und Lagerung bei -20°C (extrazelluläres Virus). Die Eppendorf-Cups mit zentrifugierten Zellen wurden weiterverwendet. Pro Kavität wurden 500 µl EMEM + 10 % FKS neu hinzugegeben und die Zellen durch abkratzen und abspülen von der Bodenfläche gelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde in die alten Eppendorf-Cups überführt und bei -20 °C eingefroren. Es wurden 6 Proben pro Zelllinie und Zeitpunkt erhalten, welche vor der

Titration wieder auf Eis aufgetaut wurden. Proben mit intrazellulärem bzw. zellassoziertem Virus wurden hierbei nach dem Auftauen für 5 min bei 3000 U/min erneut zentrifugiert, der klare Überstand in ein neues Eppendorf-Cup überführt und titriert.

3.2.5 DNA-Fragmentation

Als sicherer Nachweis für apoptotische Zellen gilt die Fragmentierung der genomischen DNA, welche mittels Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden zunächst Zellen aller drei Zelllinien (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130}) in der Konzentration $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml durch Ablösen und Verdünnen in EMEM + 10 % FKS aus je einer konfluent bewachsenen T75-Flasche gewonnen. Verwendet wurde eine 6-Well-Platte und die ausgesäte Zellzahl betrug 6×10^5 Zellen/2 ml/Well. Anschließend wurden die Zellen 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Infektion mit HSV-1/Kos erfolgte mit 5 MOI in einem serumfreien Inokulationsvolumen von 1 ml/Well. Nach erneuter einstündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde dieses abpipettiert und durch 2 ml EMEM + 10 % FKS ersetzt. Es folgte wiederum eine Inkubation über 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ und anschließend wurden alle Zellen, einschließlich derjenigen des Überstandes, isoliert. Hierfür wurden die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren von der Plastikoberfläche gelöst und die Proben jeweils in 2 ml Eppendorf-Cups überführt. Die Zellen wurden bei 1.000 U/min für 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurden 200 µl Puffer C1 und 600 µl ddH₂O (doppelt destilliert) gegeben. Der Ansatz wurde in 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt und die Proben 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 3.400 U/min für 10 min. Der infektiöse Überstand wurde entfernt und die Pellets in je 250 µl Puffer C1 und 750 µl ddH₂O resuspendiert, gevortext und erneut zentrifugiert (3.400 U/min für 10 min). Nach Entfernen der Überstände wurden die Pellets in 450 µl Puffer G2 resuspendiert, 20 s gevortext und mit 10 µl Protease versetzt. Dieser Ansatz wurde für 60 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ethanolpräzipitation. Dazu wurde der klare Überstand (short spin) in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt und je 45 µl 5 M NaCl-Lösung und 1 ml 96%-iger Ethanol zugegeben und gevortext. Die DNA wurde bei -80 °C gefällt (30 min). Danach wurde die DNA 10 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde vorsichtig mit 0,5 ml 70%-igen Ethanol gewaschen, anschließend 5 min bei 14.000 U/min zentrifugiert und nach Entfernung

des Überstandes luftgetrocknet. Die DNA-Proben wurden in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Je 10 µl jeder Probe wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (1,5 %-iges Agarosegel) analysiert. Zusammensetzung: 10 µl Probe + 10µl ddH₂O + 5 µl Ladepuffer; 20 µl auftragen. Die Auswertung des Experiments erfolgt in Hinblick auf das Vorhandensein von DNA-Banden (Fragmente) in den HSV-1-infizierten Zellproben.

3.2.6 Metabolische Aktivität/ WST-1-Test

Um die metabolische Aktivität innerhalb des Replikationszyklus von HSV-1/Kos zu charakterisieren, wurde eine Kinetik mittels Cell Proliferation Reagent (Roche) erstellt. Dieses enthält die Substanz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulphonat) sowie ein Elektron-koppelndes Reagenz in Phosphatpuffer. In intakten Zellen wird dies durch die mitochondriale Dehydrogenase zu Formazan umgesetzt, optisch charakterisiert durch eine dunkelrote Färbung. Die enzymatische Spaltung des Tetrazoliumsalses ist in der Abbildung 8 dargestellt. Je mehr lebende Zellen vorhanden sind, desto höher ist die Enzymkonzentration und dementsprechend die Menge an umgesetzten WST-1. Durch die photometrische Absorbanzmessung bei 450 nm kann die Konzentration quantifiziert und mit einer entsprechenden Kontrolle ins Verhältnis gesetzt werden.

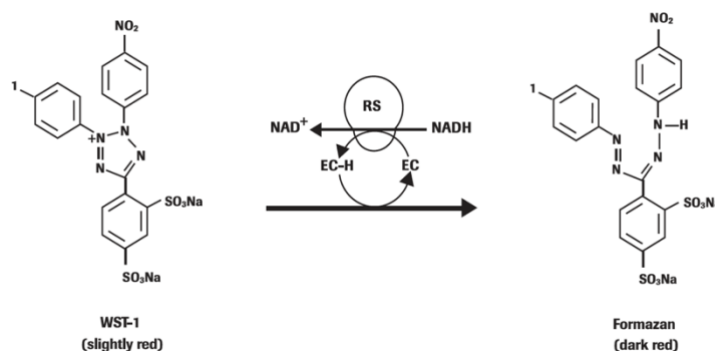
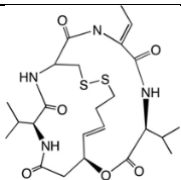
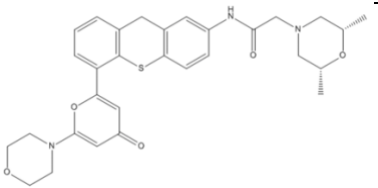
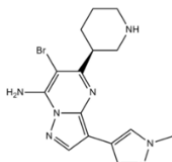


Abbildung 8: Katalytische Spaltung des Tetrazoliumsalses zu Formazan durch mitochondriale Enzyme; EC = electron coupling reagent; RS = mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system; NADH = Nicotinamidadenindinukleotid, nach Roche Cell Proliferation Reagent WST-1.

Für den WST-1-Tests wurde jeweils pro Zelllinie eine 96-Well Platte mit je 30.000 Zellen / 100 µl / Well angelegt. Die Zellen wurden durch Ablösen und Verdünnen in EMEM bzw. DMEM + 10 % FKS aus je einer konfluent bewachsenen T75-Flasche gewonnen. Anschließend wurden die Zellen 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im

Brutschrank kultiviert bis ein konfluenter Monolayer mikroskopisch nachweisbar war. Für jede Zelllinie wurden daraufhin die Zellzahl bestimmt und die Infektionsdosis (5 MOI) berechnet. Es erfolgte die Zugabe von 25 µl Viruslösung bzw. von 25 µl serumfreien Medium für die Zellkontrollen. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte bei 3, 6, 12, 24, 36 h p. i., wobei jeweils 2 h vor dem entsprechenden Zeitpunkt 10 µl WST-1-Lösung zu den entsprechenden Wells gegeben wurde. Anschließend fand die 2 h Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ unter Lichtausschluss statt. Die Messung der OD geschah bei 450 nm gegen EMEM/ DMEM + 10 % FKS mit 10 µl WST-1 als Leerwert. Die Messung jedes Zeitpunktes wurde in mindestens 15 Wells überprüft, gegebenenfalls wiederholt. Für einige noch nicht getestete Inhibitoren erfolgte zudem die Vitalitätsbestimmung gemäß diesem Protokoll. Eine dieser Substanzen war VE-822 in HCT116 Zellen. Hierbei wurden die Zellen jedoch nicht infiziert, sondern stattdessen mit dem entsprechenden Inhibitor für 48 h unter verschiedenen Konzentrationen kultiviert. Die Testung aller Substanzen wurde in mindestens 8 Wells pro Konzentration überprüft. Die Kontrollen enthielten die gleichen Konzentrationen des Lösungsmittels DMSO. Für alle übrigen Substanzen bzw. deren Konzentrationen wurde sich auf die Vorarbeiten des Kooperationspartners des Instituts für Toxikologie (Universitätsklinikum Mainz) bzw. auf bekannte Publikationen mit denselben Zelllinien verlassen. Eine Übersicht bietet die Tabelle 2.

Inhibitor	Funktion	Wirksame Konzentration (K _i)	Verwendete Konzentration	Strukturformel
FK228 (Romidepsin)	HDAC- 1-3 Inhibitor	36 nM	5 nM	
KU-60019	ATM Inhibitor	6,3 nM	3 µM	
MK-8776	CHK-1 Inhibitor	3 nM	0,5 µM	

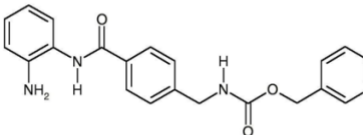
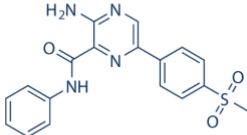
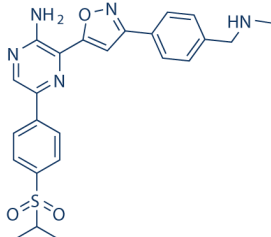
MS-275 (Entinostat)	HDAC- 1-3 Inhibitor	0,51 μ M	1 / 2 μ M	
VE-821	ATR Inhibitor	13 nM	3 μ M	
VE-822 (Berzosertib)	ATM& ATR Inhibitor	19 nM	10 nM	

Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren und ihre Funktion, Konzentrationen und Strukturformeln

3.2.7 Inhibition der Histon-Deacetylase 1 & 2 durch MS-275

Die Substanz MS-275 ist ein Benzamid, welches die HDAC1&2 spezifisch inhibiert. Aus bisherigen Publikationen ist bekannt, dass die Substanz MS-275 die Expression von PR130 hochreguliert (Goder et al. 2018). Weiterhin erhöht auch das Knock-down von HDAC1 und HDAC2 mittels siRNA die Expression von PR130 (Bradner et al. 2010, Goder et al. 2018). In diesem Zusammenhang ist der Einsatz von MS-275 im vorgestellten Zellkultursystem mit dem Knock-out von PR130 von besonderer Relevanz.

Die HCT116 Zellen wurden mit einer Konzentration von 2 μ M MS-275 behandelt. Diese Dosis wurde auf Basis von publizierten Vorarbeiten verwendet (Goder et al. 2018). Um den Einfluss dieser Inhibition von HDAC1/2 auf die HSV-1 Replikation in HCT116 Zellen bewerten zu können, wurde eine 24-Well-Platte mit 300.000 Zellen/ 500 μ l/ Well mit allen drei Zelllinien (HCT116^{Wildtyp}, HCT116 ^{Δ gDNA} und HCT116 ^{Δ PR130}) angelegt. Die Zellsuspension von 6 x 10⁵ Zellen/ml wurde durch Ablösen und Verdünnen aus je einer konfluent bewachsenen T75-Flasche gewonnen und 24h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit einer Infektionsdosis von 1 MOI, wobei ein serumfreies Inokulationsvolumen von 200 μ l/Well verwendet wurde und die

Inkubationszeit 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ betrug. Währenddessen wurde die MS-275- bzw. Kontroll-Konzentration eingestellt, indem

- 1.) 1 µl MS-275 (stock, 5 mM in DMSO) mit 2500 µl EMEM + 10 % FKS versetzt und gut gemischt wurde, sodass eine Konzentration von 2 µM entstand.
- 2.) 1 µl DMSO mit 2500 µl EMEM + 10 % FKS versetzt und gut gemischt wurde, um eine entsprechende DMSO-Kontrolle zu erhalten.
- 3.) 1 µl EMEM mit 2500 µl EMEM + 10 % FKS versetzt und gut gemischt wurde, um eine entsprechende Medium-Kontrolle zu erhalten.

Es folgte nun der schrittweise Austausch des Infektionsmediums mit 400 µl EMEM + 10 % FKS + 2 µM MS-275 bzw. 400 µl EMEM + 10 % FKS + DMSO bzw. 400 µl EMEM + 10 % FKS. Bis zur Probennahme erfolgte eine weitere Inkubation 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Diese erfolgte durch separate Abnahme (400 µl in 1,5 ml Eppendorf-Cups) und Zentrifugation des Überstandes (5 min/3000 U/min), Übertragung des Überstandes in neue Eppendorf-Cups (1,5 ml) und Lagerung bei -20 °C (extrazelluläres Virus). Die Eppendorf-Cups mit zentrifugierten Zellen wurden weiterverwendet. Pro Kavität wurden 400 µl EMEM + 10 % FKS neu hinzugegeben und die Zellen durch abkratzen und abspülen von der Bodenfläche gelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde in die ersten Eppendorf-Cups überführt und bei -20 °C eingefroren. Die 12 pro Zelllinie erhaltenen Proben wurden vor der Titration wieder auf Eis aufgetaut. Proben mit intrazellulärem Virus wurden hierbei nach dem Auftauen für 5 min bei 3000 U/min erneut zentrifugiert, der klare Überstand in ein neues Eppendorf-Cup überführt und titriert. Um eine Inhibition der zellulären Mechanismen besser gewährleisten zu können, wurden außerdem in nachfolgenden Versuchen die Zellen nach Erzeugen eines konfluenten Monolayers (vor der Infektion mit HSV-1) für weitere 24 h mit 2 µM MS-275, gelöst in EMEM + 10 % FKS, kultiviert. Die übrigen Inhibitoren, wie z. B. FK-228 oder VE-821, wurden entsprechend der in Tabelle 2 beschriebenen verwendeten Konzentrationen nach diesem Protokoll verwendet und anschließend die Replikation von HSV-1 mittels Virustitration überprüft.

3.2.8 Nachweis der Replikation von HSV-1 in HCT116 Zellen mittels Flowzytometrie

Um die Replikation von HSV-1 zu überprüfen, wurde das in der Sektion vorhandene HSV-1/E70K/EGFP ausgewählt. Die Modifikation des Virus erfolgte durch Integration einer „Enhanced Green Fluorescence Protein“ (EGFP) Fluoreszenz-Kassette zwischen die Gene UL55 und UL56, wobei das EGFP-Signal vom Elongations-Faktor-1-Alpha (EF-1 α)-Promoter veranlasst wird. Dies ermöglicht die Messung der relativen Fluoreszenz-Intensität im Flowzytometer und ist ein Indikator für die HSV-1 Replikation in Wirtszellen (Brunnemann et al. 2016).

Zum Nachweis wurde zunächst eine 12-Well-Platte mit allen drei Zelllinien HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{AgDNA} und HCT116^{APR130} angelegt. Für die geeignete Konzentration von 500.000 Zellen/ 1 ml / Well wurde eine Zellsuspension von 5×10^5 Zellen/ ml durch Ablösen und Verdünnen aus je einer konfluent bewachsenen T75-Flasche gewonnen. Vor der Infektion wurden die Platten 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um einen weitestgehend konfluenten Zellrasen zu erlangen. Die Infektion erfolgte mit HSV-1/E70K/EGFP mit 1 und 0,1 MOI, die Scheininfektion ohne Virus, wobei ein Inokulationsvolumen von 500 μ l/ well verwendet wurde und die Inkubationszeit 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ betrug. Anschließend wurde das Inokulum abpipettiert und in jede Kavität 1 ml EMEM + 10 % FKS gefüllt.

Wiederum erfolgte eine Inkubation von 12 h oder 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ und die Kontrolle der Infektion im Fluoreszenzmikroskop. Die Probennahme verlief durch Abnahme des Überstandes und Überführen in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup. Die Zellen wurden jeweils mit 1 ml PBS gewaschen, dieses durch 0,5 ml Accutase® ersetzt und bei 37 °C inkubiert bis sich alle Zellen ablösen. Zur Erzeugung einer Einzelzellsuspension wurden sie im vorher gewonnenen Überstand resuspendiert und mehrfach auf- und abpipettiert. Die Fixierung erfolgte durch Zentrifugation der Proben bei 1000 U/min für 10 min, Abnahme des Überstandes und Zugabe von 1 ml 1,0 %iger Paraformaldehyd-Lösung. Nach sorgfältiger Resuspension wurden die Proben für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgte eine erneute Zentrifugation bei 1000 U/min für 10 min, der Überstand wurde entfernt und die Zellpellets in 1 ml PBS (Raumtemperatur, RT) gewaschen, schließlich erneut bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte in 1 ml BD Stain Buffer und die Analyse aller Proben am Flowzytometer am selben Tag. Folgende Gating-Strategie wurde angewandt: Identifikation der Hauptpopulation mittels Side Scatter A (SSC-A) vs.

Forward Scatter A (FSC-A), anschließend Identifikation von EGFP-positiven bzw. -negativen Zellen.

3.2.9 Zellintegrität von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

Ein Zeichen nekrotischer Zellen sind permeable Plasmazellmembranen. Daher eignet sich der Einsatz von intrazellulären Markern zur Detektion dieser Zellen. Der BD Horizon™ Fixable Viability Stain 660 (FVS660) reagiert mit der Zellmembran, diffundiert in die Zelle und bindet kovalent an intrazelluläre Amine. In permeablen, toten Zellen bindet signifikant mehr Farbstoff und es kommt zu einem 10- bis 20-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 660 nm Wellenlänge. Die gefärbten Zellen können im Verlauf fixiert werden und halten eine gleichbleibende Viability Stain-Fluoreszenz aufrecht. Zum Nachweis wurde je eine 12-Well-Platte pro Zelllinien HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} angelegt. Für die geeignete Konzentration von 500.000 Zellen/ 1 ml / Well wurde eine Zellsuspension von 5×10^5 Zellen/ ml durch Ablösen und Verdünnen aus je einer konfluent bewachsenen T75-Flasche gewonnen. Vor der Infektion wurden die Platten 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um einen konfluenten Zellrasen zu erlangen. Die Infektion erfolgte mit HSV-1/E70K/EGFP mit 1 MOI, die Scheininfektion ohne Virus, wobei ein Inokulationsvolumen von 500 µl/ Well verwendet wurde und die Inkubationszeit 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ betrug. Anschließend wurde das Inokulum abpipettiert und in jede Kavität 1 ml EMEM + 10 % FKS gefüllt, alle Platten für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Probennahme verlief durch Abnahme des Überstandes und Überführen in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup. Die Zellen wurden jeweils mit 1 ml PBS (RT) gewaschen, dieses durch 0,5 ml Accutase® ersetzt und bei 37 °C inkubiert bis sich alle Zellen ablösten. Zur Erzeugung einer Einzelzellsuspension wurden sie im vorher gewonnenen Überstand resuspendiert und mehrfach auf- und abpipettiert.

Zunächst wurden die Positiv-Kontrollen akquiriert: Hierfür erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 1000 U/min für 10 min, Abnahme des Überstandes und Zugabe von 1 ml 4,0 %-iger Paraformaldehyd-Lösung. Nach sorgfältiger Resuspension wurden die Proben für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgte eine erneute Zentrifugation bei 1000 U/min für 10 min, der Überstand wurde entfernt und die Zellpellets in 1 ml PBS (RT) gewaschen, daraufhin erneut bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert. Bei diesem Zentrifugationsschritt wurden alle übrigen Proben ebenfalls zentrifugiert. Nachfolgend wurde bei allen Proben der Überstand entfernt und das Pellet in 1 ml

Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) gewaschen (jeweils Zentrifugation 1000 U/min 10 min). Der Farbstoff FVS660 wurde, gemäß Herstellerprotokoll, 1:4000 (aus Stock-Lösung) in DPBS verdünnt. Anschließend folgte die Resuspension der Zellpellets der zu färbenden Proben in 1 ml dieser Lösung und die Inkubation für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml BD Stain Buffer gewaschen und dann mit 1 ml 1 %-iger Paraformaldehyd-Lösung 20 min bei 4 °C fixiert. Danach kam ein erneuter Waschschrift aller Proben mit 1 ml PBS und schließlich die Wiederaufnahme in 1 ml Stain Buffer und die Analyse im Flowzytometer.

Es standen für jede Zelllinie eine ungefärbte scheininfizierte und infizierte Negativkontrolle, eine gefärbte scheininfizierte und infizierte Probe und jeweils eine scheininfizierte und infizierte Positivkontrolle zur Verfügung.

3.2.10 Nachweis der Apoptose-Induktion von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

Der genetisch programmierte Zelltod ist ein wichtiger Anhaltspunkt in der Analyse von Virus-Wirtszell-Interaktionen und bei viralen Replikationszyklen. Viren können sowohl pro- als auch antiapoptotische Signalkaskaden beeinflussen, dies gilt insbesondere für HSV-1. Besonderes Augenmerk wurde auf die Spaltung („Cleavage“) von Caspase-3 und PARP (Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase), aufgrund ihres bedeutenden Einflusses in der Signaltransduktion der Apoptose, gelegt.

Zum Nachweis wurde je eine 12-Well-Platte pro Zelllinien HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} angelegt. Für die geeignete Konzentration von 500.000 Zellen/1 ml/ Well wurde eine Zellsuspension von 5×10^5 Zellen/ ml durch Ablösen und Verdünnen aus je einer konfluent bewachsenen T75-Flasche gewonnen. Vor der Infektion wurden die Platten 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um einen konfluenten Zellrasen zu erlangen. Die Infektion erfolgte mit HSV-1/E70K/EGFP mit 1 MOI, die Scheininfektion ohne Virus, wobei ein Inokulationsvolumen von 500 µl/ Well verwendet wurde und die Inkubationszeit 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ betrug. Anschließend wurde das Inokulum abpipettiert und in jede Kavität 1 ml EMEM + 10 % FKS gefüllt, alle Platten für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 8 h wurde zu den Positivkontrollen 1 µM Staurosporin (STS) gegeben und für 16 h weiter inkubiert. Die Dosierung und Inkubationszeit für STS wurden einer Publikation über Apoptose-Induktion in HCT116 Zellen entnommen (del Solar et al. 2015).

Die Probennahme verlief durch Abnahme des Überstandes und Überführen in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup. Die Zellen wurden jeweils mit 1 ml PBS (RT) gewaschen, dieses durch 0,5 ml Accutase® ersetzt und bei 37 °C inkubiert bis sich alle Zellen ablösen. Zur Erzeugung einer Einzelzellsuspension wurden sie im vorher gewonnenen Überstand resuspendiert und mehrfach auf- und abpipettiert. Die Fixierung erfolgte durch Zentrifugation der Proben für 10 min bei 1000 U/min, Abnahme des Überstandes, Vortexen der Zellpellets und Resuspension in 250 µl Fixation/ Permeabilisation Solution (BD Cytfix/ Cytoperm Fixation/ Permeabilisation Kit). Die Proben wurden dann für 20 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend erneut Zentrifugation von 10 min bei 1000 U/min, Abnahme des Überstandes und zweifaches Waschen in 1 ml BD Perm/ Wash Buffer (1:10 in ddH₂O). Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in 100 µl BD Perm/ Wash Buffer aufgenommen und verblieben entweder ungefärbt oder mit 10 µl PE Caspase-3 Antikörper oder 10 µl PE gespaltene PARP Antikörper. Die Proben mit PE Caspase-3 Antikörper wurden lichtgeschützt 20 min auf Eis und die Proben mit PE gespaltene PARP Antikörper lichtgeschützt für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben zweimal mit je 1 ml BD Perm/ Wash Buffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 1000 U/min) wurden die Zellpellets in 1 ml BD Perm/ Wash Buffer resuspendiert und umgehend im Flowzytometer analysiert. Folgende Gating-Strategie wurde angewandt: Identifikation der Hauptpopulation mittels Side Scatter A (SSC-A) vs. Forward Scatter A (FSC-A), anschließend Identifikation der PE-positiven Zellen. Die Grenzen wurden anhand der Positiv- bzw. Negativkontrollen definiert.

3.2.11 Überprüfung des Zellzyklus von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

DNA-Schädigung führt zum Arrest des Zellzyklus, dem Versuch einer Reparatur oder dem programmierten Zelltod. Auch im Zusammenhang mit der Infektion mit HSV-1 belegen publizierte Vorarbeiten die Bedeutung des Zellzyklus und der G1-/S-Progression im Zusammenhang mit einer erhöhten Virusreplikation (Colao et al. 2017). Zum Nachweis wurde je eine 12-Well-Platte pro Zelllinien HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{AgDNA} und HCT116^{APR130} angelegt. Für die geeignete Konzentration von 500.000 Zellen/ 1 ml/ Well wurde eine Zellsuspension von 5×10^5 Zellen/ ml durch Ablösen und Verdünnen aus je einer konfluent bewachsenen T75-Flasche gewonnen. Vor der Infektion wurden die Platten 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um einen konfluenten Zellrasen zu erlangen. Zur Synchronisation des Zellzyklus wurden die

Zellen für weitere 24 h mit EMEM + 0,1 bzw. 1 % FKS bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die nicht-synchronen Zellen wurden diesem FKS-Mangel nicht unterzogen. Die Infektion erfolgte mit HSV-1/Kos mit 1 MOI, die Scheininfektion ohne Virus, wobei ein Inokulationsvolumen von 500 µl/ Well verwendet wurde und die Inkubationszeit 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ betrug. Anschließend wurde das Inokulum abpipettiert und in jede Kavität 1 ml EMEM + 10 % FKS gefüllt, alle Platten für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Probennahme (auf Eis) verlief durch Abnahme des Überstandes und Überführen in ein 2 ml Eppendorf-Cup. Die Zellen wurden jeweils mit 1 ml PBS (RT) gewaschen, dieses durch 0,5 ml Accutase® ersetzt und bei 37 °C inkubiert bis sich alle Zellen ablösten. Zur Erzeugung einer Einzelzellsuspension wurden sie im vorher gewonnenen Überstand resuspendiert und mehrfach auf- und abpipettiert.

Die Zellen wurden bei 1300 U/min 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Pellets in je 1 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurden die Pellets in je 100 µl kaltem PBS aufgenommen und daraufhin in 2 ml 80 %-igen Ethanol fixiert. Dieser wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Eppendorf-Cups vorsichtig gevortext. Die weitere Fixierung erfolgte für mindestens 1 h bei -20 °C. Anschließend kam ein erneuter Zentrifugationsschritt von 1300 U/min für 5 min und die Abnahme des Überstandes. Die Pellets wurden in 334 µl RNaseA-Lösung (RNaseA Stock: 10 mg/ml ddH₂O; pro Probe 333 µl PBS + 1 µl RNaseA) resuspendiert und für 1 h bei RT inkubiert. Zuletzt Zugabe von 164 µl Propidium-Iodid (PI)-Lösung (PI-Stock: 50 µg /ml PBS; 10 µl PI + 154 µl PBS) zu jeder Probe und die umgehende Flowzytometer-Analyse.

Folgende Gating-Strategie wurde angewandt: Identifikation der Hauptpopulation mittels SSC-A vs. FSC-A, anschließend Ausschluss von Dupletten durch PI(FL-2)-A (Area) vs. PI(FL-2)-W (Width). Die Analyse der Zellzyklus-Phasen subG1, G1, S und G2 erfolgte anhand des PI-Signals durch die ModFit Lite 5.0 Software.

3.2.12 Nachweis der Replikation von HSV-1 in HCT116 Zellen mittels Fluoreszenz

Zum Nachweis wurde eine 24-Well-Platte mit allen drei Zelllinien HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} auf sterilen, runden Deckgläschen angelegt. Für die geeignete Konzentration von 300.000 Zellen/ 500 µl/ Well wurde eine Zellsuspension von 6 x 10⁵ Zellen/ ml durch Ablösen und Verdünnen aus je einer konfluent bewachsenen T75-Flasche gewonnen. Vor der Infektion wurde die Platte 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um einen konfluenten Zellrasen zu erlangen. Die Infektion

erfolgte mit HSV-1/E70K/EGFP mit 1 und 0,1 MOI, die Scheininfection ohne Virus, wobei ein Inokulationsvolumen von 250 μ l / Well verwendet wurde und die Inkubationszeit 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ betrug. Anschließend wurde das Inokulum abpipettiert und in jede Kavität 500 μ l EMEM + 10 % FKS gefüllt. Wiederum erfolgte eine Inkubation von 12 h oder 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ und die Kontrolle der Infektion im Fluoreszenzmikroskop. Zur Fixierung der Proben folgte das vorsichtige Waschen mit 0,5 ml PBS, welches durch 250 μ l 4%-iges Paraformaldehyd ersetzt wurde. Die Inkubation der Platte fand 20 min auf Eis statt und anschließend wurden die Proben zweimal mit 0,5 ml PBS gewaschen. Zur Zellkernfärbung wurden 250 μ l Hoechst-33342 (1:500 in PBS) zugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert, danach wurden die Proben erneut zweimal mit 0,5 ml PBS gewaschen. Die Entnahme der Deckgläschen erfolgte mit einer Pinzette, die Deckgläschen wurden kurz in ddH₂O getaucht und die restliche Flüssigkeit abgetupft. Die Montierung der Proben auf Objektträgern geschah mittels eines Tropfens Einbettmedium, die Auswertung der Proben wurde am Observer Z.1 Mikroskop vollzogen.

3.2.13 qPCR von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

Zum Nachweis wurde je eine 12-Well-Platte pro Zelllinien HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{AgDNA} und HCT116^{APR130} angelegt. Für die geeignete Konzentration von 500.000 Zellen/1 ml/ Well wurde eine Zellsuspension von 5 x 10⁵ Zellen/ml durch Ablösen und Verdünnen aus je einer konfluent bewachsenen T75-Flasche gewonnen. Vor der Infektion wurden die Platten 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um einen konfluenten Zellrasen zu erlangen. Die Infektion erfolgte mit HSV-1/Kos mit 1 MOI, die Scheininfection ohne Virus, wobei ein Inokulationsvolumen von 500 μ l/ Well verwendet wurde und die Inkubationszeit 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ betrug. Anschließend wurde das Inokulum abpipettiert und in jede Kavität 1 ml EMEM + 10 % FKS gefüllt. Wiederum erfolgte eine Inkubation für 12 h und 36 h bei 37°C und 5 % CO₂ und die Kontrolle der Infektion im Mikroskop. Die Probennahme verlief durch Zentrifugation bei 1637 U/min Abnahme des Überstandes und Überführen in je ein 1,5 ml Eppendorf-Cup. Pro Eppendorf-Cup wurden 500.000 Zellen angestrebt. Die zentrifugierten Zellen wurden in 200 μ l PBS pro Eppendorf-Cup resuspendiert. Hierzu wurde jeweils 20 μ l QIAGEN Protease und 200 μ l Puffer AL (QIAGEN) gegeben. Die nachfolgenden Schritte der Inkubation, Zentrifugation bzw. DNA-Extraktion wurden mittels QIAGEN-DNA-Test-Kit (Spin Protocol) durchgeführt. Die DNA-Menge wurde am NanoDrop™ 1000 bestimmt und

die gleichen Mengen DNA aus Zellen und Überständen wurden dann zur real-time Analyse mittels QuantiTectSYBR Green PCR Kit in Triplikaten verwendet. Der Forward (5'-ACGACGACGTCCGACGGCGA-3') und Reverse (5'-GTGCTGGTGCTGGACGACAC-3') Primer vervielfältigen ein Genfragment (278 bp Länge) in der UL42 Region von HSV-1. Deren Konzentration betrug 0,5 µM in 10 µl Gesamtvolumen. Die Real-time Analyse wurde mittels PikoReal 96 Cycler gemäß des Herstellerprotokolls vorgenommen. Das PCR Programm enthielt 40 Zyklen Denaturierung für 15 Sekunden bei 95 °C, gefolgt von Annealing für 30 Sekunden bei 60 °C und Extension für 30 Sekunden bei 72 °C. Die Beurteilung der viralen DNA Konzentration erfolgte auf Basis etablierter Standardkurven.

3.2.14 Western-Blot von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

Die Lysate wurden in Jena hergestellt und anschließend an das Institut für Toxikologie der Universität Mainz geschickt und die Western Blots dort durchgeführt. Das Erzeugen der Lysate ist daher nachfolgend erläutert. Die mit HSV-1-infizierten und scheininfizierten HCT116 Zellen wurden 24 h p. i. mit je 1 ml PBS gewaschen und in 15 ml Falcon-Tubes überführt. Anschließend folgte die Zentrifugation bei 1300 U/min, 5 min, bei 4 °C. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf-Cups überführt. Dann wurden die Proben bei 13300 U/min, 5 min, 4 °C zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Je nach Pelletgröße wurden 80 - 140 µl NET-N Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitor zugegeben und die Proben 25 min inkubiert. Es folgte die Sonifikation der Proben bei einer Amplitude von 40 und 10 Pulsstößen und die Zentrifugation bei 13300 U/min, 25 min, bei 4 °C. Die Überstände wurden in ein neues Eppendorf-Cup überführt und bei - 80 °C eingefroren. Für die Proteinbestimmung nach Bradford mussten die Proben mit Aqua_{dest} 1:10 vorverdünnt, in einer 96-Well-Platte aufgetragen und bei 595 nm Wellenlänge gemessen werden. Jede Probe wurde hierbei doppelt bestimmt. Nach erfolgter Messung wurde die Proteinmenge berechnet. Pro Gel werden 30-40 µg Protein benötigt, um sie sicher detektieren zu können. Anschließend wurde Probenpuffer je nach Probenvolumen zugegeben und die Proben bei 95 °C für 5 min erhitzt. Die erzeugten Lysate wurden dann bei - 80 °C gelagert.

3.2.15 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mittels GraphPad Prism 8.0 Software. Um den Mittelwert von zwei Gruppen zu vergleichen wurde der t-Test mit dem Mann-Whitney Post-Test genutzt, sofern die Werte nicht normalverteilt waren und eine kleine Stichprobe vorlag. Das Vergleichen von Mittelwerten zweier Stichproben aus mehreren Gruppen zu einem definierten Zeitpunkt wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA) realisiert. Bei signifikanten Ergebnissen wurde anschließend der Tukey's Post-Test durchgeführt, um die Gruppenunterschiede zu detektieren. Als signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ bewertet und diese mit einem * gekennzeichnet. Hochsignifikante Ergebnisse wurden dementsprechend mit ** bei $p < 0,01$ oder *** bei $p < 0.001$ markiert.

IV. Ergebnisse

4.1 Replikationskinetik von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

Da keine Daten zur HSV-1 Infektion in dem generierten Zellkultursystem mit HCT116^{ΔPR130}, HCT116^{ΔgDNA}, sowie HCT116^{Wildtyp} Zellen bestehen, wurde zunächst eine HSV-1 Replikationskinetik für drei Zelllinien erstellt. Zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24, 36, 48, 72 h p. i. wurden die infizierten Zellen isoliert und die Viruskonzentration im Überstand bzw. zellassoziert mit HCT116 Zellen mittels TCID₅₀ Methode bestimmt. Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse wurden jeweils aus drei biologischen Replikaten und je vier technischen Replikaten errechnet. Sie zeigt die zellassozierte Viruskonzentrationen (in bzw. an den Zellen).

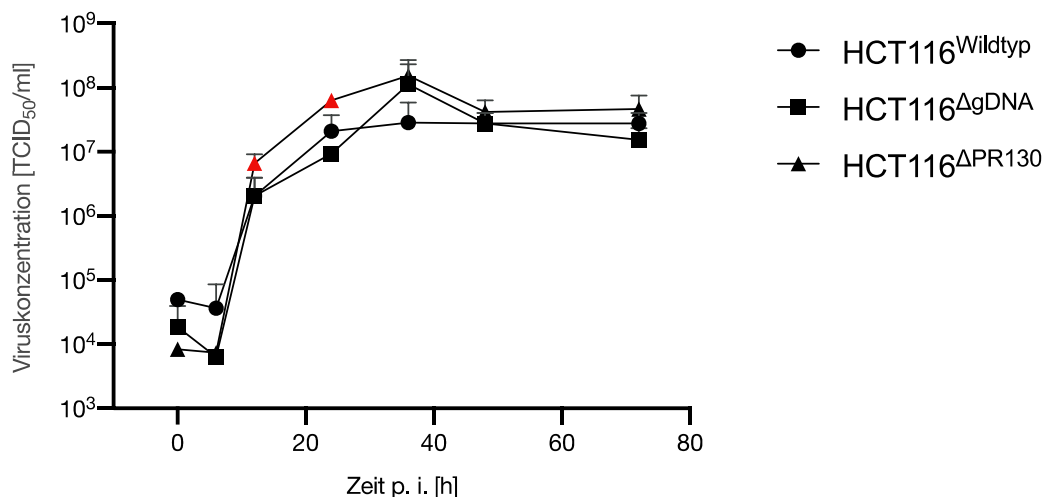


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf einer HSV-1 Infektion in HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} Zellen (zellassozierte Viruskonzentrationen), dargestellte TCID₅₀-Werte beruhen auf 3 biologischen Einzelexperimenten und stellen Durchschnittswerte ± SD dar, MOI = 5, die rot markierten Zeitpunkte sind den nachfolgenden Abbildungen detaillierter zu entnehmen.

Nach 6 h ist ein Abfall der TCID₅₀/ ml zu beobachten, wobei es sich um den Zeitraum der Adhäsion und Adsorption des Virus handelt. Darauf folgt der stärkste Anstieg zwischen 6 und 12 h. Einen signifikanten Unterschied ergab der Zeitpunkt 24 h p. i. (HCT116^{Wildtyp} M: 2,09x10⁷ TCID₅₀/ ml, HCT116^{ΔgDNA} M: 9,35x10⁶ TCID₅₀/ ml, HCT116^{ΔPR130} M: 6,32x10⁷ TCID₅₀/ ml, Signifikanz: p = 0,02 (one-way ANOVA)) und der höchste Wert wurde nach 36 h erreicht (HCT116^{Wildtyp} M: 2,87x10⁷ TCID₅₀/ ml, HCT116^{ΔgDNA} M: 1,13x10⁸ TCID₅₀/ ml, HCT116^{ΔPR130} M: 1,54x10⁸ TCID₅₀/ ml). Zur besseren Übersicht der zellassozierten Viruskonzentration der HCT116 Zellen 12 und 24 h p. i. dient die nachfolgende Abbildung 10. Die Viruskonzentration im Überstand (nicht zellassoziert) zeigt, dass der Virustiter bei HCT116^{ΔPR130} Zellen zu Beginn am

Niedrigsten ist und im Verlauf am Höchsten steigt. Im Überstand ist die Zeit des schnellsten Anstiegs zwischen 12 und 24 h p. i., hier kommt es zur Freisetzung von HSV-1. Der zeitliche Verlauf ist in der Abbildung 11 abgedruckt.

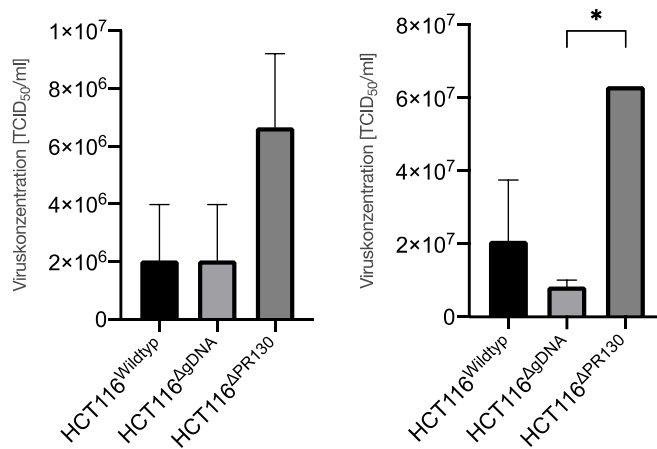


Abbildung 10:

links:

Viruskonzentration zellassoziiert (HCT116 Zellen) 12 h p. i., die entsprechende Zelllinie ist der Grafik zu entnehmen;

rechts:

Viruskonzentration zellassoziiert (HCT116 Zellen) 24 h p. i., one-way ANOVA, Tukey's Post-Test: $p = 0,02$ (*).

Zum Zeitpunkt 36 h p. i. ist die Konzentration im Überstand am höchsten (HCT116^{Wildtyp} M: $3,4 \times 10^6$ TCID₅₀/ ml, HCT116^{ΔgDNA} M: $6,4 \times 10^6$ TCID₅₀/ ml, HCT116^{ΔPR130} M: $1,7 \times 10^7$ TCID₅₀/ ml) und im weiteren Verlauf ist die Konzentration bei HCT116^{ΔPR130} Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzelllinien deutlich höher.

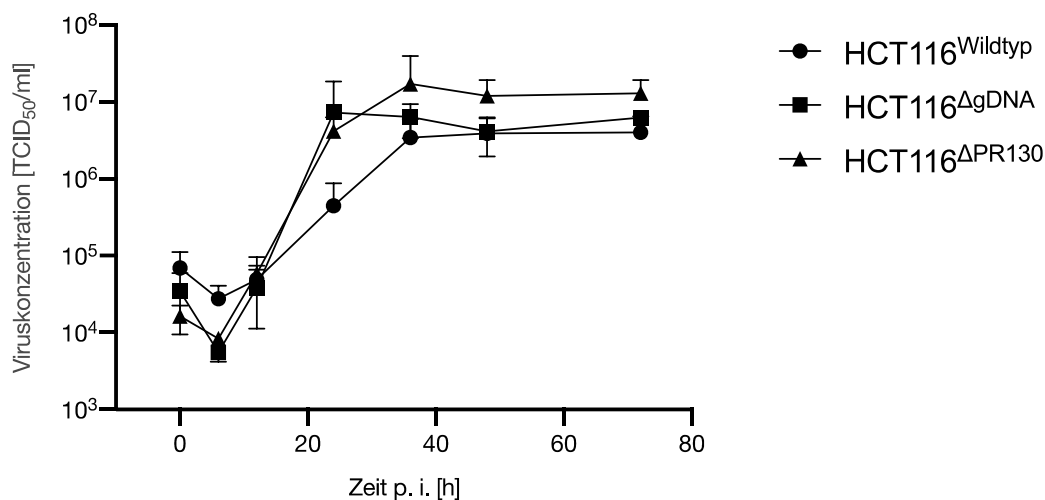


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf einer HSV-1 Infektion im Überstand von HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} Zellen, MOI = 5, dargestellte TCID₅₀-Werte beruhen auf 3 biologischen Einzelerperimenten und stellen Durchschnittswerte ± SD dar.

4.2 Metabolische Aktivität (WST-1)

Die metabolische Aktivität der Zellen nach Infektion mit HSV-1 (MOI = 5) wurde mittels Cell Proliferation Agent (Roche®) untersucht und zeigte signifikante Ergebnisse innerhalb der ersten 12 h p. i. Besonders auffällig ist, dass die HCT116^{ΔPR130} Zellen

innerhalb der ersten 6 h eine gesteigerte Aktivität von über 100% in Relation zu ihren nicht-infizierten Kontrollen aufweisen. Die Werte 3 h p. i. liegen im Durchschnitt bei 89,8 % (HCT116^{Wildtyp}), 72,8 % (HCT116^{ΔgDNA}) und 112,6 % (HCT116^{ΔPR130}), $p = 0,0006$. Nach 6 h p. i. sind sie bereits auf 52,8 % (HCT116^{Wildtyp}) und 68,2 % (HCT116^{ΔgDNA}) abgefallen, wohingegen HCT116^{ΔPR130} immer noch bei 104,0 % liegt, $p = 0,0001$. Nach 12 h p. i. sind nur 41,9 % von HCT116^{Wildtyp} aktiv, 38,9 % von HCT116^{ΔgDNA} und 76,3 % von HCT116^{ΔPR130}, $p = 0,0001$. Die statistische Analyse erfolgte mittels one-way ANOVA und dem Tukey's Post-Test. Die effiziente Replikation von HSV-1 scheint mit der mitochondrialen Aktivität in Zusammenhang zu stehen. Die PR130-negativen Zellen weisen im Zuge einer Virusinfektion mit HSV-1 in den 12 h p. i. im Vergleich zu den Kontrollen vermehrte metabolische Aktivität auf. Diese Daten sind der Abbildung 12 zu entnehmen.

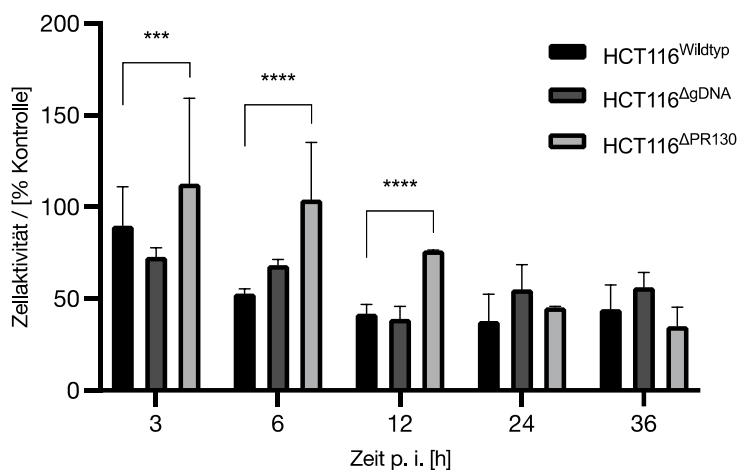


Abbildung 12: WST-1 Test von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA}, HCT116^{ΔPR130}), MOI = 5, die Zellaktivität ist in Prozent zu den jeweiligen Kontrollen angegeben; dargestellte Werte beruhen auf mind. 10 biologischen Replikaten und stellen Durchschnittswerte \pm SD dar, Signifikanzen basieren auf one-way ANOVA mit Tukey's Post-Test, 3 h: (***) $p = 0,0006$, 6 h: (****) $p < 0,0001$, 12 h: (****) $p < 0,0001$.

4.3 Quantitative PCR (qPCR) von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

Zur Verifizierung der bisher dargestellten Ergebnisse wurden zwei Zeitpunkte ausgewählt, in denen sich deutliche Unterschiede in der Viruskonzentration zwischen den Zelllinien darstellten. Zum einen ist nach 12 h p. i. der stärkste Anstieg in der viralen Replikationskinetik festzustellen, zum anderen liegt der höchste Virusertrag nach 36 h p. i. vor. Die qPCR konnte nachweisen, dass 12 h und 36 h p. i. eine höhere Konzentration von HSV-1 in den HCT116^{ΔPR130} Zellen besteht. Hierfür wurden die HSV-1 Genomäquivalente pro ng isolierter DNA als Parameter herangezogen. Nach 12 h p. i. lässt sich zunächst nur ein Trend erkennen (HCT116^{Wildtyp} M: 1325, HCT116^{ΔgDNA} M: 1607, HCT116^{ΔPR130} M: 2247 Kopien), dies ist in der Abbildung 13

dargestellt. Der Zeitpunkt nach 36 h zeigt wiederum eine klare Signifikanz (HCT116^{Wildtyp} M: 15860, HCT116^{ΔgDNA} M: 18070, HCT116^{ΔPR130} M: 32990 Kopien, $p = 0,001$ bzw. $p = 0,0007$) und ist der Abbildung 14 zu entnehmen. Die Viruskonzentration im Überstand hingegen wies wenig messbare HSV-1 Genome 12 h p. i. auf und 36 h p. i. ist nur ein verhältnismäßig geringes Signal zu detektieren, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien.

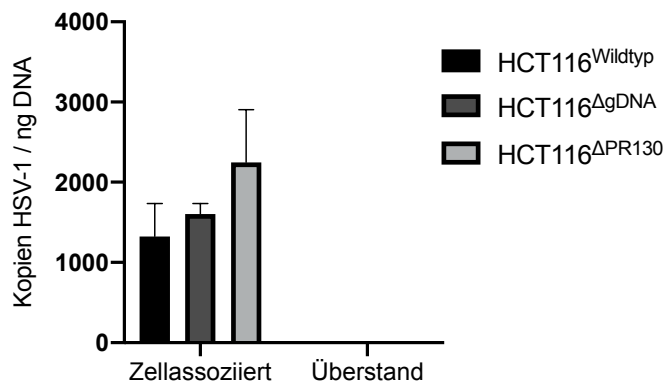


Abbildung 13: qPCR der HSV-1 Genomäquivalenten pro ng DNA isoliert aus HCT116 Zellen bzw. dem Überstand nach 12 h p. i., MOI = 1, zu sehen sind Daten aus einem repräsentativen Experiment mit drei parallelen Ansätzen pro Zelllinie \pm SD.

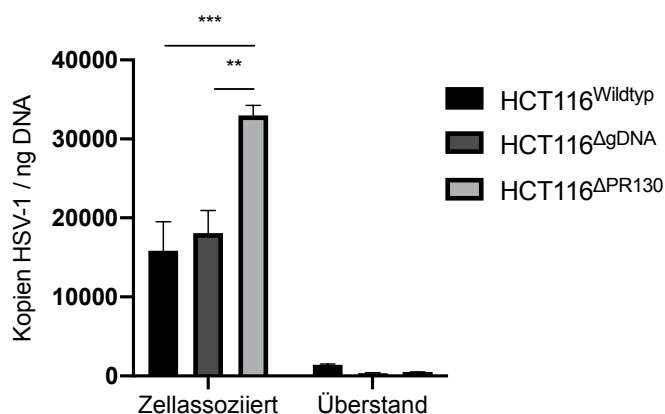


Abbildung 14: qPCR der HSV-1 Genomäquivalenten pro ng DNA isoliert aus HCT116 Zellen bzw. dem Überstand nach 36 h p. i., MOI = 1, zu sehen sind Daten aus einem repräsentativen Experiment mit drei parallelen Ansätzen pro Zelllinie \pm SD, one-way ANOVA, Tukey's Post-Test: (**) $p = 0,001$, (***) $p = 0,0007$.

Diese Daten sind anders als die Ergebnisse der Virustitration der Überstände, doch lassen sich die Experimente auch nur bedingt miteinander vergleichen, da die qPCR eine sensitivere Methode darstellt. Die Unterschiede zwischen HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} sind ungeachtet dessen eindeutig.

4.4 Immunfluoreszenz von HSV-1/E70K/EGFP-infizierten HCT116 Zellen

Zur Visualisierung der Infektion von HCT116 Zellen wurde ein rekombinantes HSV-1, namens Green-Fluorescence-Protein-HSV-1 (HSV-1/E70K/EGFP) genutzt. Dieses Protein wird exprimiert, wenn sich das Virus repliziert und kann mittels Fluoreszenz-Mikroskopie detektiert werden. Es wurden die Zeitpunkte 12 h und 24 h p. i. (MOI = 1) ausgewählt, Proben isoliert und mittels Observer Z.1 / AxioCam Mono 503 (Zeiss®)

analysiert. Zum Erstellen der Bilder wurde der Alexa-488 Kanal (Wellenlänge 493-520 nm) zur Darstellung des GFP-Signals verwendet. Die Zellkerne wurden jeweils mittels Hoechst-Färbung gefärbt und in Kombination mit dem GFP-Signal wird ersichtlich, dass sich HSV-1 im Zellkern repliziert. Die Hoechst-Färbung wurde im DAPI-Kanal (Wellenlänge 358-463 nm) dargestellt. Bereits 12 h p. i. lässt sich feststellen, dass die Anzahl an fluoreszierenden Zellen in Proben mit HCT116^{ΔPR130} höher als in den Kontrollen (HCT116^{ΔgDNA}, HCT116^{Wildtyp}) ist. Zudem ist auch die Fluoreszenz-Intensität dieser Zellen sichtbar höher. In der Abbildung 15 wird der Zeitpunkt 12 h p. i. dargestellt. Die höhere Fluoreszenz-Intensität lässt sich ähnlich 24 h p. i. beobachten. Aufgrund des stärker fortgeschrittenen zytopathischen Effekts 24 h p. i. und den damit einhergehenden Lücken im Zellrasen werden die Bilder in der Abbildung 16 in stärkerer Vergrößerung dargestellt.

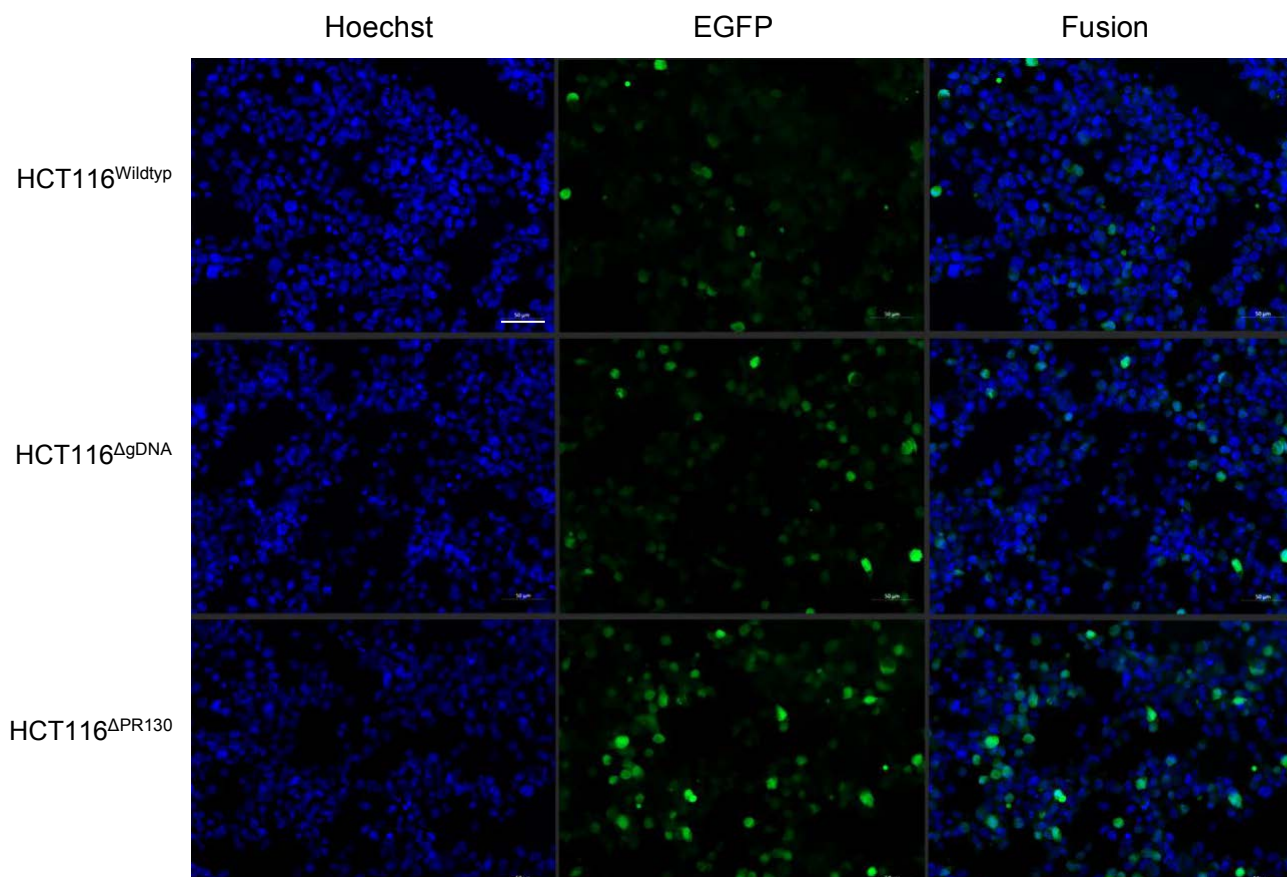


Abbildung 15: HSV-1/E70K/EGFP Infektion von HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA}, HCT116^{ΔPR130}) nach 12 h, MOI = 1, **links:** Hoechst-Zellkernfärbung, **Mitte:** EGFP-positive Zellen, **rechts:** Fusion von Hoechst + EGFP Bildern, Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

Zum Zeitpunkt 24 h p. i. zeigt sich, dass bei Infektion von HCT116^{ΔPR130} Zellen eine höhere Fluoreszenz-Intensität messbar ist. Nachdem zur EGFP-Expression eine HSV-

1 Replikation notwendig ist, kann demnach von einer gesteigerten Virusvermehrung in HCT116^{ΔPR130} Zellen gesprochen werden. Die Abbildung 17 liefert Bilder von nicht-infizierten Kontrollen. Hier wird sichtbar, dass eine Eigenfluoreszenz aller Zellen existiert, welche vor allem im Alexa-Fluor 488 Kanal zu detektieren ist. Diese ist von der GFP-Fluoreszenz durch das HSV-1/E70K/EGFP abzugrenzen. Von jeder Zelllinie wurden jeweils sechs Präparate erstellt und im Mikroskop analysiert. Die aussagekräftigsten Darstellungen wurden verwendet, eine statistische Aufarbeitung der Daten ist in diesem Format nicht möglich. Die Beurteilung der Fluoreszenz-Mikroskop Präparate bestätigt die übrigen Daten, wonach bei HSV-1-infizierten HCT116^{ΔPR130} Zellen in den ersten 24 h eine höhere Viruskonzentration als bei den Kontrollzellen vorliegt.

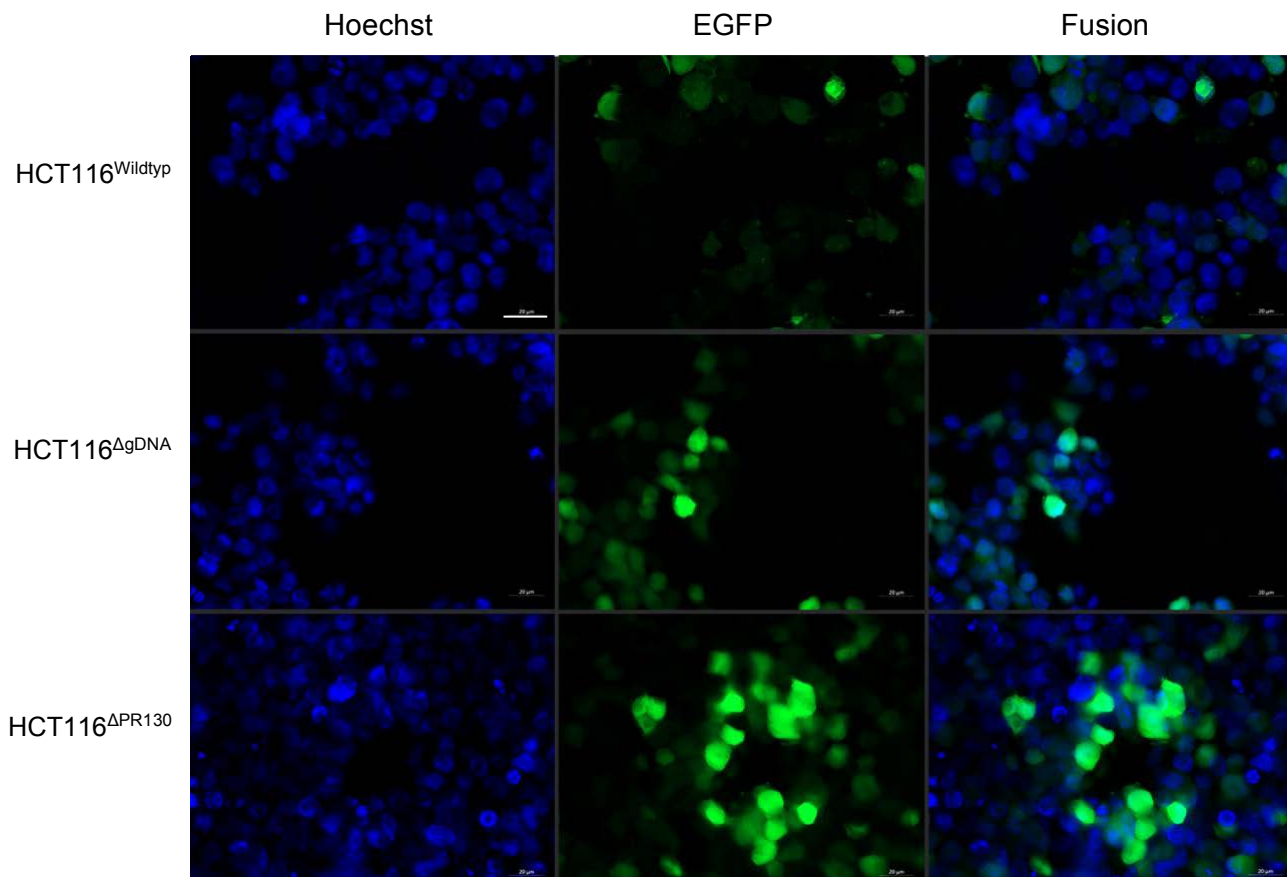


Abbildung 16: HSV-1/E70K/EGFP Infektion von HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA}, HCT116^{ΔPR130}) nach 24 h, **links:** Hoechst-Zellkernfärbung, **Mitte:** EGFP-positive Zellen, **rechts:** Fusion von Hoechst + EGFP Bildern, Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

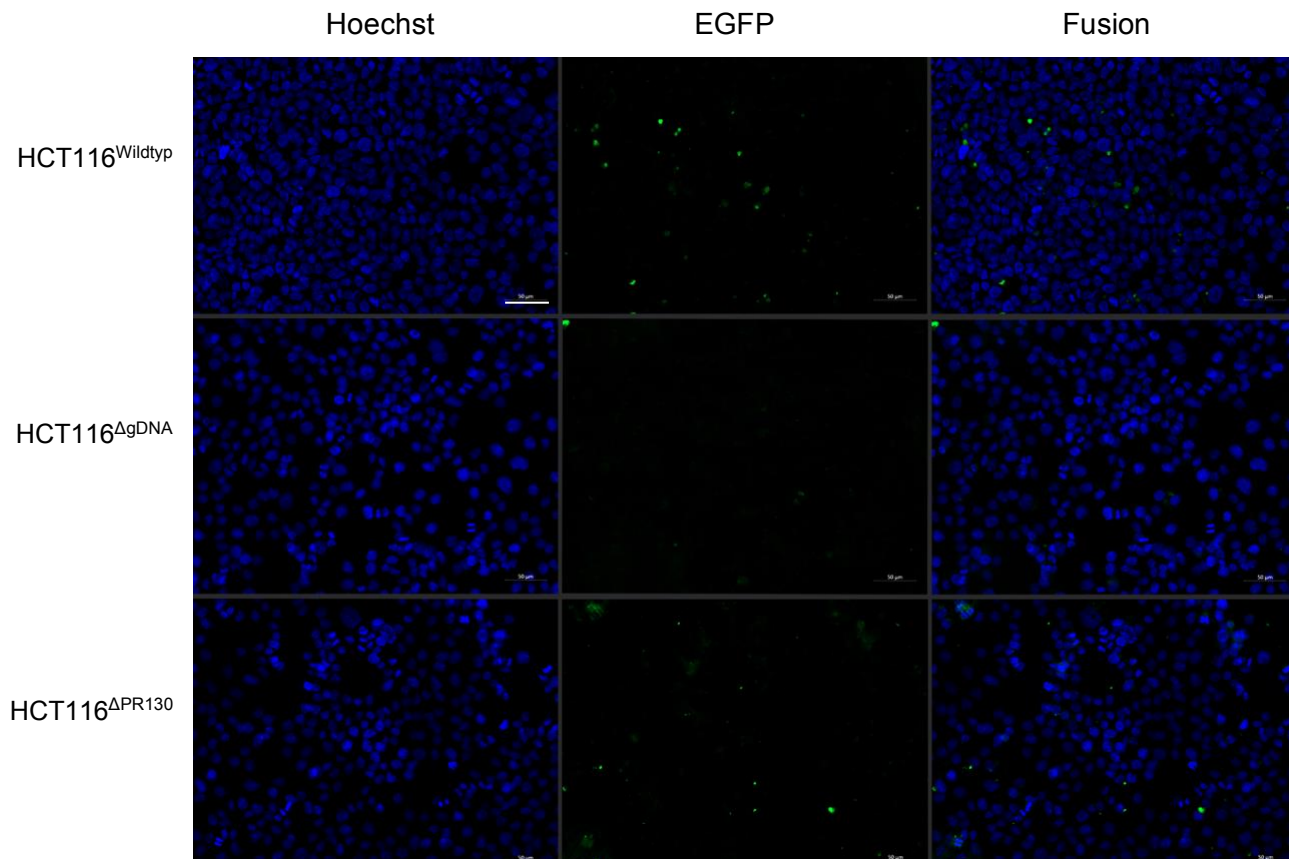


Abbildung 17: Nicht-infizierte Kontrollen: HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA}, HCT116^{ΔPR130}) nach 24 h, **links:** Hoechst-Zellkernfärbung, **Mitte:** EGFP-Signal der Zellen (Eigenfluoreszenz), **rechts:** Fusion von Hoechst + EGFP Bildern, Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

4.5 Messung HSV-1/E70K/EGFP in HCT116 Zellen mittels Flowzytometrie

Zur Quantifizierung der Expression des GF-Proteins von HSV-1/E70K/EGFP ist die Flowzytometrie die geeignete Methode. Hierbei werden die Zellen durch einen Laser detektiert und anhand der Form und Größe sortiert. Durch die Messung des Green Fluorescence Protein lässt sich die Virusreplikation analysieren. Es wurde der Zeitpunkt 12 h p. i. (MOI = 1) ausgewählt, um die Zahl der EGFP-positiven Zellen und die mediane Fluoreszenz-Intensität zu messen. Hier zeigte sich eine klare Tendenz: eine größere Anzahl an EGFP-positiven Zellen bei HCT116^{ΔPR130} (61%) im Vergleich zu den Kontrollen HCT116^{Wildtyp} (37%) und HCT116^{ΔgDNA} (35%). Ein signifikanter Unterschied (one-way ANOVA) in der medianen Fluoreszenz-Intensität bestand bei den Zellen von HCT116^{ΔPR130} (M: 17990, p = 0,007, p = 0,004) in Relation zu den übrigen HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp} M: 8920, HCT116^{ΔgDNA} M: 7630). Diese Messungen sind in der Abbildung 18 dargestellt. Die Daten aus der Fluoreszenzmikroskopie spiegeln sich daher auch in der Flowzytometrie-Messung

wider und decken sich mit den bereits gemessenen Viruskonzentrationen durch die TCID₅₀-Methode.

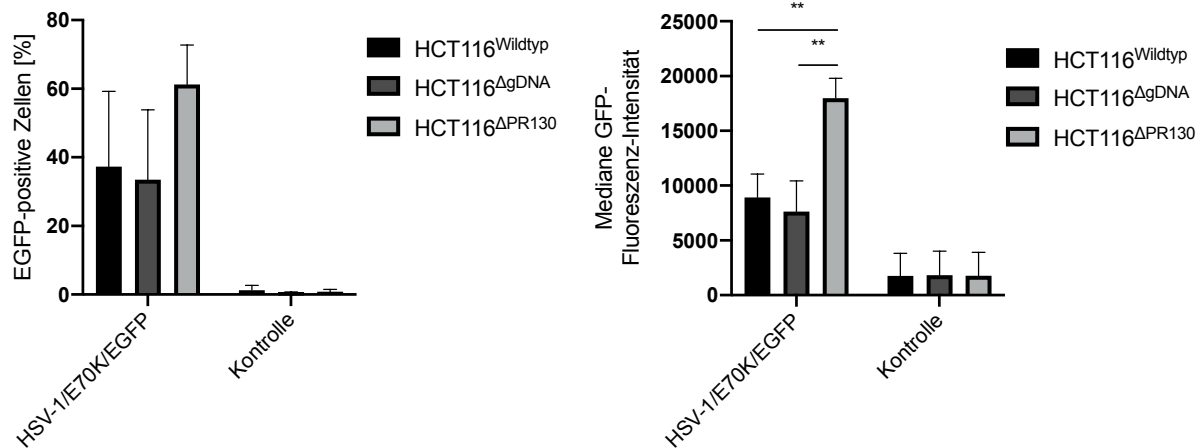


Abbildung 18: 24 h Inkubation von HSV-1/E70K/EGFP-infizierten HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130}) und nicht-infizierte Kontrollen, MOI = 1, ausgewertet im Flowzytometer, **links:** Messung der EGFP-positiven Zellen in Prozent, **rechts:** Messung der medianen GFP-Fluoreszenz-Intensität aller drei Zelllinien, zu sehen sind Daten aus 3 biologischen Experimenten ± SD, one-way ANOVA, Tukey's Post-Test: (**) $p = 0,007$, (**) $p = 0,004$.

4.6 Apoptose von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

4.6.1 DNA-Fragmentation in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

Zur weiteren Charakterisierung der Infektion wurde die Fragmentierung der genomischen DNA untersucht. Zum Zeitpunkt 24 h p. i. (MOI = 1) wurde die DNA von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen isoliert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Zum Zeitpunkt 24 h p. i. sind keine Anzeichen für eine DNA Fragmentierung in den einzelnen Proben festzustellen. Die in Abbildung 19 dargestellten Daten zeigen, dass vermutlich keine Apoptose durch HSV-1 in den HCT116 Zellen induziert wird.

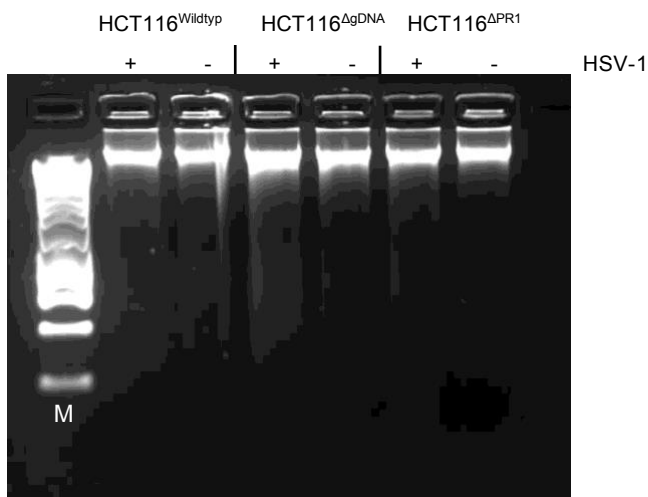


Abbildung 19: DNA-Fragmentation genomischer DNA in HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA}, HCT116^{ΔPR130}) als Zeichen des programmierten Zelltods, + = HSV-1-infiziert, - = nicht-infizierte Kontrolle, Marker (M) = Komigrationsstandard (100 Basenpaare), zu sehen ist ein repräsentatives Experiment.

4.6.2 Nachweis der aktivierten Caspase-3 und PARP-Spaltung in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

Zur Analyse apoptotischer Prozesse wurde die Aktivierung von Caspase-3 und die Spaltung PARP (Poly-(ADP-Ribose-)Polymerase) in den drei HCT116 Zelllinien untersucht. Als Zeitpunkt wurde 24 h p. i. ausgewählt und die Infektionsdosis von 1 MOI. Infolge der Infektion mit HSV-1 kommt es nicht zu einer vermehrten Aktivierung bzw. Spaltung der beiden Effektor-Kinasen, dargestellt als Anteil positiver Zellen in Prozent (HCT116^{Wildtyp}: akt. Casp. 3: 2,35 % / PARP-Spaltung: 0,84 %, HCT116^{ΔgDNA}: akt. Casp. 3: 1,51 % / PARP-Spaltung: 1,51 %, HCT116^{ΔPR130}: akt. Casp. 3: 1,62 % / PARP-Spaltung: 1,56 %). Die Positivkontrollen wurden durch 16 h Inkubation mit 1 μM Staurosporin (STS) erzeugt, die hiermit behandelten Zellen zeigen einen zunehmenden Anteil an Zellen, bei denen Caspase-3 aktiviert und PARP gespalten wird. Interessanterweise sind HCT116^{ΔPR130} Zellen anfälliger für STS; im Vergleich zu HCT116^{Wildtyp} und HCT116^{ΔgDNA} Zellen wird doppelt so viel Caspase-3 aktiviert und PARP gespalten (10,6 % bzw. 10,8 % bei HCT116^{ΔPR130} vs. 5,7 % bzw. 6,1 % bei HCT116^{Wildtyp} vs. 5,9 % bzw. 5,7% bei HCT116^{ΔgDNA}). Zu sehen sind diese Daten in der Abbildung 20.

Daraufhin wurde die Wirkung von HSV-1 und STS auf HCT116^{ΔPR130} in einem gemeinsamen Ansatz geprüft: durch STS induzierte Spaltung von Caspase-3 und PARP im Zuge einer Infektion mit HSV-1. Wider der Erwartung, dass vermehrt Zellen dem programmierten Zelltod erliegen, scheint HSV-1 die induzierte Apoptose zu hemmen. Die Spaltung von Caspase-3 wird durchschnittlich um 56,9 % (one-way ANOVA, $p < 0,05$), von PARP um 36,7 % reduziert. Es ist erkennbar, dass HSV-1 in HCT116^{ΔPR130} Zellen wahrscheinlich keine Apoptose induziert, sondern antiapoptotisch wirkt. Die Abbildung 21 zeigt die Anteile apoptotischer Zellen im Zuge einer Behandlung mit STS und der Infektion mit HSV-1.

Die Abnahme der Viruskonzentration von HSV-1/E70K/EGFP in HCT116^{ΔPR130} Zellen bei 16 h Behandlung mit STS ist sowohl mittels Flowzytometrie als auch in TCID₅₀-Experimenten nachweisbar. Im Zuge der Infektion und anschließender STS-Behandlung lassen sich 18,9 % weniger EGFP-positive Zellen nachweisen (HSV-1/E70K/EGFP: M: 54,6 % vs. + STS: M: 35,6 %, t-Test, $p = 0,002$). Dies ist der Abbildung 22 zu entnehmen.

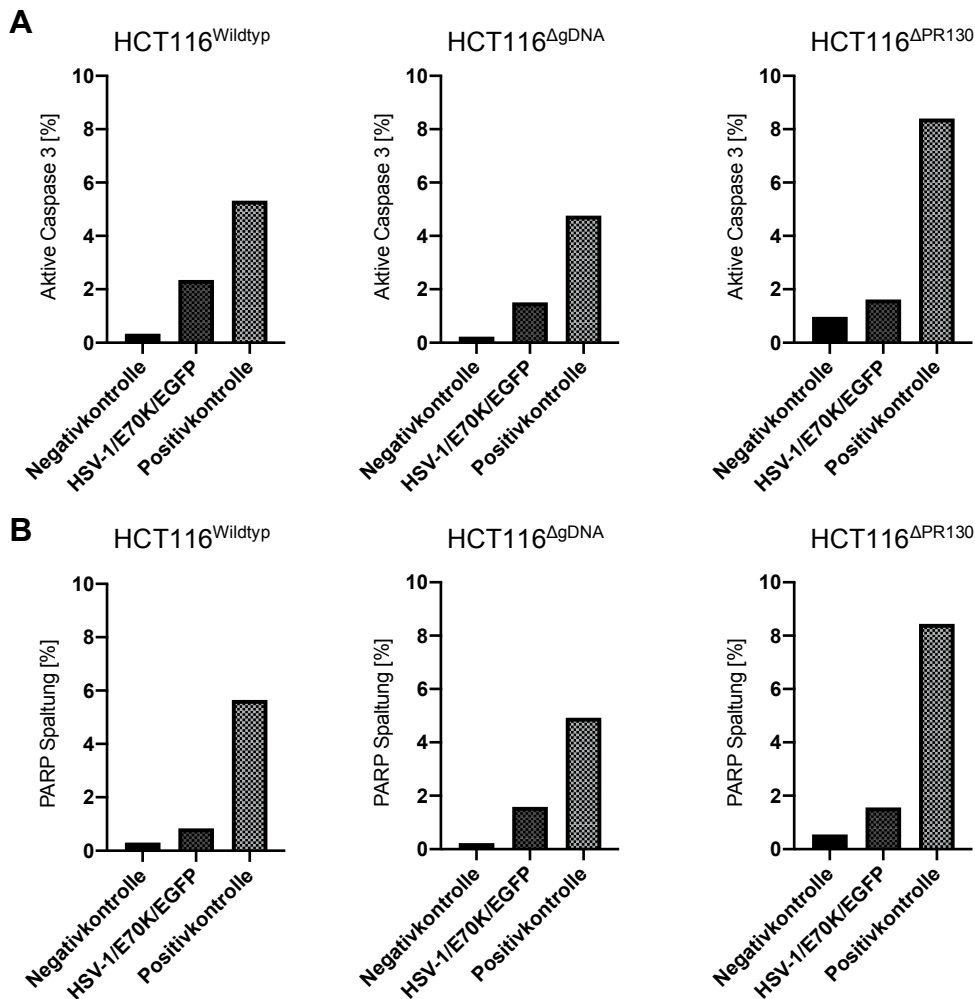


Abbildung 20: Prozentualer Anteil an apoptotischen Zellen von nicht-infizierten und HSV-1-infizierten HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} Zellen. Negativ-Kontrollen sind nicht-infizierte Zellen, Proben sind HSV-1/E70K/EGFP-infizierte Zellen, Positiv-Kontrollen mit STS-Behandlung für 16 h. Bestimmt wurde der Anteil an Zellen mit aktiver Caspase 3 (**A**) und die Spaltung von PARP (**B**) als Indikatoren für apoptotische Zellen. MOI = 1, Proben-Isolation: 24 h p. i.

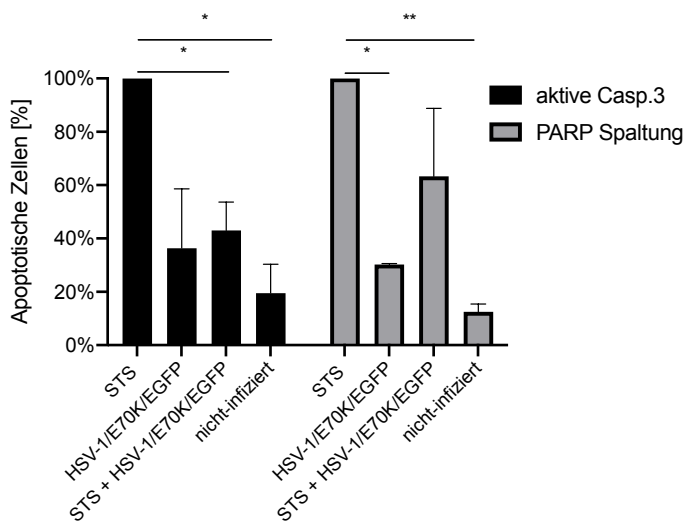


Abbildung 21:

Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen von nicht-infizierten und HSV-1-infizierten HCT116^{ΔPR130} Zellen mit bzw. ohne STS Behandlung in Relation zur nicht-infizierten Positivkontrolle mit STS (Zugabe jeweils 8 h p. i.), bestimmt wurden die aktive Caspase 3 (Casp.3) und die Spaltung von PARP als Indikatoren für apoptotische Zellen. MOI = 1, Proben-Isolation: 24 h p. i. Die Positivkontrolle ist gegenüber der Negativkontrolle signifikant (one-way ANOVA, Tukey's Post-Test: (*) $p < 0,05$ (Casp. 3), (**) $p = 0,008$ (PARP)).

PARP-Spaltung der Positivkontrolle gegenüber den HSV-1/E70K/EGFP-infizierten Zellen ist signifikant (one-way ANOVA, Tukey's Post-Test: (*) $p < 0,05$). Spaltung von Caspase 3 bei STS + HSV-1/E70K/EGFP Infektion gegenüber der Positivkontrolle ist signifikant (one-way ANOVA, Tukey's Post-Test: (*) $p < 0,05$).

Bei der Virustitration ist nicht nur zellassoziiert (HSV-1/E70K/EGFP: $M: 2,0 \times 10^5$ vs. +STS: $M: 4,2 \times 10^4$, t-Test, $p < 0,0001$), sondern auch im Überstand die Viruskonzentration nach 24 h p. i. bei einer Infektionsdosis von 1 MOI um das Dreifache reduziert (HSV-1/E70K/EGFP: $M: 6,3 \times 10^4$ vs. +STS: $M: 2,0 \times 10^4$, t-Test, $p = 0,001$). Dies ist der Abbildung 23 zu entnehmen. Der Effekt ist nicht ausschließlich auf die Anzahl an apoptotischen HCT116 Zellen zurückzuführen, da sich diese im niedrigen Prozentbereich bewegen. HSV-1 und STS scheinen sich gegenseitig in der Signaltransduktion zu beeinflussen.

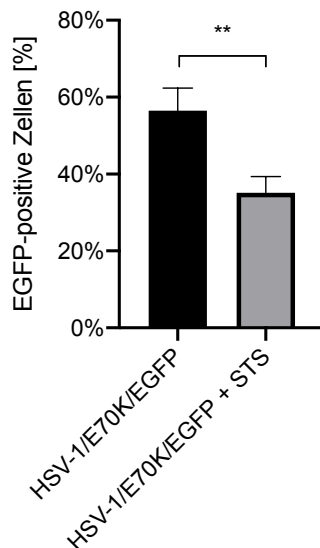


Abbildung 22: Anzahl EGFP-positiver Zellen von HSV-1/E70K/EGFP-infizierten HCT116^{ΔPR130} Zellen im Vergleich zu infizierten und STS (8 h p. i.) behandelten HCT116^{ΔPR130} Zellen, Messung 24 h p. i., MOI = 1, zu sehen sind Mittelwerte ± SD von 6 biologischen Replikaten, Mann-Whitney t-Test, $p = 0,002$ (**).

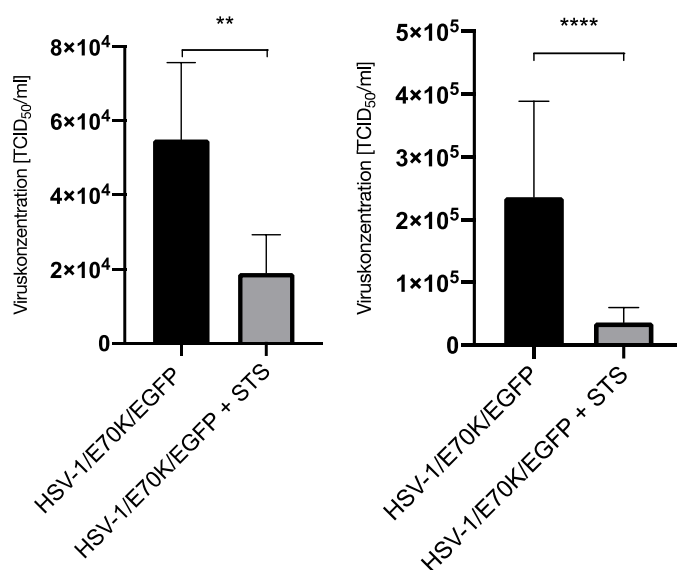


Abbildung 23:

links: Viruskonzentration von HSV-1/E70K/EGFP im Überstand in unbehandelten HCT116^{ΔPR130} Zellen im Vergleich zu STS (16 h) behandelten HCT116^{ΔPR130} Zellen, MOI = 1, Isolation 24 h p. i., zu sehen sind Mittelwerte ± SD von 3 biologischen Replikaten, Mann-Whitney T-test, (**) $p = 0,001$
rechts: Viruskonzentration von HSV-1/E70K/EGFP zellassoziiert (HCT116^{ΔPR130}), Mann-Whitney t-Test, (****), $p < 0,0001$.

4.7 Nachweis der Zellintegrität von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

Nachdem es in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen nach 24 h wenig Hinweise auf eine Apoptose-Induktion gibt, wurden HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} Zellen mit HSV-1/E70K/EGFP für 24 h bzw. 48 h infiziert (MOI = 1), mit dem Fixable Viability Stain 660 (FVS 660) markiert und im Flowzytometer analysiert. Nach 24 h sind nur 4 - 6 % der infizierten Zellen nekrotisch, nach 48 h nur 8 - 9 % der Zellen. Der Zelltod wird demnach durch HSV-1 nur mäßig intensiviert, vermutlich limitiert. Es lässt sich mittels FVS 660 kein Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien feststellen. Die Daten sind der Abbildung 24 zu entnehmen.

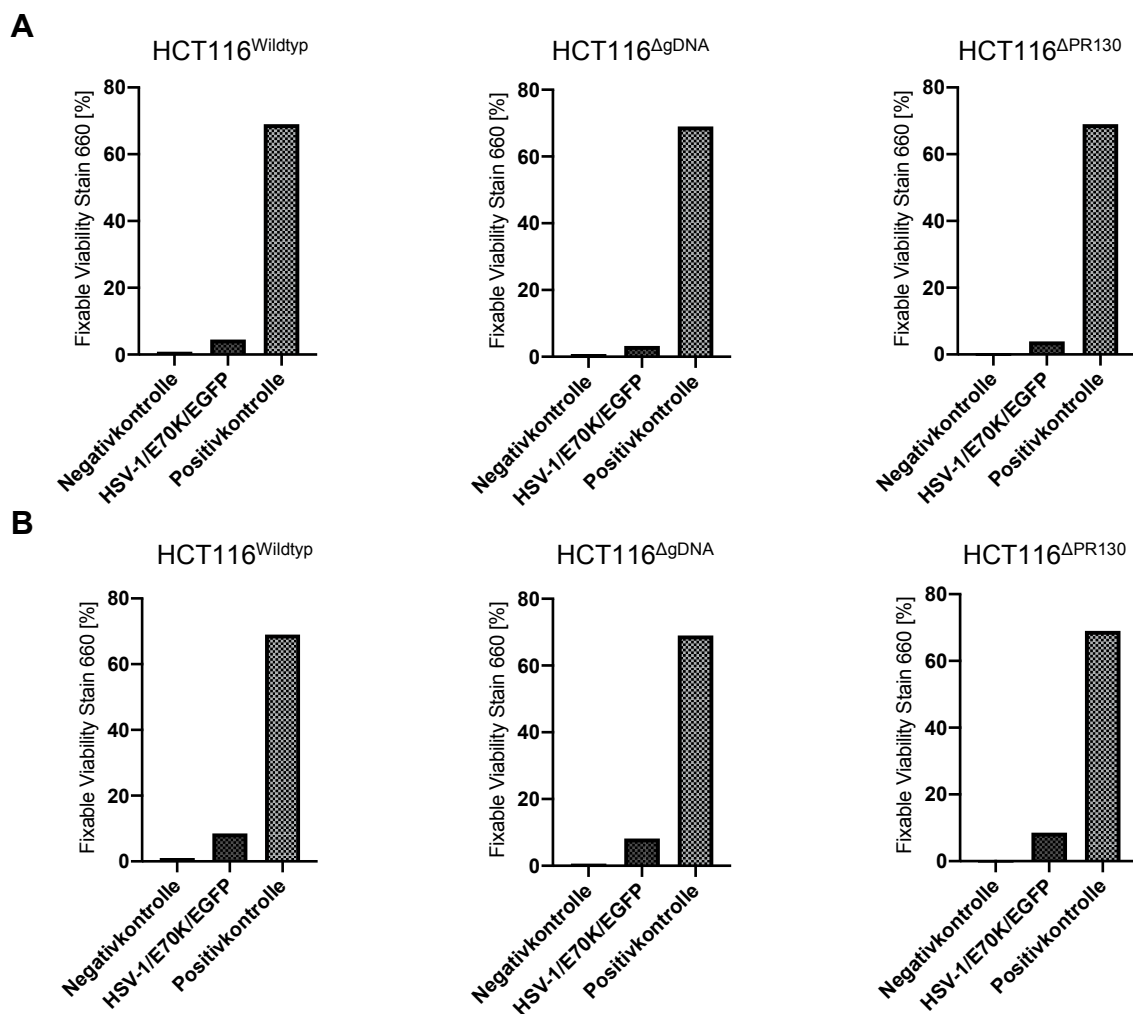


Abbildung 24: **A)** Messung der Anzahl nekrotischer Zellen nach Infektion mit HSV-1/E70K/EGFP (MOI=1) mittels Fixable Viability Stain 660 im Flowzytometer nach 24 h im Vergleich zu Negativ-Kontrolle (unbehandelt) und Positiv-Kontrolle (behandelt mit 4% Paraformaldehyd), **links:** HCT116^{Wildtyp}, **Mitte:** HCT116^{ΔgDNA}, **rechts:** HCT116^{ΔPR130} **B)** Messung nach 48 h in einem biologisch unabhängigen Experiment bei gleichen Bedingungen.

4.8 Western Blots von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

Die Analyse von Proteinen und ihre Phosphorylierungsprofile der HSV-1-infizierten HCT116 Zellen geben Aufschluss auf über den Einfluss von PP2A/PR130 auf die HSV-1 Replikation. Im Fokus der Untersuchung standen Proteine der DNA-Reparatur. Zu sehen sind repräsentative Blots von HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} Zellen infiziert mit HSV-1/Kos (MOI = 1) für 24 h. Der Abbildung 25 ist zu entnehmen, dass im Zuge einer HSV-1 Infektion die spezifische Bande (250 kDa) von ATM in HCT116^{ΔPR130} Zellen abnimmt, in den beiden Kontrollzelllinien hingegen gleichbleibt. Die Phosphorylierung von ATM steigt bei Infektion mit HSV-1 in allen drei Zelllinien an. Die CHK2 scheint von der Infektion nicht beeinflusst zu werden, ihre phosphorylierte Form weist jedoch bei der Infektion eine stärkere Intensität der Bande (70 kDa) auf, insbesondere in HCT116^{ΔPR130} Zellen. Die Interaktion von PR130 mit CHK2 ist in der Literatur bereits beschrieben, interessanterweise kann hier jedoch eine stärkere Phosphorylierung bei Abwesenheit von PR130 nachgewiesen werden (Kim et al. 2007a).

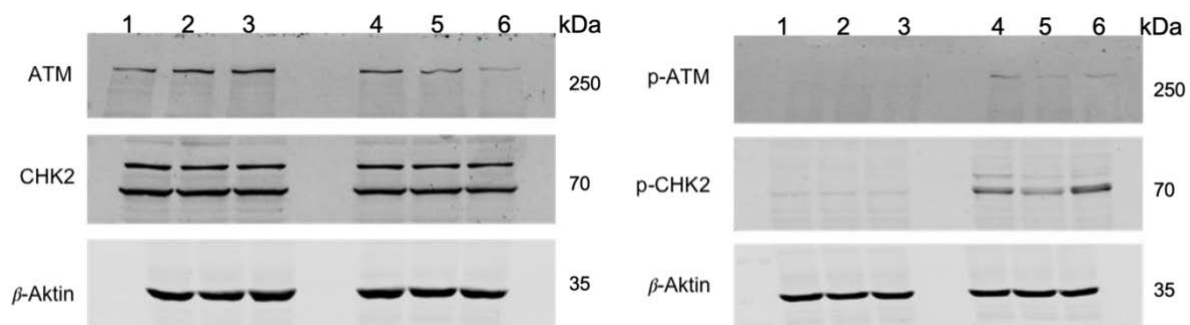


Abbildung 25: Western Blots von nicht-infizierten (1,2,3) und HSV-1-infizierten (4,5,6) HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp} (1/4), HCT116^{ΔgDNA} (2/5), HCT116^{ΔPR130} (3/6)), analysiert wurden ATM und die phosphorylierte Form (p-ATM) und der nachgeschaltete Signalweg über CHK2 bzw. phosphoryliertes CHK2, als Ladekontrolle dient β-Aktin; zu sehen sind repräsentative Blots.

In der Abbildung 26 lässt sich bei ATR im Zuge einer Infektion mit HSV-1 ein vermindertes Signal (250 kDa) in HCT116^{ΔPR130} Zellen gegenüber den Kontrollen beobachten, auch die Phosphorylierung (p-ATR) ist bei HCT116^{ΔPR130} Zellen im Vergleich zu den Kontrollen herabgesetzt. In allen drei Zelllinien nimmt das Signal von CHK1 (55 kDa) bei HSV-1 Infektion deutlich ab, dass von p-CHK1 bei allen zu, insbesondere bei HCT116^{ΔPR130}. Die Funktion von PR130 ist die Verminderung der

Phosphorylierung von CHK1, sodass die Abwesenheit von PR130 eine stärkere Phosphorylierung durchaus erklären kann.

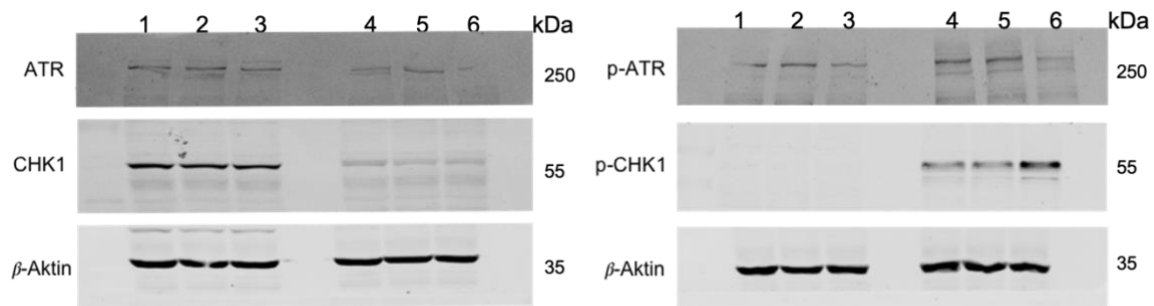


Abbildung 26: Western Blots von nicht-infizierten (1, 2, 3) und HSV-1-infizierten (4, 5, 6) HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp} (1/4), HCT116^{ΔgDNA} (2/5), HCT116^{ΔPR130} (3/6)), analysiert wurden ATR und die phosphorylierte Form (p-ATR) sowie der nachgeschaltete Signalweg über CHK1 bzw. phosphoryliertes CHK1, als Ladekontrolle dient β -Aktin; zu sehen sind repräsentative Blots.

Der Abbildung 27 ist zu entnehmen, dass die Signalintensität der Bande (55 kDa) von p53 in allen drei Zelllinien im Zuge der Infektion mit HSV-1 abnimmt, während die phosphorylierte Form (Serin-15) ein stärkeres Signal im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollen aufweist. Zwischen den HCT116 Zellen lässt sich kein Unterschied feststellen. Als Tumorsuppressor spielt p53 eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion des Zellzyklus-Arrest und der Apoptose. Serin-15 wird infolge von DNA-Schäden von den Proteinkinasen ATM /ATR phosphoryliert.

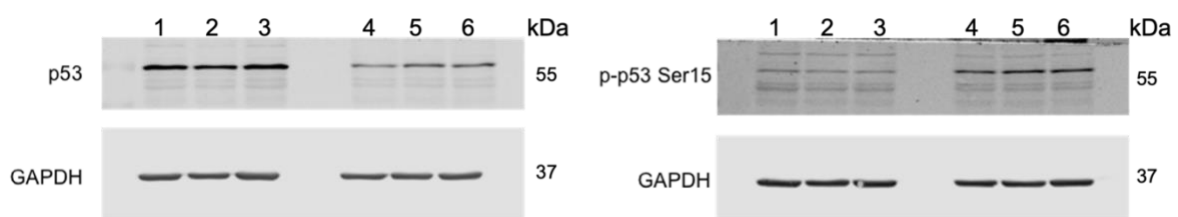


Abbildung 27: Western Blots von nicht-infizierten (1, 2, 3) und HSV-1-infizierten (4, 5, 6) HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp} (1/4), HCT116^{ΔgDNA} (2/5), HCT116^{ΔPR130} (3/6)), analysiert wurden p53 und die an Serin-15 phosphorylierte Form (p-p53 Ser15), als Ladekontrolle dient GAPDH; zu sehen sind repräsentative Blots.

Im Western Blot in der Abbildung 28 scheint das Signal von WEE1 (100 kDa) in den nicht-infizierten HCT116^{ΔPR130} gegenüber HCT116^{Wildtyp} und HCT116^{ΔgDNA} Zellen verstärkt zu sein. Dem gegenüber ist das das Signal bei Infektion mit HSV-1 in allen Zelllinien vermindert. Bei der phosphorylierten Form von CDK-1 ist im Zuge der Infektion mit HSV-1 ein deutlich verringertes Signal im Vergleich zu den nicht-

infizierten Zellen zu verzeichnen. Es ist diesen Daten nach nicht eindeutig, ob p-CDK-1 und WEE1 bei der HSV-1 Infektion unterdrückt werden oder die Progression des Zellzyklus durch das Virus ermöglichen

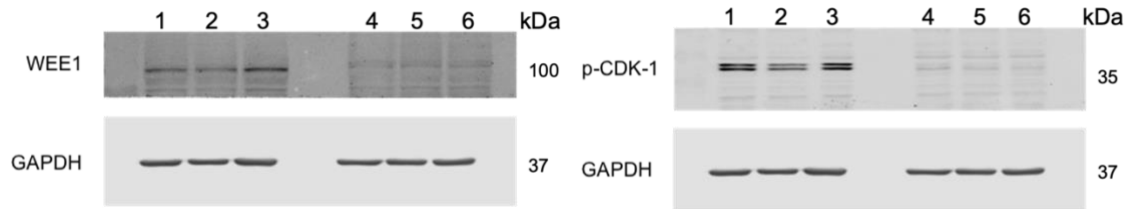


Abbildung 28: Western Blots von nicht-infizierten (1, 2, 3) und HSV-1-infizierten (4, 5, 6) HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp} (1/4), HCT116^{ΔgDNA} (2/5), HCT116^{ΔPR130} (3/6)), analysiert wurden WEE1 und das nachgeschaltete aktivierte p-CDK-1, als Ladekontrolle dient GAPDH; zu sehen sind repräsentative Blots.

Der Western Blot in Abbildung 29 zeigt zum einen, dass sich in den PR130-negativen Zellen kein PR130 nachweisen lässt und zum anderen, dass sich das Signal der Bande (130 kDa) in den HCT116^{Wildtyp} bzw. HCT116^{ΔgDNA} Zellen im Zuge der Infektion mit HSV-1 verringert. Dies weist darauf hin, dass PR130 durch HSV-1 unterdrückt wird und könnte auch zur Erklärung beitragen, wieso das Ausschalten zu einer vermehrten Virusreplikation führt.

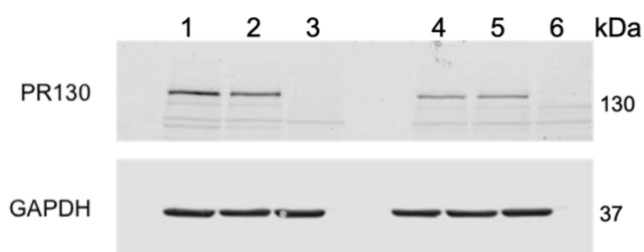


Abbildung 29: Western Blot von nicht-infizierten (1, 2, 3) und HSV-1-infizierten (4, 5, 6) HCT-116 Zellen (HCT116^{Wildtyp} (1/4), HCT116^{ΔgDNA} (2/5), HCT116^{ΔPR130} (3/6)), analysiert wurde die Expression von PR130, als Ladekontrolle dient GAPDH; zu sehen ist ein repräsentativer Blot.

PR130 wird durch HDAC1/2 reguliert. Daher wurden die HDAC 1-3 im Western Blot analysiert und sind in der Abbildung 30 dargestellt. Zwischen den nicht-infizierten und HSV-1-infizierten Blots lässt sich nur bei HDAC1 ein Unterschied bei HCT116^{ΔPR130} erkennen. Da HDAC1/2 die Expression von PR130 eigentlich unterdrücken, wird HDAC1 bei HCT116^{ΔPR130} unter HSV-1 Infektion vermutlich vermindert exprimiert. Es ist auch denkbar, dass die Interaktion des coREST/REST/HDAC-Komplex mit ICP0 von HSV-1 in den Knock-out Zellen von besonderer Bedeutung ist (Zhou et al. 2013).

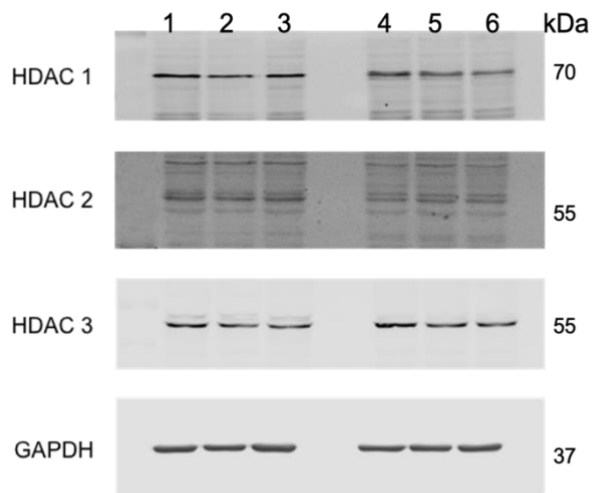


Abbildung 30: Western Blot von nicht-infizierten (1, 2, 3) und HSV-1-infizierten (4, 5, 6) HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp} (1/4), HCT116^{ΔgDNA} (2/5), HCT116^{ΔPR130} (3/6)), analysiert wurde die Expression von HDAC1-3, als Ladekontrolle dient GAPDH; zu sehen ist ein repräsentativer Blot.

In der Abbildung 31 ist zu sehen, dass eine Infektion der HCT116 Zellen mit HSV-1 zu einer verminderten Bandenintensität von STAT1 (90 kDa) in allen drei Zelllinien führt. HSV-1 bewirkt demnach eine verminderte Interferon-Stimulation und somit antivirale Antwort der Wirtszellen. Ein Unterschied zwischen den Zelllinien ist jedoch nicht zu erkennen.

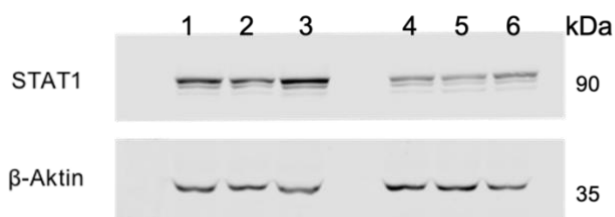


Abbildung 31: Western Blot von nicht-infizierten (1, 2, 3) und HSV-1-infizierten (4, 5, 6) HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp} (1/4), HCT116^{ΔgDNA} (2/5), HCT116^{ΔPR130} (3/6)), analysiert wurde die Expression von STAT1, als Ladekontrolle dient β -Aktin; zu sehen ist ein repräsentativer Blot.

OAS2 bindet fremde Nukleinsäure im Zytoplasma (dsRNA/ dsDNA) und katalysiert die Synthese von 2'-5'-Oligoadenylat, welches latente RNase L und stimulator of interferon genes (STING) aktiviert. Dies führt zur Degradierung viraler RNA und Inhibition der Virusreplikation. Trotz dieser bekannten Interaktion sind im Western Blot (Abbildung 32) keine nennenswerten Unterschiede im Modell mit HSV-1 und den HCT116 Zelllinien zu identifizieren (78 kDa). Das Knock-out scheint diese zelluläre antivirale Antwort nicht zu beeinflussen. Durch Interferon- α / β kommt es auf transkriptionaler Ebene zu einer Aktivierung von verschiedenen Genen und das konjugierende Enzym UBCH8 wird aktiviert. In allen drei Zelllinien scheint weder in HSV-1-infizierten Zellen noch in den nicht-infizierten Kontrollen die Ubiquitinierung durch UBCH8 (18 kDa) eine Rolle zu spielen.

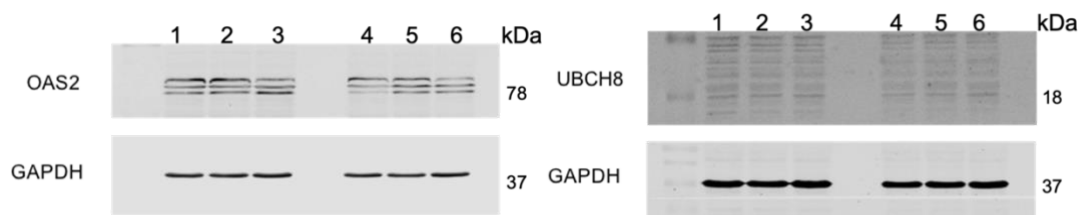


Abbildung 32: Western Blot von nicht- infizierten (1, 2, 3) und HSV-1-infizierten (4, 5, 6) HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp} (1/4), HCT116^{ΔgDNA} (2/5), HCT116^{ΔPR130} (3/6)), analysiert wurde die Expression von OAS2 und UBCH8, als Ladekontrolle dient GAPDH; zu sehen ist ein repräsentativer Blot.

4.9 HDAC-Inhibition in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

4.9.1 MS-275 (Entinostat)

Die pharmakologische Inhibition von HDAC1/2 wurde mit 2 μ M des Benzamid MS-275 erzielt, wobei im ersten Ansatz MS-275 für 24 h zu den HSV-1-infizierten HCT116 Zellen hinzugegeben wurde. Der Abbildung 33 ist zu entnehmen, dass 24 h nach Applikation der Substanz ein nahezu identisches Ergebnis der Viruskonzentrationen wie in den unbehandelten Zellen vorlag.

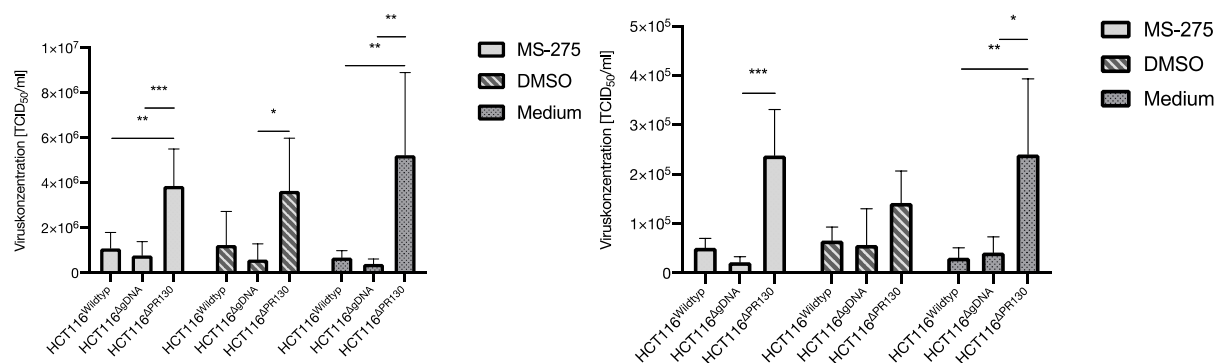


Abbildung 33: Viruskonzentration in HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130}) infiziert mit HSV-1/Kos für 24h, MOI = 1, p. i. Zugabe von 2 μ M MS-275, DMSO oder Medium zu den Nährmedien, anschließend Isolation der Proben und Ermittlung der Viruskonzentration mittels TCID₅₀, **links:** Viruskonzentration zellassoziiert (HCT116 Zellen), **rechts:** Viruskonzentration im Überstand der HCT116 Zellen; zu sehen sind Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten \pm SD, one-way ANOVA, Tukey's Post-Test: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

In allen drei Versuchsanordnungen (mit Inhibitor, DMSO-Kontrolle und Medium-Kontrolle) zeigten sich diese Resultate. Die Virusreplikation wurde durch MS-275 24 h p. i. geringfügig beeinflusst. Es ist bemerkenswert, dass die Viruskonzentration in den

HCT116^{ΔPR130} Zellen gegenüber den Kontrollzellen (HCT116^{Wildtyp} bzw. HCT116^{ΔgDNA}) sowohl zellassoziiert, als auch im Überstand signifikant höher war (zellassoziiert: HCT116^{Wildtyp}: M: 1,08x10⁶ TCID₅₀/ml / HCT116^{ΔgDNA}: M: 7,73x10⁵ TCID₅₀/ml / HCT116^{ΔPR130}: M: 3,86x10⁶ TCID₅₀/ml / p < 0,01) (Überstand: HCT116^{Wildtyp}: M: 5,12x10⁴ TCID₅₀/ml / HCT116^{ΔgDNA}: M: 2,20x10⁵ TCID₅₀/ml / HCT116^{ΔPR130}: M: 2,38x10⁵ TCID₅₀/ml / p < 0,001).

Der zweite Ansatz erfolgte durch Inkubation mit MS-275, DMSO oder Medium für 24 h vor Infektion und anschließender (p. i.) 24 h Zugabe dieser Substanzen zu den einzelnen Proben. Hierdurch wurde, wie erwartet, die Viruskonzentration in allen drei Zelllinien reduziert, bei den HCT116^{ΔPR130} Zellen und deren Überstand signifikant (zellassoziiert: MS-275: HCT116^{ΔPR130}: M: 4,24x10⁵ TCID₅₀/ml / DMSO: HCT116^{ΔPR130}: M: 1,85x10⁶ TCID₅₀/ml / p = 0,003) (Überstand: MS-275: HCT116^{ΔPR130}: M: 1,16x10⁴ TCID₅₀/ml / DMSO: HCT116^{ΔPR130}: M: 7,84x10⁴ TCID₅₀/ml / p = 0,001). Die erzielten Ergebnisse sind der Abbildung 34 zu entnehmen.

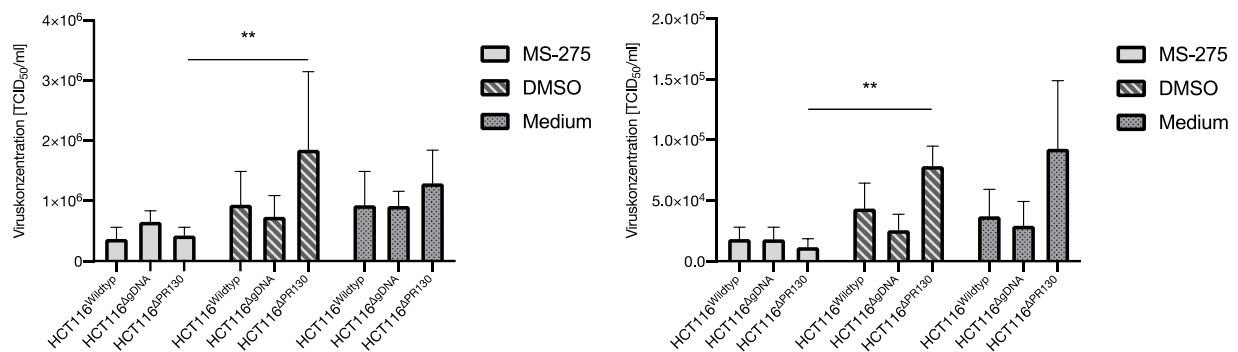


Abbildung 34: Viruskonzentration in HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130}) infiziert mit HSV-1/Kos für 24 h, MOI = 1, vor Infektion Zugabe von 2 μM MS-275, DMSO oder Medium zu den Nährmedien für 24 h, nach Infektion erneute Zugabe für 24 h, anschließend Isolation der Proben und Ermittlung der Viruskonzentration mittels TCID₅₀, **links:** Viruskonzentration zellassoziiert (HCT116 Zellen), **rechts:** Viruskonzentration im Überstand der HCT116 Zellen; zu sehen sind Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten ± SD, one-way ANOVA, Tukey's Post-Test: (***) p = 0,003, (***) p = 0,001.

Durch die Inhibition von HDAC1/2 wird die Expression von PR130 nicht mehr unterdrückt, in den Kontrollzelllinien kann PR130 nun vermehrt exprimiert werden und hemmt somit potentiell die Virusreplikation von HSV-1. Für HCT116^{ΔPR130} ist bekannt, dass sie besonders sensibel auf MS-275 reagieren, was zur Apoptose der Zellen führt (Goder et al. 2018). Auch hierdurch kommt es konsekutiv zu einer verminderten Virusreplikation.

4.9.2 FK-228 (Romidepsin)

Die Substanz FK-228 ist ebenfalls ein potenter Inhibitor der HDAC1/2 welche zur Verifizierung des vorherigen Versuchs gewählt wurde. Hierbei wurden die HCT116 Zellen für 24 h mit 5 nM des Inhibitors bzw. gleicher Konzentration DMSO prä-inkubiert und nach Infektion mit HSV-1 erneut mit 5 nM 24 h inkubiert. Zu sehen ist eine Reduktion der Viruskonzentration in allen drei Zelllinien und signifikant bei den HCT116^{Wildtyp} Zellen (M: FK-228: $5,3 \times 10^5$ TCID₅₀/ml / M: DMSO: $2,3 \times 10^6$ TCID₅₀/ml / one-way ANOVA: $p < 0,01$). Im Überstand der Zellen konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion des Virustiters um 50 % in allen drei Zelllinien beobachtet werden (FK-228: HCT116^{Wildtyp}: M: $2,02 \times 10^4$ TCID₅₀/ml / HCT116^{ΔgDNA}: M: $1,61 \times 10^4$ TCID₅₀/ml / HCT116^{ΔPR130} M: $2,42 \times 10^4$ TCID₅₀/ml / DMSO: HCT116^{Wildtyp}: M: $7,36 \times 10^4$ TCID₅₀/ml / HCT116^{ΔgDNA}: M: $7,45 \times 10^4$ TCID₅₀/ml / HCT116^{ΔPR130} M: $1,14 \times 10^5$ TCID₅₀/ml / $p < 0,05$, $p < 0,01$). Diese Daten sind der Abbildung 35 zu entnehmen.

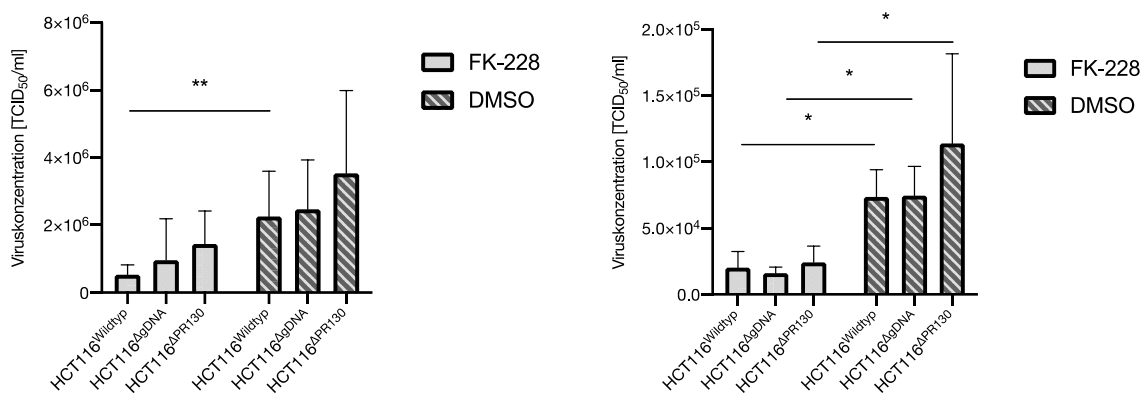


Abbildung 35: Viruskonzentration in HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130}), infiziert mit HSV-1/Kos für 24 h, MOI = 1, vor Infektion Zugabe von 5 nM FK-228 oder DMSO zu den Nährmedien für 24 h, nach Infektion erneute Zugabe für 24 h, anschließend Isolation der Proben und Ermittlung der Viruskonzentration mittels TCID₅₀, **links:** Viruskonzentration zellassoziiert (HCT116 Zellen), **rechts:** Viruskonzentration im Überstand der HCT116 Zellen; dargestellt sind Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten \pm SD, one-way ANOVA, Tukey's Post-Test: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.

4.10 ATM/ATR Inhibition in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

4.10.1 VE-821

Zu HCT116 Zellen wurde der Inhibitor VE-821 mit einer Konzentration von 3 μM für 24 h gegeben, anschließend erfolgte die Infektion mit HSV-1 und daraufhin die erneute 24 h Inkubation. Bei der zellassoziierten Viruskonzentration führte dies nur bei HCT116 ^{Δ PR130} zu einer signifikanten Reduktion des Titters, während bei HCT116^{Wildtyp} bzw. HCT116 ^{Δ gDNA} Zellen ein deutlicher Effekt ausblieb (VE-821: HCT116^{Wildtyp} M: $1,06 \times 10^5$ TCID₅₀/ml / DMSO: HCT116^{Wildtyp}: M: $7,86 \times 10^5$ TCID₅₀/ml / $p < 0,05$). Im Zellüberstand wiederum ließ sich in allen drei Zelllinien eine Verminderung der Viruskonzentration induzieren (VE-821: HCT116^{Wildtyp}: M: $3,8 \times 10^4$ TCID₅₀/ml / HCT116 ^{Δ gDNA}: M: $3,4 \times 10^4$ TCID₅₀/ml, HCT116 ^{Δ PR130}: M: $5,6 \times 10^4$ TCID₅₀/ml / DMSO: HCT116^{Wildtyp}: M: $9,1 \times 10^4$ TCID₅₀/ml / HCT116 ^{Δ gDNA}: M: $7,8 \times 10^4$ TCID₅₀/ml / HCT116 ^{Δ PR130}: M: $1,4 \times 10^5$ TCID₅₀/ml / $p < 0,05$, $p < 0,001$). Bei HCT116 ^{Δ PR130} ist die Reduktion der Viruskonzentration besonders deutlich, da ohne PR130 ATM vermindert dephosphoryliert wird und demzufolge auch für Virusproteine zur Verfügung steht. Die Inhibition von ATM verhindert diesen Mechanismus. Die beschriebenen Daten sind der Abbildung 36 zu entnehmen.

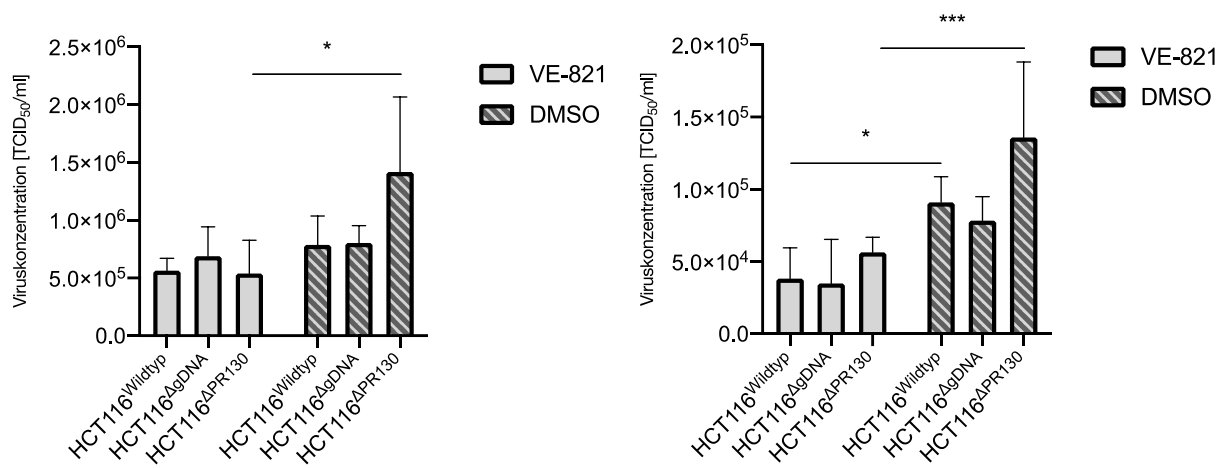


Abbildung 36: Viruskonzentration in HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116 ^{Δ gDNA} und HCT116 ^{Δ PR130}), infiziert mit HSV-1/Kos für 24 h, MOI = 1, vor Infektion Zugabe von 3 μM VE-821 oder DMSO zu den Nährmedien für 24 h, nach Infektion erneute Zugabe für 24 h, anschließend Isolation der Proben und Ermittlung der Viruskonzentration mittels TCID₅₀, **links:** Viruskonzentration zellassoziiert (HCT116 Zellen), (*) $p < 0,05$, **rechts:** Viruskonzentration im Überstand der HCT116 Zellen, von links nach rechts (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$; zu sehen sind Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten \pm SD, one-way ANOVA, Tukey's Post-Test.

4.10.2 VE-822

Zur Zytotoxizität von VE-822, einem potenten ATR/ATM-Inhibitor, lagen keine Daten für die verwendeten HCT116 Zellen vor. Daher wurde mittels WST-1 Test die metabolische Aktivität nach 48 h unter aufsteigenden Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 10 µM getestet. Die Konzentration von 10 nM wurde als akzeptabel in Bezug auf Wirksamkeit und Zellüberleben eingestuft. Der Abbildung 37 sind die Daten zu entnehmen.

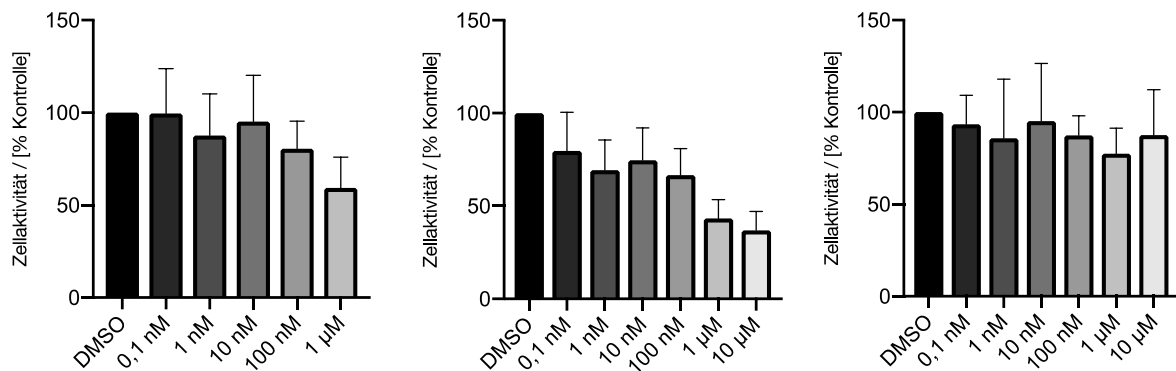


Abbildung 37: Messung der metabolischen Aktivität von HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} Zellen (**von links nach rechts**) mittels WST-1 Test nach 48 h, angegeben ist die prozentuale Zellaktivität von VE-822 behandelten Zellen in Relation zur unbehandelten DMSO-Kontrolle, getestet wurden aufsteigende Konzentrationen des Inhibitors zwischen 0,1 nM und 10 µM, Mittelwerte ± SD stammen von mind. 12 biologischen Replikaten.

Nachfolgend wurden die HCT116 Zellen mit 10 nM VE-822 inkubiert (WST-1 (10 nM): HCT116^{Wildtyp}: M: 95,2 % / HCT116^{ΔgDNA}: M: 74,6 % / HCT116^{ΔPR130}: M: 95,0 %). Wie bei den vorherigen Experimenten wurde eine Prä-Inkubation von 24 h durchgeführt und nach Infektion mit HSV-1 eine erneute Inkubation für 24 h. Dies führte trotz der geringen Dosis zu einer Reduktion der zellassoziierten Viruskonzentration insbesondere bei HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130} Zellen (VE-822: HCT116^{ΔgDNA}: M: $1,98 \times 10^5$ TCID₅₀/ml / HCT116^{ΔPR130}: M: $1,87 \times 10^5$ TCID₅₀/ml / DMSO: HCT116^{ΔgDNA}: M: $3,48 \times 10^5$ TCID₅₀/ml / HCT116^{ΔPR130}: M: $4,54 \times 10^5$ TCID₅₀/ml). Im Zellüberstand ließ sich dieser Trend ebenfalls beobachten, bei HCT116^{ΔPR130} Zellen war der Effekt signifikant (VE-822: M: $2,4 \times 10^4$ TCID₅₀/ml / DMSO: M: $4,8 \times 10^4$ TCID₅₀/ml, $p < 0,05$). Die Viruskonzentrationen in VE-822 behandelten und unbehandelten Zellen sind der Abbildung 38 zu entnehmen.

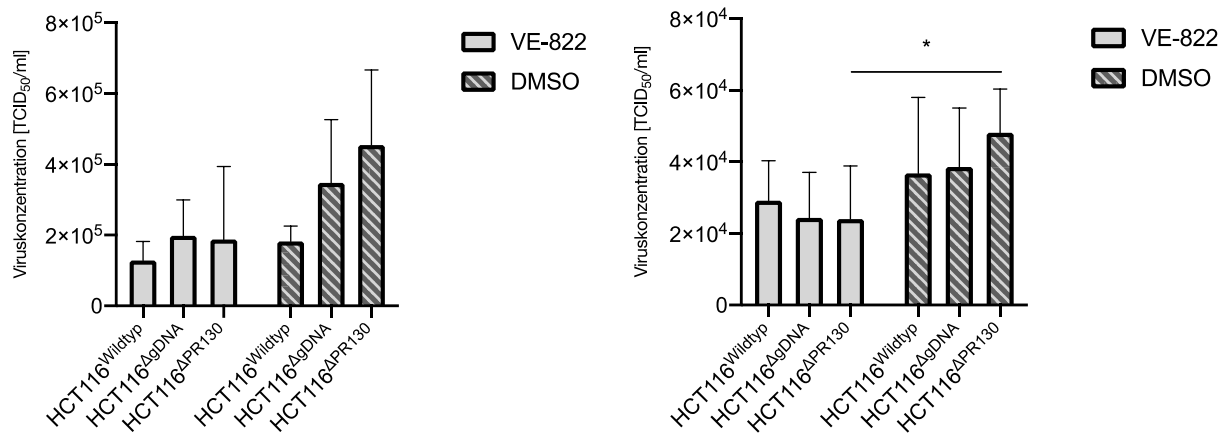


Abbildung 38: Viruskonzentration in HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130}) infiziert mit HSV-1/Kos für 24 h, MOI = 1, vor Infektion Zugabe von 10 nM VE-822 oder DMSO zu den Nährmedien für 24 h, nach Infektion erneute Zugabe für 24 h, anschließend Isolation der Proben und Ermittlung der Viruskonzentration mittels TCID₅₀, **links:** Viruskonzentration zellassoziiert (HCT116 Zellen), **rechts:** Viruskonzentration im Überstand der HCT116 Zellen; zu sehen sind Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten ± SD, one-way ANOVA, Tukey's Post-Test: (*) p < 0,05.

4.11 CHK1 Inhibition durch MK-8776 in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

Als Inhibitor der CHK1 wurde MK-8776 ausgewählt und die HCT116 Zellen mit 0,5 μM für 24 h prä-inkubiert, anschließend mit HSV-1 infiziert und nachfolgend erneut 24 h mit MK-8776 inkubiert. Im Gegensatz zu den bisherigen Inhibitoren kam es infolgedessen nicht zu einer Reduktion der Viruskonzentration, sondern zu Zelllinien abhängigen Veränderungen. Bei HCT116^{Wildtyp} und HCT116^{ΔgDNA} stieg die Viruskonzentration zellassoziiert leicht an, bei HCT116^{ΔPR130} konnte zellassoziiert eine signifikante Reduktion beobachtet werden (MK-8776: M: 2,84 × 10⁵ TCID₅₀/ml / DMSO: M: 5,26 × 10⁵ TCID₅₀/ml, p < 0,05). Im Überstand kam es unter Behandlung der Zellen mit MK-8776 zu einer Zunahme der HSV-1 Konzentration, insbesondere in den HCT116^{ΔPR130} Zellen (MK-8776: M: 8,75 × 10⁴ TCID₅₀/ml / DMSO: M: 5,98 × 10⁴ TCID₅₀/ml, p < 0,05). Da die Kontrollzelllinien keine signifikanten Effekte oder eindeutige Trends zeigten kann hierfür keine eindeutige Aussage getroffen werden. Bei HCT116^{ΔPR130} Zellen scheint die Inhibition von CHK1 eine vermehrte Virusfreisetzung zur Folge zu haben. Die Daten sind in der Abbildung 39 dargestellt.

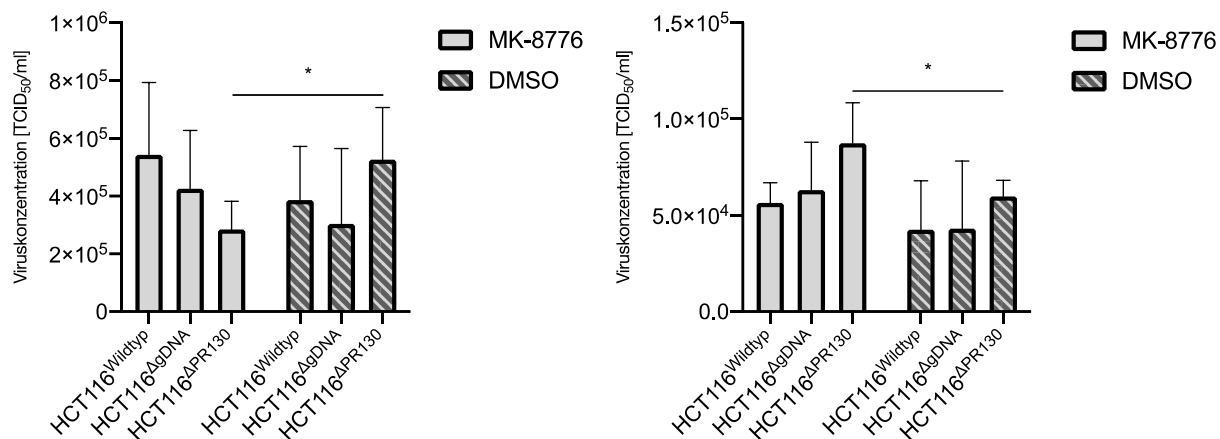


Abbildung 39: Viruskonzentration in HCT-116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130}) infiziert mit HSV-1/Kos für 24 h, MOI = 1, vor Infektion Zugabe von 0,5 μM MK-8776 oder DMSO zu den Nährmedien für 24 h, nach Infektion erneute Zugabe für 24 h, anschließend Isolation der Proben und Ermittlung der Viruskonzentration mittels TCID₅₀, **links:** Viruskonzentration zellassoziiert (HCT116 Zellen), **rechts:** Viruskonzentration im Überstand der HCT116 Zellen; zu sehen sind Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten ± SD, one-way ANOVA, Tukey's Post-Test: (*) p < 0,05.

4.12 Zellzyklus von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen

HSV-1 greift im Zuge seiner Replikation in den Zellzyklus der Wirtszellen ein und kann einen Block am G1/S-Übergang durch Interaktion mit CDKs bzw. Akkumulation von Proteinen induzieren (Ehmann et al. 2000). In nicht-infizierten, asynchronen Zellen befinden sich in allen Zelllinien 0,2 % in subG1, 67,1 % in G1, 23,7 % in S und 9,0 % in G2. Im Zuge einer HSV-1 Infektion lässt sich bei HCT116^{Wildtyp} und HCT116^{ΔgDNA} erkennen, dass mehr Zellen (78,5 %) in die G1-, weniger (19,7 %) in die S- und kaum (0,65 %) in die G2-Phase gelangen. In HSV-1-infizierten HCT116^{ΔPR130} Zellen befinden sich 63,3 % der Zellen in der G1-Phase und 34,1 % in der S-Phase. Letztere verzeichnet einen Anstieg von mehr als 10%. Die Fraktion der SubG1-Phase nimmt in infizierten HCT116^{ΔPR130} Zellen ebenso von 0,1 % auf 2,2 % zu. Die Synchronisation mittels FKS-Depletion vor der HSV-1 Infektion scheint nur einen geringen Einfluss auf die Zellzyklen zu haben. Bei HCT116^{ΔPR130} ist in der subG1-Phase ein Anstieg von 0,1 % auf 3,3 % zu verzeichnen, die übrigen Phasen zeigen nur marginale Unterschiede. In der Abbildung 40 sind diese Daten dargestellt und der Tabelle 3 bzw. 4 detailliert zu entnehmen. In der S-Phase kann HSV-1 auf Replikationskompartimente der Wirtszellen zugreifen und Zyklus abhängige Proteine für die eigene DNA-Synthese nutzen. Die Unterschiede in der Virusreplikation zwischen den HCT116 Zellen (höhere

Virustiter bei HCT116^{ΔPR130}) könnten daher auf die verschobenen Zellzyklus-Phasen zurückzuführen sein.

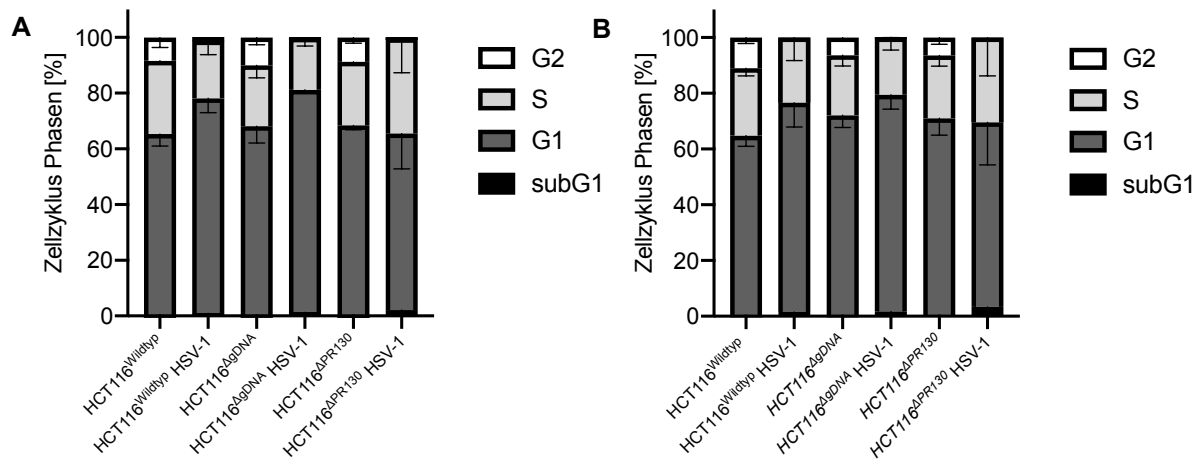


Abbildung 40: Zellzyklusphasen von nicht-infizierten und HSV-1/Kos-infizierten HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130}) in Prozent, Isolation der Zellen 24 h p. i., MOI = 1, **(A)** Zellzyklus wurde vor Infektion nicht synchronisiert, **(B)** durch FKS-Depletion im Nährmedium erzeugter Hungerzustand führt zur Synchronisation des Zellzyklus (anschließende Infektion), zu sehen sind Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten ± SD.

A

	subG1		G1		S		G2	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
HCT116^{Wildtyp}	0,2	0,1	65,1	4,4	26,3	1,0	8,4	3,6
HCT116^{ΔgDNA}	0,2	0,1	67,9	6,1	21,8	4,4	10,1	2,6
HCT116^{ΔPR130}	0,1	0,1	68,3	1,5	22,9	0,7	8,7	2,0
HCT116^{Wildtyp} HSV-1	0,9	1,3	77,2	5,1	20,7	5,0	1,2	2,0
HCT116^{ΔgDNA} HSV-1	1,3	1,9	79,8	1,2	18,7	3,0	0,1	0,2
HCT116^{ΔPR130} HSV-1	2,2	2,1	63,3	12,6	34,1	12,3	0,4	0,6

Tabelle 3: Zellzyklusphasen von nicht-infizierten und HSV-1/Kos-infizierten HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130}) in Prozent. Zellzyklen der HCT116 Zellen wurden vor Infektion nicht synchronisiert, M = Mittelwert, SD = Standard deviation

B

	subG1		G1		S		G2	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
HCT116^{Wildtyp}	0,1	0,0	64,6	3,9	24,2	2,7	11,0	2,1
HCT116^{ΔgDNA}	0,13	0,1	71,9	4,4	21,6	3,9	6,3	1,0
HCT116^{ΔPR130}	0,1	0,1	70,9	6,1	22,5	3,8	6,5	2,4
HCT116^{Wildtyp} HSV-1	1,5	0,9	75,1	8,7	23,4	8,3	0,0	0,0
HCT116^{ΔgDNA} HSV-1	1,7	0,8	77,8	5,1	20,6	4,5	0,0	0,0
HCT116^{ΔPR130} HSV-1	3,3	1,7	66,2	15,2	30,5	13,8	0,0	0,0

Tabelle 4: Zellzyklusphasen von nicht-infizierten und HSV-1/Kos-infizierten HCT116 Zellen (HCT116^{Wildtyp}, HCT116^{ΔgDNA} und HCT116^{ΔPR130}) in Prozent. Zellzyklen wurden vor Infektion durch FKS-Depletion im Nährmedium synchronisiert, M = Mittelwert, SD = Standard deviation.

V. Diskussion

5.1 Therapieoptionen bei HSV-1 Infektion

Die Behandlung mit Virostatika führt mit der Zeit zu einer gerichteten Selektion und somit zur Ausbildung von Resistenzen, sodass heute eine Vielzahl von Mutationen, beispielsweise im Thymidinkinase-Gen oder DNA-Polymerase-Gen von HSV-1, existieren und eine neue Herausforderung in der Behandlung darstellen (Bohn-Wippert et al. 2015). Klassische Nukleosid-Analoga eignen sich oft nicht zur Therapie bzw. fördern die Resistenzbildung nur noch weiter. Infolgedessen muss zunehmend auf Reservepräparate zurückgegriffen werden (Floß und Dolff 2019). Im Falle einer HSVE ist diese Problematik von besonderer Bedeutung. In den USA werden jedes Jahr ca. 7 Patienten (auf 100.000 Einwohner) mit Enzephalitis im Krankenhaus behandelt, wobei in 50-75 Prozent der Fälle eine HSVE diagnostiziert wird (Tyler 2018). Trotz empirischer Therapie leiden Patienten unter bleibenden neurologischen Schäden, sodass die Notwendigkeit von neuen Therapieoptionen besteht. Aktuell steht nicht mehr nur das Virus im Zentrum der Forschung, sondern insbesondere die Virus-Wirts-Interaktion und zelluläre Wirtsfaktoren. Hieraus kann ein neuer Einblick in die Replikationszyklen von HSV-1 gewonnen und antivirale Strategien entwickelt werden. Ein großer Vorteil wäre, dass zum einen die virale Resistenzentwicklung minimiert wird und zum anderen eine hohe genetische Konstanz der Wirtsstrukturen vorhanden ist. Da keine direkte antivirale Therapie stattfindet, könnten zudem mehrere Virusgruppen behandelt werden. Nachteilig hingegen könnten sich unerwünschte Nebenwirkungen und die Toxizität auf den Gesamtorganismus auswirken. Eine neue, vielversprechende Medikamentengruppe stellen Inhibitoren des Helicase-Primase-Enzymkomplexes von HSV-1 dar (UL5, UL8, UL52). Dieser ist an der Entwindung des DNA-Doppelstranges sowie der RNA-Primer-Synthese beteiligt und eine Hemmung führt zum Stopp der Virusreplikation (Shiraki 2017). Darüber hinaus ruht der Fokus derzeitiger wissenschaftlicher Arbeit weiterhin auf der Entwicklung therapeutische Vakzine, wobei es bis dato unterschiedliche Ansätze und Erfolge zu verzeichnen gibt. Vielversprechende Ergebnisse wurden beispielsweise bei der HSV-1 Keratitis erzielt (Royer et al. 2016). Ein interessanter, vollkommen neuer Ansatz zu Behandlung latent infizierter Patienten ist der Einsatz von „Designer“-Endonuclease und Adeno-assoziierten Viren, um Mutationen im HSV-Genom zu induzieren und dieses somit an seiner Reaktivierung zu hindern (Aubert et al. 2016).

Das Potential für neue Therapien bieten zudem die Proteine der zellulären DNA-Reparatur, da sie und ihre Interaktion mit HSV-1 für die effektive Replikation unentbehrlich sind. Ein Beispiel ist der ATM-Inhibitor KU-55933, welcher die HSV-1 Replikation und den zytopathischen Effekt bei Herpeskeratitis supprimieren konnte (Alekseev et al. 2014).

5.2 Die Rolle von PP2A/PR130 bei HSV-1 Infektion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der regulatorischen Untereinheit PR130 von PP2A im Zuge der Infektion mit HSV-1 untersucht. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass sich HSV-1 in PR130-negativen Zellen signifikant besser repliziert als in den Kontrollen. Der Grund hierfür kann anhand der durchgeführten Experimente nur bedingt geklärt werden, vielmehr müssen die Daten in den Kontext bisheriger Forschung eingeordnet werden. Ein Erklärungsansatz könnte beispielsweise der Wnt/ β -catenin Signalweg bieten. Wie bereits beschrieben, fungiert PR130 als Aktivator der Wnt-Signaltransduktion und es ist bekannt, dass der zelluläre Transkriptionsfaktor β -catenin die produktive Infektion von HSV-1 stimuliert, indem VP16 dessen Transkription fördert. Allerdings handelt es sich um späte Phasen (16 h p. i.), was diesen experimentellen Ansatz limitiert (Zhu und Jones 2018). Obwohl der Zusammenhang vorhanden ist, ist nicht eindeutig, wie die Abwesenheit von PR130 mit Wnt in Verbindung steht. Die Virusreplikation ist in HCT116 Zellen ohne PR130 erhöht, wo PP2A demzufolge nicht an der Dephosphorylierung von Zielproteinen mitwirken kann. Der resultierende Virustiter kann demnach nicht durch die PR130-induzierte Aktivierung der Wnt-Signaltransduktion erklärt werden. Ergänzend muss erwähnt werden, dass Teile des Wnt-Signalwegs nur in bestimmten Zelllinien aktiv sind, sodass die Ergebnisse aus Vero-Zellen sich nicht zwangsläufig auf HCT116 Zellen übertragen lassen.

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass Wnt/ β -catenin das Zellüberleben und -wachstum durch Stimulation des Akt Signalwegs aufrecht erhält (Kim et al. 2007b, Roof et al. 2013). Die Aktivierung von β -catenin könnte somit zu einer produktiven Infektion beitragen, indem die infizierten Wirtszellen länger überleben. Dem gegenüber stehen Untersuchungen, die belegen, dass HSV-1 Akt1 aktiviert, welches daraufhin β -catenin an Ser(552) phosphoryliert, was zur Akkumulation und Induktion von IFN- β führt. Dieses antivirale Zytokin moduliert die Immunreaktion zugunsten des Wirts (Gantner et al. 2012). Ein weiterer Ansatz könnte eine Interaktion mit Axin, einem

negativen Regulator des Wnt-Signalwegs, sein. Beispielsweise ist bekannt, dass eine vermehrte Axin Expression den HSV-induzierten, nekrotischen Zelltod minimiert. Im Zuge einer HSV-Infektion kommt es, abhängig vom zeitlichen Verlauf und der Viruslast, zu einer Induktion von Autophagie. Axin ist an der Inhibition der Autophagie-vermittelten Suppression der Virusreplikation beteiligt und trägt somit zu einer effizienteren Replikation bei (Choi und Kee 2014). Die Experimente wurden jedoch mit Fibroblasten-ähnlichen Mauszellen (L939) durchgeführt und unterscheiden sich von epithelialen HCT116 Zellen.

Da PR130 auch mit dem zellulären Ca^{2+} -Haushalt von Kardiomyozyten in Verbindung steht, wäre hier ebenfalls eine Virus-Wirtszell-Interaktion möglich. Bekannt ist, dass HSV-1 einen allmählichen Rückgang in der mitochondrialen Ca^{2+} Aufnahme in den ersten 12 h p. i. (lytischer Zyklus) verursacht. Dies wiederum fördert die Virusreplikation (Anand und Tikoo 2013). Die limitierte Datenlage ermöglicht jedoch keine weiterführende Interpretation.

Wahrscheinlicher als die bereits genannten Interaktionen sind für die HSV-1 Replikation jedoch die Signalwege, die zwischen PP2A/PR130 und dem DDR bzw. epigenetischen Regulatoren stattfinden. Diese könnten ebenso erklären, wieso es bei HCT116^{ΔPR130} zu erhöhten Viruskonzentrationen kommt.

5.3 Zellüberleben und Apoptose der HCT116 Zellen

Der WST-1 Test misst die Funktion der mitochondrialen Dehydrogenase und ist ein zuverlässiges Instrument zur Bestimmung der Zellvitalität. In den HSV-1-infizierten HCT116 Zellen ist auffällig, dass in den ersten 6 h p. i. die Aktivität in den HCT116^{ΔPR130} Zellen vorübergehend zunimmt und bis 12 h p. i. höher als in den Kontrollen ist. In Bezug auf die Aktivität der Mitochondrien ist bekannt, dass HSV-1 die mitochondriale DNA des Wirts schnell und vollständig degradiert. Das virale UL12.5 Protein lokalisiert an die Mitochondrien und induziert den DNA-Abbau in Abwesenheit anderer viraler Genprodukte (Saffran et al. 2007). Es ist vorstellbar, dass sich das Virus hierdurch der antiviralen Immunantwort der Mitochondrien entzieht, welche durch pattern recognition receptors (PRRs) bzw. retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) like receptors (RLRs) das Eindringen des Virus registrieren. Weitere Arbeiten haben jedoch gezeigt, dass HSV-1 nicht zwangsläufig auf die Elimination der mitochondriale DNA angewiesen ist. Bei Infektionen mit UL12.5 negativem HSV-1 werden ähnlich hohe Virustiter wie in den Kontrollen erreicht (Duguay et al. 2014). Interessanterweise

ist die mitochondriale Aktivität, welche im WST-1 Test gemessen wurde, in den HCT116^{ΔPR130} Zellen in den ersten 12 h signifikant erhöht. Es ist daher unklar, wieso in den Zellen mit optimierter Virusreplikation die mitochondrialen Enzyme effizienter arbeiten, als in den Kontrollzellen. Wahrscheinlich wird hierbei die Atmungskette zur Steuerung der ATP-Produktion durch das Virus ausgenutzt, wobei eine Balance zwischen Nutzen und Schaden erwogen werden muss. Darüber hinaus ist auch möglich, dass antiapoptotische Signalwege durch HSV-1 aktiviert werden, welche den Metabolismus der Mitochondrien beeinflussen. Im klinischen Kontext gibt es Hinweise, dass bei HSVE-Patienten der Schutz von mitochondrialer DNA durch das Antibiotikum Minocyclin einen Einfluss auf das Zellüberleben bei HSV-1 Infektion hat (Wnęk et al. 2016). Daher ist die weiterführende Analyse der Interaktion zwischen PP2A/PR130 und den Wirts-Mitochondrien eventuell von Nutzen.

Die ermittelten Ergebnisse des Fixable Viability Stain 660 weisen darauf hin, dass HSV-1-infizierte HCT116 Zellen in den 24 h p. i. nur marginal nekrotische Veränderungen erfahren. Im Verlauf der Infektion nimmt die Zahl der nekrotischen Zellen zu und es ist zu erwarten, dass die übrigen Zellen Stück für Stück der Nekrose erliegen werden. Die ermittelten Ergebnisse spiegeln nicht den gesamten Zeitraum p. i. wider und lassen daher nur den Rückschluss ziehen, dass der Zelltod auf einen späteren Zeitpunkt verlagert wird.

Die Apoptose ist bei HSV-1-infizierten HCT116 Zellen mittels DNA-Fragmentation nicht nachweisbar. In der Literatur finden sich Hinweise, dass selbst bei Ethanol-Behandlung von HSV-1-infizierten HL-60 Zellen keine charakteristischen oligonukleosomalen DNA-Fragmente nachgewiesen werden konnten. HSV-1 konnte auch der nukleären Apoptose-Induktion durch zytotoxische T-Lymphozyten entgegenwirken. Die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche war ungeachtet dessen nicht betroffen, weshalb die Autoren von zwei unabhängigen Signalwegen der Apoptose-Induktion ausgehen (Jerome et al. 1998). Diese Hypothese würden auch die Experimente mit der Analyse von aktiver Caspase-3 und der Spaltung von PARP in HCT116 Zellen stützen. Es ist unwahrscheinlich, dass keine Zellen dem apoptotischen Zelluntergang erliegen, jedoch scheint HSV-1 diesem Prozess innerhalb den ersten 24 h p. i. entgegenzuwirken. In den mit STS generierten Positiv-Kontrollen stellte sich heraus, dass HCT116^{ΔPR130} Zellen empfindlicher als die Kontrollzellen sind. Dies ist nachvollziehbar, da STS ein Breitbandkinaseinhibitor (u. a. gegen Proteinkinase C) ist

und Caspase-9 aktiviert. STS inhibiert auch die CHK1, welche ein Substrat von PP2A/PR130 ist, und begünstigt den Übergang in die G2-Phase bzw. Mitose und letztendlich den Caspase-abhängigen Zelltod (Tam und Schlegel 1992).

In der Literatur belegen Daten die Inhibition von apoptotischen Signalwegen durch HSV-1. Sowohl lytische Virusproteine wie ICP22 oder ICP27, als auch Tegumentproteine wie US3 oder Hüllproteine wie US5 (gJ), US6 (gD) und US8 (gE) supprimieren die intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Signalwege. Hierbei dienen Caspasen (3/8/9), NF- κ B oder p53 als zelluläre Ziele (You et al. 2017).

Selbst bei HCT116^{APR130} Zellen, welche nachweislich empfindlicher auf STS reagieren, konnte HSV-1 die Induktion der Apoptose hemmen. Durch Supprimieren der Spaltung von Caspase-3 und PARP in den ersten 24 h p. i. ist es HSV-1 möglich, seinen Replikationszyklus zu vollenden. Dies ist ein wichtiges Indiz, wie flexibel das Virus auf genetische Veränderungen des Wirts, wie die Elimination von PR130, reagieren kann und die Instabilität der HCT116^{APR130} Zellen nutzt.

p53 ist der Schlüsselfaktor in der Kontrolle der Apoptose und die phosphorylierte Form (Serin-15) ist im Western Blot der HCT116 Zellen nach HSV-1 Infektion besonders deutlich markiert. Auf die HSV-1 Replikation hat p53 einen dualen Effekt: es spielt eine positive Rolle durch die Verstärkung der ICP27 Expression und eine negative Rolle aufgrund der Inhibition der ICP0 Expression. Der negative Effekt wird zwar durch die Interaktion von ICP22 mit p53 supprimiert, dennoch ist unklar, ob ICP22 die Apoptose direkt beeinflussen kann (Maruzuru et al. 2013). ICP27 ist für die virale Replikation aufgrund seiner vielfältigen Aktivität in der viralen mRNA/ DNA Synthese und Koordinierung von Signalwegen unerlässlich. Auf Basis von ICP27-negativen HSV-1 Varianten konnte die Inhibition der Apoptose eindeutig belegt werden (Pradhan und Nguyen 2013). ICP27 kann p38 und den Janus-Kinase Signalweg aktivieren, sowie die Expression von antiapoptotischen Genen wie gJ und gD verstärken. Hierdurch kann die Virusreplikation in der frühen Phase der Infektion maximiert und das Freisetzen des Virus in der späten Phase verbessert werden. Somit stellt es einen Schlüsselregulator für die weitere Entwicklung der Wirtszelle dar. US3 codiert für eine Serin/Threonin-Kinase, welche die biologischen Funktionen des Virus und der Wirtszelle reguliert, indem es beispielsweise den Austritt des Nucleokapsids oder das Rearrangieren des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst. Experimentelle Arbeiten zeigen, dass US3 die Freisetzung von Cytochrom C und die Aktivierung der Procaspase-3 in HSV-1-infizierten HEP-2 Zellen supprimiert und die Apoptose in einer prä-

mitochondrialen Phase blockiert. Weiterhin phosphoryliert die US3 Proteinkinase Procaspase-3, um die Apoptose-Resistenz zu fördern (Benetti und Roizman 2007). Somit reguliert US3 sowohl den intrinsischen Signalweg, aber durch Modulation von NF- κ B auch den extrinsischen Signalweg. Interessanterweise steht US3 auch mit HDAC1/2 in Verbindung, welche die Expression von PR130 supprimieren. Durch US3 kommt es zur Phosphorylierung von HDAC1/2 und somit zur Suppression von PR130. Dies könnte ein weiteres Indiz dafür sein, dass PR130 an der Limitierung des Zellüberlebens und somit der Replikation von HSV-1 beteiligt ist. Der extrinsische Signalweg wird zusätzlich durch das virale US5-Gen, welches gJ codiert, supprimiert. Das Ziel sind die Caspase-3/-8, welche nach Apoptose-Induktion durch UV-Bestrahlung in ihrer Aktivität gehemmt werden (Jerome et al. 1999). Im Zusammenhang mit all diesen Erkenntnissen über die Inhibition der Apoptose durch HSV-1 erscheinen die erlangten Ergebnisse in den HCT116 Zellen plausibel. Die Aktivierung von Caspase-3 und Spaltung von PARP wird durch die HSV-1 Infektion vermindert und das Zellüberleben verlängert. Die in den Titrationsexperimenten verminderten Viruskonzentrationen lassen sich zum einen auf die Sensibilität von HCT116^{ΔPR130} auf STS zurückführen, zum anderen sind Interaktionen zwischen dem viralen US11-Protein und STS bekannt, die zur Inhibition der STS-induzierten Apoptose führen können (Javouhey et al. 2008). Hierdurch kann die Viruskonzentration beeinflusst werden, jedoch sind unter Umständen Mechanismen im Zusammenhang mit PP2A/PR130 involviert, die bis dato noch nicht bekannt sind. Schließlich scheint die Apoptose nur zum Teil für die Verminderung des Virustiters verantwortlich zu sein.

Das letzte untersuchte Element in diesem Zusammenhang ist die 2'-5'-Oligoadenylat Synthetase 2 (OAS2). Sie ist Mitglied der 2'-5'-Synthetase Familie, Proteine, welche in der angeborenen Immunabwehr bei Virusinfektionen von Bedeutung sind. OAS2 bindet fremde Nukleinsäure im Zytoplasma (dsRNA/ dsDNA) und katalysiert die Synthese von 2'-5'-Oligoadenylat, welches latente RNase L und stimulator of interferon genes (STING) aktiviert. Dies führt zur Degradierung viraler RNA und Inhibition der Virusreplikation (Mozzi et al. 2015). Trotz dieser Hinweise in der Literatur sind im Westernblot keine nennenswerten Unterschiede im Modell mit HSV-1 und den HCT116 Zelllinien zu identifizieren. Das Fehlen von PR130 scheint diese zelluläre antivirale Antwort nicht zu beeinflussen. Es ist erwähnenswert, dass bei HSV-1 Infektion das virale RNA-bindende Protein US11 der Aktivität von OAS entgegenwirkt

(Sánchez und Mohr 2007). Durch Interferon- α/β kommt es auf transkriptionaler Ebene zu einer Aktivierung von verschiedenen Genen, u. a. IFN-stimulated gene 15 (ISG15). Dieses codiert für das ISG15-Protein, ein 15-kDa Ubiquitin-like protein (Ubl), welches aus zwei Ub-verwandten Domänen besteht. ISG15 ist ein Ubl, welches infolge einer Interferon- α/β Stimulation an zelluläre Proteine konjugiert wird. Das wesentliche konjugierende Enzym (E2) hierfür ist UBCH8. Die Zielproteine können von ISG15 vor proteasomaler Degradation geschützt, in ihrer Aktivität verändert oder in ihrer Lokalisation beeinflusst werden (Zhao et al. 2004). In allen drei Zelllinien scheint weder im Zuge der Infektion mit HSV-1 noch in den nicht-infizierten Kontrollen die Ubiquitinierung durch UBCH8 (18 kDa) eine Rolle zu spielen. Bekannt ist, dass das Influenza-B-Virus den ISG15 Signalweg umgeht (Yuan und Krug 2001).

Apoptose ist ein wichtiger Schutzmechanismus des Wirts und trägt zur Eliminierung von infizierten Zellen bei, daher sind auch im Zusammenhang mit PR130 weiterführende Experimente sinnvoll. Außerdem ist es bezüglich der Etablierung der latenten Infektion von Bedeutung, die antiapoptotischen Signale von HSV-1 detailliert zu verstehen, um die Therapiemöglichkeiten durch neue Substanze bzw. Inhibitoren zu erweitern.

5.4 DNA-Reparaturmechanismen in HSV-1-infizierten Zellen

Da sich HSV-1 als DNA-Virus im Zellkern vermehrt, interagiert es mit dem zellulären DNA-Reparaturmechanismen und triggert eine komplexe nachfolgende Reaktion. Einige spezifische Signalwege werden hierbei aktiviert, während andere gezielt inhibiert werden, um die intrinsische antivirale Abwehr zu unterdrücken. Das HSV-1 Genom wird in den Nukleus als lineares Molekül mit nicks und single-strand gaps transportiert, was Reparaturfaktoren triggern könnte. Die Manipulation dieser Genomstrukturen kann die Infektiosität vermindern und die DDR-Antwort verändern. (Smith et al. 2014). Bisher bekannte Experimente belegen, dass das lineare, virale Genom von zellulären NHEJ-Proteinen erkannt wird. Hintergrund sind endogenen inter-strand DNA cross-links (ICLs), für welche Herpesviren aufgrund ihres hohen Anteils an Guanin-Cytosin (GC) im Genom anfälliger sind (Roizman 1979). Die virale E3 ubiquitin ligase ICP0 wirkt dem entgegen, indem sie die Degradierung von DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs), einem Schlüssel des NHEJ-Signalwegs, einleitet (Parkinson et al. 1999). Parallel dazu werden andere zelluläre Proteine der homologen Rekombination (HR) Reparatur (Mre11, Rad50, Nbs1 und

Rad51) zu viralen pre-replikativen Orten und Replikationskompartments transferiert, wo sie die Virusreplikation fördern (Lilley et al. 2005). Die präzisen molekularen Mechanismen dahinter sind bisher wenig verstanden, jedoch könnte das selektive Ausschalten von Genen nachfolgend die Expression viraler Gene verhindern. Im Hinblick auf PR130 ist besonders interessant, dass ATR zu den HSV-1 Replikationszentren rekrutiert wird. In nicht-infizierten Zellen wird ATR als Reaktion auf lange Abschnitte von ssDNA angrenzend zu dsDNA aktiviert. Außerdem kommt es durch Substrate von ATM-vermittelter End-Resektion zur Aktivierung von ATR. Generell führt auch die Rekrutierung von RPA an ssDNA Strecken zur Signalweiterleitung an ATR und ATRIP, welche wiederum an der Phosphorylierung von CHK1 beteiligt sind. Obwohl nun ATM bei der Infektion von Zellen mit HSV-1 aktiviert wird, werden ATR und CHK1 entgegen der Erwartung inaktiviert, selbst unter der Behandlung mit Hydroxyurea, einer Substanz, welche Replikationsgabeln in ihrer Aktivität zum Erliegen bringen kann (Mohni et al. 2010).

In den Experimenten mit VE-821 und VE-822 konnte wiederholt gezeigt werden, dass die Virusreplikation zu einem Teil auf ATR angewiesen ist. Weiterhin ist gleichwohl bekannt, dass das virale SSB ICP8 und der Helicase-/Primase-Komplex die weitere Signaltransduktion an wichtigen Downstream-Proteinen wie RPA oder die Phosphorylierung von CHK1 hemmen (Mohni et al. 2010). Dies könnte das Kollabieren der DNA-Gabeln verhindern und hiervon würde HSV-1 profitieren (Mohni et al. 2013). Die physiologische Funktion von PP2A/PR130 ist unter anderem die Dephosphorylierung von CHK1. Im Western Blot ist ersichtlich, dass p-CHK1 bei HCT116^{ΔPR130} stärker phosphoryliert wird, was in Abwesenheit von PR130 nachvollziehbar scheint. Das dieser Effekt im Zusammenhang mit der Virusinfektion auftritt kann so interpretiert werden, dass der Übergang in die G2-Phase des Zellzyklus zum Zelluntergang führen kann, dem das Virus entgegenzusteuern versucht. Die Arretierung in der G1/S-Phase hingegen könnte für HSV-1 von Vorteil sein. Die Inhibition von CHK1 bei HCT116^{ΔPR130} Zellen sorgt für eine stärkere Freisetzung des Virus und unterstreicht somit die Rolle des Zellzyklus für den HSV-1 Replikationszyklus. In nicht-infizierten Zellen ist bekannt, dass der ATR-Signalweg die angehaltenen Replikationsgabeln stabilisieren und das Kollabieren verhindern kann, um wiederum die Formierung von DSBs zu verhindern (Peasland et al. 2011). Für HSV-1 könnte ein Erklärungsansatz diesbezüglich sein, dass die viralen Helicasen unter Umständen das Kollabieren der Gabeln nicht ausreichend verhindern können.

Infolge einer HSV-1 Infektion kommt es zudem zur Aktivierung der ATM-Kinase, was die Virusreplikation wahrscheinlich fördert (Lilley et al. 2005). Dies geschieht indem der MRN-Komplex (MRE11, RAD50 und NBS1) einen Doppelstrangbruch registriert. ATM besitzt eine Vielzahl von Substraten, unter anderem die Histonvariante H2AX (die phosphorylierte Form hiervon ist γ H2AX), welche die Signale weiterleiten. Trotz der Aktivierung von ATM wird die HR inhibiert, was mittels chromosomalen Reporter-Assays wiederholt nachgewiesen werden konnte. Daher sind die für HSV-1 nützlichen Funktionen dieser Kinasen wahrscheinlich unabhängig vom HR-Signalweg (Schumacher et al. 2012). Auch bei der lytischen Replikation von EBV wird der ATM Signalweg genutzt, allerdings ist unklar, ob ATM notwendig ist, um ideale Bedingungen für eine effiziente Replikation zu schaffen oder die Expression von lytischen Genen zu fördern (Hau und Tsao 2017). Weiterhin können replikativer Stress und die Aktivierung von ATR in proliferierenden Zellen auch den Nukleotidpool limitieren. Dieser spielt für die Synthese von DNA-Viren wiederum eine wichtige Rolle.

In Bezug auf die DNA-Reparatur moduliert HSV-1 selektiv weitere Mechanismen, beispielsweise formiert das virale ssDNA-bindende Protein ICP8 einen Komplex mit der viralen UL12 Exonuklease. Zusammen stimulieren sie die Rekombinations-abhängige Replikation mittels single-strand Annealing und Resektion, um andere Formen des End-Joining zu inhibieren (Schumacher et al. 2012). Aufgrund der Tatsache, dass der DDR Signalweg unterschiedliche und zum Teil überlappende Funktionen erfüllt, z. B. auch bei der Induktion einer Immunreaktion, ist es schwierig, präzise Aussagen bezüglich der HSV-1 Replikation zu treffen. Die durchgeführten Experimente beweisen jedoch die Relevanz von ATM und ATR für eine effiziente Replikation von HSV-1. Die Inhibition der Viruskonzentration bei HCT116^{ΔPR130} ist besonders markant, da ATM in Abwesenheit von PR130 vermindert dephosphoryliert wird. Es verbleibt bei HCT116^{ΔPR130} Zellen im phosphorylierten Zustand und steht demzufolge auch für Virusproteine zur Verfügung. Bei Inhibition von ATM wird dieser Mechanismus verhindert. Die Western Blot Daten unterstreichen die Interpretation, da die Banden von p-ATM (250 kDa) und p-ATR (250 kDa) im Zuge der HSV-1 Infektion ein stärkeres Signal aufweisen. Besonders in den nachgeschalteten CHKs spielt die Phosphorylierung offensichtlich eine Rolle. Die Funktion von PP2A/PR130 ist auch die Verminderung der Phosphorylierung von CHK1, sodass die Abwesenheit von PR130 eine stärkere Phosphorylierung durchaus erklären kann. Die resultierende Steuerung des Übergangs in die S/G2-Phase des Zellzyklus kann den Zelluntergang beeinflussen

und ist somit für HSV-1 relevant. Wichtig ist, dass die HSV-1 Infektion von neuronalen Zellen die DDR-Signaltransduktion nicht in gleichem Ausmaß aktivieren muss, wie in nicht-neuronalen Zellen, daher müssen die Daten mit Vorsicht interpretiert und können wahrscheinlich nur auf epitheliale Zellen übertragen werden (Lilley et al. 2005).

5.5 Rolle des Zellzyklus für HSV-1

Die Phase des Zellzyklus zum Zeitpunkt der Infektion entscheidet das Ergebnis des DDR-Signalwegs bei zellulärem DNA-Schaden. Weiterhin beeinflusst sie auch die virale Replikation und wird gleichermaßen von Viren manipuliert. Virale Onkoproteine zielen häufig auf den Tumorsuppressor pRb (phosphoryliertes Retinoblastomgen), woraus freier E2F Transkriptionsfaktor resultiert. Dieser unterstützt den Eingang in die S-Phase (Moody und Laimins 2010). Die viral induzierte Progression des Zellzyklus ermöglicht DNA-Viren ihren Zugang zu Replikationskompartimenten zu optimieren, welche besonders in der S-Phase erreichbar sind. Eine Alternative stellt die Aktivierung des DDR-Signalwegs in der G₂-Phase dar, wo es zu keiner Konkurrenz mit der Wirts-DNA-Synthese kommt. Die virale Dysregulation des Zellzyklus und des DDR hat darüber hinaus auch funktionell Konsequenzen für die Integrität des Wirtsgenoms. HSV-1 stimuliert nicht die Biosynthese von zellulären Nukleotiden, sondern induziert stattdessen den Arrest des Zellzyklus und ist auf virale Enzyme zur Produktion von Nukleotiden angewiesen (Hume und Kalejta 2009). Dies ist schlüssig, da HSV-1 während der lytischen Replikation eine beträchtliche Menge DNA generieren muss. Herpesviren können auf ihre eigenen Enzyme wie z. B. die DNA Polymerase zurückgreifen und müssen gegenüber kleineren DNA-Viren weniger zelluläre Enzyme des Wirts nutzen. Bisherige Experimente zeigen, dass HSV-1 und andere DNA-Viren Proteine, wie die cyclin-dependent kinases, benötigen, welche Zellzyklus abhängig sind (Schang et al. 2000). Inhibitoren von cdk2 oder cdk5 können die HSV-1 Replikation verhindern, daher scheint es naheliegend, dass HSV-1 auch die G₁/S-Phase beeinflussen kann. Tatsächlich werden HSV-1-induzierte Dysregulationen des Zellzyklus in asynchron wachsenden Zellen beobachtet. Betroffen sind z. B. das vor Infektion exprimierte cyclin E/CDK2 und cyclin A/CDK2, während die cdk-Inhibitoren, p21 und p27 wahrscheinlich nicht manipuliert werden. Weiterhin ist bekannt, dass nach Infektion die Akkumulation von hyperphosphoryliertem Rb die zelluläre DNA-Synthese wirksam hemmt. Die Daten weisen darauf hin, dass HSV-1 Mechanismen entwickelt hat, die Zellen daran hindern, nach der G₁-Phase den Checkpoint zu passieren und in

der S-Phase die DNA-Replikation zu vervollständigen (Ehmann et al. 2000). In asynchron wachsenden Hep-2 Zellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Zellzyklus Progress durch die S-Phase von der phosphorylierten Form von Cyclin E abhängig ist und es im Zuge einer Infektion mit HSV-1 zu einer Abnahme von phosphoryliertem CDK kommt. Dies wird durch ERK1/2 vermittelt. (Colao et al. 2017). Virale Proteine, die eine Bedeutung für den Arrest am G1-Checkpoint haben, sind ICP0 und ICP27. ICP0 induziert die Expression des CDK-Inhibitors p21 in Abhängigkeit von p53 (Hobbs und DeLuca 1999). Darüber hinaus reduziert ICP27 in Verbindung mit ICP4 und VHS die Regulatoren Cyclin D1 und Cdk4, wodurch der G1-Arrest erreicht wird (Song et al. 2001). Die Aktivierung von Wirtsproteinen des DDR-Signalwegs führt auch zum Arrest des Zellzyklus, so werden z. B. durch den ATM/ATR-Signalweg CHK1 bzw. CHK2 phosphoryliert, welche wiederum nachgeschaltete Zielproteine phosphorylieren, welche den G1/S-Arrest verursachen. Ein Beispiel hierfür ist p53, welches p21 hochreguliert und dieses nun als Cdk2-Inhibitor funktioniert. Der Zellzyklus bleibt infolgedessen in der G1-Phase, bis der Schaden repariert oder die ATM/ATR-induzierte Repression aufgehoben wird. Um diesen Prozess modulieren zu können, sind nicht nur vorgeschaltete Aktivatoren wie ATM/ATR Ziele, sondern auch CHK1 bzw. CHK2 zur viralen Inaktivierung des DDR. Aus den bisherigen Daten ist bekannt, dass genau dieser Signalweg für die HSV-1 Replikation von Bedeutung ist und folglich ist es wahrscheinlich, dass PP2A/PR130 auch hier wesentlich ist.

Die durchgeführten Zellversuche zeigen, dass im Zuge einer HSV-1 Infektion die HCT116 Zellen in der G₁-Phase arretiert werden bzw. der Progress der S-Phase in die G₂-Phase nicht mehr möglich ist. Im Vergleich zu den Kontrollen befinden sich in HSV-1-infizierten HCT116^{ΔPR130} Zellen mehr Zellen in der S-Phase, jedoch ebenfalls keine in der G₂-Phase. Hier könnte die Ursache der erhöhten Replikationsrate von HSV-1 in HCT116^{ΔPR130} Zellen gegenüber den Kontrollen liegen, denn die S-Phase bietet für Viren optimale Bedingungen wie etwa den Zugriff auf den zellulären Nukleotidpool, was durch die Arretierung erst ermöglicht wird. Dieser Interpretationsansatz könnte ferner erklären, wieso trotz gleicher Versuchsanordnungen Unterschiede in den Virustitern bei HCT116^{ΔPR130} zu finden sind. Je nachdem in welcher Phase (G₁, S oder G₂) sich die HCT116 Zellen zum Zeitpunkt der Infektion befinden, könnte der Effekt verstärkt oder vermindert auftreten. Die Ergebnisse der durch FKS-Depletion induzierten Synchronisation der Zellzyklen scheinen hier widersprüchlich, denn die

Unterschiede im Vergleich zu den nicht-synchronisierten HCT116 Zellen sind eher marginal. Jedoch müssten zur Überprüfung der Synchronisation weitere Experimente durchgeführt werden, denn die Inkubation der HCT116 Zellen im Nährmedium ohne FKS führt nicht zwangsläufig zur vollständigen Synchronisierung der Zellzyklen. Eine besser geeignete Methode wäre z. B. die Applikation von Thymidin oder Aphidicolin (Chen und Deng 2018). Zur Überprüfung der erlangten Ergebnisse in nachfolgenden Versuchen sollte dies berücksichtigt werden. Die getroffenen Aussagen bezüglich der G1- bzw. S-Phase bleiben hiervon jedoch unberührt. PP2A/PR130 spielt in dem Progress des Zellzyklus im Zusammenhang mit CHK1 eine entscheidende Rolle und könnte diese auch im Rahmen der Infektion mit HSV-1 darstellen.

WEE1 ist eine nukleäre Kinase, welche zur Familie der Serin-/Threonin-Kinasen gehört und eine Schlüsselrolle in der Zellzyklus Progression einnimmt. Es reguliert die Zellgröße und inhibiert den Eingang in die Mitose durch Inhibition von CDK-1. Die Dauer der G2-Phase und die G2/M-Progression wird von WEE1 maßgeblich beeinflusst (Matheson et al. 2016). Im Western Blot scheint das Signal von WEE1 (100 kDa) in den nicht-infizierten HCT116^{ΔPR130} gegenüber HCT116^{Wildtyp} und HCT116^{ΔgDNA} Zellen verstärkt zu sein. Dem gegenüber ist das Signal bei Infektion mit HSV-1 in allen Zelllinien vermindert. Bei der nachgeschalteten Kinase, genauer: der phosphorylierten Form von CDK-1, ist im Zuge der Infektion mit HSV-1 ein deutlich verringertes Signal im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen zu verzeichnen. Bisher sind keine Interaktionen zwischen WEE1 und HSV-1 bekannt, dennoch sollte die Regulation des G2/M-Checkpoints untersucht werden, da von verschiedenen Viren bekannt ist, dass sie mit PP2A interagieren. Dieses kann als Cdc25 Regulator den G2/M-Checkpoint aktivieren (Margolis et al. 2006). Im Zusammenhang mit HSV-1 gibt es nach derzeitigem Kenntnisstand allerdings keinen Anhalt hierfür.

5.6 Bedeutung der HDACs in HSV-1-infizierten Zellen

Viren verwenden unterschiedliche Strategien, um ihr Genom gegen die intrinsische Immunabwehr zu schützen. Die Modifizierung von Chromatin ist ein Schlüsselement zellulärer DNA-Reparaturmechanismen. Die Deposition von Histonen oder die Formation von Nukleosomen an viralen Genomen limitiert das Andocken von nachteiligen Reparaturfaktoren. Dies dient auch als Erklärungsansatz, warum im Zuge einer HSV-1 Infektion nur eine schwache Assoziation von Histonen beobachtet wird (Conn und Schang 2013). Weiterhin ist bekannt, dass die Deposition der Histon-

Variante H3.3 auf eindringende HSV-1 Genome durch den HIRA Histon-Chaperon-Komplex zur Inhibition der viralen Genexpression und lytischen Infektion führen (Rai et al. 2017). Bisher ist jedoch noch unklar, inwiefern die Kombination von Histonen und deren Modifikation von viralen Genomen die DDR Proteine beeinflusst, welche ebenfalls mit den viralen Genomen assoziiert sind.

Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist PP2A/PR130, welches physiologisch durch HDAC1/2 supprimiert wird und für die Dephosphorylierung von ATM und CHK1 mitverantwortlich ist. Es könnte die Verbindung der epigenetischen Modifikation und DDR im Zuge einer HSV-1 Infektion darstellen. In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Viruskonzentration in HCT116^{ΔPR130} Zellen signifikant höher ist als in den Kontrollzellen. Gleichzeitig kommt es bei Inhibition von HDAC1/2 durch MS-275 im Zuge einer HSV-1 Infektion zu verminderten Viruskonzentrationen in allen HCT116 Zellen. Dies könnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein. In den PR130-positiven Zellen induziert die Inhibition durch MS-275 die Expression und Acetylierung der regulatorischen Untereinheit PR130 von PP2A. PP2A kann als Holoenzym somit an der Dephosphorylierung von ATM bzw. CHK1 mitwirken. Die Kontrolle des Zellzyklus Progress durch PR130 beeinflusst den Übergang von Zellen aus der G1- zur S-Phase. Die herabgesetzte Aktivität der beiden Kinasen (ATM bzw. CHK1) führt dazu, dass der Arrest der S-Phase nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Zellen gelangen in die G2-Phase bzw. Mitose und erliegen dem apoptotischen Zelltod.

In PR130-negativen Zellen werden ATM und CHK1 weniger dephosphoryliert und es verbleiben mehr Zellen in der S-Phase. Hiervon profitiert HSV-1 und repliziert sich in HCT116^{ΔPR130} Zellen signifikant besser. Dieser Zusammenhang wird in der Abbildung 41 schematische dargestellt. Weiterhin spielt die direkte Interaktion zwischen HDACs und HSV-1 eine Rolle. Beispielsweise ist bisher bekannt, dass HDAC1 mit ICP8, ICP0 bzw. US3 und HDAC2 mit US3 interagieren. ICP8 ist für die Umverteilung des HDAC1/CoRest Komplex mit LSD1 ins Zytoplasma verantwortlich. Als eine etablierte Histon-Demethylase könnte LSD1 im Zusammenspiel mit HDACs die koordinierte Regulation der post-translationalen Modifikation von Histonen in Verbindung mit dem viralen Genom veranlassen (Shi et al. 2005). ICP0 unterbricht die Assoziation von HDAC1 mit CoRest und lokalisiert HDAC1/ICP0 an ND10 bodies (nuclear domain 10) (Gu und Roizman 2009). Dies wirkt sich direkt auf die virale Genexpression und Replikation aus.

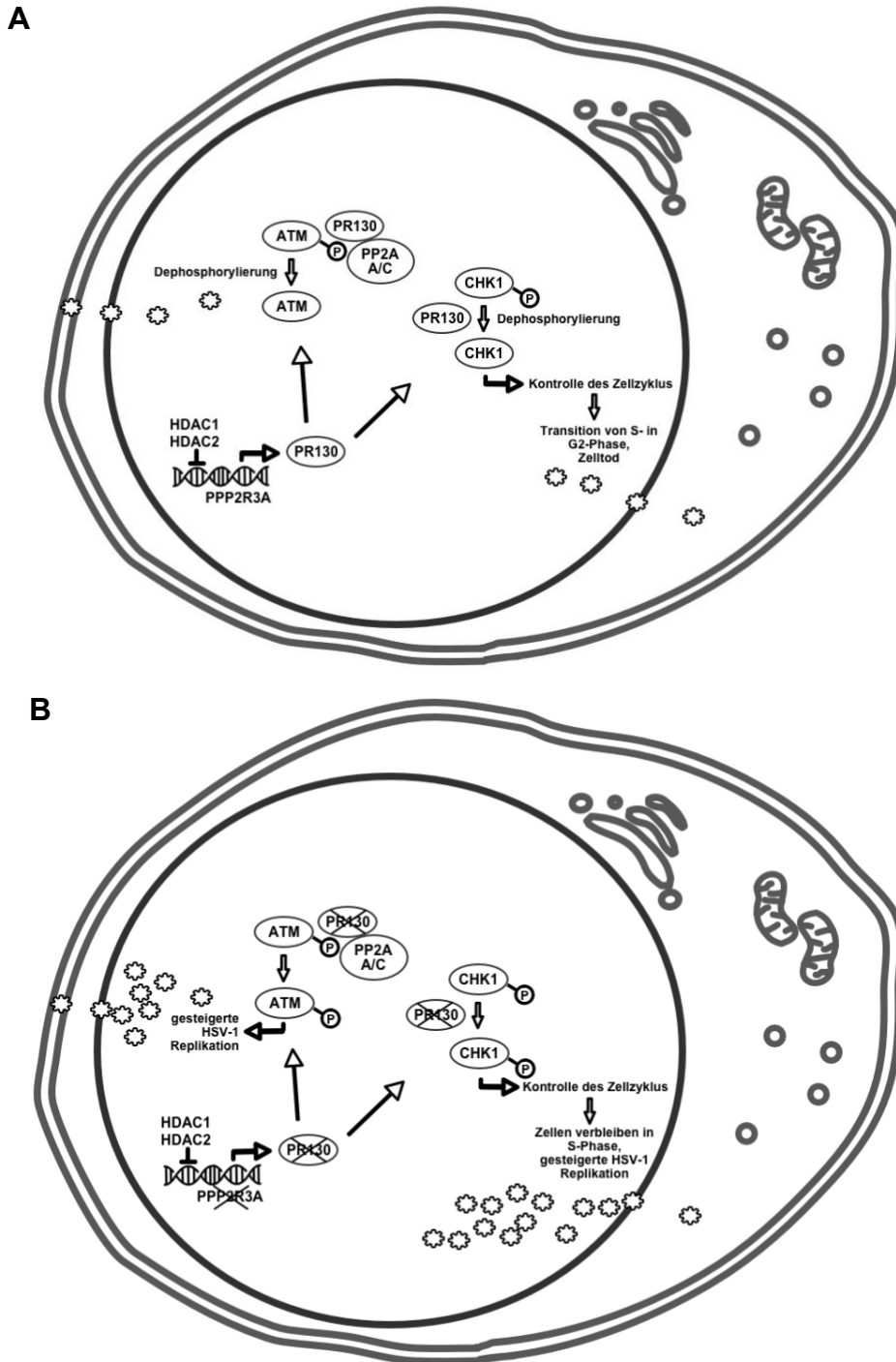


Abbildung 41:

A) Schematische Abbildung einer HCT116^{Wildtyp} Zelle; physiologisch unterdrücken HDAC1/2 die Expression von PR130, die Inhibition von HDAC1/2 z. B. durch MS-275 erhöht die Expression von PPP2R3A und somit von PR130. Das Holoenzym PP2A/PR130 ist an der Dephosphorylierung von ATM sowie von CHK1 beteiligt, infolgedessen kontrolliert PR130 den Zellzyklus und im Verlauf einer HSV-1 Infektion ist die Virusreplikation limitiert;

B) Schematische Abbildung einer HCT116^{ΔPR130} Zelle; durch das Eliminieren des Genabschnitts von PPP2R3A wird PR130 nicht exprimiert und bei einer Infektion mit HSV-1 verbleiben ATM und CHK1 phosphoryliert, mehr Zellen befinden sich mit ihrem Zellzyklus in der S-Phase und HSV-1 kann sich effektiv replizieren.

Die Zunahme an ICP0 ermöglicht es ICP0 HDAC1 von CoRest zu verdrängen. Hierdurch wird auch die CoRest-assoziierte Genrepression inhibiert (Gu und Roizman 2007). Die virale Proteinkinase US3 kann die Expression von viralen Reportergenen bewirken und die nachgeschaltete Phosphorylierung sowohl von HDAC1 als auch von HDAC2 steht mit US3 im Zusammenhang. Für die Replikation von HSV-1 spielt dies jedoch nur eine untergeordnete Rolle (Walters et al. 2010). Dennoch verursachen diese viralen Faktoren (ICP0, ICP8, US3) Veränderungen in der Lokalisation und funktionalen Rolle von HDACs und Ko-Repressor-Komplexen im Zuge einer HSV-1 Infektion. Sie fördern die virale Replikation und es bedarf weiterer Experimente zur Analyse der Interaktion zwischen viralen Proteinen und HDACs, um ein umfassendes Verständnis über die Details zu entwickeln. Bei den HCT116 Experimenten mit MS-275 zeigte sich eine Verminderung der Viruskonzentrationen, obwohl bei der Inhibition von HDAC1/2 auch eine Steigerung der Viruskonzentration möglich ist.

Solche Ergebnisse habe sich im Zusammenhang mit onkolytischen HSV-1 Experimenten gezeigt. Das Epilepsie Medikament Valproat ist ebenso ein HDAC-Inhibitor und der Einsatz in Gliomzellen konnte die Transkription von IFN-stimulierenden antiviralen Genen wie z. B. Signal-transducer and activator of transcription 1 (STAT1) supprimieren. Dies führt zu gesteigerter HSV-1-Genexpression, -Ausbreitung und Zytotoxizität. Der Transkriptionsfaktor STAT1 kann durch mehrere Liganden, wie beispielsweise Interferon alpha (IFN- α), Interferon gamma (IFN- γ) oder den Epidermal Growth Factor (EGF) aktiviert werden. Weiterhin spielt er eine Rolle bei der Immunantwort auf Pathogene und dem Zellüberleben, weshalb er in Folge einer Virusinfektion häufig aktiviert wird. STAT1 führt nach Aktivierung zu einem Hochregulieren von Interferon-Stimulated Genes (ISG) und erhöhte damit sekundär die Interferon-Produktion. Interessant ist, dass STAT1 in den HCT116 Zellen bei einer Infektion mit HSV-1 im Western Blot vermindert exprimiert und somit vermutlich weniger Interferon produziert wird. Zwischen den HCT116 Zellen ist kein Unterschied detektierbar, weshalb der Rückschluss nahe liegt, dass es sich um eine Begrenzung der antiviralen Antwort des Wirts durch HSV-1 handelt.

Ähnlich wie in den durchgeführten Experimenten mit MS-275 in dieser Arbeit musste Valproat vor Zugabe des Virus appliziert werden, um vorteilhafte Effekte zu verursachen. Die zeitgleiche Gabe hatte nicht die gleichen Auswirkungen. Hieraus lässt sich ableiten, dass der Zeitpunkt der Gabe für eine effektive Kombinationstherapie von großer Relevanz ist (Otsuki et al. 2008). Auch andere

HDAC-Inhibitoren wie Trichostatin A verbessern die Replikation und onkolytische Aktivität von mutiertem HSV-1 in Squamösen Zellkarzinom Zellen (SCC) (Katsura et al. 2009). Bei Brustkrebs-Zelllinien lässt sich beobachten, dass Pan-HDAC Inhibitoren oder HDACi, welche auf Klasse I HDACs abzielen, effektiver sind, als Inhibitoren für Klasse II bzw. selektive Inhibitoren (Cody et al. 2014).

Bezogen auf den Zustand der latenten Infektion ist bekannt, dass Neuronen, die mit rekombinantem HSV-1 latent infiziert wurden, auf die Applikation von Trichostatin reagieren. Aufgrund der darauffolgenden Zunahme der Aktivität von viralen immediate early Promotoren liegt die Vermutung nahe, dass HDACs eine Bedeutung in der Kontrolle der HSV-1 Latenz bzw. der Reaktivierung einnehmen (Arthur et al. 2001). Auch wenn in dieser Arbeit der Fokus auf dem lytischen Zyklus liegt, so wäre dennoch interessant, die Rolle von PP2A/PR130 in der latenten Phase zu untersuchen. Hier könnten neue Erkenntnisse über die Reaktivierung gewonnen werden, denn die Interaktion von HDAC1/2 und HSV-1 lässt sich mit Kenntnis über PR130 eventuell neu interpretieren.

VI. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass PR130 eine wichtige Rolle bei der Infektion mit HSV-1 spielt. Das Ausschalten dieser regulatorischen Untereinheit von PP2A verursacht höhere Virustiter und veränderte Zellvitalität. Der Grund hierfür ist vorrangig in der Interaktion von PR130 mit ATM und CHK1 zu sehen (Goder et al. 2018). Infolge der Abwesenheit von PR130 kommt es nicht zur Dephosphorylierung dieser Kinasen. Aus der Literatur ist bekannt, dass HSV-1 ATM zur effektiven Replikation benötigt (Edwards et al. 2018). Weiterhin unterbleibt die Zellzykluskontrolle durch CHK1 und das Virus kann die S-Phase der Wirtszelle für die eigene Replikation ausnutzen. Entscheidend ist auch, dass die Aktivierung von Caspase-3 durch HSV-1 in HCT116^{ΔPR130} Zellen reduziert wird und HSV-1 somit direkt antiapoptotisch agiert (You et al. 2017). Eine verstärkte Nekrose in den HCT116^{ΔPR130} Zellen konnte zudem ausgeschlossen werden. Zusammenfassend begünstigen diese Faktoren die virale Replikation. Die erzielten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass PR130 zur Limitierung von Virusinfektionen von der Wirtszelle benötigt wird. Die Kenntnisse über die Interaktion zwischen HDAC1/2 und PR130 im Verlauf einer HSV-1 Infektion können dazu beitragen, das Verständnis von lytischen und auch latenten Phasen detaillierter zu verstehen und bisher gewonnene Daten in diesem Zusammenhang neu zu bewerten. Weiterführende Experimente wären in Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y) durchführbar. Diese stellen einen geeigneten Wirt dar und könnten die erlangten Ergebnisse in einem zusätzlichen Zellkulturmodell stützen.

VII. Anhang

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abbildung 1: Schematischer Aufbau des HSV-1	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HSV-1	8
Abbildung 3: Struktur der Protein Phosphatase PP2A	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Holoenzymstruktur von PP2A	20
Abbildung 5: Zellrasen unbehandelter Vero-Zellen	34
Abbildung 6: Schema des Genabschnitts von PPP2R3A	35
Abbildung 7: Zellrasen HCT116 ^{Wildtyp} , HCT116 ^{ΔgDNA} , HCT116 ^{ΔPR130}	36
Abbildung 8: Schematische Darstellung der katalytischen Spaltung von WST-1	40
Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf einer HSV-1 Infektion in HCT116 Zellen	51
Abbildung 10: Viruskonzentration nach 12 h bzw. 24 h p. i. in HCT116 Zellen	53
Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der HSV-1 Infektion im Überstand (HCT116)	53
Abbildung 12: WST-1 Test HSV-1-infizierter HCT116 Zellen	54
Abbildung 13: qPCR der HSV-1-infizierten HCT116 Zellen 12 h p. i.	55
Abbildung 14: qPCR der HSV-1-infizierten HCT116 Zellen 36 h p. i.	55
Abbildung 15: HSV-1/E70K/EGFP Infektion von HCT116 Zellen 12 h p. i.	56
Abbildung 16: HSV-1/E70K/EGFP Infektion von HCT116 Zellen 36 h p. i.	57
Abbildung 17: Nicht-infizierte HCT116 Zellen nach 24 h	58
Abbildung 18: Flowzytometrie HSV-1/E70K/EGFP-infizierter HCT116 Zellen	59
Abbildung 19: DNA-Fragmentation HSV-1-infizierter HCT116 Zellen	59
Abbildung 20: Analyse von Casp. 3 / PARP in HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	61
Abbildung 21: Apoptotische Zellen bei STS behandelten HCT116 ^{ΔPR130} Zellen	61
Abbildung 22: EGFP-Messung HCT116 ^{ΔPR130} Zellen nach Infektion mit HSV-1/E70K/EGFP und STS-Behandlung	62

Abbildung 23: Virustitration HCT116 ^{ΔPR130} Zellen nach Infektion mit HSV-1/E70K/EGFP und STS-Behandlung	62
Abbildung 24: Flowzytometrie (Fixable Viability Stain 660) nach 24 h und 48 h	63
Abbildung 25: Western Blot HCT116 Zellen (ATM bzw. CHK2)	64
Abbildung 26: Western Blot HCT116 Zellen (ATR bzw. CHK1)	65
Abbildung 27: Western Blot HCT116 Zellen (p53 bzw. p-p53 Ser15)	65
Abbildung 28: Western Blot HCT116 Zellen (WEE1 bzw. p-CDK-1)	66
Abbildung 29: Western Blot HCT116 Zellen (PR130)	66
Abbildung 30: Western Blot HCT116 Zellen (HDAC1-3)	67
Abbildung 31: Western Blot HCT116 Zellen (STAT1)	67
Abbildung 32: Western Blot HCT116 Zellen (OAS2 bzw. UBCH8)	68
Abbildung 33: Viruskonzentration MS-275 behandelte HCT116 Zellen	68
Abbildung 34: Viruskonzentration MS-275 (24 h) behandelte HCT116 Zellen	69
Abbildung 35: Viruskonzentration FK-228 behandelte HCT116 Zellen	70
Abbildung 36: Viruskonzentration VE-821 behandelte HCT116 Zellen	71
Abbildung 37: WST-1 Test VE-822 behandelte HCT116 Zellen	72
Abbildung 38: Viruskonzentration VE-822 behandelte HCT116 Zellen	73
Abbildung 39: Viruskonzentration MK-8776 behandelte HCT116 Zellen	74
Abbildung 40: Zellzyklusphasen von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	75
Abbildung 41: Schematische Abbildung der Inhibition von HDAC1/2 und Rolle von PR130 im Zuge einer HSV-1 Infektion	90

Tabellenverzeichnis	Seite
Tabelle 1: Übersicht humanpathogener Herpesviren	4
Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren und ihre Funktion / Konzentrationen	42
Tabelle 3: Zellzyklus (asynchron) von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	75
Tabelle 4: Zellzyklus (FKS-Depletion) von HSV-1-infizierten HCT116 Zellen	76

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche 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: *Herr Prof. Dr. rer. nat. Andreas Henke, Herr Prof. Dr. rer. nat. Oliver Krämer, Frau Dr. rer. nat. Mandy Beyer, Frau Dr. rer. nat. Brigitte Glück,*

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 15.11.2021

Christoph F. Jacob

Danksagung

Mein Dank gebührt in erster Linie meinem Doktorvater Prof. Dr. Henke, der mich mit der Materie vertraut gemacht hat und bei der Auswahl des Themas federführend war. Er hatte jeder Zeit ein offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen und sorgte dafür, dass ich in allen Teilen der Arbeit bestens betreut wurde. Die Zusammenarbeit hat mich fachlich wie auch persönlich sehr bereichert.

Darüber hinaus gilt mein Dank Prof. Dr. Krämer, welcher für die Initiation des Projekts mit verantwortlich ist. Durch ihn und seine Arbeitsgruppe konnte meine Arbeit vorangebracht werden. Für die Durchführung der Western Blots am Institut für Toxikologie des Universitätsklinikums Mainz sei hier nochmals ausdrücklich gedankt.

Die Mitarbeiter der Sektion Experimentelle Virologie sollen ebenfalls nicht unerwähnt bleiben. Vielen Dank für die Bereitstellung von Material, die Beantwortung fachlicher Fragen und die Hilfe bei praktischen Tätigkeiten. Sie waren mir eine große Hilfe.

Vielen Dank dem Interdisziplinärem Zentrum für Klinische Forschung Jena für die Unterstützung durch das Stipendium und das gut organisierte Retreat in Bad Blankenhain.

Danke an meine wundervolle Ehefrau Eva, für deine Unterstützung, die mir immer wieder Kraft und Motivation gegeben hat.

Danke an meine Familie, die mich beständig gefördert und unterstützt hat. Ohne euch wäre dies alles nicht möglich gewesen.

Literaturverzeichnis

Alekseev O, Donovan K, Azizkhan-Clifford J. 2014. Inhibition of Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Kinase Suppresses Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Keratitis IOVS, 55 (2):706-715.

Amir J. 2001. Clinical Aspects and Antiviral Therapy in Primary Herpetic Gingivostomatitis. *Pediatr Drugs*, 3 (8):593-597.

Anand SK, Tikoo SK. 2013. Viruses as modulators of mitochondrial functions. *Adv Virol*, 2013:738794.

Arino J, Woon CW, Brautigan DL, Miller TB, Johnson GL. 1988. Human liver phosphatase 2A: cDNA and amino acid sequence of two catalytic subunit isotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (12):4252.

Arthur JL, Scarpini CG, Connor V, Lachmann RH, Tolkovsky AM, Efstathiou S. 2001. Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro. *J Virol*, 75 (8):3885-3895.

Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K. 2007. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press.

Aryal S 14.08.2019. Structure of HSV-1 & Genom [Website]. <https://microbenotes.com/herpes-simplex-virus-1-hsv-1/>.

Astruc J. 1754. *De morbis venereis. A treatise of Venereal Disease*. London: Innys and Richardson.

Aubert M, Madden EA, Loprieno M, DeSilva Felixge HS, Stensland L, Huang ML, Greninger AL, Roychoudhury P, Niyonzima N, Nguyen T, Magaret A, Galleto R, Stone D, Jerome KR. 2016. In vivo disruption of latent HSV by designer endonuclease therapy. *JCI Insight*, 1 (14).

Avitabile E, Forghieri C, Campadelli-Fiume G. 2009. Cross talk among the glycoproteins involved in herpes simplex virus entry and fusion: the interaction between gB and gH/gL does not necessarily require gD. *J Virol*, 83 (20):10752-10760.

Ayoub HH, Chemaitelly H, Abu-Raddad LJ. 2019. Characterizing the transitioning epidemiology of herpes simplex virus type 1 in the USA: model-based predictions. *BMC Medicine*, 17 (1):57-57.

Baskaran R, Velmurugan BK. 2018. Protein phosphatase 2A as therapeutic targets in various disease models. *Life Sci*, 210:40-46.

Benetti L, Roizman B. 2007. In transduced cells, the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 precludes activation and induction of apoptosis by transfected procaspase 3. *J Virol*, 81 (19):10242-10248.

Benson PM, Malane SL, Banks R, Hicks CB, Hilliard J. 1989. B Virus (Herpesvirus simiae) and Human Infection. *JAMA Dermatology*, 125 (9):1247-1248.

Bers DM. 2004. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol*, 37 (2):417-429.

Bloom DC, Giordani NV, Kwiatkowski DL. 2010. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *BBA Gene Regulatory Mechanisms*, 1799 (3):246-256.

Bohn-Wippert K, Kaspar M, Zell R, Sauerbrei A, Krumbholz A, Karrasch M. 2015. Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. *J Antimicrob Chemother*, 71 (1):6-16.

Bradner JE, Mak R, Tanguturi SK, Mazitschek R, Haggarty SJ, Ross K, Chang CY, Bosco J, West N, Morse E, Lin K, Shen JP, Kwiatkowski NP, Gheldof N, Dekker J, DeAngelo DJ, Carr SA, Schreiber SL, Golub TR, Ebert BL. 2010. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (28):12617.

Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE. 1981. Heterogeneity of Malignant Cells from a Human Colonic Carcinoma. *Cancer Res*, 41 (5):1751.

Brunnemann A-K, Liermann K, Deinhardt-Emmer S, Maschkowitz G, Pohlmann A, Sodeik B, Fickenscher H, Sauerbrei A, Krumbholz A. 2016. Recombinant herpes simplex virus type 1 strains with targeted mutations relevant for aciclovir susceptibility. *Sci Rep*, 6:29903.

Cayla X, Ballmer-Hofer K, Merlevede W, Goris J. 1993. Phosphatase 2A associated with polyomavirus small-T or middle-T antigen is an okadaic acid-sensitive tyrosyl phosphatase. *Eur J Biochem*, 214 (1):281-286.

Chen G, Deng X. 2018. Cell Synchronization by Double Thymidine Block. *Bio-protocol*, 8 (17):e2994.

Choi EJ, Kee SH. 2014. Axin expression delays herpes simplex virus-induced autophagy and enhances viral replication in L929 cells. *Microbiol Immunol*, 58 (2):103-111.

Christen V, Duong F, Bernsmeier C, Sun D, Nassal M, Heim MH. 2007. Inhibition of alpha interferon signaling by hepatitis B virus. *J Virol*, 81 (1):159-165.

Cocchi F, Menotti L, Dubreuil P, Lopez M, Campadelli-Fiume G. 2000. Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated

by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin1 (PRR1/HveC/HlgR) and nectin2 (PRR2/HveB). *J Virol*, 74 (8):3909-3917.

Cody JJ, Markert JM, Hurst DR. 2014. Histone Deacetylase Inhibitors Improve the Replication of Oncolytic Herpes Simplex Virus in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9 (3):e92919.

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 (1):9176.

Colgrove RC, Liu X, Griffiths A, Raja P, Deluca NA, Newman RM, Coen DM, Knipe DM. 2016. History and genomic sequence analysis of the herpes simplex virus 1 KOS and KOS1.1 sub-strains. *Virol J*, 487:215-221.

Conn KL, Schang LM. 2013. Chromatin dynamics during lytic infection with herpes simplex virus 1. *Viruses*, 5 (7):1758-1786.

Conn PM. 2008. *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. 1. Aufl. Totowa: Humana Press.

Corey L, Spear PG. 1986. Infections with Herpes Simplex Viruses. *N Engl J Med*, 314 (11):686-691.

Coriell LL, Rake G. 1950. Electron microscopy of herpes simplex. *J Bacteriol Res*, 59 (1):61-68.

Creyghton MP, Roel G, Eichhorn PJ, Vredeveld LC, Destree O, Bernards R. 2006. PR130 is a modulator of the Wnt-signaling cascade that counters repression of the antagonist Naked cuticle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (14):5397-5402.

Dagda RK, Zaucha JA, Wadzinski BE, Strack S. 2003. A developmentally regulated, neuron-specific splice variant of the variable subunit Bbeta targets protein phosphatase 2A to mitochondria and modulates apoptosis. *J Biol Chem*, 278 (27):24976-24985.

Davis AJ, Yan Z, Martinez B, Mumby MC. 2008. Protein phosphatase 2A is targeted to cell division control protein 6 by a calcium-binding regulatory subunit. *J Biol Chem*, 283 (23):16104-16114.

del Solar V, Lizardo Darleny Y, Li N, Hurst Jerod J, Brais Christopher J, Atilla-Gokcumen GE. 2015. Differential Regulation of Specific Sphingolipids in Colon Cancer Cells during Staurosporine-Induced Apoptosis. *Chem Biol*, 22 (12):1662-1670.

Dohner K, Wolfstein A, Prank U, Echeverri C, Dujardin D, Vallee R, Sodeik B. 2002. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. *Mol Biol Cell*, 13 (8):2795-2809.

Duguay BA, Saffran HA, Ponomarev A, Duley SA, Eaton HE, Smiley JR. 2014. Elimination of mitochondrial DNA is not required for herpes simplex virus 1 replication. *J Virol*, 88 (5):2967-2976.

Edwards TG, Bloom DC, Fisher C. 2018. The ATM and Rad3-Related (ATR) Protein Kinase Pathway Is Activated by Herpes Simplex Virus 1 and Required for Efficient Viral Replication. *J Virol*, 92 (6).

Ehmann GL, McLean TI, Bachenheimer SL. 2000. Herpes Simplex Virus Type 1 Infection Imposes a G1/S Block in Asynchronously Growing Cells and Prevents G1 Entry in Quiescent Cells. *Virology*, 267 (2):335-349.

Engman ML, Adolfsson I, Lewensohn-Fuchs I, Forsgren M, Mosskin M, Malm G. 2008. Neuropsychologic outcomes in children with neonatal herpes encephalitis. *Pediatr Neurol*, 38 (6):398-405.

Fatahzadeh M, Schwartz RA. 2007. Human herpes simplex labialis. *Clin Exp Dermatol*, 32 (6):625-630.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM. 2013. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Floß N, Doff S. 2019. Opportunistische Infektionen durch humane Herpesviren. *Der Internist*, 60 (7):678-683.

Gantner BN, Jin H, Qian F, Hay N, He B, Ye RD. 2012. The Akt1 isoform is required for optimal IFN-beta transcription through direct phosphorylation of beta-catenin. *J Immunol*, 189 (6):3104-3111.

Garibal J, Hollville É, Bell AI, Kelly GL, Renouf B, Kawaguchi Y, Rickinson AB, Wiels J. 2007. Truncated Form of the Epstein-Barr Virus Protein EBNA-LP Protects against Caspase-Dependent Apoptosis by Inhibiting Protein Phosphatase 2A. *J Virol*, 81 (14):7598.

Goder A, Emmerich C, Nikolova T, Kiweler N, Schreiber M, Kuhl T, Imhof D, Christmann M, Heinzl T, Schneider G, Kramer OH. 2018. HDAC1 and HDAC2 integrate checkpoint kinase phosphorylation and cell fate through the phosphatase-2A subunit PR130. *Nat Commun*, 9 (1):764.

Götz J, Probst A, Mistl C, Nitsch RM, Ehler E. 2000. Distinct role of protein phosphatase 2A subunit C α in the regulation of E-cadherin and β -catenin during development. *Mech Dev*, 93 (1):83-93.

Granzow H, Klupp BG, Fuchs W, Veits J, Osterrieder N, Mettenleiter TC. 2001. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol*, 75 (8):3675-3684.

Grinde B. 2013. Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response. *J Oral Microbiol*, 5:125-136.

Gu H, Roizman B. 2007. Herpes simplex virus-infected cell protein 0 blocks the silencing of viral DNA by dissociating histone deacetylases from the CoREST-REST complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (43):17134-17139.

Gu H, Roizman B. 2009. Engagement of the Lysine-Specific Demethylase/HDAC1/CoREST/REST Complex by Herpes Simplex Virus 1. *J Virol*, 83 (9):4376.

Guo F, Stanevich V, Wlodarchak N, Sengupta R, Jiang L, Satyshur KA, Xing Y. 2014. Structural basis of PP2A activation by PTPA, an ATP-dependent activation chaperone. *Cell Res*, 24 (2):190-203.

Guo H, Reddy SA, Damuni Z. 1993. Purification and characterization of an autophosphorylation-activated protein serine threonine kinase that phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 268 (15):11193-11198.

Hafezi W, Lorentzen EU, Eing BR, Müller M, King NJC, Klupp B, Mettenleiter TC, Kühn JE. 2012. Entry of Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) into the Distal Axons of Trigeminal Neurons Favors the Onset of Nonproductive, Silent Infection. *PLOS Pathogens*, 8 (5):e1002679.

Haines K, Huang GS. 2019. Precision Therapy for Aggressive Endometrial Cancer by Reactivation of Protein Phosphatase 2A. *Cancer Res*, 79 (16):4009-4010.

Harfouche M, Chemaitelly H, Abu-Raddad LJ. 2019. Herpes simplex virus type 1 epidemiology in Africa: Systematic review, meta-analyses, and meta-regressions. *J Infect*, 79 (4):289-299.

Hau PM, Tsao SW. 2017. Epstein-Barr Virus Hijacks DNA Damage Response Transducers to Orchestrate Its Life Cycle. *Viruses*, 9 (11).

Hendrix P, Mayer-Jackel RE, Cron P, Goris J, Hofsteenge J, Merlevede W, Hemmings BA. 1993. Structure and expression of a 72-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A. Evidence for different size forms produced by alternative splicing. *J Biol Chem*, 268 (20):15267-15276.

Hobbs WE, DeLuca NA. 1999. Perturbation of cell cycle progression and cellular gene expression as a function of herpes simplex virus ICP0. *J Virol*, 73 (10):8245-8255.

Hume AJ, Kalejta RF. 2009. Regulation of the retinoblastoma proteins by the human herpesviruses. *Cell Div*, 4:1-1.

Janssens V, Goris J. 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, 353 (3):417-439.

Janssens V, Goris J, Van Hoof C. 2005. PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet*, 15 (1):34-41.

Janssens V, Derua R, Zwaenepoel K, Waelkens E, Goris J. 2009. Specific regulation of protein phosphatase 2A PR72/B" subunits by calpain. *Biochem Biophys Res Commun*, 386 (4):676-681.

Janssens V, Zwaenepoel K, Rosse C, Petit MM, Goris J, Parker PJ. 2016. PP2A binds to the LIM domains of lipoma-preferred partner through its PR130/B" subunit to regulate cell adhesion and migration. *J Cell Sci*, 129 (8):1605-1618.

Janssens V, Jordens J, Stevens I, Van Hoof C, Martens E, De Smedt H, Engelborghs Y, Waelkens E, Goris J. 2003. Identification and functional analysis of two Ca²⁺-binding EF-hand motifs in the B"/PR72 subunit of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 278 (12):10697-10706.

Javouhey E, Gibert B, Arrigo AP, Diaz JJ, Diaz-Latoud C. 2008. Protection against heat and staurosporine mediated apoptosis by the HSV-1 US11 protein. *Virol J*, 376 (1):31-41.

Jerome KR, Tait JF, Koelle DM, Corey L. 1998. Herpes simplex virus type 1 renders infected cells resistant to cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis. *J Virol*, 72 (1):436-441.

Jerome KR, Fox R, Chen Z, Sears AE, Lee H, Corey L. 1999. Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J Virol*, 73 (11):8950-8957.

Johnston C, Gottlieb SL, Wald A. 2016. Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus. *Vaccine*, 34 (26):2948-2952.

Jordens J, Janssens V, Longin S, Stevens I, Martens E, Bultynck G, Engelborghs Y, Lescrier E, Waelkens E, Goris J, Van Hoof C. 2006. The protein phosphatase 2A phosphatase activator is a novel peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase. *J Biol Chem*, 281 (10):6349-6357.

Katsura T, Iwai S, Ota Y, Shimizu H, Ikuta K, Yura Y. 2009. The effects of trichostatin A on the oncolytic ability of herpes simplex virus for oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Gene Ther*, 16 (3):237-245.

Kelly BJ, Fraefel C, Cunningham AL, Diefenbach RJ. 2009. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virus Res*, 145 (2):173-186.

Kennedy PG. 1988. A retrospective analysis of forty-six cases of herpes simplex encephalitis seen in Glasgow between 1962 and 1985. *Q J Med*, 68 (255):533-540.

Kim MA, Kim HJ, Brown AL, Lee MY, Bae YS, Park JI, Kwak JY, Chung JH, Yun J. 2007a. Identification of novel substrates for human checkpoint kinase Chk1 and Chk2 through genome-wide screening using a consensus Chk phosphorylation motif. *Exp Mol Med*, 39 (2):205-212.

Kim SE, Lee WJ, Choi KY. 2007b. The PI3 kinase-Akt pathway mediates Wnt3a-induced proliferation. *Cell Signal*, 19 (3):511-518.

King DH. 1988. History, pharmacokinetics, and pharmacology of acyclovir. *J Am Acad Dermatol*, 18 (1 Pt 2):176-179.

Kleinberger T. 2015. Mechanisms of cancer cell killing by the adenovirus E4orf4 protein. *Viruses*, 7 (5):2334-2357.

Korr G, Thamm M, Czogiel I, Poethko-Mueller C, Bremer V, Jansen K. 2017. Decreasing seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Germany leaves many people susceptible to genital infection: time to raise awareness and enhance control. *BMC Infect Dis*, 17 (1):471-471.

Kruse T, Biedenkopf N, Hertz EPT, Dietzel E, Stalman G, Lopez-Mendez B, Davey NE, Nilsson J, Becker S. 2018. The Ebola Virus Nucleoprotein Recruits the Host PP2A-B56 Phosphatase to Activate Transcriptional Support Activity of VP30. *Mol Cell*, 69 (1):136-145.e136.

Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. 2014. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Mosc)*, 79 (13):1635-1652.

Lee J-H, Paull TT. 2004. Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 Complex. *Science*, 304 (5667):93.

Lees-Miller SP, Long MC, Kilvert MA, Lam V, Rice SA, Spencer CA. 1996. Attenuation of DNA-dependent protein kinase activity and its catalytic subunit by the herpes simplex virus type 1 transactivator ICP0. *J Virol*, 70 (11):7471-7477.

Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. 2018. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res*, 46 (D1):D708-D717.

Leoni V, Gianni T, Salvioli S, Campadelli-Fiume G. 2012. Herpes simplex virus glycoproteins gH/gL and gB bind Toll-like receptor 2, and soluble gH/gL is sufficient to activate NF-kappaB. *J Virol*, 86 (12):6555-6562.

Li D, Musante V, Zhou W, Picciotto MR, Nairn AC. 2018. Striatin-1 is a B subunit of protein phosphatase PP2A that regulates dendritic arborization and spine development in striatal neurons. *J Biol Chem*, 293 (28):11179-11194.

Li H, Baskaran R, Krisky DM, Bein K, Grandi P, Cohen JB, Glorioso JC. 2008. Chk2 is required for HSV-1 ICP0-mediated G2/M arrest and enhancement of virus growth. *Virol J*, 375 (1):13-23.

Li L, Li Z, Li X, Wang E, Lang F, Xia Y, Fraser NW, Gao F, Zhou J. 2016. Reactivation of HSV-1 following explant of tree shrew brain. *J Neurovirol*, 22 (3):293-306.

Li S, Brignole C, Marcellus R, Thirlwell S, Binda O, McQuoid MJ, Ashby D, Chan H, Zhang Z, Miron M-J, Pallas DC, Branton PE. 2009. The Adenovirus E4orf4 Protein Induces G2/M Arrest and Cell Death by Blocking Protein Phosphatase 2A Activity Regulated by the B55 Subunit. *J Virol*, 83 (17):8340.

Li X, Virshup DM. 2002. Two conserved domains in regulatory B subunits mediate binding to the A subunit of protein phosphatase 2A. *Eur J Biochem*, 269 (2):546-552.

Lilley CE, Carson CT, Muotri AR, Gage FH, Weitzman MD. 2005. DNA repair proteins affect the lifecycle of herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (16):5844-5849.

Littré E. 1853. *Oeuvres complètes d'Hippocrate*. Paris: Bailliere.

Liu R, Wang J-Z. 2009. Protein phosphatase 2A in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 16 (4):273-277.

Longin S, Goris J. 2006. 11 Reversible methylation of protein phosphatase 2A. In: Clarke SG, Tamanoi F, Hrsg. *The Enzymes*. Academic Press, 303-324.

Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM. 2015. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS One*, 10 (10):e0140765.

Margolis SS, Perry JA, Forester CM, Nutt LK, Guo Y, Jardim MJ, Thomenius MJ, Freel CD, Darbandi R, Ahn J-H, Arroyo JD, Wang X-F, Shenolikar S, Nairn AC, Dunphy WG, Hahn WC, Virshup DM, Kornbluth S. 2006. Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis. *Cell*, 127 (4):759-773.

Martens E, Stevens I, Janssens V, Vermeesch J, Götz J, Goris J, Van Hoof C. 2004. Genomic Organisation, Chromosomal Localisation Tissue Distribution and Developmental Regulation of the PR61/B' Regulatory Subunits of Protein Phosphatase 2A in Mice. *J Mol Biol*, 336 (4):971-986.

Maruzuru Y, Fujii H, Oyama M, Kozuka-Hata H, Kato A, Kawaguchi Y. 2013. Roles of p53 in herpes simplex virus 1 replication. *J Virol*, 87 (16):9323-9332.

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, Rosembli N, Marks AR. 2001. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol*, 153 (4):699-708.

Matheson CJ, Backos DS, Reigan P. 2016. Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 37 (10):872-881.

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 316 (5828):1160-1166.

McCright B, Rivers AM, Audlin S, Virshup DM. 1996. The B56 family of protein phosphatase 2A (PP2A) regulatory subunits encodes differentiation-induced phosphoproteins that target PP2A to both nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem*, 271 (36):22081-22089.

McGeoch DJ, Dolan A, Donald S, Brauer DHK. 1986. Complete DNA sequence of the short repeat region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Nucleic Acids Res*, 14 (4):1727-1745.

McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor P. 1988. The Complete DNA Sequence of the Long Unique Region in the Genome of Herpes Simplex Virus Type 1. *J Gen Virol*, 69 (7):1531-1574.

McQuillan G, Kruszon-Moran D, Flagg EW, Paulose-Ram R. 2018. Prevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in persons aged 14–49: United States, 2015–2016 Centers for Disease Control and Prevention.

Meeusen B, Janssens V. 2018. Tumor suppressive protein phosphatases in human cancer: Emerging targets for therapeutic intervention and tumor stratification. *Int J Biochem Cell Biol*, 96:98-134.

Mettenleiter TC. 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res*, 106 (2):167-180.

Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. 2009. Herpesvirus assembly: An update. *Virus Res*, 143 (2):222-234.

Michelson S, Turowski P, Picard L, Goris J, Landini MP, Topilko A, Hemmings B, Bessia C, Garcia A, Virelizier JL. 1996. Human cytomegalovirus carries serine/threonine protein phosphatases PP1 and a host-cell derived PP2A. *J Virol*, 70 (3):1415.

Milne RS, Nicola AV, Whitbeck JC, Eisenberg RJ, Cohen GH. 2005. Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, 79 (11):6655-6663.

Miron J, Picard C, Labonte A, Auld D, Breitner J, Poirier J. 2019. Association of PPP2R1A with Alzheimer's disease and specific cognitive domains. *Neurobiol Aging*, 81:234-243.

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. 2010. *Molekulare Virologie*. 3. Aufl. Heidelberg: Springer Spektrum.

Mohni KN, Livingston CM, Cortez D, Weller SK. 2010. ATR and ATRIP are recruited to herpes simplex virus type 1 replication compartments even though ATR signaling is disabled. *J Virol*, 84 (23):12152-12164.

Mohni KN, Dee AR, Smith S, Schumacher AJ, Weller SK. 2013. Efficient herpes simplex virus 1 replication requires cellular ATR pathway proteins. *J Virol*, 87 (1):531-542.

Moody CA, Laimins LA. 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 10 (8):550-560.

Moreno CS, Park S, Nelson K, Ashby D, Hubalek F, Lane WS, Pallas DC. 2000. WD40 repeat proteins striatin and S/G(2) nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 275 (8):5257-5263.

Mozzi A, Pontremoli C, Forni D, Clerici M, Pozzoli U, Bresolin N, Cagliani R, Sironi M. 2015. OASes and STING: adaptive evolution in concert. *Genome Biol Evol*, 7 (4):1016-1032.

Nakashima H, Kaufmann JK, Wang P-Y, Nguyen T, Speranza M-C, Kasai K, Okemoto K, Otsuki A, Nakano I, Fernandez S, Goins WF, Grandi P, Glorioso JC, Lawler S, Cripe TP, Chiocca EA. 2015. Histone deacetylase 6 inhibition enhances oncolytic viral replication in glioma. *J Clin Invest*, 125 (11):4269-4280.

Newcomb WW, Fontana J, Winkler DC, Cheng N, Heymann JB, Steven AC. 2017. The Primary Enveloped Virion of Herpes Simplex Virus 1: Its Role in Nuclear Egress. *mBio*, 8 (3):e00825-00817.

Nicola AV, Hou J, Major EO, Straus SE. 2005. Herpes simplex virus type 1 enters human epidermal keratinocytes, but not neurons, via a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol*, 79 (12):7609-7616.

Nicoll MP, Proenca JT, Efsthathiou S. 2012. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev*, 36 (3):684-705.

O'Connor CM, Hoffa MT, Taylor SE, Avelar RA, Narla G. 2019. Protein phosphatase 2A Aalpha regulates Abeta protein expression and stability. *J Biol Chem*, 294 (15):5923-5934.

Oberg B. 1989. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol Ther*, 40 (2):213-285.

Otsuki A, Patel A, Kasai K, Suzuki M, Kurozumi K, Antonio Chiocca E, Saeki Y. 2008. Histone Deacetylase Inhibitors Augment Antitumor Efficacy of Herpes-based Oncolytic Viruses. *Mol Ther*, 16 (9):1546-1555.

Oxford, Öberg. 1985. *Conquest of Viral Diseases, A Topical Review of Drugs and Vaccines*. 1 Aufl.: Amsterdam: Elsevier.

Parkinson J, Lees-Miller SP, Everett RD. 1999. Herpes simplex virus type 1 immediate-early protein vmw110 induces the proteasome-dependent degradation of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase. *J Virol*, 73 (1):650-657.

Peasland A, Wang LZ, Rowling E, Kyle S, Chen T, Hopkins A, Cliby WA, Sarkaria J, Beale G, Edmondson RJ, Curtin NJ. 2011. Identification and evaluation of a potent novel ATR inhibitor, NU6027, in breast and ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer*, 105 (3):372-381.

Pradhan P, Nguyen ML. 2013. Early passage neonatal and adult keratinocytes are sensitive to apoptosis induced by infection with an ICP27-null mutant of herpes simplex virus 1. *Apoptosis*, 18 (2):160-170.

Rai TS, Glass M, Cole JJ, Rather MI, Marsden M, Neilson M, Brock C, Humphreys IR, Everett RD, Adams PD. 2017. Histone chaperone HIRA deposits histone H3.3 onto foreign viral DNA and contributes to anti-viral intrinsic immunity. *Nucleic Acids Res*, 45 (20):11673-11683.

Ramchandani M, Kong M, Tronstein E, Selke S, Mikhaylova A, Magaret A, Huang ML, Johnston C, Corey L, Wald A. 2016. Herpes Simplex Virus Type 1 Shedding in Tears and Nasal and Oral Mucosa of Healthy Adults. *Sex Transm Dis*, 43 (12):756-760.

Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Epidemiol*, 27 (3):493-497.

Remmerie M, Janssens V. 2019. PP2A: A Promising Biomarker and Therapeutic Target in Endometrial Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9 (462).

Roizman B. 1979. The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes. *Cell*, 16 (3):481-494.

Roof C, Krohn S, Kretzschmar C, Huebner R, Rolfs A, Freund M, Junghanss C. 2013. PI3K/Akt Signaling Interacts With Wnt/ β -Catenin Signaling But Does Not Induce An Accumulation Of β -Catenin In The Nucleus Of Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. *Blood*, 122 (21):4886.

Royer DJ, Gurung HR, Jinkins JK, Geltz JJ, Wu JL, Halford WP, Carr DJJ. 2016. A Highly Efficacious Herpes Simplex Virus 1 Vaccine Blocks Viral Pathogenesis and Prevents Corneal Immunopathology via Humoral Immunity. *J Virol*, 90 (11):5514-5529.

Russell TA, Tschärke DC. 2016. Lytic Promoters Express Protein during Herpes Simplex Virus Latency. *PLOS Pathogens*, 12 (6):e1005729.

Rutkowski AJ, Erhard F, L'Hernault A, Bonfert T, Schilhabel M, Crump C, Rosenstiel P, Efstathiou S, Zimmer R, Friedel CC, Dölken L. 2015. Widespread disruption of host transcription termination in HSV-1 infection. *Nat Commun*, 6:7126-7126.

Sablina AA, Hector M, Colpaert N, Hahn WC. 2010. Identification of PP2A complexes and pathways involved in cell transformation. *Cancer Res*, 70 (24):10474-10484.

Saffran HA, Pare JM, Corcoran JA, Weller SK, Smiley JR. 2007. Herpes simplex virus eliminates host mitochondrial DNA. *EMBO Rep*, 8 (2):188-193.

Sánchez R, Mohr I. 2007. Inhibition of Cellular 2'-5' Oligoadenylate Synthetase by the Herpes Simplex Virus Type 1 Us11 Protein. *J Virol*, 81 (7):3455.

Sandbaumhuter M, Dohner K, Schipke J, Binz A, Pohlmann A, Sodeik B, Bauerfeind R. 2013. Cytosolic herpes simplex virus capsids not only require binding inner tegument protein pUL36 but also pUL37 for active transport prior to secondary envelopment. *Cell Microbiol*, 15 (2):248-269.

Santamaria E, Mora MI, Potel C, Fernandez-Irigoyen J, Carro-Roldan E, Hernandez-Alcoceba R, Prieto J, Epstein AL, Corrales FJ. 2009. Identification of replication-competent HSV-1 Cgal+ strain signaling targets in human hepatoma cells by functional organelle proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 8 (4):805-815.

Sauerbrei A, Wutzler P. 2007. Herpes simplex and varicella-zoster virus infections during pregnancy: current concepts of prevention, diagnosis and therapy. Part 1: herpes simplex virus infections. *Med Microbiol Immunol*, 196 (2):89-94.

Sawtell NM, Thompson RL. 1992. Rapid in vivo reactivation of herpes simplex virus in latently infected murine ganglionic neurons after transient hyperthermia. *J Virol*, 66 (4):2150-2156.

Schang LM, Rosenberg A, Schaffer PA. 2000. Roscovitine, a specific inhibitor of cellular cyclin-dependent kinases, inhibits herpes simplex virus DNA synthesis in the presence of viral early proteins. *J Virol*, 74 (5):2107-2120.

Schmidt K, Kins S, Schild A, Nitsch RM, Hemmings BA, Götz J. 2002. Diversity, developmental regulation and distribution of murine PR55/B subunits of protein phosphatase 2A. *Eur J Neurosci*, 16 (11):2039-2048.

Schneweis KE. 2001. Herpes-Viren / Herpes simplex Virus (HSV) 1 und 2. In: Köhler W EH, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie*. 8. Auflage Aufl: Urban Fischer Verlag München, 562-570.

Schneweis KE, Nahmias AJ. 1971. Antigens of Herpes simplex virus type 1 and 2-immunodiffusion and inhibition passive hemagglutination studies. *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol*, 141 (5):471-487.

Schumacher AJ, Mohni KN, Kan Y, Hendrickson EA, Stark JM, Weller SK. 2012. The HSV-1 exonuclease, UL12, stimulates recombination by a single strand annealing mechanism. *PLoS Pathog*, 8 (8):e1002862.

Sents W, Ivanova E, Lambrecht C, Haesen D, Janssens V. 2013. The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity. *The FEBS Journal*, 280 (2):644-661.

Shi Y-J, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y. 2005. Regulation of LSD1 Histone Demethylase Activity by Its Associated Factors. *Mol Cell*, 19 (6):857-864.

Shiraki K. 2017. Helicase-primase inhibitor amenamevir for herpesvirus infection: Towards practical application for treating herpes zoster. *Drugs Today (Barc)*, 53 (11):573-584.

Shtrichman R, Sharf R, Barr H, Dobner T, Kleinberger T. 1999. Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein is specific to transformed cells and requires an interaction with protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (18):10080.

Sili U, Kaya A, Mert A, Group HSVES. 2014. Herpes simplex virus encephalitis: clinical manifestations, diagnosis and outcome in 106 adult patients. *J Clin Virol*, 60 (2):112-118.

Simonato M, Manservigi R, Marconi P, Glorioso J. 2000. Gene transfer into neurones for the molecular analysis of behaviour: focus on herpes simplex vectors. *Trends Neurosci*, 23 (5):183-190.

Slavin HB, Gavett E. 1946. Primary herpetic vulvovaginitis. *Proc Soc Exp Biol Med*, 63:343.

Smith S, Reuven N, Mohni KN, Schumacher AJ, Weller SK. 2014. Structure of the herpes simplex virus 1 genome: manipulation of nicks and gaps can abrogate infectivity and alter the cellular DNA damage response. *J Virol*, 88 (17):10146-10156.

Song B, Yeh KC, Liu J, Knipe DM. 2001. Herpes simplex virus gene products required for viral inhibition of expression of G1-phase functions. *Virol J*, 290 (2):320-328.

Spear PG, Eisenberg RJ, Cohen GH. 2000. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virol J*, 275 (1):1-8.

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 (3):401-407.

Stevens I, Janssens V, Martens E, Dilworth S, Goris J, Van Hoof C. 2003. Identification and characterization of B^γ-subunits of protein phosphatase 2 A in *Xenopus laevis* oocytes and adult tissues. *Eur J Biochem*, 270 (2):376-387.

Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T, Martin SG. 2011. The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer*, 11 (5):364-374.

Studahl M, Lindquist L, Eriksson BM, Gunther G, Bengner M, Franzen-Rohl E, Fohlman J, Bergstrom T, Aurelius E. 2013. Acute viral infections of the central nervous system in immunocompetent adults: diagnosis and management. *Drugs*, 73 (2):131-158.

Takahashi M, Shibata H, Shimakawa M, Miyamoto M, Mukai H, Ono Y. 1999. Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J Biol Chem*, 274 (24):17267-17274.

Tam SW, Schlegel R. 1992. Staurosporine overrides checkpoints for mitotic onset in BHK cells. *Cell Growth Differ*, 3 (11):811-817.

Taylor MW. 2014. *Viruses and Man: A History of Interactions*. 1. Aufl. Basel: Springer International Publishing.

Taylor TJ, Brockman MA, McNamee EE, Knipe DM. 2002. Herpes simplex virus. *Front Biosci*, 7:d752-764.

Tsatsos M, MacGregor C, Athanasiadis I, Moschos MM, Hossain P, Anderson D. 2016. Herpes simplex virus keratitis: an update of the pathogenesis and current treatment with oral and topical antiviral agents. *Clin Exp Ophthalmol*, 44 (9):824-837.

Tyler KL. 2018. Acute Viral Encephalitis. *N Engl J Med*, 379 (6):557-566.

Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. 2008. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature*, 454 (7205):780-783.

Unna PG. 1883. *J. cutan. vener. Dis.* 1: 321. In: Oates JK, Hrsg. *Veneral disease genital herpes*. *J Hosp Med*, 13 - 19.

Vyse AJ, Gay NJ, Slomka MJ, Gopal R, Gibbs T, Morgan-Capner P, Brown DW. 2000. The burden of infection with HSV-1 and HSV-2 in England and Wales: implications for the changing epidemiology of genital herpes. *Sex Transm Infect*, 76 (3):183-187.

Walters MS, Kinchington PR, Banfield BW, Silverstein S. 2010. Hyperphosphorylation of histone deacetylase 2 by alphaherpesvirus US3 kinases. *J Virol*, 84 (19):9666-9676.

Wang SS, Esplin ED, Li JL, Huang L, Gazdar A, Minna J, Evans GA. 1998. Alterations of the PPP2R1B Gene in Human Lung and Colon Cancer. *Science*, 282 (5387):284.

Westermarck J. 2018. Targeted therapies don't work for a reason; the neglected tumor suppressor phosphatase PP2A strikes back. *FEBS J*, 285 (22):4139-4145.

Whitley RJ, Soong SJ, Linneman C, Jr., Liu C, Pazin G, Alford CA. 1982. Herpes simplex encephalitis. *Clinical Assessment*. *JAMA* 247 (3):317-320.

- Wieczorek M, Ginter T, Brand P, Heinzl T, Krämer OH. 2012. Acetylation modulates the STAT signaling code. *Cytokine Growth F R*, 23 (6):293-305.
- Wildy P. 1973. Herpes: history and classification *The herpesviruses*. New York: Academic Press, 1 - 25.
- Wilson AC, Mohr I. 2012. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. *Trends Microbiol*, 20 (12):604-611.
- Wilson LG. 1976. Viral encephalopathy mimicking functional psychosis. *Am J Psychiatry*, 133 (2):165-170.
- Wnęk M, Ressel L, Ricci E, Rodriguez-Martinez C, Guerrero JCV, Ismail Z, Smith C, Kipar A, Sodeik B, Chinnery PF, Solomon T, Griffiths MJ. 2016. Herpes simplex encephalitis is linked with selective mitochondrial damage; a post-mortem and in vitro study. *Acta Neuropathol*, 132 (3):433-451.
- Woestenberg PJ, Tjhie JHT, de Melker HE, van der Klis FRM, van Bergen JEAM, van der Sande MAB, van Benthem BHB. 2016. Herpes simplex virus type 1 and type 2 in the Netherlands: seroprevalence, risk factors and changes during a 12-year period. *BMC Infect Dis*, 16:364-364.
- Wollenberg A, Zoch C, Wetzel S, Plewig G, Przybilla B. 2003. Predisposing factors and clinical features of eczema herpeticum: a retrospective analysis of 100 cases. *J Am Acad Dermatol*, 49 (2):198-205.
- Xing Y, Xu Y, Chen Y, Jeffrey PD, Chao Y, Lin Z, Li Z, Strack S, Stock JB, Shi Y. 2006. Structure of Protein Phosphatase 2A Core Enzyme Bound to Tumor-Inducing Toxins. *Cell*, 127 (2):341-353.
- Yang J, Li Z, Gan X, Zhai G, Gao J, Xiong C, Qiu X, Wang X, Yin Z, Zheng F. 2016. Deletion of Pr130 Interrupts Cardiac Development in Zebrafish. *Int J Mol Sci*, 17 (11).
- Yang SI, Lickteig RL, Estes R, Rundell K, Walter G, Mumby MC. 1991. Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen. *Mol Cell Biol*, 11 (4):1988.
- You Y, Cheng A-C, Wang M-S, Jia R-Y, Sun K-F, Yang Q, Wu Y, Zhu D, Chen S, Liu M-F, Zhao X-X, Chen X-Y. 2017. The suppression of apoptosis by α -herpesvirus. *Cell Death Dis*, 8 (4):e2749.
- Yuan W, Krug RM. 2001. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J*, 20 (3):362-371.
- Zhang Y, Talmon G, Wang J. 2016. MicroRNA-587 antagonizes 5-FU-induced apoptosis and confers drug resistance by regulating PPP2R1B expression in colorectal cancer. *Cell Death Dis*, 7 (12):e2525.

Zhao C, Beaudenon SL, Kelley ML, Waddell MB, Yuan W, Schulman BA, Huibregtse JM, Krug RM. 2004. The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN- α/β -induced ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (20):7578.

Zhou G, Du T, Roizman B. 2013. The Role of the CoREST/REST Repressor Complex in Herpes Simplex Virus 1 Productive Infection and in Latency. *Viruses*, 5 (5):1208-1218.

Zhu L, Jones C. 2018. The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway stimulates herpes simplex virus 1 productive infection. *Virus Res*, 256:29-37.

Zhu Z, Du T, Zhou G, Roizman B. 2014. The stability of herpes simplex virus 1 ICP0 early after infection is defined by the RING finger and the UL13 protein kinase. *J Virol*, 88 (10):5437-5443.

Zou L, Elledge SJ. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300 (5625):1542-1548.

Zwaenepoel K, Louis JV, Goris J, Janssens V. 2008. Diversity in genomic organisation, developmental regulation and distribution of the murine PR72/B" subunits of protein phosphatase 2A. *BMC Genomics*, 9:393.

Zwaenepoel K, Goris J, Erneux C, Parker PJ, Janssens V. 2010. Protein phosphatase 2A PR130/B"alpha1 subunit binds to the SH2 domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 2 and prevents epidermal growth factor (EGF)-induced EGF receptor degradation sustaining EGF-mediated signaling. *FASEB J*, 24 (2):538-547.