

**Aufrechterhaltung
der
HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort im
Trigeminusganglion**

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von Susanne Himmelein

München 2008

**Aufrechterhaltung
der
HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort im
Trigeminusganglion**

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von Susanne Himmelein

am 16.12.2008

Erstgutachter:

Frau PD Dr. Christine Falk

Zweitgutachter:

Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Mitgutachter:

Herr Prof. Dr. Jürgen Soll

Herr Prof. Dr. Heinrich Jung

Dissertation eingereicht am: 16.12.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2010

Für meine Eltern und Großeltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Immunsystem	3
2.2 Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)	3
2.2.1 MHC Klasse I-Moleküle	4
2.2.2 MHC Klasse II-Moleküle	5
2.3 T-Zell-Rezeptor	7
2.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren	9
2.5 Herpes-Simplex-Virus 1	12
2.5.1 Viruseinteilung und Struktur	13
2.5.1.1 Systematik	13
2.5.1.2 Struktur	14
2.5.2 Infektion und Replikation	16
2.5.2.1 „ <i>immediate early</i> “-Genexpression	17
2.5.2.2 „ <i>early</i> “-Genexpression	18
2.5.2.3 „ <i>late</i> “-Genexpression	18
2.6 Latente HSV-1-Infektion	19
2.7 CD8 ⁺ T-Zellantwort während einer viralen Infektion	21
2.8 Identifikation von Gedächtnis-Vorläufer-Zellen	22
2.9 CD8 ⁺ T-Zellen erkennen HSV-1-spezifische Epitope	23
2.10 CD8 ⁺ T-Zell-Antwort im HSV-1 infizierten TG	26
2.11 Das murine HSV-1-Infektionsmodell	27

	Seite
3. FRAGESTELLUNG	31
4. MATERIAL UND METHODEN	33
4.1 Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie	33
4.2 Geräte	35
4.3 Chemikalien	35
4.4 Medien und Puffer	36
4.5 Materialien	37
4.6 Mäuse und deren Infektion der Hornhaut mit HSV-1	38
4.7 Virus-Stamm	38
4.8 Herstellung von Einzel-Zell-Suspensionen aus Geweben	38
4.9 Tetramere	39
4.10 Durchflusszytometrie	39
4.11 Behandlung der Mäuse	41
4.11.1 Corticosteron-Behandlung	41
4.11.2 TAK-779 Reagenz	42
4.11.3 <i>In vivo</i> -Depletion von CD4 T-Zellen	42
4.11.4 BrdU <i>in vivo</i> Proliferatons-Assay	43
4.12 Herstellung von Gefrierschnitten	43
4.13 Immunhistochemie	44
4.14 Plaque Assay	44
4. 15 Bestimmung der gH-Genkopien mittels RT-PCR	44
4.16 Positive Selektion von CD8+ T-Zellen mittels MACS-Beads	45
4.17 Adoptiver Transfer von Zellen	46
4.18 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mit Hilfe der Neubauerzählkammer	46

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
5. ERGEBNISSE	47
5.1 CD8 ⁺ T-Zell-Akkumulation im TG	47
5.2 CD8 ⁺ T-Zellen umgeben Neurone sowohl im akuten als auch im latent infizierten TG	49
5.3 HSV-spezifische CD8 ⁺ Effektor-T-Zellen im akut infizierten TG und Gedächtnis CD8 ⁺ T-Zellen im latent infizierten TG exprimieren CXCR3	51
5.4 CXCR3 ist an der Regulierung der HSV-spezifischen Effektor CD8 ⁺ T-Zellen ins TG während der akuten Phase einer Infektion beteiligt	53
5.5 Blockierung der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 während der Latenz einer HSV-1 Infektion beeinträchtigt den Aktivierungszustand der CD8 ⁺ T-Zell-Population im infizierten Ganglion	56
5.6 Blockierung der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 während einer HSV-1 Latenz beeinflusst nicht die Viruslast im infizierten TG	58
5.7 HSV-1 spezifische CD8 ⁺ T-Zellen im peripheren Blut wandern nicht in das HSV-infizierte Ganglion während der viralen Latenz ein	60
5.8 HSV-spezifische CD8 ⁺ T-Zellen im peripheren Blut werden aus dem latent HSV-1 infizierten TG nach einer Unterbrechung des endogenen CD8 ⁺ T-Zell-Pool ausgeschlossen	63
5.9 CD4 ⁺ Helfer T-Zellen sind nicht für die Repopularisierung der CD8 ⁺ T-Zellen im Corticosteron-behandelten TG verantwortlich	69
6. DISKUSSION	73
7. REFERENZEN	78
8. ABKÜRZUNGEN	88
9. DANKSAGUNG	92
10. LEBENSLAUF	93
11. ERKLÄRUNG	95

1. Zusammenfassung

Nach einer primären Infektion etabliert das Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1) eine latente Infektion in den sensorischen Neuronen des Trigeminalganglions (TG). Von hier aus kann das Virus reaktivieren und unterschiedliche Erkrankungsbilder hervorrufen. *Herpes labialis* ist die bekannteste und unschädlichste HSV-1 Reaktivierungsform. *Herpes keratitis*, die durch eine HSV-1-Reaktivierung verursacht werden kann, führt zu einer progressiven Trübung der Hornhaut und ist eine der Hauptursachen für Erblindungen weltweit.

Der Latenzzustand von HSV-1 im TG ist durch eine limitierte Genexpression charakterisiert. In den HSV-1 latent infizierten TG findet man außer dem Latenz assoziierten Transkript (LAT) eine chronische Entzündung, die durch eine starke CD8⁺ T-Zell-Infiltration und eine erhöhte Chemokinexpression aufweist.

Unser Labor und andere Forschungsgruppen haben gezeigt, dass HSV-spezifische CD8⁺ T-Zellen in das infizierte TG einwandern und dort lebenslang in einem aktivierten Zustand verbleiben, in direktem Kontakt zu infizierten Neuronen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass diese CD8⁺ T-Zellen im Ganglion auf virale Proteine reagieren können, welche früh im Reaktivierungsprozess gebildet werden. IFN- γ und die Freisetzung von lytischen Granula in die Neurone verhindern eine vollständige HSV-1 Reaktivierung und die Produktion von infektiösen Virionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung zweier Chemokine (IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5) und deren Rezeptoren (CXCR3 und CCR5) bei der Infiltration von CD8⁺ T-Zellen während einer akuten und latenten HSV-1-Infektion im HSV-1 Mausmodell untersucht. Weiter wurde nachgeprüft, ob die HSV-spezifische Gedächtnis CD8⁺ T-Zell-Population im latent infizierten TG kompartimentalisiert ist und ein Nachfüllen von Zellen aus dem peripheren Blut benötigt.

Als erstes wurde die Interaktion der Chemokine CXCL10 und CCL5 und deren Rezeptoren CXCR3 und CCR5 mittels des nicht-peptidischen Inhibitors TAK-779 im TG sowohl während einer akuten als auch einer latenten Infektion untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass TAK-779 die Infiltration der CD8⁺ T-Zellen während der akuten Infektion signifikant inhibiert. Eine längere Verabreichung von TAK-779 zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Aufrechterhaltung des CD8⁺ T-Zell-Pools während der

Latenz. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass die Aufrechterhaltung der CD8⁺ Gedächtnis-Population kein Nachfüllen an Zellen aus der Peripherie benötigt. Weiter wurden adoptive Transfer-Studien durchgeführt, bei welcher HSV-spezifische Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen in Empfängermäuse transferiert wurden, bei denen schon ein stabiler CD8⁺ T-Zell Gedächtnis-Pool im TG etabliert war. Die CD8⁺ T-Zellen des Spenders exprimierten ein anderes CD45-Allel, um die Unterscheidung zwischen den transferierten Zellen von denen des Empfängers zu ermöglichen. Acht Wochen nach dem Transfer der HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen konnten diese im Blut und den lymphoiden Geweben der Empfängermaus aber nicht im TG nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, dass der CD8⁺ T-Zell Gedächtnis-Pool im latent infizierten TG nicht durch zirkulierende HSV-spezifische CD8⁺ T-Zellen aufgefüllt wird.

Eine neue Arbeit aus der Gruppe um Carbone zeigte, dass eine Transplantation von latent infizierten TG unter die Nierenkapsel des Empfängers in einer rapiden Abnahme der sich dort befindlichen CD8⁺ T-Zell-Population resultiert und dass das Nachfüllen an Zellen an die Funktion der CD4⁺ T-Zellen gebunden war. Um diese Ergebnisse in einer physiologischeren Umgebung zu verifizieren, wurden 90% der CD8⁺ T-Zellen von latent infizierten TG mittels der Behandlung der Mäuse mit Corticosteron depletiert. Anschließend wurden transgene HSV-spezifische CD8⁺ T-Zellen in die mit Corticosteron behandelten Mäuse transferiert und deren endogene CD4⁺ T-Zellen mittels eines Antikörpers gegen CD4 depletiert. Es zeigte sich, dass die CD8⁺ T-Zell-Population im TG vollständig durch die endogenen CD8⁺ T-Zellen wieder aufgefüllt wurde und dass in diesem Modell die Anwesenheit intakter CD4⁺ T-Zellen nicht notwendig war. Diese Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass nach Störung der Homöostase durch Corticosteron es zu einer Wiederherstellung der CD8⁺ T-Zell-Gedächtnis-Population durch Replikation der verbleibenden Zellen kommt.

Diese Untersuchungen haben wichtige Auswirkung auf die Entwicklung von Impfstoffen, um Rezidive von HSV-1 durch das Boosten der CD8⁺ T-Zell-Antwort im latent infizierten TG zu verhindern. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Expansion der HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Population in den lymphatischen Organen und im Blut durch eine Impfung nur wenig Einfluss auf die CD8⁺ T-Zell-Population im TG haben würde.

2. Einleitung

2.1 Immunsystem

Aufgabe des Immunsystems ist die Abwehr körperfremder Substanzen und Krankheitserreger wie Viren, Bakterien, Parasiten oder Pilzen. Voraussetzung dafür ist es, dass das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen unterscheiden kann.

Es gibt zwei Hauptkomponenten der Immunität: die angeborene, unspezifische und die erworbene, spezifische Abwehr. Die angeborene Abwehr bildet die erste Verteidigungslinie des Organismus. Sie umfasst mechanische, chemische und biologische Faktoren. Eine erste Abwehr bilden unterschiedliche Zelltypen des hämatopoetischen Systems, wie z.B. Phagozyten, neutrophile Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie lösliche Faktoren (Zytokine) und Bestandteile des Komplementsystems.

Die erworbene Abwehr wird hingegen zur Eliminierung einer Infektion aktiviert, wenn die unspezifische Abwehr nicht mehr ausreicht. Hauptmerkmal der erworbenen Abwehr ist zum einen ihre hohe Spezifität und zum anderen die Erinnerung an vorherige Kontakte mit dem gleichen Antigen. Die Grundlage für dieses Gedächtnis bilden die Zellen des lymphatischen Systems, die T- und B-Lymphozyten. Diese entwickeln sich aus gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen, die wiederum aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen. B-Lymphozyten reifen im Knochenmark und bilden die humorale Immunantwort (Produktion und Sekretion von Antikörpern) [Reth *et al.* 1992]. T-Lymphozyten reifen im Thymus heran und bilden die zelluläre Immunantwort [Fehling *et al.* 1997].

2.2 Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex umfasst eine Gruppe von Genen, die beim Menschen auf Chromosom 6 lokalisiert ist und als HLA-Lokus (engl.: human leucocyte antigen) bezeichnet wird [van den Elsen *et al.* 1995]. MHC-Moleküle sind polymorphe Transmembranglykoproteine. Ihre Aufgabe liegt in der Präsentation von Peptiden. Diese Peptide werden T-Zellen präsentiert, die körperfremde Peptide im Kontext mit dem MHC-Molekül erkennen können und dadurch aktiviert werden. Es

gibt grundsätzlich zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen, MHC Klasse I und MHC Klasse II.

2.2.1 MHC Klasse I-Moleküle

MHC Klasse I-Moleküle beim Menschen werden als HLA-A, HLA-B und HLA-C bezeichnet. Sie befinden sich auf fast allen kernhaltigen Körperzellen, mit Ausnahme von Zellen des zentralen Nervensystems. Diese Moleküle bilden integrale Glykoproteine der Plasmamembran, welche aus zwei Ketten bestehen, einer schweren, glykosylierten, die Membran durchspannende α -Kette und einer kleinen β 2-Mikroglobulin-Kette, die an die schwere Kette assoziiert ist [Bjorkman *et al.* 1990]. Diese β 2-Mikroglobulin-Kette ist ein 12 Kilodalton (kD) kleines, nicht-polymorphes, lösliches und nicht im MHC-Lokus kodiertes Protein. Die extrazelluläre Domäne der α -Kette wird aus drei Untereinheiten gebildet. Diese gehören der Immunglobulin-Superfamilie an, da ihre Struktur der extrazellulären Domäne der Immunglobuline ähnelt. Die Domänen α 1 und α 2 bilden an den seitlichen Enden eine geschlossene Peptidbindungsfurche aus [Janeway und Travers 1997] (siehe Abbildung 1). Normalerweise präsentieren MHC Klasse I-Moleküle Peptide aus intrazellulären Proteinen des Zytosols. Diese sind körpereigene oder virale Proteine. Diese Peptide werden durch das Proteasom [Goldberg *et al.* 1992; Niedermann *et al.* 1996] generiert und gelangen über den ATP-abhängigen TAP (engl.: transporter associated protein) –Transporter in das Endoplasmatische Retikulum, wo die Synthese der MHC-Moleküle stattfindet [Ortmann *et al.* 1994]. Vor ihrer Beladung sind die MHC-Moleküle mit verschiedenen Chaperonen assoziiert. Ihre vollständige Faltung und ihr Transport zur Oberfläche wird durch die Peptidbindung induziert [Germain *et al.* 1994].

Struktur des MHC-Klasse-I-Moleküls

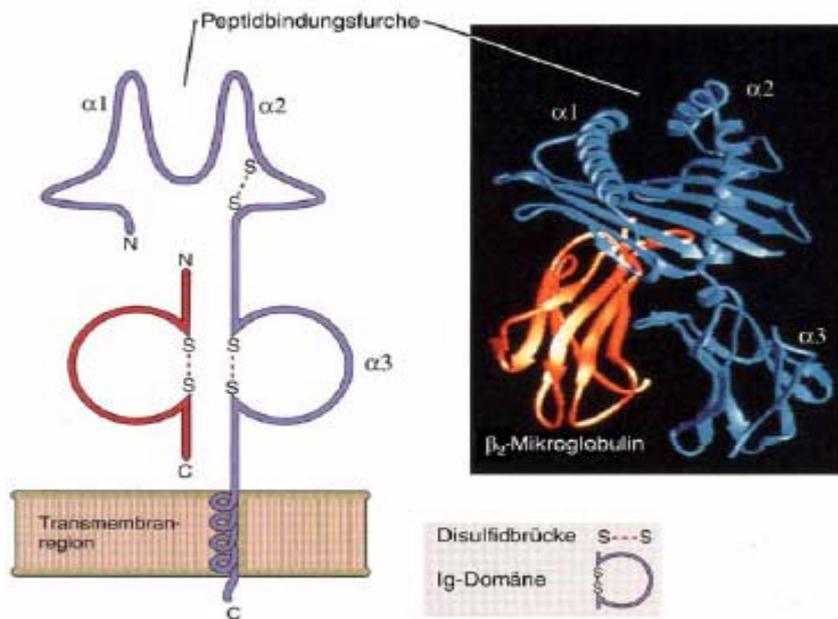


Abbildung 1: Darstellung des MHC-Klasse-I-Moleküls

Die schematische Abbildung links zeigt das MHC-Klasse-I-Molekül, das sich aus einer membranständigen β_2 -Mikroglobulin-Untereinheit und einer α -Kette mit Transmembrandomäne und intrazellulärem C-Terminus zusammensetzt. Rechts ist die Kristallstruktur des Moleküls aufgezeigt. (Abbas et al., 2000).

2.2.2 MHC Klasse II-Moleküle

MHC Klasse II-Moleküle werden nur auf immunkompetenten Zellen wie z.B. den B-Lymphozyten, aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, epidermalen Langerhanszellen und Epithelzellen des Thymus exprimiert [Janeway und Travers 1997]. Diese Moleküle werden beim Menschen in drei Genloci kodiert: HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP [van den Elsen *et al.* 1995; Janeway und Travers 1997]. Die MHC Klasse II-Moleküle bestehen aus zwei glykosilierten, membranständigen Ketten, einer α - und einer β -Kette. Jede Kette besteht aus zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Diese sind nicht-kovalent miteinander verbunden, wobei die $\alpha 1$ - mit der $\beta 1$ -Domäne die Peptidbindungsfurche bildet. Diese ist jedoch seitlich offen (siehe Abbildung 2). MHC Klasse II-Moleküle präsentieren extrazelluläre Peptidfragmente, welche phagozytisch oder durch rezeptorvermittelte Endozytose in intrazelluläre Vesikel antigenpräsentierender Zellen (APZ) aufgenommen wurden. In dem zunehmend angesäuerten Endosom erfolgt ein proteolytischer Abbau, wobei die entstehenden Peptide nach Verschmelzung mit

einem MHC Klasse II-haltigen Vesikel auf die neusynthetisierten MHC-Moleküle geladen werden [Janeway und Travers 1997; Germain *et al.* 1994]. Darauf folgend werden die MHC-Moleküle an die Oberfläche transportiert.

Die Peptidbindungsfurche des MHC Klasse I-Moleküls unterscheidet sich nicht nur strukturell, sondern auch funktionell von der des MHC Klasse II-Moleküls. Diese Peptide sind 8-10 Aminosäuren lang und werden über allelspezifische Bindungstaschen im Boden der Peptidbindungsfurche, sowie durch zusätzliche Fixierung der Amino- und Carboxyenden des Peptids mittels konservierter Tyrosinreste an beiden Enden der Furche verankert [Janeway und Travers 1997]. Bei MHC Klasse II-Molekülen sind die Peptide mindestens 13 Aminosäuren lang. Die Bindungsfurche ist offen, deshalb können auch längere Peptide gebunden werden, auch wenn deren Enden seitlich herausragen. Die Stabilisierung des Komplexes erfolgt auf dieselbe Weise wie bei MHC Klasse I-Molekülen.

Beide Klassen sind hochpolymorph. Dies wird durch eine vermehrte Anzahl an Genen und durch eine Vielzahl an Allelen erreicht. Die α -Kette der HLA-DR-Moleküle stellt die einzige Ausnahme dar. Die verschiedenen HLA-DR β -Ketten werden zusammen mit einer identischen α -Kette exprimiert.

Struktur des MHC-Klasse-II-Moleküls

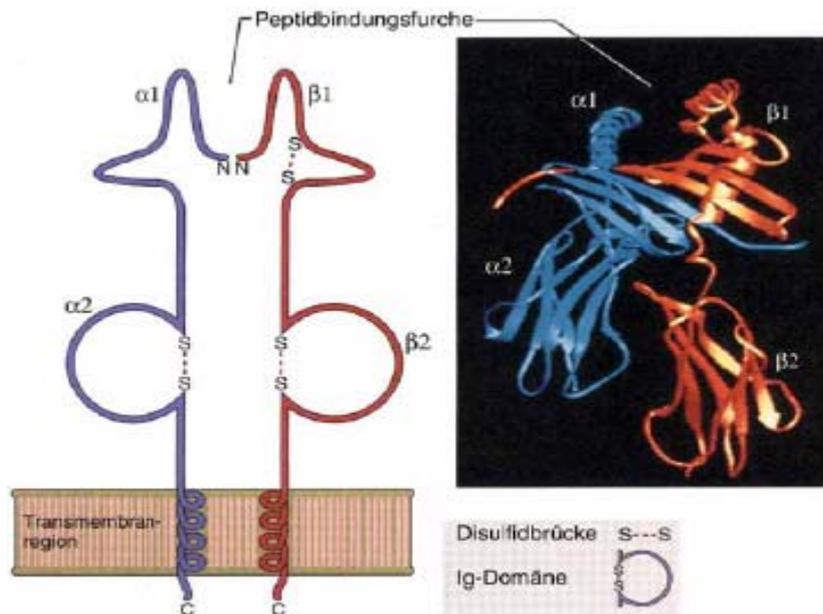


Abbildung 2: Darstellung des MHC-Klasse II-Moleküls

Die schematische Abbildung links zeigt das MHC-Klasse-II-Molekül, das aus zwei α -Domänen und zwei β -Domänen besteht. Beide besitzen eine Transmembrandomäne und einen intrazellulären Rest. Rechts ist die Kristallstruktur dargestellt. (Abbas et al., 2000).

2.3 T-Zell-Rezeptor (TZR)

Der T-Zell-Rezeptor (TZR) besteht aus einem multimeren Proteinkomplex. Das sind zum einen die variablen Glykoproteine des TZR, die α und β -Kette, die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Über diese beiden Untereinheiten erfolgt die Antigenerkennung im Zusammenspiel mit den MHC-Molekülen von antigen-präsentierenden Zellen (APZ) [Clevers et al. 1988]. Das α/β -Heterodimer besitzt jedoch nur eine kurze Transmembrandomäne und assoziiert deshalb zur Signaltransduktion mit dem CD3-Proteinkomplex. Der CD3-Komplex wiederum besteht aus den Untereinheiten γ , δ , ϵ , und ζ , die unterschiedliche Aufgaben bei der Signalübermittlung ins Zellinnere übernehmen [Clevers et al. 1988]. Ein schematischer Aufbau des TZR-Komplexes ist in Abbildung 3 gezeigt.

Klasse I-Moleküle präsentiert werden. MHC Klasse I-Moleküle befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen mit unterschiedlicher Expressionsstärke. Zu einer vollständigen Aktivierung der Zelle muss es zu einem weiteren Co-Stimulus kommen. Dies kann durch die Interaktion des CD28-Moleküls auf der T-Zelle mit dem B7-Molekül auf der APZ induziert werden. Erst beide Signale zusammen ermöglichen eine vollständige Aktivierung, welche zu einer klonalen Expansion und zu einer Differenzierung in Effektorzellen führt. Diese CD8⁺ T-Zellen entwickeln sich zu zytotoxischen Zellen, welche die von Krankheitserregern befallenen Zellen töten können. Die CD4⁺ T-Zellen differenzieren hingegen entweder zu Th1-Zellen, die eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Makrophagen spielen oder zu Th2-Zellen, die den B-Zellen bei der Aktivierung der Antikörperproduktion zur Seite stehen. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen produzieren eine Reihe von Effektormolekülen wie z.B. Perforin, Granzym A/B, IFN- γ , TNF- α , TNF- β und den Fas-Liganden. Diese können entweder eine Apoptose der Zielzelle induzieren oder aber diese direkt durch Perforation zerstören [Knickerbein *et al.* 2008].

2.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die nicht nur die Migration der Leukozyten, sondern auch deren Aktivierung und Differenzierung durch die Bindung des spezifischen Oberflächenrezeptors an die Zielzelle regulieren. Der Name entstand aus „chemotaktisch aktive Zytokine“, sprich Chemokine. Die Familie der Chemokine besteht aus mehr als 50 Chemokinen und über 17 Chemokinrezeptoren. Eine konservierte Sequenz von Aminosäuren dient zur Einteilung der einzelnen Mitglieder in vier Familien [Nelson *et al.* 1998]. In Abbildung 4 sind die Chemokine und ihre dazugehörigen Chemokinrezeptoren dargestellt.

Es gibt C-, C-C-, C-X-C- und C-X₃-C-Chemokine. Das X repräsentiert jeweils eine variable Aminosäure zwischen den ersten beiden Cysteinen der primären Aminosäuresequenz. Für viele Chemokine existieren mehrere Namen, so dass vor kurzem eine neue Nomenklatur eingeführt wurde, bei der die Reihenfolge der Cysteine mit einem L für Ligand und einer Zahl kombiniert wurde (z. B. CCL5) [Zlotnik *et al.* 2000].

Chemokine wirken hochgradig redundant [Mantovani *et al.* 1999], d. h. viele der bekannten Proteine wirken nicht nur auf eine Zellpopulation. Zusätzlich exprimieren

die jeweiligen Leukozytenpopulationen mehrere Rezeptoren für Chemokine. Dabei können diese Rezeptoren mit verschiedenen Chemokinen einer Klasse interagieren (siehe Abbildung 5). So binden z. B. alle vier MCP-Moleküle an den Rezeptor CCR2 (C-C-Chemokin-Rezeptor-2), wobei aber MCP-2, MCP-3 und MCP-4 auch an die Rezeptoren CCR1 und CCR3 binden können [Mantovani *et al.* 1999]. Dies dient der Regulation und zielgenauen Wanderung der Leukozyten im Gewebe und führt so zu einem eng verflochtenen Netzwerk an Interaktionen der beteiligten Zellen.

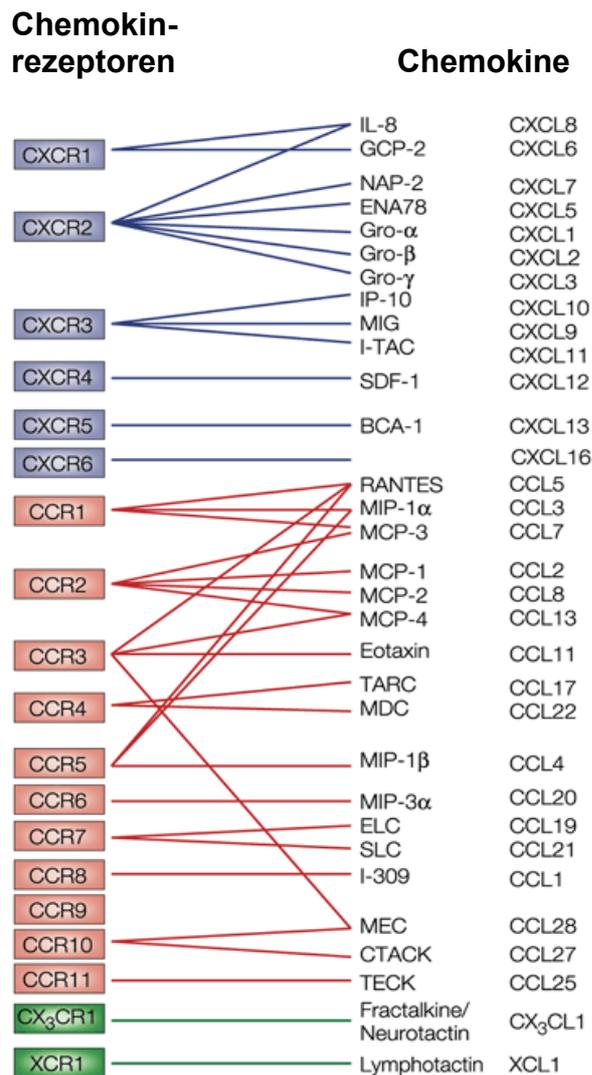
Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen, die sich auf der Oberfläche von Leukozyten befinden. Die meisten Rezeptoren erkennen mehr als ein Chemokin und einige Chemokine binden an verschiedene Rezeptoren.

Die Chemokinrezeptoren werden in CCR1 bis CCR10, CXCR1 bis CXCR6, CR1 und CX3CR1 eingeteilt [Murphy *et al.* 2000]. Eine Ausnahme bildet der DARC/Duffy-Rezeptor auf Erythrozyten, der sowohl CCR-, als auch CXC-Chemokine binden kann und eine Art Scavenger-Rezeptor für Chemokine darstellt [Darbonne *et al.* 1991].

Die Expression der Chemokinrezeptoren auf Leukozyten ist stark vom Aktivierungs- und Differenzierungszustand der Zellen abhängig. Aufgrund der Chemokinrezeptorexpression lassen sich deswegen auch unterschiedliche Subpopulationen bei den Leukozyten erkennen. Neben der Einteilung der T-Zellen in zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helfer-Zellen, können diese u.a. anhand ihres Chemokinrezeptorprofils weiter unterteilt werden. So unterscheiden sich naive T-Zellen in ihrer Rezeptorexpression von Effektor T-Zellen, Effektor Gedächtnis T-Zellen (T_{EM}), Zentrale Gedächtnis T-Zellen (T_{CM}), folliculäre Helfer T-Zellen (T_{FH}), Th1- und Th2-Zellen [Sallusto *et al.* 1998; Sallusto *et al.* 1999; Breitfeld *et al.* 2000]. Während naive T-Zellen z. B. CCR7 und CXCR4 exprimieren [Randolph *et al.* 1999], tragen Effektor und Gedächtnis T-Zellen CCR2 bis CCR6, CCR8, CCR9 und CXCR5 auf ihrer Oberfläche [Sallusto *et al.* 1999; Bleul *et al.* 1997; Sallusto *et al.* 1997; Campbell *et al.* 1999; Zabel *et al.* 1999; Legler *et al.* 1998].

Chemokinrezeptoren auf T-Zellen sind unter anderem CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR3. CXCR3 und CCR5 werden beide auf aktivierten T-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen und reifen dendritischen Zellen exprimiert. CXCR3 ist der Rezeptor für interferon-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10), monokine induced by interferon-γ (Mig) und interferon-inducible T-cell α-chemoattractant (I-TAC) [Cook *et al.* 2004; Carr *et al.* 2008].

Zytokine können sowohl während einer akuten, als auch einer latenten Infektion mit HSV-1 im TG nachgewiesen werden. Chemokine wie IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 und MCP-1/CCL2, sowie Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und IL-6 werden im latent infizierten murinen TG exprimiert [Cook *et al.* 2004]. CXCR3 und CCR5 und ihre Liganden CXCL10/IP-10 und CCL5/RANTES wurden ebenso im latent infizierten humanen TG nachgewiesen [Derfuss *et al.* 2007].



Nature Reviews | Immunology

Abbildung 4: Chemokinrezeptoren und ihre dazugehörigen Chemokine

Chemokine lassen sich in verschiedene Subklassen unterteilen. CXC-Subklassen sind in blau, CC-Subklassen in rot und die C bzw. CX3C in grün dargestellt.

(Amanda E. I. Proudfoot, Nature Reviews Immunology 2, 106-115 (February 2002))

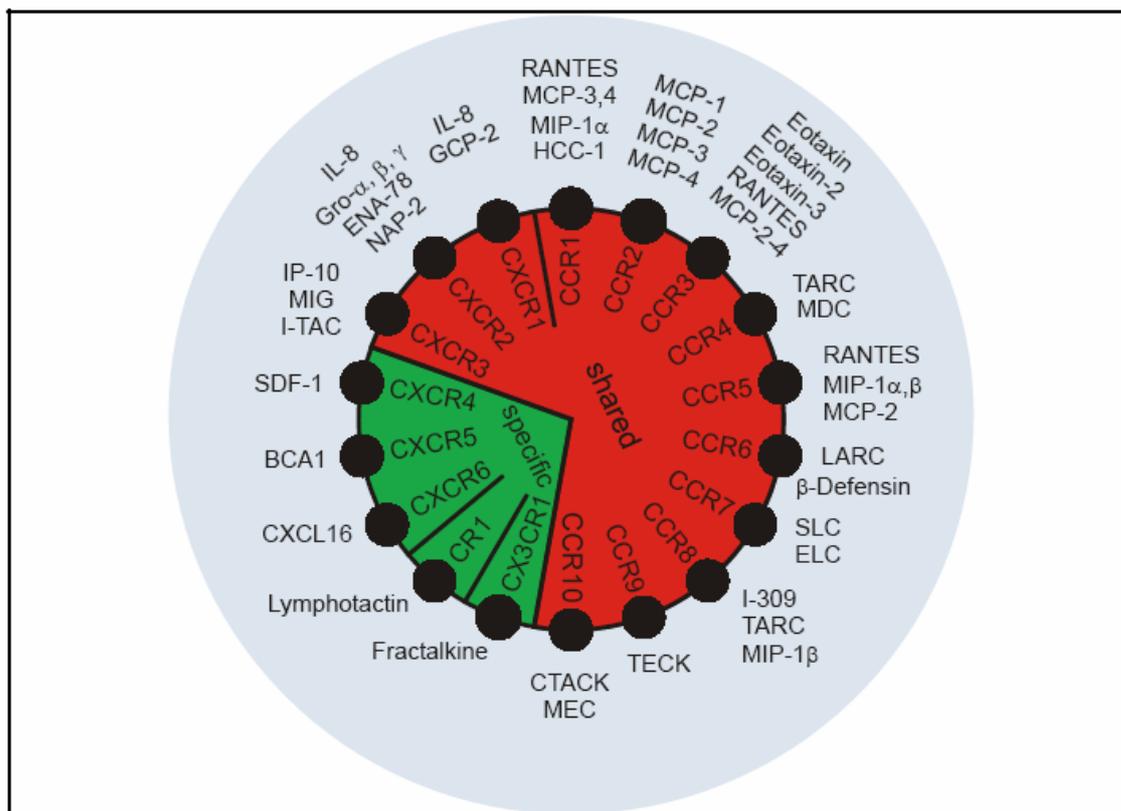


Abbildung 5: Redundanz der bisher bekannten humanen Chemokinrezeptoren und deren Liganden (Mantovani *et al.*, 1999)

2.5 Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV-1)

Das Herpes-Simplex-Virus-1 (HSV-1) stellt ein weltweit verbreitetes infektiöses humanes Pathogen dar [Nahmias *et al.* 1990]. Meistens erfolgt die Erstinfektion in jungen Jahren [Whitley *et al.* 1998] und ist oft asymptomatisch [Umene and Sakaoka 1999; Remeijer, Osterhaus and Verjans 2004]. Mehr als 85% der Weltbevölkerung sind seropositiv für HSV-1. Die Inzidenz hängt von der Altersgruppe, dem Sozialstatus und der geographischen Lage ab [Siegel *et al.* 1992; Schillinger *et al.* 2004]. Die Prävalenz für HSV-1 in Deutschland liegt bei etwa 90%. Die Infektionsrate für HSV-2 ist dagegen deutlich geringer und liegt bei 10 bis 20%.

Nach einer initialen Replikation am Infektionsherd (Mundschleimhaut) etabliert das HSV-1-Virus eine Latenz in den Neuronen der sensorischen Ganglien und persistiert dort lebenslang [Roizman and Sears 1987; Theil *et al.* 2003]. HSV-1 kann von hier aus gelegentlich reaktivieren und unterschiedliche Erkrankungsbilder hervorrufen (Herpes labialis, Herpes keratitis, Stomatitis aphthosa). Als Auslöser für eine HSV-1 Reaktivierung kommen Hautreizungen wie Verbrennungen, starke Sonnen-

bestrahlung, Reizungen des Ganglions (Entzündung) oder systemische Ursachen wie Stress, Menstruation, Fieber, Tumorerkrankungen und bakterielle Lungenentzündungen in Betracht [Wade *et al.* 1982; Whitley *et al.* 1984; Lafferty *et al.* 1987; Ichihashi *et al.* 2004].

Bei Menschen mit Neurodermitis, bei Kindern oder bei Personen mit einer Abwehrschwäche kann es zu schweren oder gar lebensbedrohlichen Verläufen kommen.

Eine HSV-1 Infektion/Reaktivierung der Augen ist noch immer die häufigste Ursache für eine Erblindung in industrialisierten Ländern [Remeijer, Osterhaus and Verjans 2004; Liesegang 2001].

Die beiden HSV-Typen HSV-1 und HSV-2 sind genetisch sehr ähnlich. HSV-2 ist ein sexuell übertragbares Pathogen, das oft zu Genitalläsionen führt. HSV-1 kann ebenfalls den Genitalbereich infizieren und eine Latenz in den dorsalen Ganglien etablieren [Lowhagen *et al.* 2000; Lafferty 2002; Roberts *et al.* 2003; Looker and Garnett 2005]. Jedoch sind genitale HSV-1 Infektionen normalerweise klinisch nicht so schwer und reaktivieren auch weniger häufig als bei HSV-2. Dieses Phänomen kann zum Teil auf den Unterschied von Subtypen der Neurone zurückgeführt werden, in welchen HSV-1 und HSV-2 vorzugsweise Latenz etablieren [Margolis *et al.* 2007].

2.5.1 Viruseinteilung und Struktur

2.5.1.1 Systematik

HSV-1 gehört zur Familie der Herpesviren, die durch eine einheitliche morphologische Struktur und durch die Fähigkeit sowohl zur lytischen Vermehrung, als auch zur Etablierung der Latenz im Wirtsorganismus charakterisiert ist. HSV-1 wird aufgrund biologischer und molekulargenetischer Merkmale in die Gruppe der α -Herpesviren eingeordnet, die *in vitro* schnell replizieren, ein breites Wirtsspektrum besitzen und in den Ganglien des Wirtes dauerhaft überleben können. Ein weiterer Vertreter der α -Herpesviren ist das Varicella-Zoster-Virus.

Die β -Herpesviren, wie z.B. das Cytomegalovirus, besitzen ein enges Spektrum an infizierbaren Zellen. Sie haben einen relativ langen Vermehrungszyklus und breiten sich deshalb *in vitro* nur langsam aus. Die infizierten Zellen erscheinen deutlich größer.

Die γ -Herpesviren haben ein sehr enges Wirtszellspektrum. Die Dauer des Replikationszyklus ist jedoch bei den verschiedenen Virustypen unterschiedlich. Ein Vertreter dieser Familie ist das Epstein-Barr-Virus.

2.5.1.2 Struktur

Ein Kapsid in Form eines Ikosaeders, das aus 162 symmetrischen Einzelbausteinen, den sogenannten Kapsomeren, besteht, umgibt die DNA. DNA und Kapsid werden unter der Bezeichnung Nukleokapsid zusammengefasst und erreichen einen Durchmesser von 110 nm. Das aus Phosphoproteinen bestehende Tegument bildet einen Ring um das Nukleokapsid herum. Den Abschluss des Partikels bildet die Virushülle, welche durch Knospung des Virus aus der Wirtszelle entsteht und aus zelleigener Lipiddoppelmembran aufgebaut ist. In diese Membran sind virusspezifische Glykoproteine eingelagert. In Abbildung 6 ist dieser Aufbau anhand einer elektronenmikroskopischen Aufnahme und einer schematischen Skizze dargestellt.

Elektronenmikroskopische Aufnahme:

schematische Darstellung:

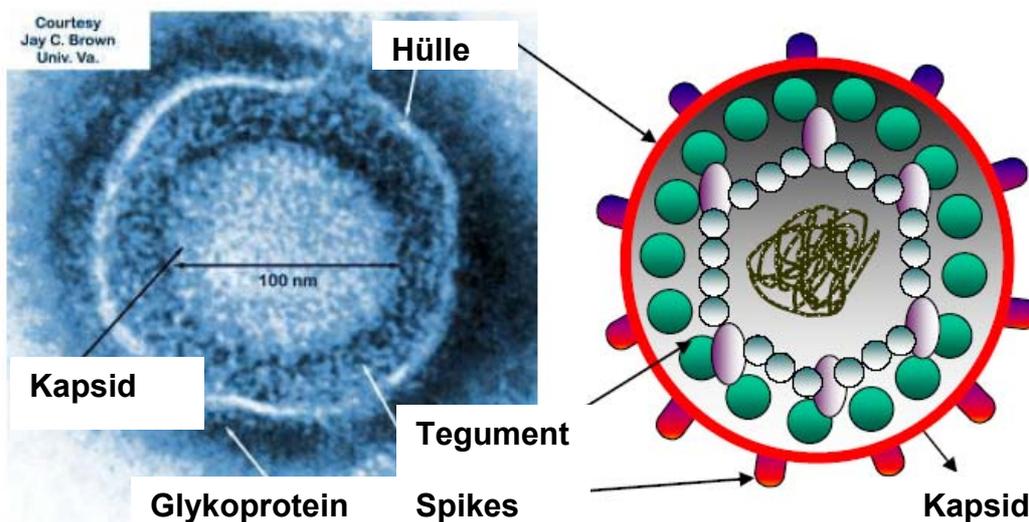


Abbildung 6: Aufbau des HSV-1

Elektronenmikroskopische Aufnahme (links) und schematische Darstellung (rechts) der HSV-1 Struktur.

(Courtesy Jay C. Brown Univ. Va.)

Bei HSV-1 handelt es sich um ein doppelsträngiges, aus zirka 152 Kilobasen (kb) bestehendes DNA-Virus [Weir *et al.* 2001]. Das Genom beinhaltet mindestens 84 offene Leserahmen und besteht aus zwei singulären Abschnitten, U_L-und U_S-Segmenten, (U_L= unique long; U_S= unique small), welche jeweils von kurzen, entgegengesetzt orientierten Wiederholungen (Repetitionen) eingerahmt werden. Die Wiederholungen des U_L-Segments werden als *ab* und *b'a'* bezeichnet und die Wiederholungen des U_S-Segments als *a'c'* und *ca* (siehe Abbildung 7). Diese Segmente können in vier verschiedenen isomeren Formen vorkommen [Rajcani *et al.* 2004].



Abbildung 7: Bildliche Darstellung des HSV-1-Genoms:

Das Genom besteht aus einem unique long (U_L) und einem unique short (U_S) Segment, das durch entgegengesetzte Wiederholungen (repeats) an den Termini (a, b, c), sowie intern (a', b', c') unterteilt wird.

(Kaech *et al.*, 2003; Nat. Immunol.)

2.5.2 Infektion und Replikation

Der Lebenszyklus von HSV-1 wird in drei Hauptgruppen aufgeteilt: i) produktive oder lytische Infektion, bei welcher infektiöse Nachkommen produziert werden und die Lyse der Wirtszelle erfolgt; ii) nicht-produktive oder latente Infektion, in welcher die virale Transkription begrenzt ist und keine infektiösen Nachkommen gebildet werden und iii) Reaktivierung aus der Latenz, bei der virale Gentranskription während der Latenz zur DNA-Replikation und de novo-Produktion von infektiösen Nachkommen, in Abwesenheit von Tegumenten oder viralen Komponenten, führt.

Eine Infektion beginnt, wenn die viralen Glykoproteine auf der Oberfläche der HSV-1-Hüllmembran an den Oberflächenrezeptor der Zielzelle binden. Die Glykoproteine B (gB), gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL und gM werden alle auf der Oberfläche von HSV-1 exprimiert, wobei nicht alle für die Virusanheftung und das Eindringen des Virus in die Zielzelle entscheidend sind.

Die Anheftung von HSV-1 an die Zielzelle wird durch die Anlagerung von gC oder gB an Glykosaminoglykan-Reste, wie z.B. Heparansulfat, auf der Zelloberfläche herbeigeführt. Das Eindringen von HSV-1 in die Zielzelle benötigt die Bindung von gD an einen der vielen Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Der Viruseintritt ist durch die Fusion der viralen Hülle mit der Plasmamembran der Zielzelle komplett. Dieser Prozess benötigt gB, gD und den gH/gL-Komplex. Nach der viralen Verschmelzung wird das Nukleokapsid, inklusive einiger Tegumentproteine, in den Zellkern transportiert. Andere Tegumentproteine verbleiben im Zytoplasma, wie z.B. das „virus host shutoff“ (vhs), ein Protein, das sofort mit der Degradierung der WirtsmRNA beginnt. Das Genom zirkularisiert und die Transkription beginnt mit der Expression der „immediate early“ (IE)-Gene (α -Gene) für die Regulation der Expression. Darauf folgend werden die „early“ (E)-Gene (β -Gene) transkribiert, deren Genprodukte für die Replikation und die Aktivierung der späten Gene notwendig sind. Diese „late“ (L)-Gene (γ -Gene) werden als letzte exprimiert. Aus deren Genprodukten bestehen die Strukturkomponenten und durch sie wird der Zusammenbau der Virionen organisiert. Der zeitliche Verlauf der Genexpression ist in Abbildung 8 graphisch dargestellt. Die bei der Replikation nach dem „rolling circle“-Mechanismus entstehenden Genom-Konkatamere werden geschnitten und in Core und Kapsid verpackt, die im Kern akkumulieren und nukleäre Einschlusskörper bilden.

2.5.2.1 „immediate early“-Genexpression

Eine HSV-1-Infektion von nicht-neuronalen Zellen führt normalerweise zum Tod der Wirtszelle. In den meisten Zellen löst HSV-1 eine lytische Infektion aus, in welchem es sein ganzes Genom repliziert. Während einer lytischen Infektion ist die virale Genexpression strengstens reguliert. Die fünf α -Genprodukte ICP4, ICP0, ICP27, ICP47 und ICP22 werden zwei-vier Stunden nach der Infektion exprimiert [Preston *et al.* 2000].

ICP4 ist ein wichtiges virales α -Protein, welches als Transkriptionsfaktor dient um die frühen (early, β) und späten (late, γ) Gene zu aktivieren [Watson and Clements 1980]. ICP4 kann ebenso als Repressor dienen, wobei die Expression der „immediate early“-Gene inhibiert wird [Deluca *et al.* 1985].

ICP0 ist ein nicht-essenzielles Protein, kann aber die virale Genexpression mit einem geringen MOI (Multiplizität der Infektion) aktivieren. ICP0 ist für eine effiziente Reaktivierung von HSV-1 aus der Latenz wichtig [Halford and Schaffer 2001]. Es kann die Chromatinstruktur beeinflussen, indem es die Histonproteine und andere nukleare Proteine wie ND10-Körper (nuclear domain 10) abbaut [Maul *et al.* 1998; Everett *et al.* 1998; Lomonte *et al.* 2001].

ICP27 ist ein wichtiges α -Protein, welches für die lytische Infektion bei HSV-1 benötigt wird, wie auch für die frühe und besonders die späte Genexpression erforderlich ist. ICP27 hat wichtige Funktionen [Weir *et al.* 2001], wie die Regulation des Spleißens, die Translation und die post-translative Modifikation der viralen Genexpression und reguliert den nuklearen Transport der viralen mRNA-Transkripte. Es kontrolliert die Genexpression in der Wirtszelle, indem es mit den snRNPs (small nuclear ribonucleoprotein particles) interagiert und das Spleißen der mRNA der Wirtszelle hemmt [Hardy and Sandri-Goldin 1994]. Spleißen ist ein wichtiger Schritt der Prozessierung von RNA. Es findet im Zellkern von Eukaryonten statt. Hierbei entsteht aus der prä-mRNA die reife mRNA. Durch das Spleißen werden Introns entfernt und die angrenzenden Exons miteinander zur fertigen mRNA verknüpft.

ICP47 ist für die virale lytische Infektion notwendig. Es spielt aber auch eine sehr wichtige Rolle in der Immunevasion. ICP47 ist ein lösliches 12-kDa-Protein, das effektiv die Antigenpräsentation der viralen Peptide blockieren kann, indem es den TAP (transporter associated with antigen processing)-Komplex blockiert.

ICP22 ist nicht für die virale Replikation, aber für die Expression von ICP0 und einiger später (late) Gene wichtig [Weir *et al.* 2001].

2.5.1.2 „early“-Genexpression

Kurz nach der Synthese der α -Proteine findet die Expression der β -Gene statt. Frühe Gene sind hauptsächlich für die DNA-Replikation erforderlich [Böhmer and Lehman 1997]. Die β -Genexpression beginnt schon drei Stunden nach der Infektion und erreicht ihren Höhepunkt vier-sechs Stunden danach. Die DNA-Replikation beginnt mit der Expression der β -Gene und dauert bis etwa 15 Stunden nach der Infektion an.

Eines der β -Genprodukte, die Thymidin-Kinase (TK), ist nicht für die virale DNA-Synthese von nicht-neuronalen Zellen entscheidend, denn das Virus kann zelluläres TK verwenden. Jedoch ist es für die virale Replikation in neuronalen Zellen entscheidend, da Neuronen keine eigene TK beinhalten.

2.5.1.3 „late“-Genexpression

Die viralen späten Gene können in zwei Gruppen, die γ 1 und γ 2-Gene, unterteilt werden. γ 1-Gene werden in geringen Mengen vor der viralen DNA-Synthese exprimiert und in hohen Mengen nachdem die virale DNA-Synthese eingesetzt hat. Die Expression der γ 2-Gene hängt vollständig vom Beginn der viralen DNA-Synthese ab. Einige der γ 1-Gene beinhalten strukturelle Proteine, wie z.B. das Glykoprotein B (gB) und das Glykoprotein D (gD). γ 2-Gene kodieren für gC, gH, U_S11 und U_S9.

Das Glykoprotein B (gB) ist ein γ 1-Gen, das auf einem sehr geringen Niveau während der Initiation der viralen DNA-Synthese exprimiert wird. Deshalb würde die gB-Genexpression während der frühen Phase einer HSV-1-Reaktivierung aus der Latenz sehr gering sein. Normalerweise exprimieren Neurone nur ein geringe Menge an MHC Klasse I. Sie scheinen die Expression aber während des lytischen Zyklus einer HSV-1-Infektion hoch zu regulieren. Folglich ist es wahrscheinlich, dass Neurone eine geringe Dichte an gB₄₉₈₋₅₀₅-Epitopen früh während des Reaktivierungsprozesses exprimieren.

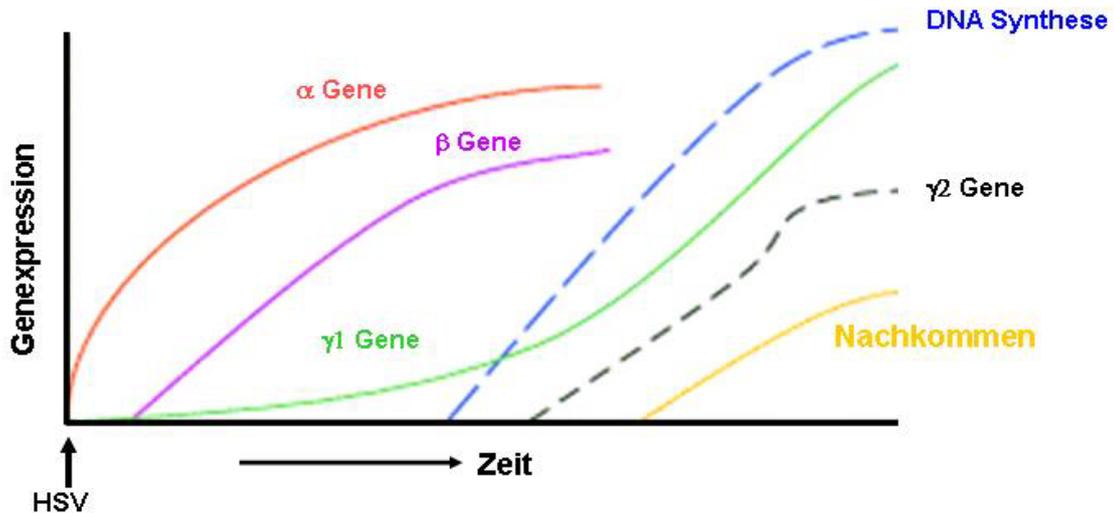


Abbildung 8: HSV-1-Genexpression während einer lytischen Infektion.

Die α -Gentranskripte sind die ersten HSV-1-Gentranskripte, die gebildet werden. Sie können zwei-vier Stunden nach der Infektion detektiert werden. Wenn diese α -Proteine in einer angemessenen Menge vorhanden sind, erfolgt die Transkription der β -Gene (fünf-sieben Stunden nach der Infektion). Daraufhin erfolgt die virale DNA-Synthese, die Expression der γ -Gentranskripte und die Produktion von infektiösen Nachkommen.

Die X-Achse stellt die Zeit nach einer HSV-1-Infektion dar. Die Y-Achse zeigt das Niveau der α -, β - und γ -Genexpression an. Die gestrichelte blaue Linie die DNA-Synthese. Hinzuzufügen ist, dass die γ_1 -Gene auch in der Abwesenheit der DNA-Synthese exprimiert werden können. Diese sind sehr stark nach dem Start der DNA-Replikation erhöht. Diese Graphik zeigt nur die allgemeine Chronologie der Ereignisse auf.

(Khanna *et al.* 2004; Trends in Immunology)

2.6 Latente HSV-1-Infektion

Die klassische Definition einer HSV-1 Latenz ist die eines kompletten viralen Genoms, in der keine Produktion von infektiösen Viren stattfindet. Während einer HSV-1-Latenz erfolgt eine minimale Expression des viralen Genoms und für mehrere Jahre wurde angenommen, dass das Latenz assoziierte Transkript (LAT) das einzige Transkript ist, das produziert wird. Studien in den letzten Jahren stellen dieses Konzept in Frage [Feldman *et al.* 2002; Kramer and Coen 1995; Liu *et al.* 2000]. Eine limitierte Expression von Gentranskripten und Proteinen wurde in den sensorischen Ganglien von Mäusen, denen infektiöse Virionen fehlen, nachgewiesen. Geringe Mengen an ICP4 und TK wurden durch eine RT-PCR *in vivo*, als auch in *ex vivo* Kulturen von latent infizierten TG nachgewiesen. Eine kürzliche histologische Studie

mit latent infizierten Mäuse-TG zeigte eine Expression der Transkripte ICP4, TK und in seltenen Fällen auch gC.

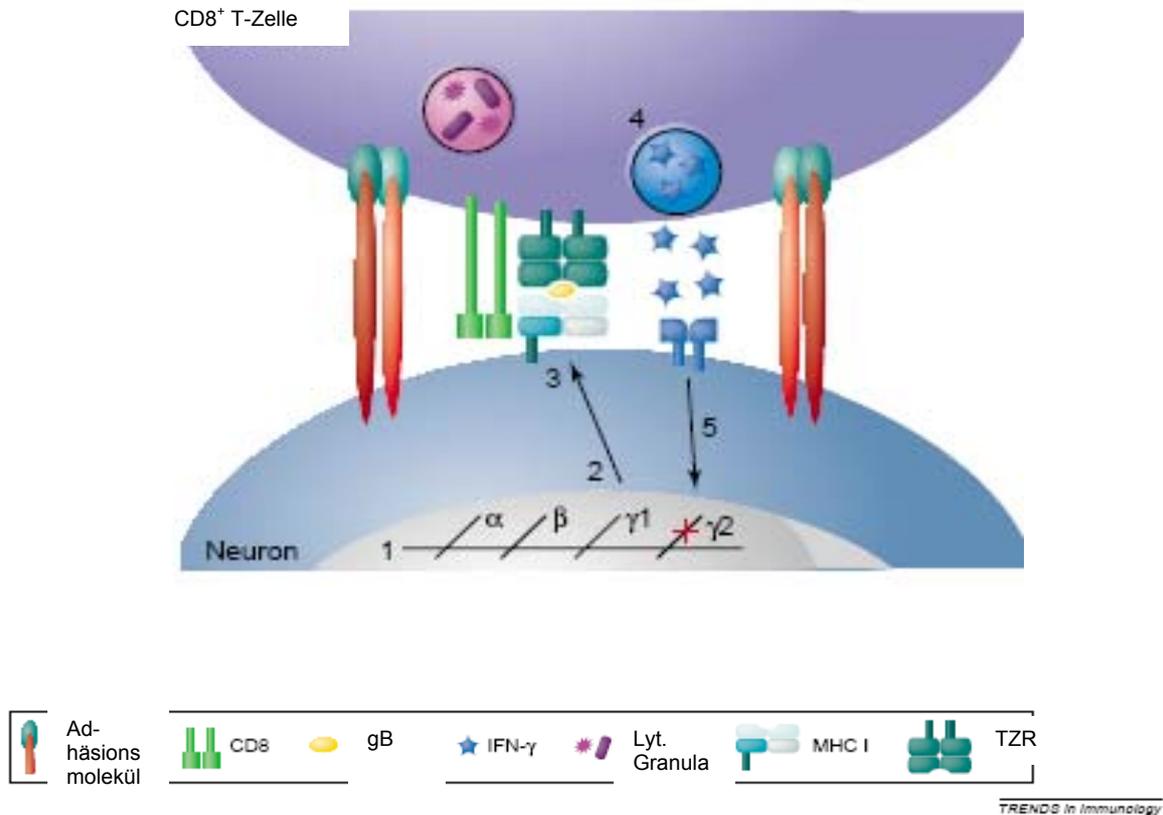


Abbildung 9: Modell der Immunüberwachung während einer latenten HSV-1-Infektion und Reaktivierung

Obwohl HSV-1 effizient in Neuronen von Mäusen replizieren kann, findet keine spontane Reaktivierung aus der Latenz wie in anderen Lebewesen (z.B. Menschen und Kaninchen) statt. Im mit HSV-1 latent infizierten TG exprimieren viele Neurone die viralen α-, β- und sogar γ1-Genprodukte. Diese werden schnell zu Peptiden prozessiert und mit dem MHC I-Molekül auf der Oberfläche von Neuronen präsentiert (1). In C57BL/6-Mäusen werden die α- und β-Genprodukte von CD8⁺ T-Zellen ignoriert, aber ein immundominantes Epitop des γ1-Genprodukts, das Glykoprotein B (gB), bindet an den Rezeptor (2). Weil gB und MHC I auf einem sehr niedrigen Niveau zu einem frühen Zeitpunkt während einer Reaktivierung exprimiert werden, induziert eine geringe Anzahl an gB-MHC I-Komplexen die IFN-γ-Produktion durch CD8⁺ T-Zellen (4). Zu diesem Zeitpunkt während der Reaktivierung kann IFN-γ die darauf folgende Expression der γ2-Gene und die Formation von Virionen blockieren (4, 5). Das Neuron wird nicht zerstört, aber das Virus wird im Latenzzustand gehalten. (Khanna *et al.*, 2004; Trends in Immunology)

2.7 CD8⁺ T-Zell-Antwort während einer viralen Infektion

CD8⁺ T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Eliminierung der meisten viralen Infektionen. Eine primäre CD8⁺ T-Zell-Antwort resultiert in der Kontrolle der Infektion und in der Generierung von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen, die nach einer erneuten Infektion mit dem selben viralen Pathogen eine protektive Immunität aufweisen.

Nach einer initialen Infektion expandieren antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen in den lymphoiden Organen und differenzieren weiter zu Effektor-T-Zellen. Expansion beinhaltet die schnelle programmierte Zellteilung, die durch die Interaktion von naiven CD8⁺ T-Zellen mit den antigentragenden antigenpräsentierenden Zellen (APZ) im lymphoiden Gewebe hervorgehen. Die Effektor-CD8⁺ T-Zellen unterscheiden sich phänotypisch von den naiven Vorläufern, indem sie die Expression von CD127 (IL-7R α) und CD62L (L-Selektin) herunterregulieren, während die Expression von CD43, CD44, CD122 (IL-2R β) und LFA-1 hochreguliert wird [Kaech *et al.* 2002; Slifka and Whitton 2000]. Zytotoxische Effektor-T-Zellen können nun Zielzellen durch Sekretion von Zytotoxinen töten. Dies geschieht durch Perforin und Granzymen, die in speziellen lytischen Granula gespeichert sind, und bei der Freisetzung die Membran der Zielzelle perforieren und im Innern der Zelle Apoptose auslösen. Zum anderen kann Apoptose auch durch die Bindung des Fas-Liganden (CD95L) an den Fas-Rezeptor (CD95) in CD95-exprimierenden Zellen induziert werden.

Nach der Expansionsphase begehen 95-99% der Virus-spezifischen Effektor-T-Zellen Apoptose, was mit der Beseitigung des Pathogens einhergeht [Kaech *et al.* 2002]. In lymphoiden Organen kann die Kontraktion der T-Zellen aus einer Kombination von programmiertem Zelltod und Emigration bestehen. Dabei gibt es zwei Hauptwege: i) activation induced cell death (AICD), der die Fas/FasL-Interaktion beinhaltet und ii) activated T cell autonomous death (ACAD), der nicht von Zytokinen und Rezeptoren abhängig ist. Man vermutet, dass beide Wege durch Caspasen induziert werden [Strasser and Pellegrini 2004; Murrack and Kappler 2004; Hildeman *et al.* 2002].

Nach der Kontraktionsphase überlebt eine kleine Population an antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen im TG und verbleibt lebenslang [Masopust *et al.* 2004]. Gedächtniszellen können bis zu zwei Jahre in Mäusen [Lau *et al.* 1994] und bis zu 35-50 Jahren beim Menschen nachgewiesen werden [Demkowicz, Jr. *et al.* 1996].

Sie haben die Fähigkeit schnell auf eine zweite Begegnung mit dem Pathogen zu expandieren und werden langfristig durch die homöostatische Proliferation, die durch IL-15 und weniger durch IL-7 gesteuert wird, am Leben erhalten [Gourley *et al.* 2004].

2.8 Identifikation von Gedächtnis-Vorläufer-Zellen

Die anfängliche CD8⁺-Effektor-Population beinhaltet eine kleine Subpopulation (5-15%), die CD127 (IL-7Rα) exprimieren und das Potential besitzen in langlebige Gedächtnis-Zellen zu differenzieren (siehe Abbildung 10) [Kaech *et al.* 2003]. Die Häufigkeit dieser CD127 positiven CD8⁺ T-Zellen nimmt während der Kontraktionsphase zu.

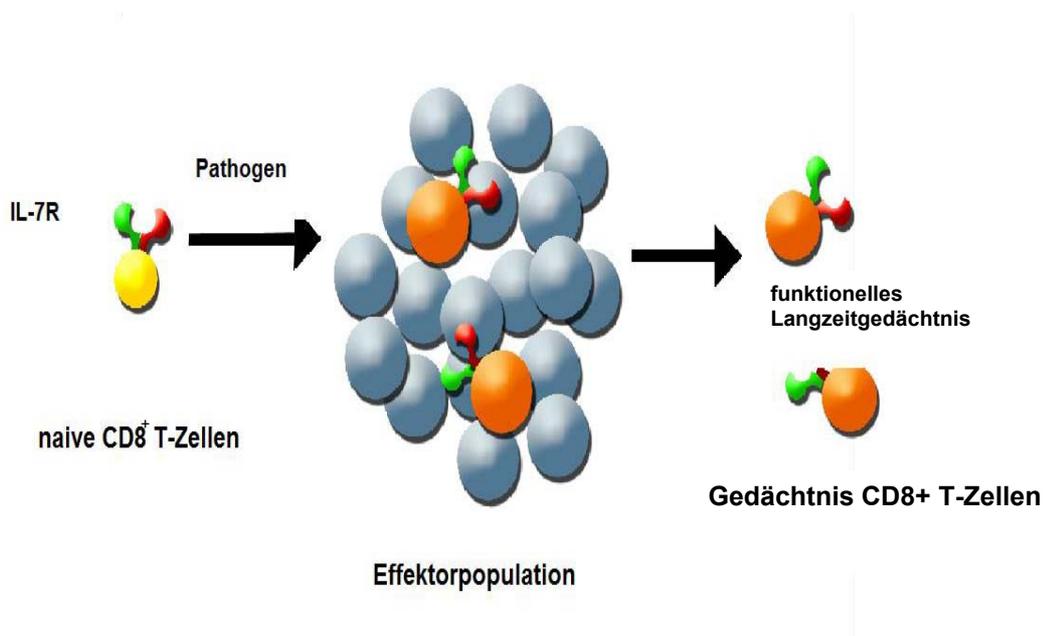


Abbildung 10: CD127 (IL-7Rα)-Expression identifiziert CD8⁺ -Vorläufer-T-Zellen innerhalb einer CD8⁺ - Effektor- Zell-Population

Naive und Gedächtnis-CD8⁺ T-Zellen exprimieren CD127. Während der Expansionsphase beinhaltet die anfängliche CD8⁺ -Effektor-Population eine kleine Subpopulation (5-15%), die CD127 exprimiert und das Potential besitzt, sich in langlebige Gedächtnis-Zellen zu differenzieren.

(Weir *et al.* 2001; Gene)

Unter einigen Umständen kann die CD8⁺ T-Zell-Antwort zu mehr als einem viralen Epitop ausgelöst werden, was zu einer Generierung von unterschiedlichen antigenspezifischen CD8⁺ T-Zell-Subtypen führen kann. Während die Antwort auf einige Epitope stärker (dominant) als bei anderen ist (subdominant), kann eine Hierarchie einer Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Antwort beobachtet werden. Dieses Phänomen wird als Immundominanz bezeichnet und wird durch viele Faktoren wie dem T-Zell-Repertoire, der Antigenprozessierung und Präsentation reguliert [Yewdell and Bennink 1999].

2.9 CD8⁺ T-Zellen erkennen HSV-1- spezifische Epitope

CD8⁺ T-Zellen erkennen virusinfizierte Zellen durch die Präsentation von virusabstammenden Peptiden innerhalb einer Bindungsfurche der MHC I-Moleküle. Es gibt drei Typen von Epitopen. Die immundominanten Epitope werden hauptsächlich von virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt. Das immundominante HSV-1-Epitop in C57BL/6-Mäusen besteht aus den Aminosäuren 498-505 des Glykoproteins B (gB₄₉₈₋₅₀₅). Dieses ist immunodominant und wird von annähernd 70 % aller HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen während einer akuten Infektion erkannt. Subdominante Epitope werden von einer Subpopulation an HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen erkannt. Der Grund, warum diese Epitope nur eine Subpopulation an CD8⁺ T-Zellen stimulieren, ist unklar. In C57BL/6-Mäusen ist ein Epitop, bestehend aus den Aminosäuren 822-829 der Ribonukleotid Reduktase Untereinheit 1 (RR1₈₂₂₋₈₂₉) von HSV-1 subdominant. Es wird von etwa 20 % aller HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach einer akuten Infektion erkannt. Die dritte Klasse wird als kryptisch bezeichnet, weil die Expansion von reaktiven CD8⁺ T-Zellen nur dann beobachtet werden kann, wenn ein immundominantes Epitop verloren geht. In Abwesenheit von dominanten Epitopen können diese kryptischen Epitope dominant werden und sogar den subdominanten Epitopen vorgezogen werden.

Während der anfänglichen Expansion erkennen 77 % aller HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im TG von C57BL/6-Mäusen das immundominante gB₄₉₈₋₅₀₅-Epitop und 15 % erkennen das subdominante RR1₈₂₂₋₈₂₉-Epitop. Nach der Kontraktion erkennen nahezu alle HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen das gB₄₉₈₋₅₀₅-Epitop. Während der lytischen Infektion wird gB als ein γ 1-Protein exprimiert, wobei RR1 als β -Protein exprimiert wird.

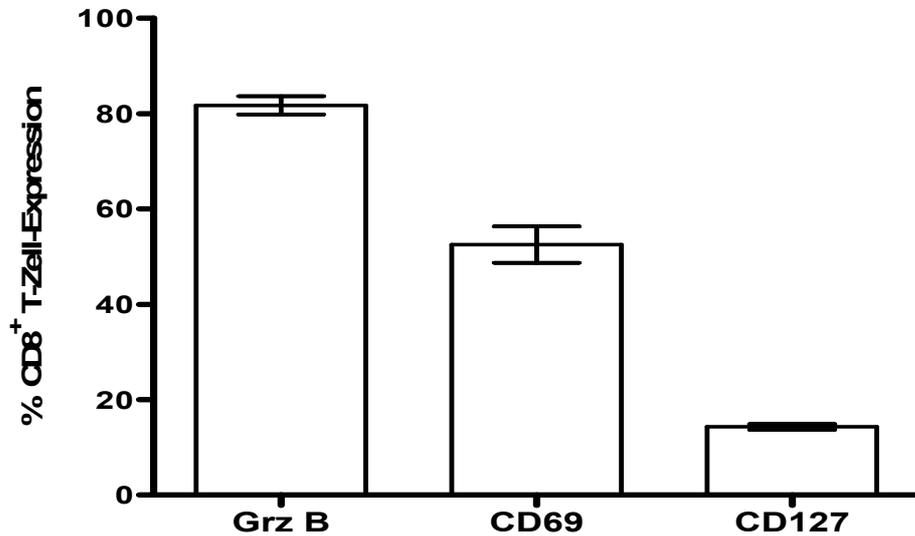
Indem ein Tetramer, der das gB₄₉₈₋₅₀₅-Peptid beinhaltet, in Verbindung mit einem anti-CD8-Antikörper verwendet wurde, konnte der TZR der CD8⁺ T-Zellen in latent infizierten TG nachgewiesen werden. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass viele Zellen in jedem TG ihren TZR in einer apparenten Synapse zu den Neuronen polarisiert.

Diese Ergebnisse sind von besonderer Bedeutung, weil sie eine direkte Interaktion zwischen den CD8⁺ T-Zellen und den Neuronen aufzeigen. Dies deutet darauf hin, dass die Neuronen nicht nur das gB-Protein während der Latenz exprimieren, sondern es wird ebenfalls genügend MHC-Klasse I für die Ligation und Polarisierung des TZR produziert.

Die Mehrheit der CD8⁺ T-Zellen im latent infizierten TG einer Maus ist für ein einzelnes immundominantes Epitop, einem HSV-1 γ 1-Genprodukt, dem Glykoprotein B (gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b) spezifisch. Viele dieser gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen CD8⁺ T-Zellen exprimieren den Aktivierungsmarker CD69 (Abbildung 11B).

A

Expression von Aktivierungsmarkern im akut infizierten TG



B

Expression von Aktivierungsmarkern im latent infizierten TG

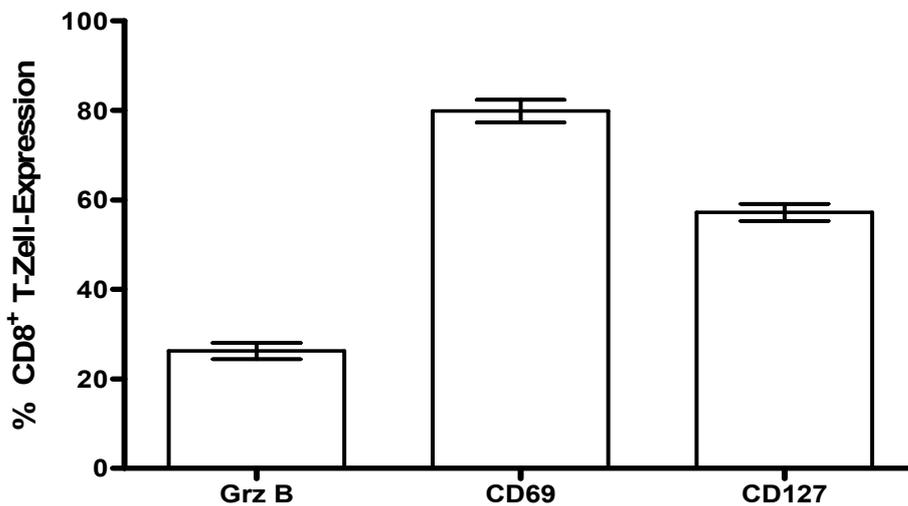


Abbildung 11: Expression der Aktivierungsmarker Granzym B, CD69 und CD127 im akut und latent infizierten TG

C57BL/6-Mäuse wurden mit HSV-1 okular infiziert. Acht (A) bzw. 30 (B) Tage nach der Infektion wurden die TG entnommen, Einzel-Zell-Suspensionen (wie im Material- und Methodenteil beschrieben) hergestellt, mit einem anti-CD45, CD8, Grz. B, CD69 und CD127- Antikörper gefärbt und mittels FACS-Zytometer analysiert. Dargestellt ist die Prozentzahl der CD8⁺ T-Zellen, die für Grz. B, CD69 und CD127 positiv sind. (Dissertation von Brian S. Sheridan; 2008)

2.10 CD8⁺ T-Zell-Antwort im HSV-1 infizierten TG

CD8⁺ T-Zellen beginnen früh nach der Infektion (sechs Tage) mit der Infiltration ins TG [Lang and Nikolich-Zugich 2005]. Zu diesem Zeitpunkt hat die HSV-1 Latenz schon in einigen Neuronen begonnen, während zur gleichen Zeit in einigen anderen Neuronen noch virale Replikation stattfindet.

Einmal im TG angekommen, beginnen die CD8⁺ T-Zellen mit der Expansion und anschließender Kontraktion. Der Anfang der Kontraktionsphase korreliert mit der Viruseliminierung und der Etablierung der Latenz. Bis zu 30 Tage nach der Infektion findet die Kontraktion der CD8⁺ T-Zellen statt. Schließlich verbleibt eine stabile Population an Gedächtnis-T-Zellen im latent infizierten TG [Liu, Khanna, Chen, Fink and Hendricks 2000; Khanna *et al.* 2003].

Ein wesentliches Charakteristikum des immunologischen Gedächtnisses ist die Fähigkeit schnell und stärker auf eine erneute Exposition mit demselben Antigen zu reagieren. Diese zweite Antwort ist normalerweise quantitativ und qualitativ besser.

Gedächtnis-Zellen unterscheiden sich von naiven Zellen durch folgende Verhaltensweisen: i) sie reagieren sensitiver auf geringe Konzentrationen von Antigen, ii) nach Antigenstimulation erfolgt eine schnellere Proliferation, iii) sie können schneller Effektorfunktionen zur Verfügung stellen, iv) sie können eine höhere Anzahl an Zytokinen ausschütten und v) sie exprimieren Adhäsionsmoleküle zum Eintritt in periphere Gewebe. Gedächtnis-T-Zellen sind weniger abhängig von einer Kostimulation durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ).

Gedächtnis-T-Zellen lassen sich durch verschiedene phänotypische Oberflächenmarker von naiven T-Zellen unterscheiden, z.B. durch CD62L (L-Selektin) und durch den Chemokinrezeptor CCR7. Diese sind für den Eintritt in Lymphknoten durch „high endothelial venules“ (HEV) erforderlich und sind auf allen naiven T-Zellen stark exprimiert. Ihre Expression auf Gedächtnis-T-Zellen ist dagegen heterogen und ermöglicht somit die Unterscheidung zweier Subpopulationen: Zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CD62L^{hoch}/CCR7^{hoch}) und Effektor Gedächtnis-T-Zellen (CD62L^{niedrig}/CCR7^{niedrig}).

Zentrale Gedächtnis-T-Zellen wandern vorzugsweise in lymphatische Organe, bilden Interleukin-2 (IL-2) und proliferieren stark nach Stimulierung durch Antigen. Effektor Gedächtnis-T-Zellen proliferieren nach Antigenstimulierung nur sehr schwach, können dafür aber unmittelbar „klassische“ Effektorfunktionen (z.B. Zytotoxizität) ausüben und halten sich ausschließlich in nicht-lymphatischen Geweben auf.

Zur Zeit existieren zwei grundlegende Modelle, um die Generierung von Gedächtnis-T-Zellen zu erklären: i) das lineare Differenzierungsmodell, bei dem zufolge die Gedächtnis-T-Zellen aus einer Subpopulation von Effektorzellen heranreifen; ii) ein divergenter Pfad, bei dem angenommen wird, dass sich aus einer naiven T-Zelle entweder eine Effektor- oder eine Gedächtnis-T-Zelle entwickelt.

2.11 Das murine HSV-1-Infektionsmodell

Nach Erstinfektion der Epitheloberfläche der Hornhaut (Cornea) induziert die virale Replikation die Migration von Langerhans-Zellen in die Hornhaut [Brissette-Storkus *et al.* 2002]. Nach der Aufnahme von viralen Antigenen wandern die Langerhans-Zellen in die submandibularen Lymphknoten. Dort erfolgt die Präsentation der viralen Antigene den naiven T-Zellen. Die eindringenden polymorph-nukleären Zellen (PMN) eliminieren in den ersten Tagen nach der Infektion die Viren von der Hornhaut [Tumpey *et al.* 1996]. Nach anfänglicher Replikation gewinnt das Virus Zugang zu den Nervtermini und wird durch retrograden axonalen Transport zu den neuronalen Zellkörpern im Trigeminalganglion transportiert [Shimeld *et al.* 2001]. Replizierendes Virus kann normalerweise zwei Tage nach Infektion nachgewiesen werden [Lang and Nikolich-Zugich 2005]. Nach einer kurzen Zeit an viraler Replikation wird in einem Teil der sensorischen Neuronen eine lebenslange latente Infektion etabliert [Roizman and Sears 1987].

Da eine spontane HSV-1-Reaktivierung in Mäusen eher unwahrscheinlich ist, wird eine Reaktivierung in den Mäusen durch Stress ausgelöst. Eine „spontane“ HSV-1-Reaktivierung, die bei Menschen, aber nicht bei Mäusen festgestellt wurde, könnte auf eine immer wiederkehrende Aussetzung der Menschen auf Stress hervorgerufen werden. Humane Neurone exprimieren wahrscheinlich eine geringere Dichte an HSV-1-Epitopen während einer HSV-1-Reaktivierung aus der Latenz. Grund dafür könnte die selektive Eigenschaft des ICP47 von HSV-1 sein, welches das humane TAP blockiert.

Während der Reaktivierung wandert das Virus über anterograden axonalen Transport zurück zur Peripherie, an die Stelle oder in die Nähe der Erstinfektion. Dort werden neue Läsionen durch virale Replikation in den Epithelzellen hervorgerufen.

In Abbildung 12 ist das Infektionsmodell schematisch dargestellt.

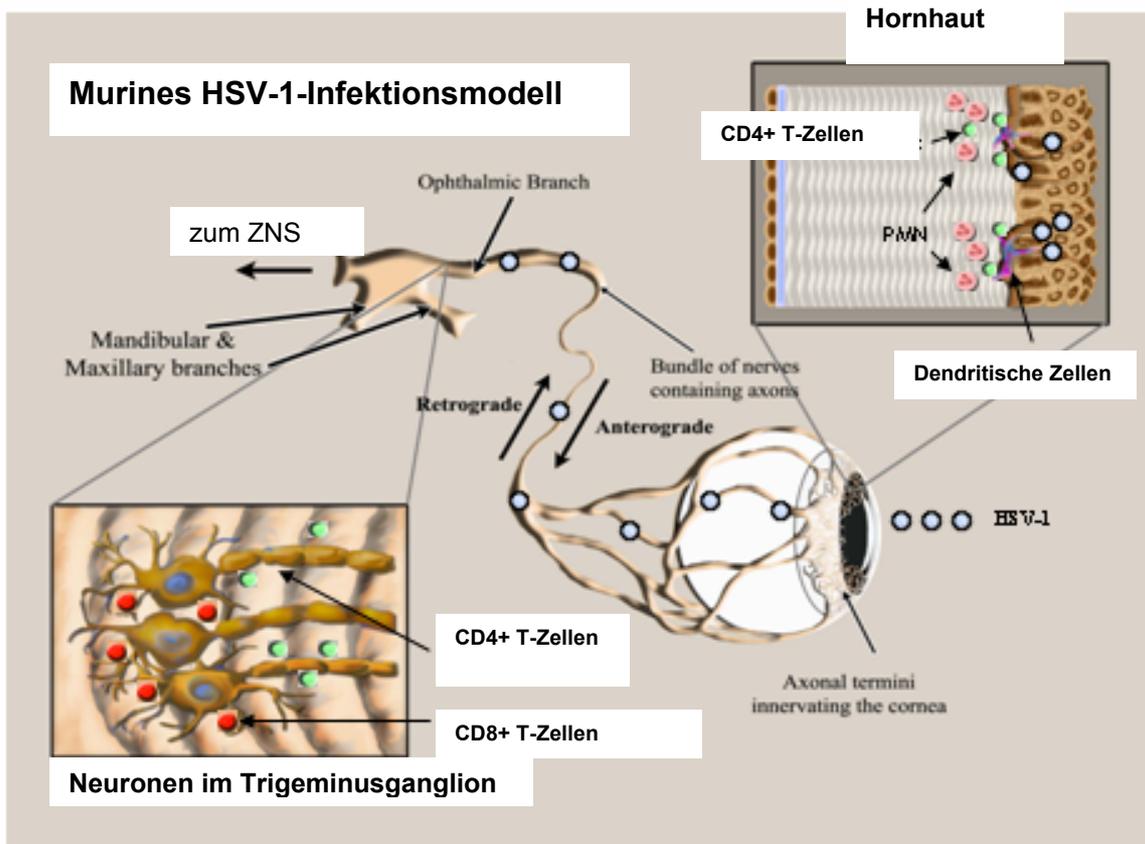


Abbildung 12: HSV-1 Maus-Modell

Nach einer Infektion der Epitheloberfläche der Hornhaut repliziert HSV-1 in den Epithelzellen und gewinnt Zugang zu den Termini der sensorischen Neuronen. Das Virus wird dann über retrograden axonalen Transport zu den neuronalen Zellkörpern im Trigeminusganglion (TG) transportiert. Nach einer kurzen Replikationsphase etabliert sich nun in einem Teil der Neuronen eine lebenslange latente Infektion. Nach ungefähr fünf Tagen beginnen die CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen mit der Infiltration ins TG und verbleiben dort lebenslang. Die CD8⁺ T-Zellen lokalisieren sich in unmittelbarer Nähe zu den neuronalen Zellkörpern, während sich die CD4⁺ T-Zellen verstreut im Ganglion, besonders in der Nähe der axonalen Areale, befinden. Infektiöse Viren werden innerhalb von wenigen Tagen nach der Infektion auf der Hornhaut von infiltrierenden polymorph-nukleären Zellen (PMN) eliminiert.

(Labor Prof. Dr. Hendricks, University of Pittsburgh)

In unserem Modell beginnen die Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sechs Tage nach der Infektion ins TG einzuwandern. Acht Tage nach der Infektion ist die höchste Anzahl an CD8⁺ T-Zellen erreicht. Nach der Expansion im submandibularen Lymphknoten erfolgt eine dramatische Kontraktion der T-Zell-Anzahl. Eine 80-90%ige Reduktion an CD8⁺ T-Zellen findet 34 Tage nach der Infektion im Vergleich zu acht Tagen nach der Infektion statt. Eine erhebliche Population an CD8⁺ T-Zellen bleibt lebenslang im Tier erhalten. Diese Beibehaltung an CD8⁺ T-Zellen wird auch im Menschen beobachtet, wo CD8⁺ T-Zellen die latent infizierten Neuronen umgeben. Beim Menschen und in Mäusen verbleibt die Population an Virus-spezifischen T-Zellen, die sich auch während der Latenz im TG befinden, in einem Aktivierungszustand. In nicht-infizierten Geweben sind die Virus-spezifischen Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen nicht aktiviert. Der Gedächtnis-CD8⁺ T-Zell-Pool, der sich im TG befindet, wird als aktivierte Effektor-Gedächtnis-Zelle beschrieben. Sie exprimieren hohe Werte an CD44, CD69 und IL-7R α , produzieren IFN- γ und TNF- α nach einer Stimulierung *ex vivo*, sind direkt *ex vivo* zytotoxisch und positiv für Granzym B und Perforin.

Vermutlich ist der Kontakt mit Antigenen für die Beibehaltung einer Effektor-Gedächtnis-Population erforderlich. Im Gegensatz dazu wird die Zentrale Gedächtnis-Population durch die homöostatische Proliferation aufrechterhalten. In akuten Infektionen formt sich der CD8⁺ T-Zell-Gedächtnis-Pool nach der Eliminierung des Pathogens und wird durch die homöostatische Proliferation, die durch die Zytokine IL-2, IL-7 und IL-15 reguliert wird, beibehalten. Auf der anderen Seite scheinen chronische Infektionen eine „erschöpfte“ CD8⁺ T-Zell-Gedächtnis-Population zu generieren, die nicht in der Lage ist auf homöostatische Signale dieser Zytokine zu reagieren. Die Beibehaltung dieser Population benötigt den ständigen Kontakt mit dem Antigen, was in einer reduzierten Expression der Rezeptoren von IL-7 und IL-15, sowie der Hochregulierung von PD-1 resultiert. Diese entstandene Gedächtnis-Population ist funktionell beeinträchtigt. Es fehlt ihr die zytotoxische Funktion und sie ist nicht in der Lage IFN- γ und TNF- α zu produzieren [Sheridan *et al.* 2007].

Während der anfänglichen Replikation des Virus auf der Epitheloberfläche der Hornhaut beginnen Makrophagen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen mit der Infiltration ins TG [Kodukula *et al.* 1999; Liu *et al.* 1996; Sciammas *et al.* 1997; Pereira *et al.* 2001; Grubor-Bauk *et al.* 2003]. Sie kontrollieren die virale Replikation durch die Produktion

des antiviralen Agens Nitritoxid (NO), des Tumornekrosefaktors TNF- α und IFN- γ [Kodukula *et al.* 1999b; Liu, Tang and Hendricks 1996]. NO und TNF- α werden hauptsächlich von Makrophagen produziert, während $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen vorwiegend IFN- γ produzieren [Kodukula *et al.* 1999; Liu, Tang and Hendricks 1996; Sciammas *et al.* 1997; Pereira *et al.* 2001; Grubor-Bauk *et al.* 2003]. Eine Depletion von Makrophagen, die Neutralisation von TNF- α und IFN- γ , oder die Hemmung der NO-Produktion führen zu einer signifikanten Erhöhung des Virustiters und der Anzahl von infizierten Neuronen im TG.

$\alpha\beta$ -T-Zellen haben eine wichtige Funktion bei der Eliminierung des replizierenden Virus und der Etablierung der Latenz in einigen Neuronen. In Abwesenheit dieser Zellen etabliert das Virus eine Latenz in einigen Neuronen (nachgewiesen durch LAT-Expression), allerdings findet in einer kleinen Anzahl von Neuronen immer noch Replikation statt [Metcalf *et al.* 1979; Gesser *et al.* 1994; Ellison *et al.* 2000; Simmons and Tschärke 1992]. Während einer HSV-1-Infektion in SCID-Mäusen (severe combined immune deficiency), denen die adaptive Immunität fehlt, stattdessen aber eine sehr ausgeprägte angeborene Immunität besitzen, führt die dauernde virale Replikation in einigen Neuronen zur lethalen Enzephalitis [Gesser *et al.* 1994; Ellison *et al.* 2000]. Adoptiver Transfer von $\alpha\beta$ -T-Zellen stellt die Fähigkeit der SCID-Mäuse eine uniforme Latenz zu etablieren, sowie die HSV-1 Infektion zu überleben, wieder her [Minagawa and Yanagi 2000].

Eine Reduktion der Lymphozytenzahl aus dem Blut wird durch die Gabe von Corticosteron induziert. Ein erhöhter Corticosteron-Spiegel ist ein allgemein gültiges Anzeichen für Stress. Glykokortikoide beeinflussen die Expression von Zytokinen wie IFN- α , - β und - γ , IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 und TNF- α . Die Expression von Zytokinrezeptoren werden ebenfalls durch sie geregelt. Interessanterweise können Glykokortikoide einen Wechsel von Th1 (IL-2, IFN- γ) zu Th2 (IL-4, IL-6) induzieren und regulieren auch die T-Zell-Funktion, indem sie Apoptose induzieren. Zudem besitzen sie die Fähigkeit die T-Zell-Proliferation zu hemmen und möglicherweise auch die T-Zell-Funktion teilweise durch die Blockierung des Zell-Zyklus (G_0/G_1) zu regulieren. Zusätzlich können sie die Prozessierung von Antigen inhibieren, indem sie die Generierung von Peptiden beeinträchtigen, was zu einer reduzierten Funktion der APZ führt.

3. Fragestellung

Nach einer primären Infektion der Mundschleimhaut oder der Hornhaut kann das Herpes-Simplex-Virus 1 (HSV-1) eine Latenz in den sensorischen Neuronen im Trigeminalganglion (TG) etablieren. Von hier aus reaktiviert das Virus periodisch und verursacht einen harmlosen *Herpes labialis* oder eine bedrohliche *Herpes keratitis* die zur Erblindung führen kann.

Die Existenz einer sehr stabilen CD8⁺ T-Zell-Population während einer latenten murinen HSV-1-Infektion und die erhöhte Expression von Chemokinen und deren Chemokinrezeptoren deutete darauf hin, dass diese Entzündungskomponenten sowohl bei der Aufrechterhaltung der HSV-1-Latenz, als auch bei einem Reaktivierungsprozess mitbeteiligt sind und möglicherweise das ständige Nachfüllen an T-Zellen aus der Peripherie benötigt. Es gibt hingegen besonders aus der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Hendricks Arbeiten die dafür sprechen, dass i) das Verhältnis von CD8⁺ T-Zellen im latent infizierten TG, welche HSV-spezifisch sind, sehr konstant ist (50% HSV-spezifisch / 50% HSV-unspezifisch). Dies wurde anhand von Tetramerfärbungen und funktionellen Studien nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ist die Frequenz der HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut sehr gering (<5%) [Khanna *et al.* 2003]. ii) Die Behandlung von latent infizierten Mäusen mit Corticosteron verringert die CD8⁺ T-Zell-Population um ca. 75%, aber die Population erholt sich nach sechs bis acht Tagen wieder zu einem normalen Niveau. Selbst dann bleibt das Verhältnis von HSV-spezifischen zu HSV-unspezifischen CD8⁺ T-Zellen 1:1 bestehen [Freeman *et al.* 2007]. iii) IL-15^{-/-}-Mäuse entwickeln eine numerisch reduzierte, aber stabile Population an HSV-spezifischen Gedächtnis-CD8⁺ T-Zellen im TG, wohingegen diese Zellen in der Lunge und im peripheren Blut nahezu verloren gehen [Sheridan *et al.* 2006].

Ziel dieser Arbeit war es, auf der einen Seite die Bedeutung der Chemokine (IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5) und deren zugehörige Chemokinrezeptoren (CXCR3 und CCR5) bei der Infiltration von HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sowohl während einer akuten als auch latenten Infektion mit HSV-1 zu untersuchen. Auf der anderen Seite war es wichtig herauszufinden, ob die HSV-spezifische Gedächtnis CD8⁺ T-Zell-Population im latent infizierten TG kompartimentalisiert ist und ein Nachfüllen an T-Zellen aus dem peripheren Blut benötigt.

Untersuchungen der Mechanismen, die für das Anlocken und die Aufrechterhaltung der CD8⁺ Gedächtnis-T-Zell-Population im infizierten TG verantwortlich sind, sind von besonderer Bedeutung, insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung von Vakzinen welche die Reaktivierung verhindern.

4. Material und Methoden

4.1 Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Epitop (Anti-Maus-)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD45	PerCP APC-Cy7	30-F11 30-F11	Becton-Dickinson Becton-Dickinson
CD8	APC-Cy7 Pacific Blue APC-Alexa-Fluor 750	53-6.7 53-6.7 53-6.7	Becton-Dickinson eBioscience Becton-Dickinson
CD3	APC-AF750	145-2C11	Becton-Dickinson
CD4	PE-Cy7	RM4-5	Becton-Dickinson
H-2K ^b -Tetramer gB ₍₄₉₈₋₅₀₅₎	PE APC		NIAID Tetramer Facility; Emory University Vaccine Center, Atlanta, GA
CD16/32 (Fc-Block)		2.4G2	Becton-Dickinson

Epitop (Anti-Maus-)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD45.1	FITC	A20	Becton-Dickinson
CD45.2	APC	104	Becton-Dickinson
	PerCP-Cy5.5	104	Becton-Dickinson
Thy1.1 (CD90.1)	FITC	OX-7	Becton-Dickinson
Thy1.2 (CD90.2)	APC	53-5.1	Becton-Dickinson
CD69	FITC	H1.2F3	Becton-Dickinson
Grz. B	APC	GB11	Caltag
	PE	GB11	Caltag
CXCR3	APC	220803	R&D Systems
CD44	FITC	IM7	Becton-Dickinson
	PE	IM7	Becton-Dickinson
Ly6C	FITC	RB6-8C5	Becton-Dickinson
CD62L	APC	MEL-14	Becton-Dickinson
CD127	PE-Cy7	LG.7F9	eBioscience
VLA-4	PE	R1-2	Biolegend
LFA-1 (CD11a)	PE-Cy7	2D7	Becton-Dickinson
BrdU	FITC	3D4	Becton-Dickinson
DiD	DiD (APC)	-	Invitrogen

4.2 Geräte

Kryostat 3050S [Leica, Wetzlar, Deutschland]

Zentrifuge (groß) [Sorvall RT7 Plus]

Zentrifuge (klein) [Eppendorf 5415R]

FACS-Zytometer [BD FACS Aria]

Cell Counter [Beckman Coulter Vi-Cell XR]

4.3 Chemikalien

Ketamine-Hydrochlorid [Phoenix Scientific, St. Joseph, MO]

Xylazin [Phoenix Scientific, St. Joseph, MO]

Hanks Buffered Salt Solution (HBSS) [Bio Whittaker, Walkersville, MD]

Fluorescein [Akron, Abita Springs, LA]

Fötale Kälberserum (FKS) [Atlanta Biologicals, Lawrenceville, GA]

Kollagenase Typ I [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO]

Corticosteron [MP Biomedicals, Irvine, CA]

(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (HBC) [Sigma- Aldrich]

TAK-779 (*N,N*-dimethyl-*N*-[4-[[[2-(4-methylphenyl)-6,7-dihydro-5*H*-benzocyclohepten 8yl]carbonyl]amino]benzyl]tetrahydro-2*H*-pyran-4-aminium chloride) [NIH]

5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) [Sigma-Aldrich]

Penicillin/Streptavidin [Invitrogen (Gibco)]

Natrium-Azid (NaN₃) [J.T. Baker]

Bovines Serumalbumin (BSA) [Sigma Aldrich]

Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA) [Sigma Aldrich]

Sucrose [Fisher Scientific]

Paraformaldehyd (PFA) [Electron Microscopy Sciences]

Phosphate Buffered Saline (PBS) [Invitrogen (Gibco)]

Heparin [Sigma Aldrich]

Aceton [Fisher Scientific]

Methylcellulose [Sigma Aldrich]

Lysin [Sigma Aldrich]

Tris [Invitrogen]

NH₄Cl [Fisher Scientific]

L-Glutamin [Invitrogen (Gibco)]

4.4 Medien und Puffer

Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) [Bio Whittaker, Walkersville, MD]

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) [Bio Whittaker, Walkersville, MD]

RBC-Lyse-Puffer, pH 7,2:

0,16 M NH₄Cl

0,17 M Tris

in dH₂O

FACS-Puffer:

PBS

0,1% NaN₃

1% FBS

MACS-Puffer:

PBS

0,5% BSA

2 mM EDTA

Plaque-Assay-Medium:

DMEM

2% FBS

1% Pen/Strep

1% L-Glutamin

1% HEPES

1% Natriumpyruvat

4.5 Materialien

DNeasy-Säulen [Qiagen]

TaqMan Universal PCR Master Mix [Roche, Branburg, NJ]

HSV-1 gH-spezifisches Primer-Probe-Set [ABI Assays-by-Design Service; Applied Biosystems, Foster City, CA]

Optiprep-Gradienten [Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY]

40-µm-Filter [BD Labware, Bedford, MA]

FACSDiva- Software [BD Biosciences]

Optimal Cryostate Temperature [Tissue-Tek, Naperville, IL Compound]

CD8 MicroBeads Separation Kit [Miltenyi Biotec]

4.6 Mäuse und deren Infektion der Hornhaut mit HSV-1

Sechs bis acht Wochen alte weibliche Wildtyp (WT) C57BL/6-Mäuse (B6; CD45.2, Thy1.2), B6.SJL-*Ptprc^aPepc^b*/BoyJ (B6.SJL; CD45.1, Thy1.1) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) und gB-TI.1 β transgene Mäuse (von F. Carbone zur Verfügung gestellt) wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit 2,0 mg Ketamin-Hydrochlorid und 0,04 mg Xylazin (Phoenix Scientific, St. Joseph, MO) in 0,2 ml HBSS (Bio Whittaker, Walkersville, MD) betäubt. Die Hornhaut der betäubten Mäuse wurde 15-30 mal im Zickzack-Verfahren mit einer 30G-Nadel eingeritzt und die Augen mit 3 μ l RPMI (Bio Whittaker, Walkersville, MD), welches 1×10^5 PFU des HSV-1-Virus enthält, infiziert. Die Effizienz der Infektion wurde sporadisch mittels topikaler Applikation von Fluorescein (Akron, Abita Springs, LA) direkt auf der Hornhaut zwei Tage nach der Infektion unter dem Mikroskop überprüft. Alle Tierexperimente wurden mit Genehmigung der University of Pittsburgh Institutional Animal Care and Use Committee durchgeführt.

4.7 Virus-Stamm

Der HSV-1-RE-Stamm wurde in Vero-Zellen herangezogen und intakte Virionen wurden durch Optiprep-Gradienten nach der Anleitung des Herstellers (Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY) isoliert. Die PFU wurden mittels eines Standard-Plaque-Assays auf einem Monolayer an Vero-Zellen bestimmt.

4.8 Herstellung von Einzel-Zell-Suspensionen aus Geweben

Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infektion erhielten die Mäuse eine Injektion mit 0,3 ml Heparin (1000 U/ml) und nach anschließender Betäubung wurden sie durch Ausblutung getötet. Die Gewebe wurde in 100 μ l (TG) oder 1 ml (Lunge) DMEM (Bio Whittaker), das 10% FBS (HyClone, Logan, UT or Atlanta Biologicals, Lawrenceville, GA) und 400 U/ml Kollagenase Typ I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) enthielt, für eine Stunde bei 37°C verdaut. TG wurden mittels Titration und Passierung durch einen 40- μ m-Filter (BD Labware, Bedford, MA) in Einzel-Zell-Suspension gebracht, während die Lungen, Milz und Lymphknoten mechanisch mit Hilfe eines Nylon-Filters zerkleinert wurden. Weiterhin wurden sie mit RBC-Lyse-Puffer (0,16 M NH_4Cl ,

0,17 M Tris in dH₂O, pH 7,2) zehn Minuten bei Raumtemperatur behandelt, um die roten Blutzellen zu zerstören.

100 µl Blut wurde den Mäusen nach dem Durchschneiden der Arterien aus dem Brustkorb entnommen. Das gesammelte Blut wurde bis zur Weiterverarbeitung in 50 µl Heparin (1000 U/ml) gegeben. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und das Pellet in 1 ml vorgewärmten RBC-Puffer resuspendiert. Zwei Minuten später wurden die Zellen nochmals gewaschen und ein weiteres Mal mit RBC-Puffer für weitere fünf Minuten inkubiert. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer konnten die Zellen weiterverarbeitet werden.

Die Entnahme der Gewebe und die Präparation wurde für einen adoptiven Transfer und für *ex vivo*-Kulturen, die länger als sechs Stunden andauern, unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Daten wurden an einem FACSAria Zytometer gesammelt und mit der FACSDiva-Software (BD Biosciences) analysiert.

4.9 Tetramere

MHC-Tetramere bestehen aus vier MHC-Molekülen, welche mit einem spezifischen Peptid assoziiert und mit einem Fluorochrom markiert sind. PE-konjugierte H-2K^b-Tetramere, die das gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎-Peptid beinhalten, wurden vom National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Core facility (Emory University Vaccine Center, Atlanta, GA) zur Verfügung gestellt.

4.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Identifizierung, Zählung und Sortierung von Zellen oder Partikeln in Suspension. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional

zur Menge an gebundenem Antikörper/Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Zellgröße des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar durch eine gemeinsame Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

Fluorochrom	Absorptionsmaxima [nm]	Emissionsmaxima [nm]
APC-Cy7	743	767
FITC	495	519
PerCP	490	675
PE	480	578
Pacific Blue	405	455
APC-AF 750	633	775
PE-Cy7	488	760

Eine Oberflächenfärbung wurde mit 2×10^6 Zellen/ml (Milz, Lunge und drainierende Lymphknoten (DLN)) oder einem TG-Äquivalent durchgeführt. Die Einzel-Zell-Suspensionen wurden in FACS-Puffer resuspendiert. Alle Proben wurden mit Fc-Block (1 μ g/Ansatz), um die unspezifischen Bindungen zu blockieren, für zehn Minuten auf Eis behandelt. Für alle phänotypischen Analysen wurden die TG, Milz, DLN und Lunge mit CD45-spezifischem Antikörper gefärbt, um somit das Eingrenzen der Populationen exklusiv um die infiltrierenden, vom Knochenmark abstammenden Zellen zu gewährleisten. Nach dem Fc-Block wurden die Antikörper direkt für eine Stunde auf Eis zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, in 1% PFA/PBS fixiert und am FACS-Zytometer analysiert. Eine Färbung von Blutzellen erfolgt ähnlich wie eine Färbung der anderen Gewebe. Zum Schluss allerdings erfolgt eine Inkubation mit Cytofix/Cytoperm. Dieser Schritt ist notwendig, um die restlichen roten Blutkörperchen zu entfernen.

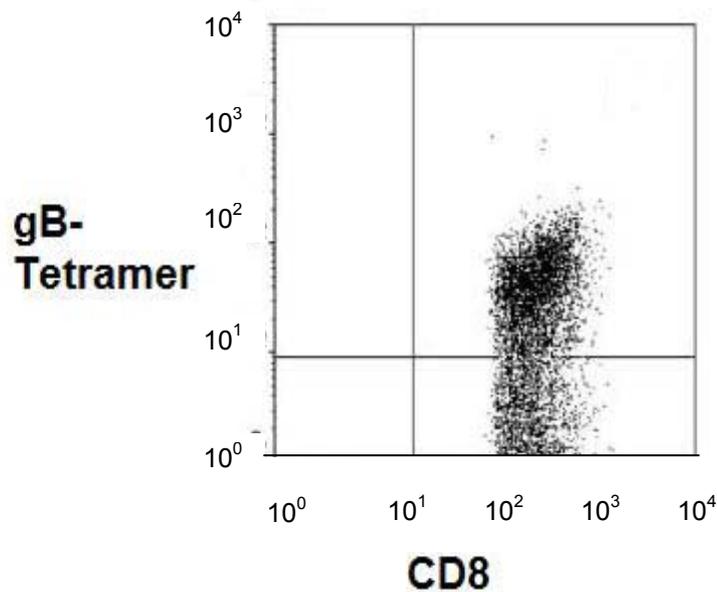


Abbildung 13: Darstellung der CD8⁺ T-Zellen, die für gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎ spezifisch sind

Die Zellen wurden mit CD45-spezifischem Antikörper gefärbt, um somit das Eingrenzen der Populationen exklusiv um die vom Knochenmark abstammenden Zellen zu gewährleisten. Gleichzeitig wurde eine anti-CD8- und anti-gB-Tetramer-Färbung durchgeführt. Dargestellt sind CD8⁺ T-Zellen, die für gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎ spezifisch sind.

4.11 Behandlung der Mäuse

4.11.1 Corticosteron-Behandlung

An drei aufeinanderfolgenden Tagen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion, wurde den Mäusen 400 µg/ml Corticosteron (MP Biomedicals, Irvine, CA) im Trinkwasser verabreicht. Frisches Corticosteron wurde jeden zweiten Tag hergestellt.

Corticosteron wurde in 30% (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin (HBC; Sigma- Aldrich) in Lösung gebracht, indem 9 g HBC in 30 ml H₂O auflöst wurden. Anschließend wurden 100 mg Corticosteron in 5 ml HBC gelöst und auf ein Volumen von 250 ml mit H₂O gebracht.

4.11.2 TAK-779 Reagenz

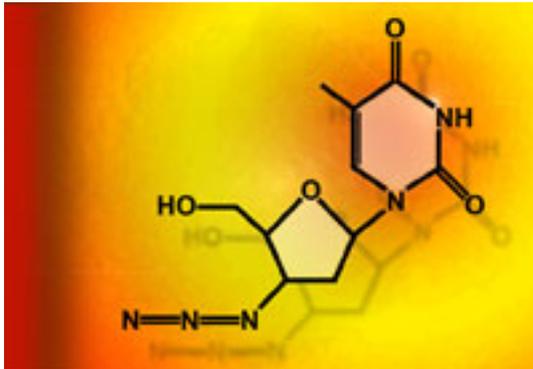


Abbildung 14: Darstellung der Strukturformel von TAK-779

TAK-779 ist ein Kleinstmolekül, eine nicht-peptidische Verbindung. Es wurde vom NIH bereitgestellt. TAK-779 wurde als ein anti-HIV-1-Agenz entwickelt. Es inhibiert die Ligandenbindung an den Rezeptor. TAK-779 blockiert effizient die Migration von T-Zellen, die CXCR3 und CCR5 exprimieren, an Orte der Entzündung.

TAK-779 wurde zuerst in Wasser aufgelöst und anschließend mit sterilem 1x PBS bis zur gewünschten Konzentration weiterverdünnt. Um die optimale Dosis von TAK-779 herauszufinden, wurden vorausgehende Studien mit unterschiedlichen Konzentrationen an TAK-779 (150 µg und 250 µg pro Maus) durchgeführt. Da nahezu identische Effekte mit beiden Dosen erzielt wurde, wurde die geringere Dosis (150 µg pro Maus) für die weiteren Untersuchungen benutzt. Für Kurzzeitbehandlungen wurde TAK-779 subkutan sechs Tage nach der Infektion injiziert und am achten Tag die unterschiedlichen Gewebe entfernt. Für Langzeitbehandlungen wurde 30, 34 und 38 Tage nach der Infektion TAK-779 verabreicht und am vierzigsten Tag das Gewebe entnommen.

4.11.3 *In vivo*-Depletion von CD4 T-Zellen

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor der Entnahme der Gewebe erhielten latent-infizierte Mäuse eine intravenöse Injektion von 0,750 mg/ml des CD4-Antikörpers (Klon GK1.5). Es wurden 100 µl pro Maus injiziert.

4.11.4 BrdU *in vivo* Proliferations-Assay

Proliferation *in vivo* wurde durch eine 1 mg BrdU–Injektion, die vier Stunden vor Gewebeentnahme i.v. verabreicht wurde, gemessen. BrdU ist ein synthetisches Nukleosid analog von Thymidin. Es baut sich in die neu synthetisierten DNA-Stränge ein und kann durch einen spezifischen Antikörper mittels FACS-Analyse detektiert werden.

Für Lunge, Milz und Lymphknoten wurden 2×10^6 Zellen pro Röhrchen und für das TG ein TG-Äquivalent eingesetzt. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend mit Fc-Block (Verdünnung 1:50) für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Für die Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit anti-CD45 (Verdünnung 1:25 in FACS-Puffer), anti-CD8 (Verdünnung 1:25 in FACS-Puffer) und gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎-Tetramer (Verdünnung 1:500 in FACS-Puffer) für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden das Pellet in 100 µl Cytofix/Cytoperm resuspendiert und für 20 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Durch die Cytofix/Cytoperm-Lösung wurden die Zellen fixiert. Es enthält Paraformaldehyd, welches eine Denaturierung und Präzipitation von Proteinen und deren Seitenketten verursacht. Ebenso wird die Permeabilisierung der Zellwand mit dieser Reagenz erreicht. Nach dem Waschen erfolgte die Behandlung der Zellen mit 100 µl Cytoperm Plus für zehn Minuten auf Eis. Die Zellen wurden nochmals gewaschen und mit DNase (30 µg/Ansatz) für eine Stunde bei 37°C behandelt, um das sich in den Zellen befindliche BrdU frei zu setzen. Daraufhin wurden die Zellen mit einem anti-BrdU-FITC-Antikörper für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit 1% PFA fixiert und am FACS-Zytometer analysiert.

4.12 Herstellung von Gefrierschnitten

Ganglien wurden nach einer PBS-Perfusion der Mäuse entnommen und über Nacht in einer Periodat-Lysin-Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Am nächsten Tag wurden die TG als erstes in 20% Sucrose und anschließend in 10% Sucrose für je 20 Minuten gewaschen. Danach wurden sie in Optimal Cryostate Temperature (OCT) Compound (Tissue-Tek, Naperville, IL) eingebettet. 6 µm dicke Schnitte wurden an einem Kryostat 3050S (Leica, Wetzlar, Deutschland) bei –20°C geschnitten. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

4.13 Immunhistochemie

Die 6 µm dicken Schnitte wurden für zwei Minuten in -20°C kaltem Azeton fixiert und für etwa 30 Minuten an der Luft getrocknet. Schnitte die mit einem direkt-gekoppelten Primär-Antikörper gefärbt wurden, wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag eingedeckelt.

Schnitte die mit einem nicht-direkt-gekoppelten Primär-Antikörper gefärbt wurden, wurden zuerst mit Ziegenerum für 30 Minuten blockiert und anschließend mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einem markierten Sekundär-Antikörper inkubiert und sofort danach eingedeckelt.

Bei Doppelfärbungen wurden die Schnitte als erstes mit dem direkt-gekoppelten Primär-Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie für 30 Minuten mit Ziegenerum blockiert und anschließend ein weiteres Mal über Nacht mit dem zweiten nicht-gekoppelten Antikörper inkubiert. Am dritten Tag wurden die Schnitte dann für 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper inkubiert und daraufhin eingedeckelt.

4.14 Plaque Assay

Vero-Zellen wurden in einer 48-Loch-Platte ausplattiert. 3×10^4 Zellen pro Loch wurden eingesetzt und mit 200 µl DMEM aufgefüllt. Am nächsten Tag wurde geprüft, ob die Zellen konfluent waren. Jeden zweiten Tag während der TG-Kultur wurden Überstände aus jedem Loch entfernt und mit frischem Medium ersetzt. Die Überstände wurden bei -80°C gelagert. Die gesammelten Überstände wurden aufgetaut und bei 37°C für eine Stunde auf einen Zellrasen aus Vero-Zellen gegeben. Diese wurden dann mit einem Medium, das 0.5% Methylcellulose enthält, für zwei-drei Tage inkubiert. Eine Detektion des Virus von latent infizierten TG-Kulturen lässt auf eine HSV-1 Reaktivierung schließen.

4.15 Bestimmung der gH-Genkopien mittels quantitativer RT-PCR

Die Anzahl der HSV-1 Genomkopien in latent infizierten TG wurde mittels Real Time-PCR (RT-PCR)-Quantifizierung des Gens für HSV-1 Glykoproteins H (gH) bestimmt. Die TG wurden entnommen und mit Hilfe von Kollagenase in Einzel-Zell-

Suspensionen gebracht. Die DNA wurde dann mittels DNeasy-Säulen (Qiagen) nach der Beschreibung des Herstellers extrahiert und spektrophotometrisch analysiert. 12,5 ng (1 ng/ μ l) der DNA aus den TG-Suspensionen wurden mit 12,5 μ l TaqMan Universal PCR Master Mix (Roche, Branburg, NJ) vermischt und ein HSV-1 gH-spezifisches Primer-Probe-Set, das von ABI Assays-by-Design Service (Applied Biosystems, Foster City, CA) synthetisiert wurde, benutzt. Proben, Standards und Kontrollen (50 μ l/Loch) wurden in einer 96-Loch-Platte mit dem ABI Prism 7700 Sequenz-Detektor gemessen. ABI Primer Express v1.5a Software Default Settings wurde für die Kontrolle des Instruments und der Daten-Analyse verwendet. Der gH Forward Primer hatte die Sequenz (5'-GACCACCAGAAAACCCTCTTT-3'), der gH Reverse Primer hatte (5'-ACGCTCTCGTCTAGATCAAAGC-3') und die Probe hatte die Sequenz (5'-[FAM]TCCGGACCATTTTC[NFQ]-3'). Die Zahl der Genkopien von gH in jeder Probe wurde mittels der Standard-Kurve, die aufgrund bekannter Konzentrationen von gH-beinhaltenen Plasmidstandards generiert wurde, bestimmt. Die Zahl der Kopien an gH DNA pro TG konnte mittels der totalen DNA, die aus jedem TG extrahiert wurde, berechnet werden.

4.16 Positive Selektion von CD8⁺ T-Zellen mittels MACS-Beads

Die Milz einer mit HSV-1 infizierten Maus wurde isoliert und eine Einzel-Zell-Suspension hergestellt. Die Zahl der Zellen wurde mit einer Neubauerkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 80 μ l MACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. 15 μ l (pro 10^7 Zellen) CD8 MicroBeads wurden zugegeben und für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit MACS-Puffer gewaschen und das Pellet in 500 μ l MACS-Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert. Diese Zellen wurden dann auf das vorbereitete Säulchen gegeben. Das Säulchen wurde dreimal mit je 500 μ l MACS-Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Säulchen vom Magneten entfernt und mit 1 ml Puffer wurden die so isolierten CD8⁺ T-Zellen in einem 15-ml-Gefäß aufgefangen.

4.17 Adoptiver Transfer von Zellen

Nach Herstellen einer Einzelzellsuspension und anschließender Separation der CD8⁺ T-Zellen mittels spezifischer MACS-Beads CD8⁺ T-Zellen wurden die Zellen zweimal mit 1x HBSS gewaschen und auf die gewünschte Zellzahl (5×10^6 /Maus) in 200 μ l 1x HBSS eingestellt. Die Suspension wurde in die seitliche Schwanzvene der Maus injiziert.

4.18 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mit Hilfe der Neubauerzählkammer

Mit Hilfe der Neubauerzählkammer kann die Gesamtzellzahl ermittelt und gleichzeitig die Zellen auf ihre Vitalität hin überprüft werden. Trypanblau kann die Membran von lebenden Zellen nicht passieren, aber das Zytoplasma toter Zellen wird blau angefärbt. 20 μ l Zellsuspension wurde mit 80 μ l Trypanblau vermischt und mit 10 μ l dieser Suspension die Kammer gefüllt. Ausgezählt wurde am Mikroskop mit einer 100fachen Vergrößerung.

5. Ergebnisse

5.1 CD8⁺ T-Zell-Akkumulation im TG

Etwa sechs Tage nach der Infektion beginnt die Infiltration der CD8⁺ T-Zellen ins TG. Zu diesem Zeitpunkt ist eine HSV-1-Latenz schon in einigen Neuronen etabliert, in anderen findet noch virale Replikation statt. Die initiale Antwort der CD8⁺ T-Zellen findet in den submandilaren Lymphknoten, den drainierenden Lymphknoten (DLN) der Hornhaut, statt. Wenn die CD8⁺ T-Zellen im TG angekommen sind, expandieren sie und erreichen acht Tage nach der Infektion ihr höchstes Niveau (siehe Abbildung 15). Der Beginn der Kontraktionsphase geht mit der Beseitigung des Virus und der Etablierung der uniformen Latenz einher (zwischen acht und zehn Tagen nach der Infektion wird die virale Replikation beendet und replizierender Virus kann nicht mehr im TG festgestellt werden). Kontraktion findet bis zu 30 Tage nach der Infektion statt, bei welcher ca. 90% der CD8⁺ Effektor T-Zellen sterben. Anschließend bleibt eine stabile Population an Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen im latent infizierten TG lebenslang erhalten (CD8⁺ T-Zellen befinden sich in nächster Nähe zu den neuronalen Zellkörpern, siehe Abb. 16).

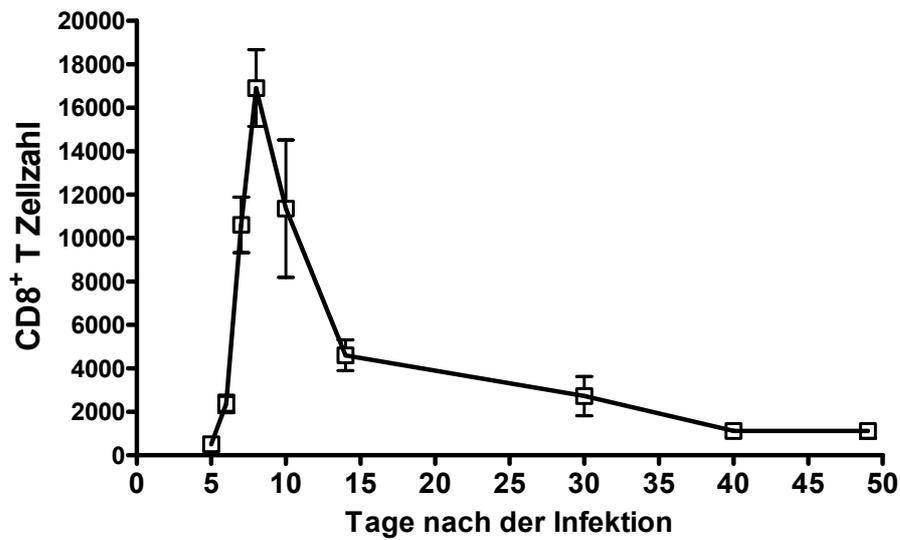


Abbildung 15: Akkumulation von CD8⁺ T-Zellen im TG während des zeitlichen Verlaufs einer HSV-1 Infektion

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion wurden TG entnommen, Einzel-Zell-Suspensionen hergestellt, mit einem anti-CD45- und anti-CD8-Antikörper zum Nachweis der CD8-Expression gefärbt und mittels FACS-Zytometer analysiert (Beschreibung siehe Material- und Methodenteil). Dargestellt ist die absolute CD8⁺ T-Zellzahl der gesamten Lymphozytenpopulation pro TG zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion. Die gezeigten Daten resultieren aus vier Experimenten (n=5 Mäuse/Experiment).

5.2 CD8⁺ T-Zellen umgeben Neurone sowohl im akuten als auch im latent infizierten TG

Nach Etablierung der Latenz bei einer HSV-1 Infektion verbleiben die CD8⁺ T-Zellen lebenslang im TG des Wirtes. Im Menschen umgeben die CD8⁺ T-Zellen selektiv die Neurone, welche latent mit HSV-1 infiziert sind. Wie in unserem Maus-Modell in Abbildung 16 zu sehen ist, umgeben CD8⁺ T-Zellen (rot) einige Neurone (grün), aber es befinden sich auch sehr viele CD8⁺ T-Zellen weit über das Gewebe verteilt (Abbildung 16C/D).

Acht Tage nach der Infektion befindet sich eine sehr hohe Anzahl an CD8⁺ T-Zellen im akut infizierten TG (Abbildung 16A). Im latent infizierten TG (41 Tage nach der Infektion) befinden sich weniger CD8⁺ T-Zellen im TG (Abbildung 16B). Es findet aber noch immer eine Polarisierung einiger CD8⁺ T-Zellen zu den Neuronen statt.

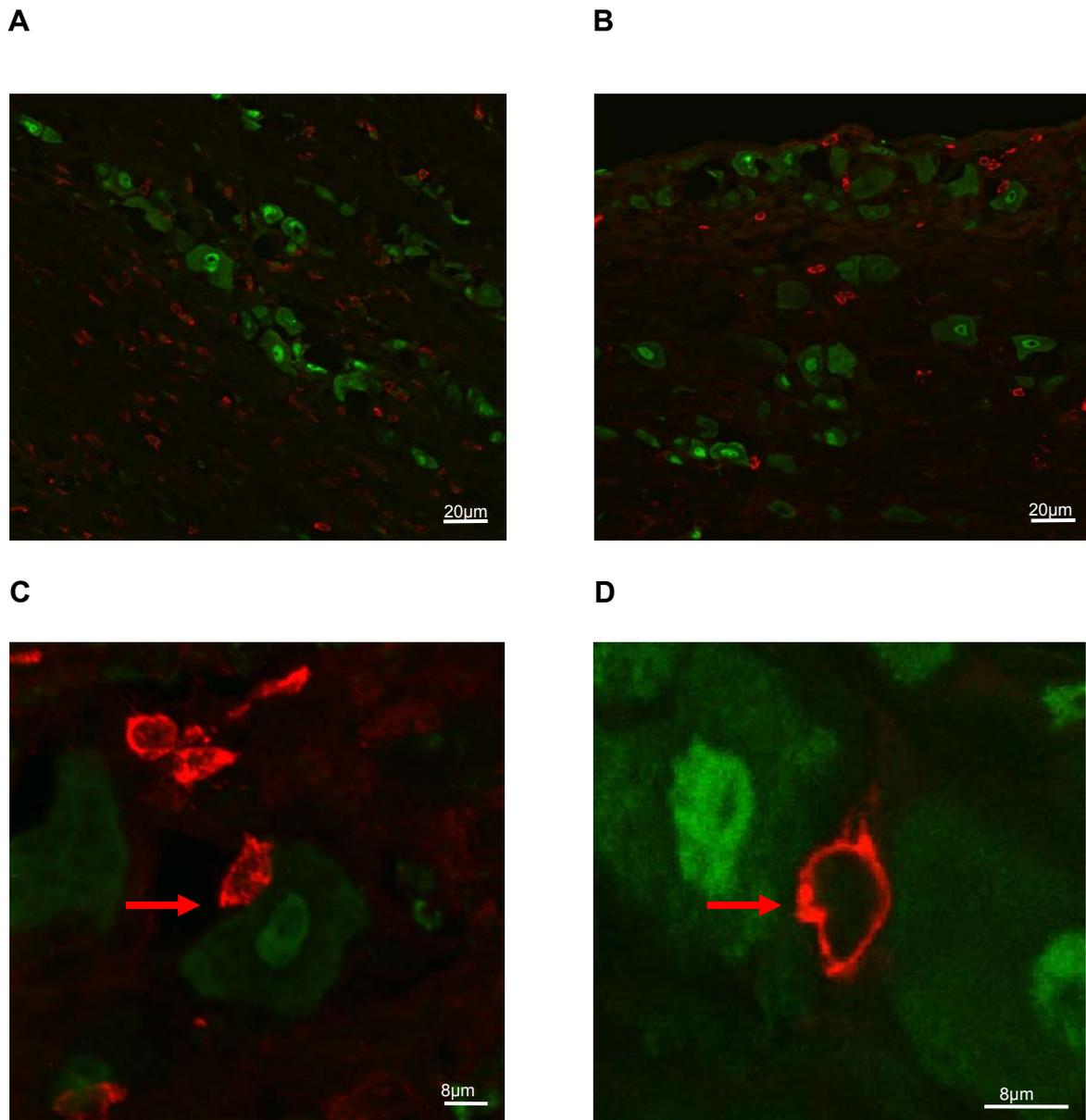


Abbildung 16: CD8⁺ T-Zellen umgeben einige Neurone sowohl im akut (acht Tage nach der Infektion) als auch latent (41 Tage nach der Infektion) infizierten TG

6-µm-dicke TG-Gefrierschnitte wurden mit anti-CD8-Antikörper (Alexa Fluor 568) und NeuN (Marker für Neurone) (Alexa Fluor 488) angefärbt und mittels konfokalem Mikroskop analysiert (Beschreibung siehe Material- und Methodenteil). CD8⁺ T-Zellen (rot) umgeben Neurone (grün) im akut als auch latent infizierten TG. (A) Akut infiziertes TG; Vergrößerung 40X. (B) Latent infiziertes TG; Vergrößerung 40X. (C), (D) Latent infiziertes TG. Darstellung einer Synapse zwischen der CD8⁺ T-Zelle und dem Neuron (roter Pfeil); Vergrößerung 60X.

5.3 HSV-spezifische CD8⁺ Effektor-T-Zellen im akut infizierten TG und Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen im latent infizierten TG exprimieren CXCR3

Um herauszufinden, ob eine Expression von CXCR3 auf CD8⁺ T-Zellen sowohl in akut als auch latent infizierten Mäusen stattfindet, wurden Mäuse acht bzw. 41 Tage mit HSV-1 (Stamm RE) infiziert. Anschließend wurde die Prozentzahl der CD8⁺ T-Zellen, die den Chemokinrezeptor CXCR3 exprimieren, in den unterschiedlichen Geweben mittels FACS-Zytometer ermittelt. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse aufgezeigt.

CXCR3-Expression von CD8⁺ T-Zellen in akut und latent infizierten Mäusen

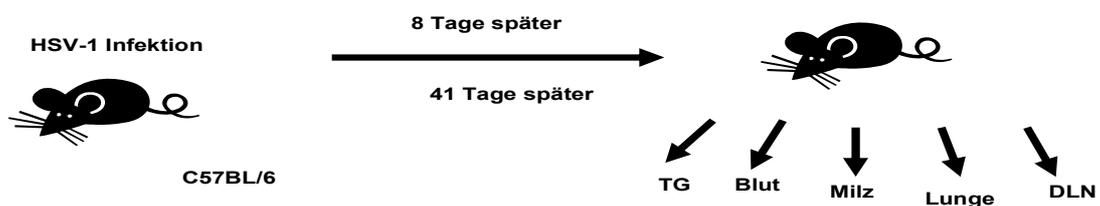


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Behandlungsschemas der Mäuse.

C57BL/6-Mäuse wurden mit HSV-1-RE okular infiziert. Acht und 41 Tage nach der Infektion wurden TG, Lunge, Milz, DLN und Blut entnommen und weiterverarbeitet.

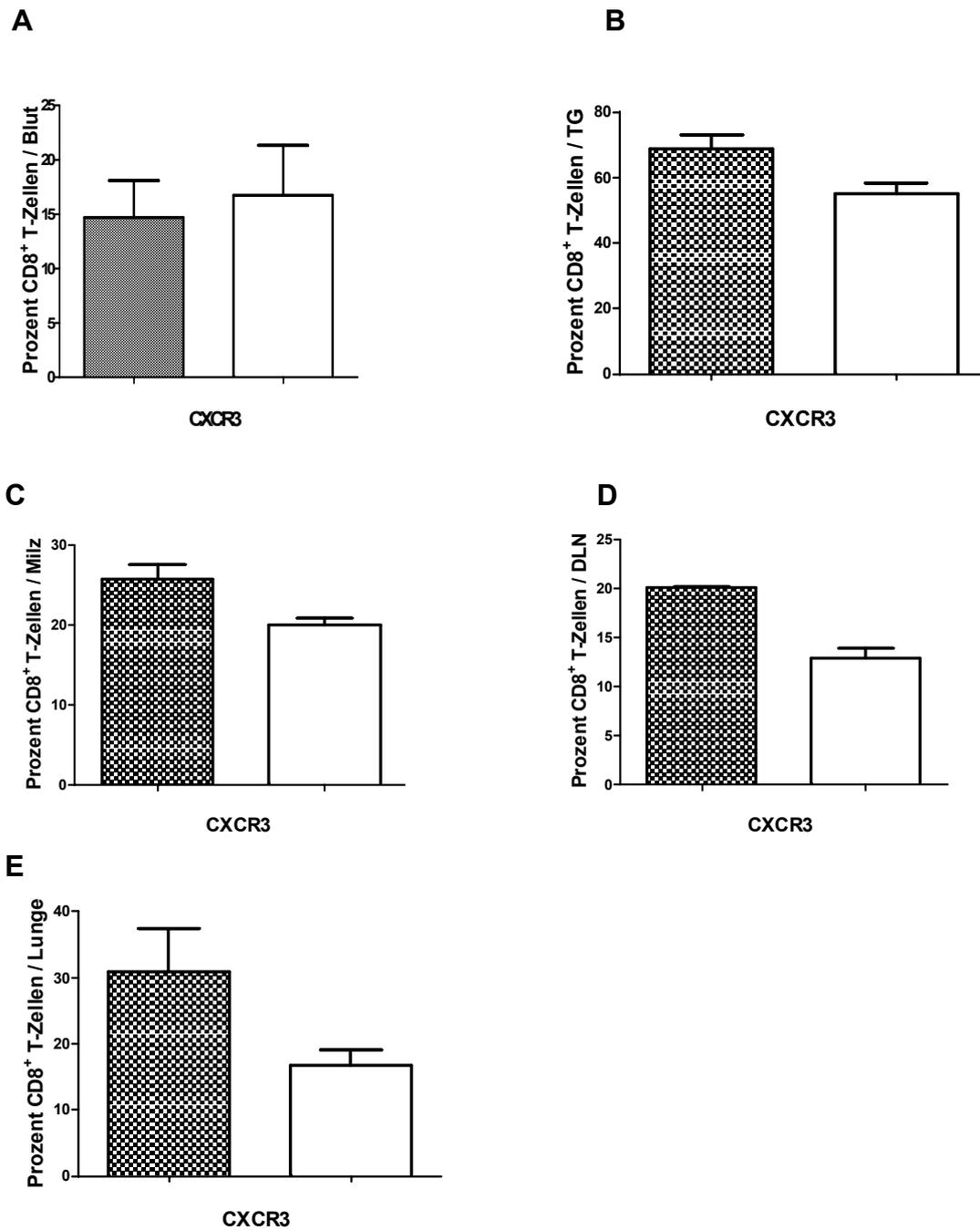


Abbildung 18: CXCR3-Expression von CD8⁺ T-Zellen im akut und latent infizierten TG

Acht (linker Balken) bzw. 41 (rechter Balken) Tage nach der Infektion wurde den C57BL/6-Mäusen (A) Blut, (B) TG, (C) Milz, (D) DLN und (E) Lunge entnommen, Einzel-Zell-Suspensionen wie im Material- und Methodenteil beschrieben, hergestellt, mit anti-CD45-, anti-CD8- und anti-CXCR3-Antikörpern gefärbt und mittels FACS-Zytometer analysiert. Dargestellt ist die CXCR3-Expression auf CD8⁺ T-Zellen in Prozent der Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen im Lymphozytengate. Die gezeigten Daten resultieren aus vier Experimenten (n=5 Mäuse/Experiment). Sowohl in der akuten als auch latenten Phase einer HSV-1 Infektion wird CXCR3 auf den CD8⁺ T-Zellen exprimiert.

5.4 CXCR3 ist an der Regulierung der HSV-spezifischen Effektor CD8⁺ T-Zellen ins TG während der akuten Phase einer Infektion beteiligt

Um die Rolle der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 während der initialen Infiltration der CD8⁺ T-Zellen ins HSV-1 infizierte Ganglion zu bestimmen, wurden Mäuse sechs Tage nach der Infektion systemisch mit TAK-779 behandelt.

TAK-779 ist ein Kleinstmolekül, nicht-peptidischer Verbindung. TAK-779 wurde als ein anti-HIV-1-Agenz entwickelt. Es inhibiert die Ligandenbindung an den Rezeptor. TAK-779 blockiert effizient die Migration von T-Zellen, die CXCR3 und CCR5 exprimieren, an Orte der Entzündung.

In Abbildung 19 ist ein vereinfachtes Schema der Behandlungsweise der Mäuse dargestellt. Zwei Tage nach der Behandlung wurde die absolute Zellzahl und die gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im individuellen Ganglion mittels FACS-Analyse ermittelt. In den Mäusen die mit TAK-779 behandelt wurden, war die Infiltration der CD8⁺ T-Zellen und der gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im HSV-1 infizierten TG signifikant reduziert, was auf eine funktionelle Rolle des Chemokinrezeptors CXCR3 auf die Migration von CD8⁺ T-Zellen ins akut infizierte TG hinweist. Ebenso wurde die Zahl der Genkopien des viralen Glykoproteins H bestimmt, um zu sehen ob die Verabreichung von TAK-779 einen Einfluss auf die Viruslast besitzt. Interessanterweise führte das selbe Behandlungsschema nicht zu einer erhöhten Viruslast. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Population der CD8⁺ T-Zellen, die in das HSV-1 infizierte Trigeminalganglion einwandert, immer noch ausreichend ist um die virale Reaktivierung zu unterdrücken. Das Ergebnis ist in Abbildung 20 dargestellt.

Blockierung der Chemokinrezeptoren während der akuten Phase der Infektion

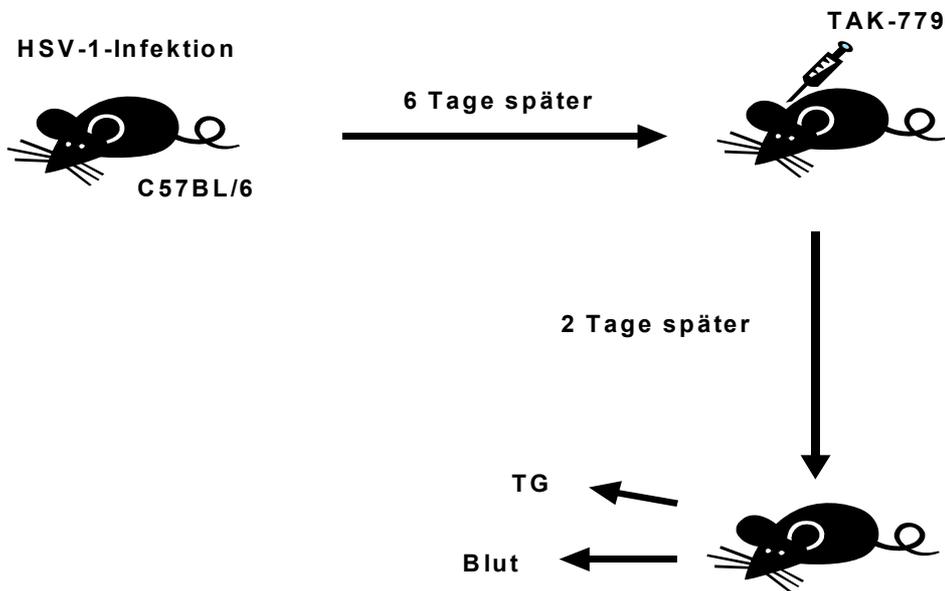
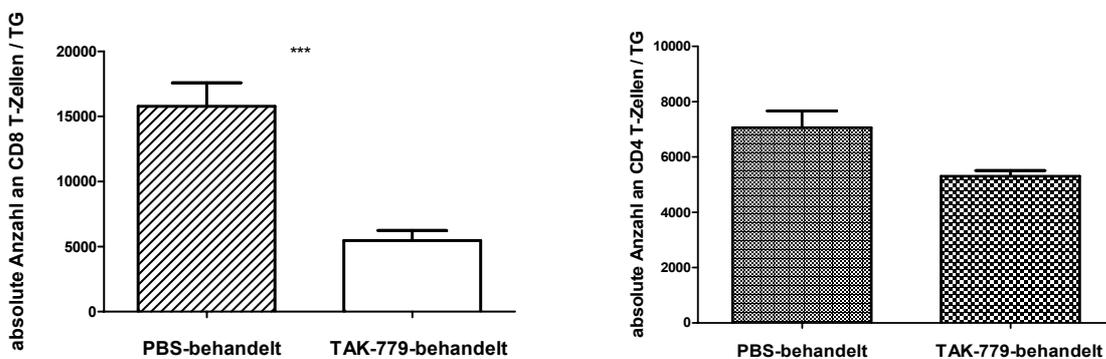


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Behandlungsschemas der Mäuse.

C57BL/6-Mäuse wurden mit HSV-1 okular infiziert. Sechs Tage nach der Infektion wurde den Mäusen 150µg TAK-779 subkutan verabreicht. Nach zwei Tagen wurden den Mäusen die TG und das Blut entnommen und weiter verarbeitet.

A



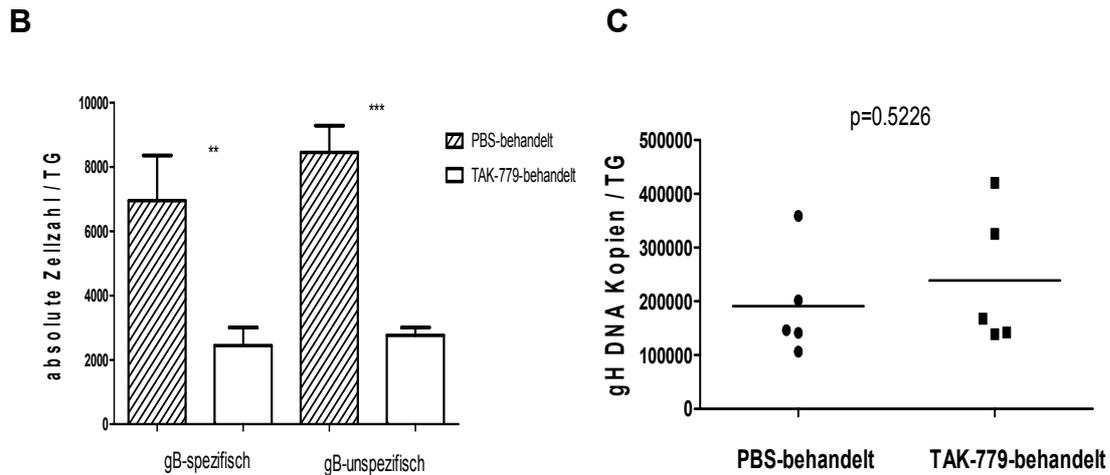


Abbildung 20: Effekt von TAK-779 auf die CD8⁺ T-Zell-Infiltration ins HSV-1 infizierte Ganglion

Sechs Tage nach der Infektion wurde C57BL/6-Mäusen entweder eine subkutane Injektion mit 150 µg/Maus TAK-779 oder PBS verabreicht. Zwei Tage danach wurde das TG entfernt, eine Einzel-Zell-Suspension hergestellt, mit CD45, CD8, CD4 und gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen Antikörpern, zum Nachweis der Expression von CD8, CD4 und Glykoprotein B, gefärbt und mittels FACS-Zytometer analysiert (A & B). Ebenso wurde die DNA aus dem TG extrahiert und eine quantitative RT-PCR durchgeführt, um die Zahl der Genkopien des viralen Glykoproteins H (gH) zu bestimmen (C). (A) Absolute Zellzahl von CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen pro TG. CD8: *** p=0.0003. (B) Absolute Zellzahl von gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen und unspezifischen CD8⁺ T-Zellen pro TG. gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifisch: ** p=0.0088, unspezifisch: *** p= < 0.0001. In (C) sind die HSV-1 gH-Genkopien pro TG dargestellt. Die quantitative RT-PCR wurde wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Student'scher T-Test zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die gezeigten Daten resultieren aus drei Experimenten (n=5 Mäuse/Experiment).

5.5 Blockierung der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 während der Latenz einer HSV-1 Infektion beeinträchtigt nicht den Aktivierungszustand der CD8⁺ T-Zell-Population im infizierten Ganglion

Um zu bestimmen ob die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 für die Aufrechterhaltung der CD8⁺ T-Zell-Population im latent HSV-1 infizierten TG wichtig sind, wurden C57BL/6-Mäuse mit TAK-779 30, 32 und 34 Tage nach der Infektion behandelt. 36 Tage nach der Infektion wurde die absolute Zellzahl der CD8⁺ T-Zellen und der gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im TG mittels FACS-Zytometer ermittelt. Es konnte kein Unterschied in der Zellzahl konnte zwischen den TAK-779 und PBS-behandelten Mäusen festgestellt werden (Abbildung 22A). Dies deutet darauf hin, dass die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 nicht für die Aufrechterhaltung der CD8⁺ T-Zell-Population im TG während einer HSV-1 Infektion benötigt werden.

Um weiterhin zu zeigen ob die Chemokine eventuell für die Assoziation der CD8⁺ T-Zellen mit den latent infizierten Neuronen verantwortlich sind, wurden latent infizierte C57BL/6-Mäuse 30, 32 und 34 Tage nach der Infektion mit TAK-779 behandelt. Das TG wurde zwei Tage später entfernt und Gefrierschnitte hergestellt. Diese wurden mit CD8- und NeuN-Antikörpern gefärbt (Abbildung 22B). Es konnte gezeigt werden, dass sich die CD8⁺ T-Zellen in der Nähe der latent infizierten Neuronen befinden und durch den CXCR3-Chemokinrezeptor mit dem Neuron in Kontakt treten. In den unbehandelten TG wurden die CD8⁺ T-Zellen in der Nähe der Neuronen beobachtet. Bei den TAK-779 behandelten TG waren CD8⁺ T-Zellen vorhanden, aber im Gegensatz zu den unbehandelten waren sie über das ganze Gewebe verstreut. In Abbildung 22 sind die Ergebnisse dargestellt.

Blockierung der Chemokinrezeptoren während der latenten Phase einer Infektion

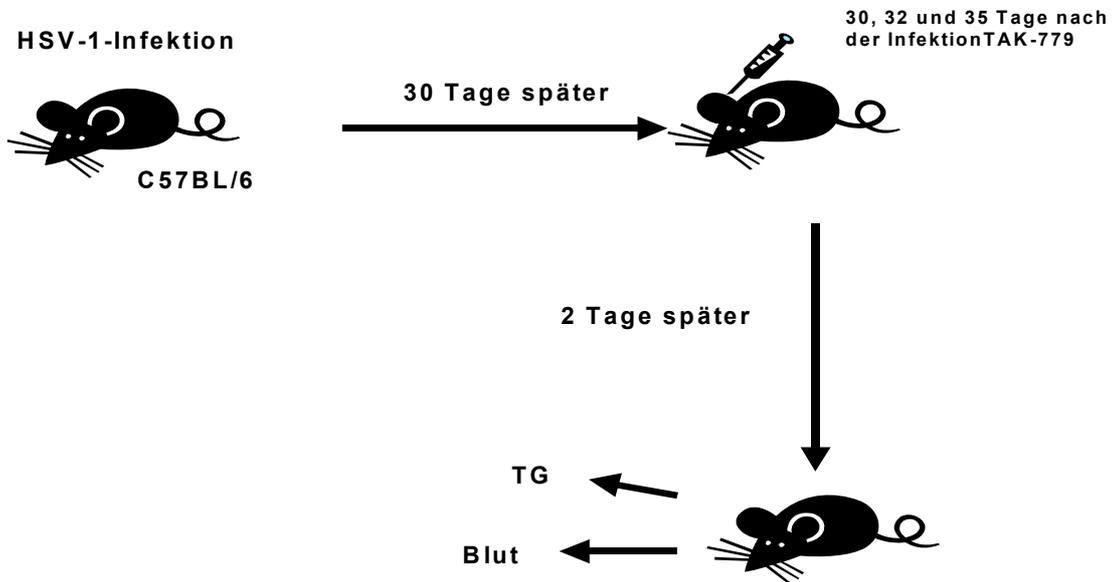
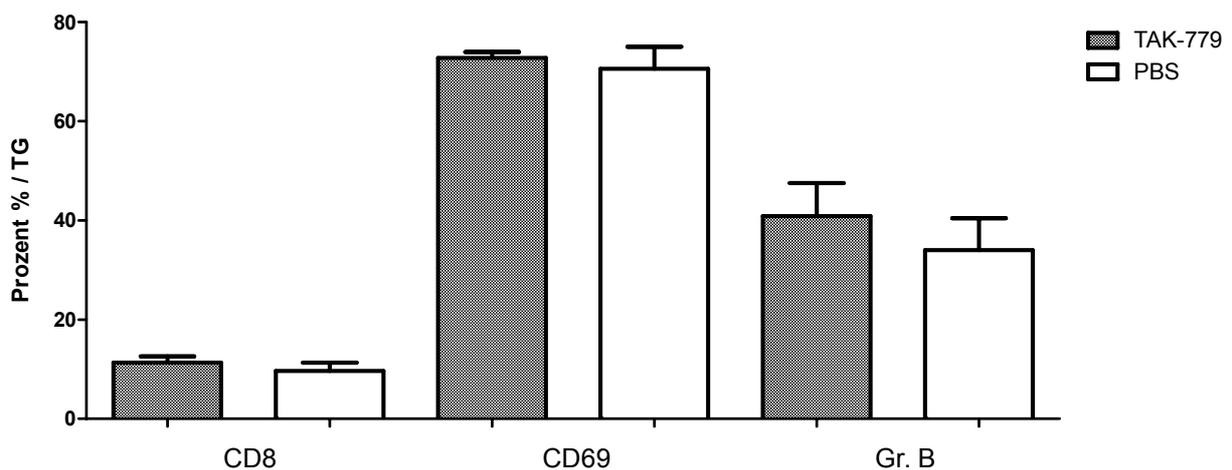


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Behandlungsschemas der Mäuse.

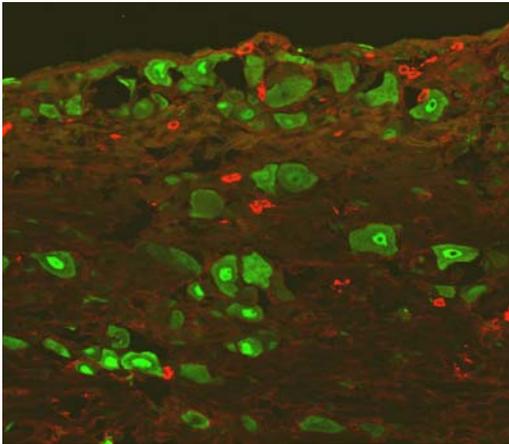
C57BL/6-Mäuse wurden mit HSV-1 (10^5 PFU/Auge) infiziert. 30, 32 und 34 Tage nach der Infektion wurde den Mäusen TAK-779 (150 μ g/Maus) subkutan verabreicht. Zwei Tage später wurden die TG und das Blut entnommen.

A



B

Latent infiziert, PBS behandelt



Latent infiziert, TAK-779 behandelt

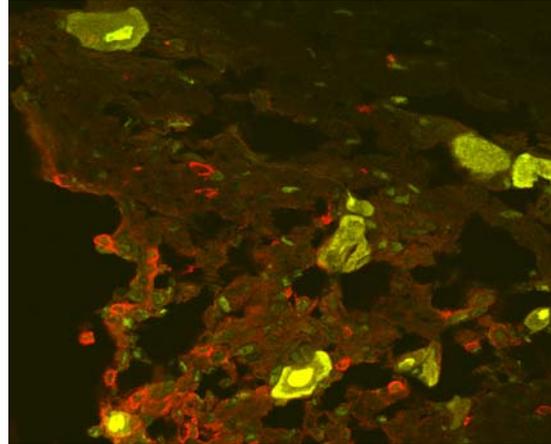


Abbildung 22: Effekt der TAK-779 Behandlung auf den Aktivierungszustand und die Assoziation der CD8⁺ T-Zellen mit den latent infizierten Neuronen während einer HSV-1 Latenz

Latent infizierte Mäuse wurden 30, 32 und 34 Tage nach der Infektion entweder mit TAK-779 oder PBS behandelt. (A) Das TG wurde 36 Tage nach der Infektion entfernt, Einzel-Zell-Suspensionen wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben, hergestellt, mit Antikörpern die gegen CD45, CD8, CD69 und Granzym B (Aktivierungsmarker) gerichtet sind, gefärbt und mittels FACS-Zytometer analysiert. Die gezeigten Daten resultieren aus drei Experimenten (n=5 Mäuse/Gruppe/Experiment). Kein Unterschied zwischen den TAK-779- und PBS-behandelten Mäusen konnte festgestellt werden. (B) Latent infizierte Mäuse wurden 30, 32 und 34 Tage nach der Infektion entweder mit TAK-779 oder PBS behandelt. Das TG wurde 36 Tage nach der Infektion entfernt. Gefrierschnitte wurden hergestellt (Beschreibung siehe Material- und Methodenteil), mit anti-CD8 (rot) und NeuN-Antikörpern (grün) gefärbt und mittels konfokalem Mikroskop ausgewertet (Vergrößerung 20X).

5.6 Blockierung der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 während einer HSV-1 Latenz beeinflusst die Viruslast im infizierten TG nicht

Um zu bestimmen ob die Blockierung von CXCR3 und CCR5 auf den CD8⁺ T-Zellen die virale Reaktivierung während einer HSV-1 Latenz beeinflussen kann, wurden C57BL/6-Mäuse mit TAK-779 30, 32 und 34 Tage nach der Infektion behandelt. 36 Tage nach der Infektion wurde die Viruslast der individuellen Ganglien durch quantitative RT-PCR erfasst. Wie in Abbildung 23A zu sehen ist, enthielten die TG von TAK-779 behandelten Mäusen die gleiche Anzahl an gH-Genkopien wie die mit

PBS behandelten. Auch der Effekt von TAK-779 auf die Frequenz einer HSV-1-Reaktivierung innerhalb einer *ex vivo* TG-Kultur, die endogene CD8⁺ T-Zellen enthielt, wurde bestimmt. Übereinstimmend mit der Kopiezahl im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung einer *ex vivo*-Kultur von latent infizierten TG mit unterschiedlichen Dosen an TAK-779 nicht die Frequenz der HSV-1 Reaktivierung ändert (Abbildung 23B). Abschließend kann gesagt werden, dass die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 auf den CD8⁺ T-Zellen nicht für die Beibehaltung von HSV-1 im Latenzzustand benötigt werden.

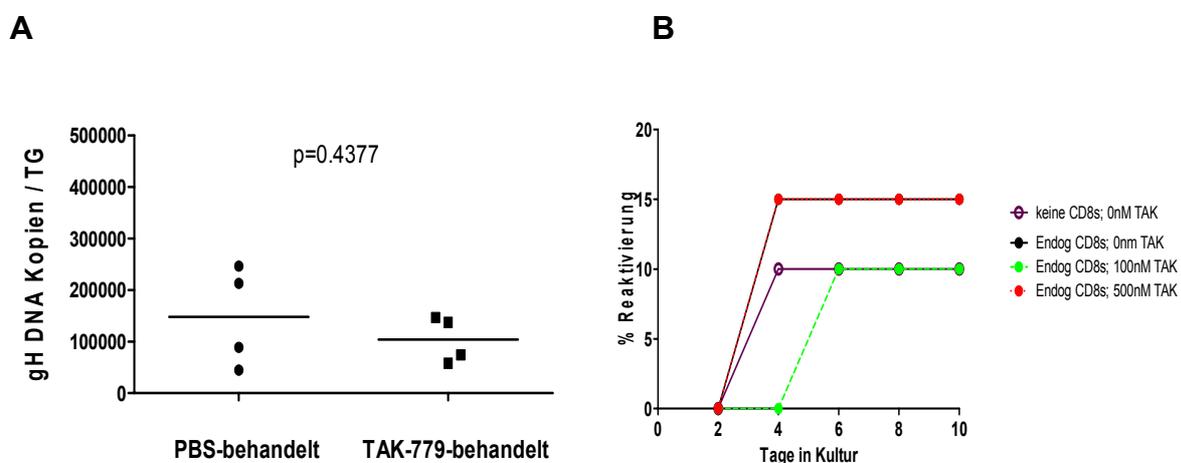


Abbildung 23: Effekt der TAK-779-Behandlung auf die virale Reaktivierung während einer HSV-1 Latenz

(A) Latent infizierte C57BL/6-Mäuse wurden 30, 32 und 34 Tage nach der Infektion mit TAK-779 oder PBS behandelt. 36 Tage nach der Infektion wurde das TG entfernt, DNA isoliert und die Zahl der Genkopien von gH pro TG durch quantitative RT-PCR bestimmt. Student'scher t-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. (B) TG von latent infizierten Mäusen wurden in Einzel-Zell-Suspension gebracht und in 1/5 TG-Äquivalente pro Loch in Medium allein oder Medium mit entweder 100 nM oder 500 nM TAK-779 gebracht. Reaktivierung aus der Latenz wurde dadurch bestimmt, in dem man die Kulturüberstände auf lebenden Virus durch Plaque Assays alle zwei Tage testete. Überlebens-Kurven-Analysen (log-rank-Test) zeigten keinen statistischen Unterschied zwischen den Gruppen.

5.7 HSV-1 spezifische CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut wandern nicht in das HSV-infizierte Ganglion während der viralen Latenz ein

Um zu beweisen, dass die Aufrechterhaltung der HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Population im latent infizierten TG keine Infiltration an CD8⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut benötigt, wurden HSV-spezifische CD8⁺ T-Zellen aus der Milz einer gBT I.1-Maus (CD45.2), die mindestens 30 Tage infiziert war, durch adoptiven Transfer in latent infizierte CD45.1-Mäuse injiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Transfer wurde die Zahl der Spender-Zellen (CD45.2) in verschiedenen Geweben der Empfänger (CD45.1) quantifiziert. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, konnten gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische CD8⁺ T-Zellen des Spenders in einer hohen Konzentration im Blut und den peripheren lymphatischen Organen des Empfängertieres nachgewiesen werden. Jedoch konnten keine dieser gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen Spender-Zellen im TG bis 8,5 Wochen nach dem Transfer detektiert werden.

Da sich die gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen nicht im latent infizierten TG (bis zu 8,5 Wochen nach adoptiven Transfer), aber in den lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben des Empfängers nachweisen ließen, ist dies ein Hinweis dafür, dass kein Austausch von Zellen zwischen dem TG und dem peripheren Blut stattfindet.

Migration von HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen des Spenders in das latent infizierte TG

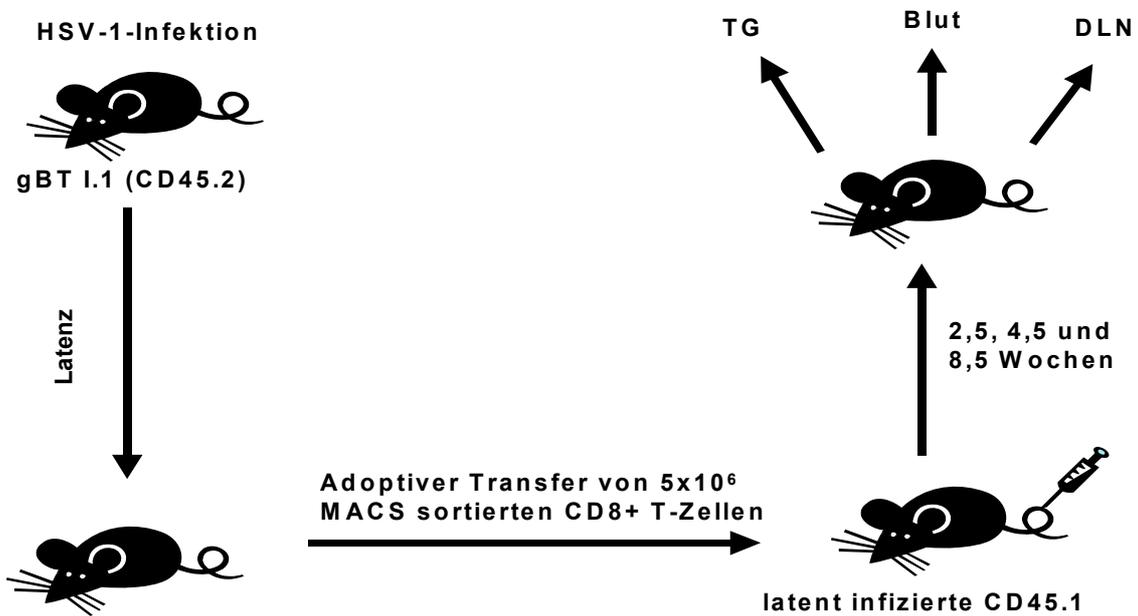
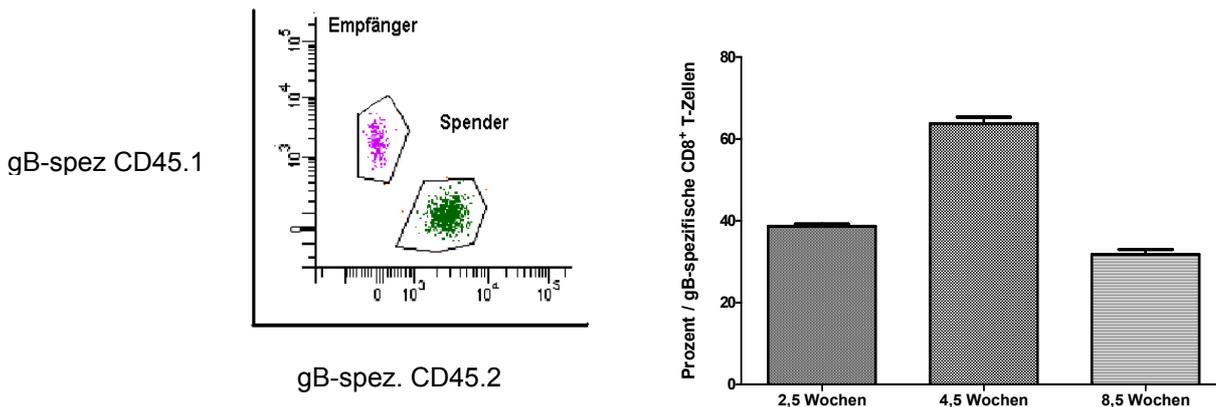


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Behandlungsschemas der Mäuse.

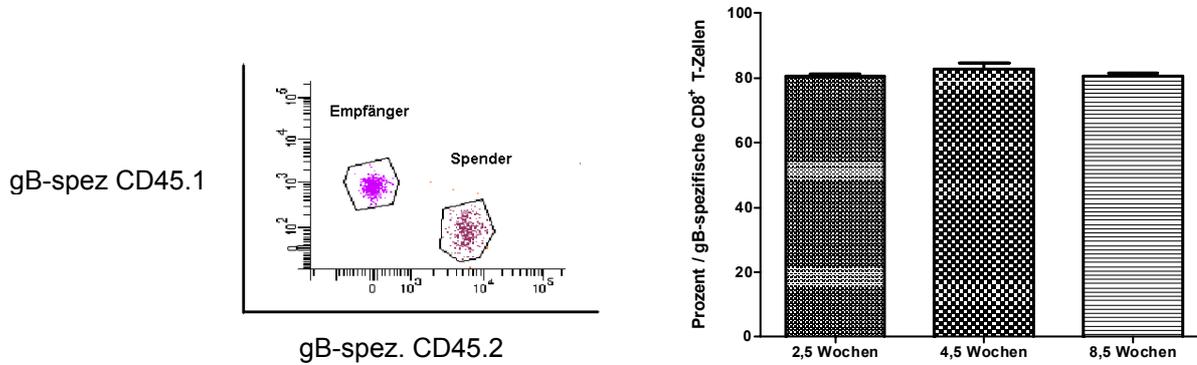
gBT I.1-Mäuse (CD45.2) wurden mit HSV-1 okular infiziert. 30 Tage später wurde die Milz dieser Mäuse entnommen. Mit Hilfe von MACS-Beads wurde eine positive Selektion auf CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Diese wurden dann durch adoptiven Transfer in ebenso latent infizierte CD45.1-Mäuse injiziert. 2,5, 4,5 und 8,5 Wochen später wurden die TG, die DLN und das Blut entnommen.

A

Blut



B
DLN



C
TG

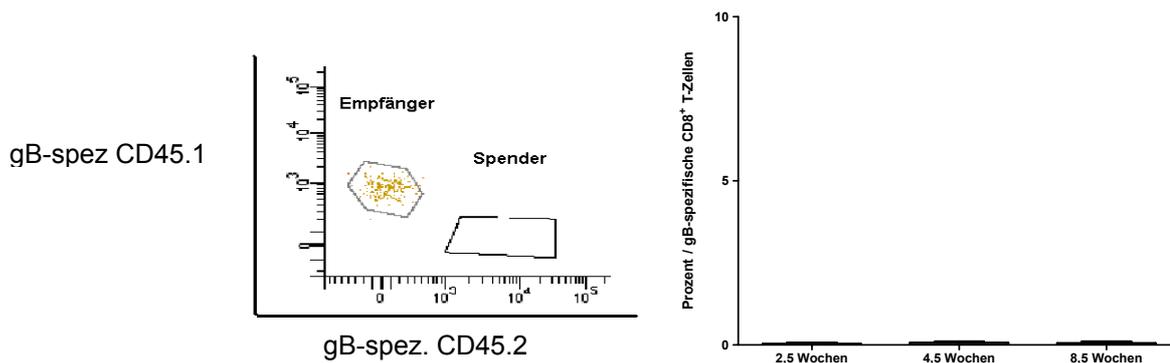


Abbildung 25: gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische CD8⁺ T-Zellen des Spenders wurden nach der initialen Kolonisierung aus dem HSV-1 infizierten TG ausgeschlossen

CD8⁺ T-Zellen aus der Milz einer latent infizierten gBT I.1-Maus (CD45.2) wurden durch adoptiven Transfer in latent infizierte Empfänger (CD45.1) injiziert. Zu angegebenen Zeitpunkten nach dem Transfer wurden die verschiedenen Gewebe entfernt, Einzel-Zell-Suspensionen hergestellt, mit anti-CD8, CD45.1, CD45.2 und gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎-Tetramer (H-2K^b) gefärbt und mittels FACS-Zytometer analysiert (eingegrenzt auf CD8-CD45.1 und CD8-CD45.2, die gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-Tetramer positiv sind). Daten wurden als Standardfehler des Median (SEM) der Prozente an gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen Zellen angegeben. Die gezeigten Daten resultieren aus drei Experimenten (n=5 Mäuse/Experiment). Rechte Abb.: Prozentangaben für das (A) Blut, (B) DLN und (C) TG sind dargestellt. Linke Abb.: Dot plots (4,5 Wochen). Zu beiden Zeitpunkten konnten gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische Zellen nachgewiesen werden. gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische Zellen des Spenders im Blut und DLN konnten zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten im TG keine gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen Zellen des Spender detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass keine Infiltration von Zellen in das TG erfolgt.

5.8 HSV-spezifische CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut werden aus dem latent HSV-1 infizierten TG nach einer Unterbrechung des endogenen CD8⁺ T-Zell-Pool ausgeschlossen

Um zu untersuchen ob gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische CD8⁺ T-Zellen des Spenders in das mit HSV-1 latent infizierte TG nach einer Störung des Gedächtnis-Pools einwandern können, wurde latent infizierten Empfängern (CD45.1) drei Tage lang Corticosteron im Trinkwasser verabreicht. Corticosteron ist ein Steroidhormon. Es wird im Kortex der Nebenniere produziert. Die Behandlung der Mäuse mit Corticosteron führte zu einer annähernd 80%-igen Abnahme der Größe der CD8⁺ T-Zell-Population im TG. Jedoch wurde ein normales Niveau der Population nach sechs-acht Tagen nach Absetzung des Corticosterons wieder hergestellt. Interessanterweise behält die wiederhergestellte Population das charakteristische 1:1-Verhältnis von gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen zu nicht-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bei. Dies weist entweder auf eine extrem regulierte Infiltration aus dem peripheren Blut oder der Expansion von überlebenden CD8⁺ T-Zellen innerhalb des TG hin.

Nach Verabreichung von frischem Wasser für weitere drei Tage erhielten die Mäuse durch adoptiven Transfer gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische CD8⁺ T-Zellen, die aus der Milz von latent infizierten gBT I.1-Mäusen (CD45.2) gewonnen wurden. Zwei Wochen nach dem Transfer wurde das TG entfernt, Einzel-Zell-Suspensionen hergestellt und auf gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische CD8⁺ T-Zellen der Empfänger und Spender untersucht. Trotz der Repopulation der CD8⁺ T-Zellen nach der Corticosteron-Behandlung konnten keine gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen Zellen des Spenders im Empfänger nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit Carbone's Ergebnissen zeigen diese Resultate ebenso, dass die CD8⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut nicht in das latent infizierte TG einwandern. In Abbildung 26 wird das Behandlungsschema der Mäuse dargestellt. In Abbildung 27 das Ergebnis des Versuchs.

Migration von HSV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen des Spenders in das latent infizierte TG nach einer Störung des Gedächtnis-Pools durch Corticosteron

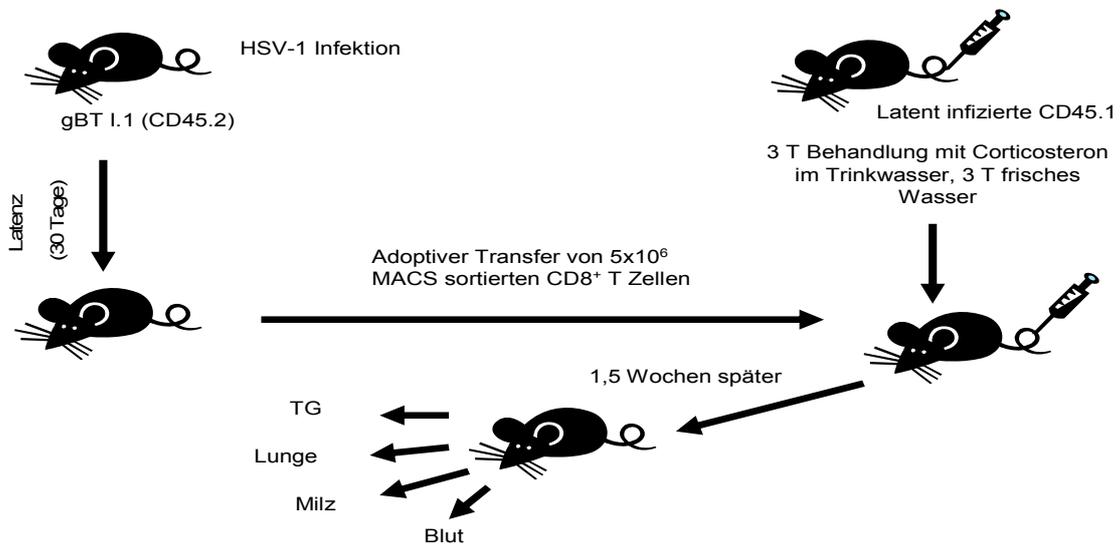


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Behandlungsschemas der Mäuse.

gBT I.1-Mäuse (CD45.2) wurden mit HSV-1 okular infiziert. 30 Tage später wurde die Milz dieser Mäuse entnommen. Mit Hilfe von MACS-Beads wurde eine positive Selektion auf CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Diese wurden dann durch adoptiven Transfer in ebenso latent infizierte CD45.1-Mäuse injiziert. Diese Mäuse erhielten vor dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen drei Tage lang Corticosteron im Trinkwasser. Anschließend wurde ihnen drei Tage lang frisches Wasser verabreicht. 1,5 Wochen später wurde den CD45.1-Mäusen die TG, die Milz, die Lungen und das Blut entnommen.

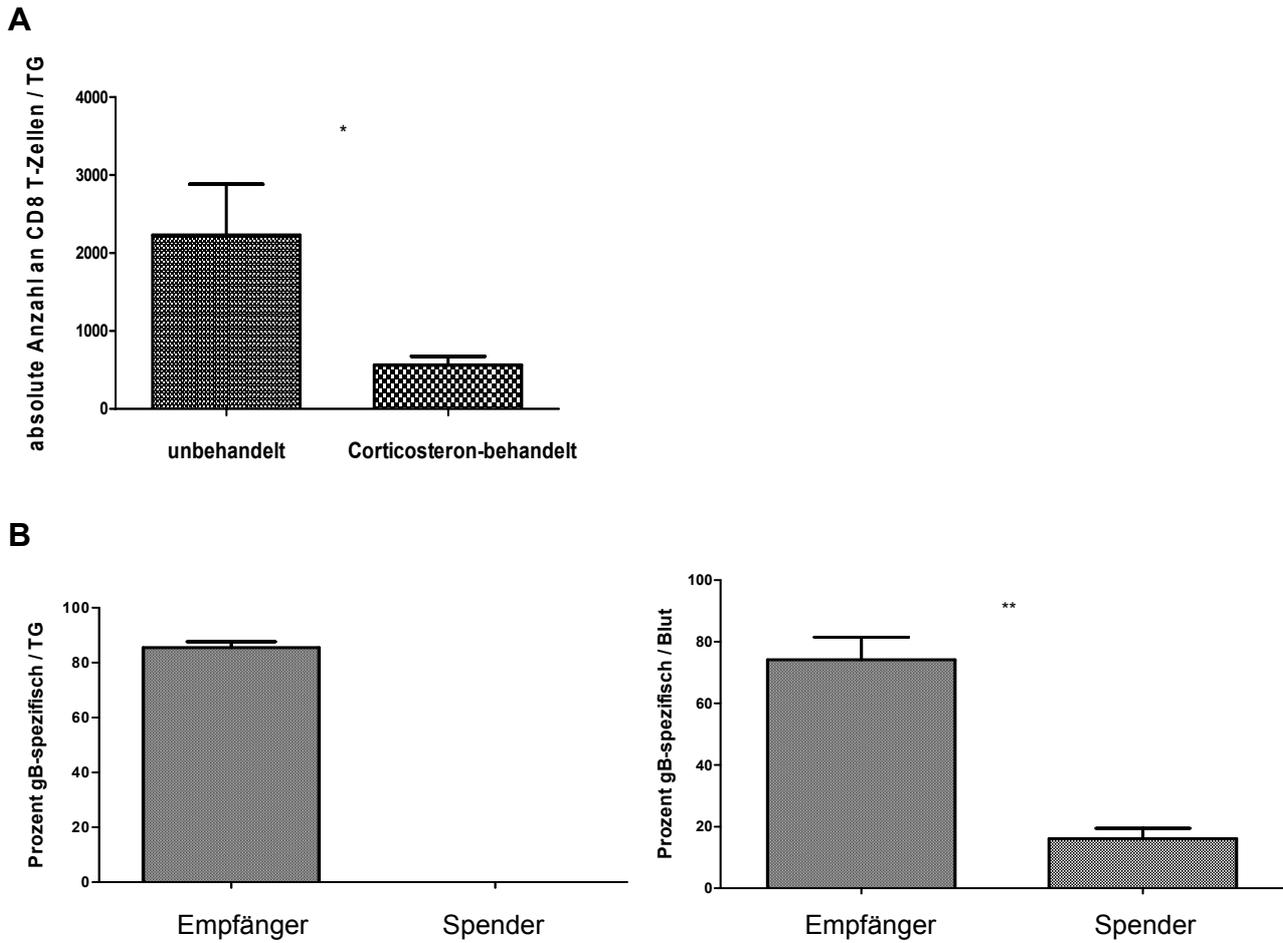


Abbildung 27: Zirkulierende HSV-spezifische CD8⁺ T-Zellen werden aus dem latent infizierten TG sogar nach einer Störung der endogenen CD8⁺ T-Zell-Population ausgeschlossen

(A) Die absolute Zellzahl an CD8⁺ T-Zellen wurde aus dem TG von latent infizierten Mäusen, die mit oder ohne Corticosteron im Trinkwasser (drei Tage) behandelt wurden, bestimmt. (B) Latent infizierte Empfänger-Mäuse (CD45.1) erhielten drei Tage lang Corticosteron im Trinkwasser, gefolgt von drei Tagen frischem Wasser. HSV-spezifische CD8⁺ T-Zellen des Spenders wurden durch adoptiven Transfer in Empfänger-Mäuse injiziert. Zwei Wochen nach dem Transfer wurden die unterschiedlichen Gewebe entnommen, in Einzel-Zell-Suspensionen gebracht und mittels FACS-Zytometer auf gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische CD8⁺ T-Zellen der Empfänger (linker Balken) und Spender (rechter Balken) untersucht. Linker Graph stellt die Prozentzahl von gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische CD8⁺ T-Zellen im TG dar, rechter Graph die Prozentzahl von gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische CD8⁺ T-Zellen im Blut. Die gezeigten Daten resultieren aus vier Experimenten (n=5 Mäuse/Experiment).

Um zu bestimmen, ob die Wiederherstellung der CD8⁺ T-Zell-Population nach der Störung durch Corticosteron aus der Proliferation an überlebenden Zellen im TG erfolgt, wurden gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische CD8⁺ T-Zellen des Spenders, die aus der Milz einer latent infizierten C67BL/6-Maus gewonnen und mit DiD gefärbt wurden, mittels adoptiven Transfer in latent infizierte Empfänger (C57BL/6) transferiert.

Zwei Wochen nach dem adoptiven Transfer erhielten die Mäuse vier Stunden vor der Entnahme der Organe BrdU, um die zelluläre Proliferation zu bestimmen. Verschiedene Gewebe der Empfänger wurden entfernt, in Einzel-Zell-Suspensionen gebracht und auf BrdU positive gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische CD8⁺ T-Zellen der Spender und Empfänger quantifiziert. Das Behandlungsschema ist in Abbildung 28 dargestellt.

Das Auffinden von gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im TG in der Abwesenheit von Spender-Zellen und einer hohen Proliferationsrate an gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im TG (BrdU-Einbau) würde mit unserer Hypothese übereinstimmen, dass sogar nach einer dramatischen Abnahme des Gedächtnis-Pools innerhalb des TG kein Austausch von T-Zellen mit dem peripheren Blut stattfindet (Abbildung 29).

Wiederherstellung der CD8⁺ T-Zell-Population nach der Störung durch Corticosteron erfolgt aus der Proliferation an überlebenden Zellen im TG

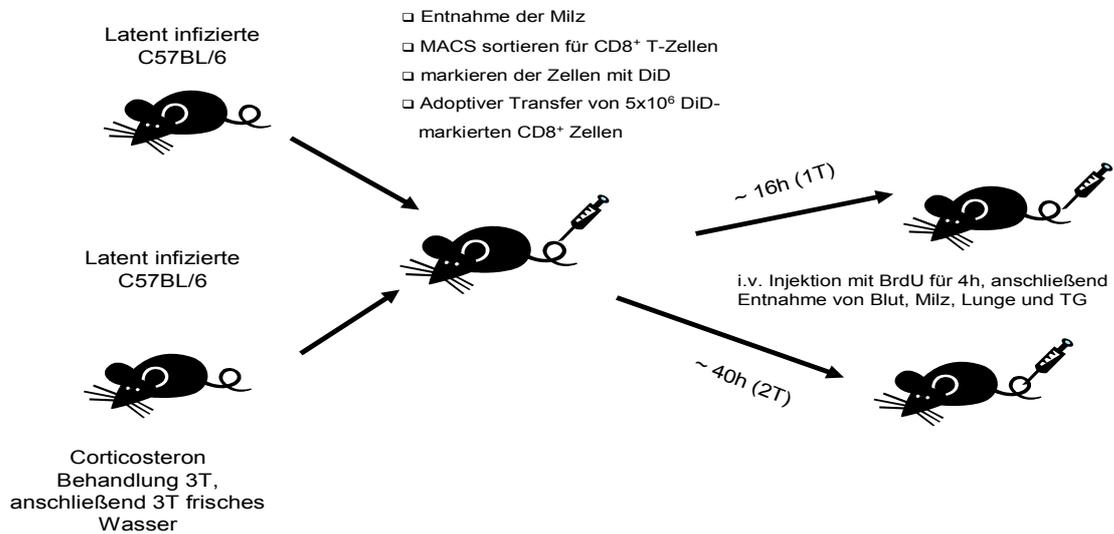
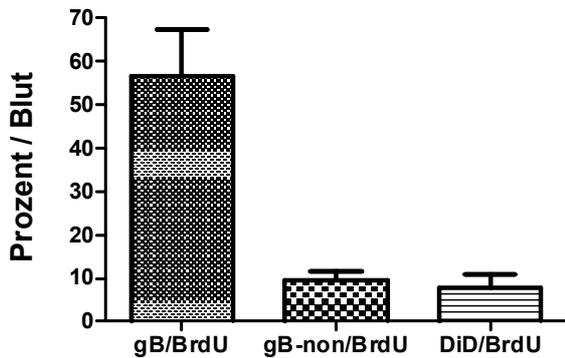


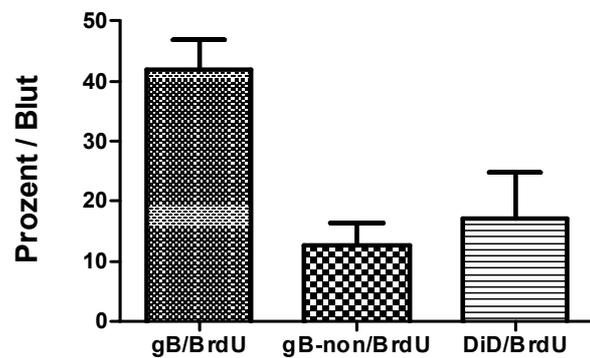
Abbildung 28: Schematische Darstellung des Behandlungsschemas der Mäuse.

C57BL/6-Mäuse wurden mit HSV-1 latent infiziert. 30 Tage später wurde die Milz dieser Mäuse entnommen. Mit Hilfe von MACS-Beads wurde eine positive Selektion auf CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Diese wurden nach der Selektion mit DiD markiert und anschließend durch adoptiven Transfer in ebenso latent infizierte C57BL/6-Mäuse injiziert. Diese Mäuse erhielten vor dem Transfer der CD8⁺ T-Zellen drei Tage lang Corticosteron im Trinkwasser. Anschließend wurde ihnen drei Tage lang frisches Wasser verabreicht. Sechzehn Stunden bzw. 40 Stunden nach dem Transfer erhielten die Mäuse eine Injektion mit BrdU. Vier Stunden nach Verabreichung wurde ihnen die TG, die Milz, die Lungen und das Blut entnommen.

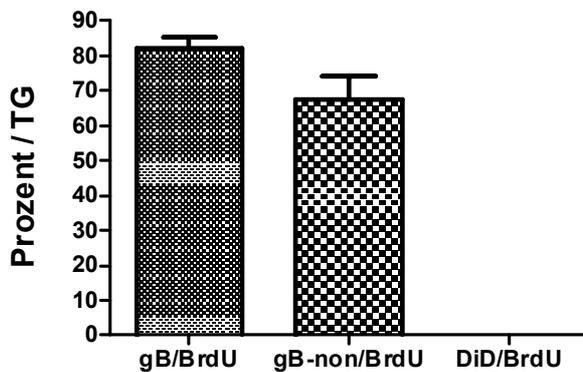
Ein Tag nach dem Transfer



Zwei Tage nach dem Transfer



Ein Tag nach dem Transfer



Zwei Tage nach dem Transfer

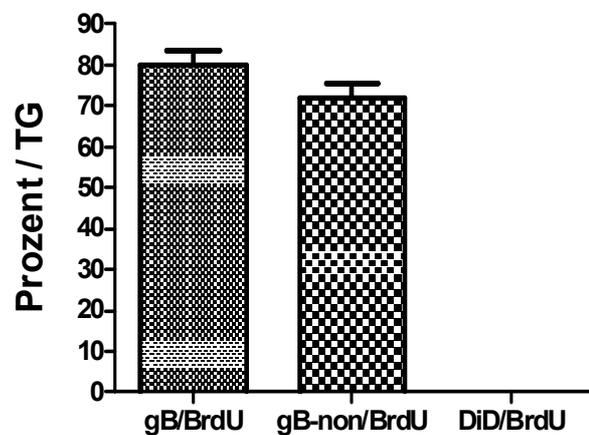


Abbildung 29: CD8⁺ T-Zellen im TG Corticosteron-behandelter Mäuse proliferieren, um so die CD8⁺ T-Zell-Population zu erhalten

Mit HSV-1 latent infizierte Empfängermäuse (CD45.1) erhielten drei Tage lang Corticosteron im Trinkwasser, gefolgt von drei Tagen frischen Wassers. gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifische CD8⁺ T-Zellen des Spenders wurden mit DiD markiert und durch adoptiven Transfer in latent infizierte Empfänger transferiert. Ein oder zwei Tage nach dem Transfer bekamen die Mäuse i.v. eine Injektion mit BrdU. Vier Stunden nach Verabreichung von BrdU wurden die unterschiedlichen Gewebe entnommen, Einzel-Zell-Suspensionen hergestellt und mit den Antikörpern CD8, gB₍₅₉₈₋₅₀₅₎-Tetramer (H-2K^b) und anti-BrdU gefärbt und mittels FACS-Zytometer analysiert. Dargestellt ist die Prozentzahl an gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, die BrdU positiv sind (linker Balken), sowie die Prozentzahl an gB-unspezifischen CD8⁺ T-Zellen, die BrdU positiv sind (mittlerer Balken). CD8⁺ T-Zellen, die BrdU und DiD positiv sind, sind im rechten Balken dargestellt. Die gezeigten Daten resultieren aus drei Experimenten (n=5 Mäuse/Experiment).

5.9 CD4⁺ Helfer T-Zellen sind nicht für die Repopularisierung der CD8⁺ T-Zellen im Corticosteron-behandelten TG verantwortlich

Ein kürzlich erschienener Bericht von Carbone *et al.* demonstrierte, dass CD4⁺ T-Zellen bei der Repopulation von CD8⁺ T-Zellen im HSV-1 infizierten TG notwendig sind. Um die Notwendigkeit der CD4⁺ T-Zellen bei der Wiederherstellung der CD8⁺ T-Zell-Population nach einer Corticosteron-Behandlung zu bestimmen, wurden die CD4⁺ T-Zellen der Mäuse durch eine Injektion mit einem anti-CD4-Antikörper vor und während der Drei-Tages-Behandlung mit Corticosteron depletiert. Die CD4-depletierten Mäuse erhielten drei Tage frisches Wasser und anschließend wurde die absolute Zellzahl an CD8⁺ T-Zellen und gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Das Behandlungsschema der Mäuse ist in Abbildung 30 dargestellt. In unserem Modell hatte die Depletion der CD4⁺ T-Zellen keinen Einfluss auf die Wiederherstellung der CD8⁺ T-Zell-Population nach einer Behandlung mit Corticosteron. Nach Verabreichung des CD4-Antikörpers war die Prozentzahl der gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen Zellen von behandelten und unbehandelten Mäusen nahezu identisch. Auch in der Milz und der Lunge konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (siehe Abbildung 31).

Depletion der CD4⁺ T-Zellen beeinflusst die Wiederherstellung der CD8⁺ T-Zell-Population nicht

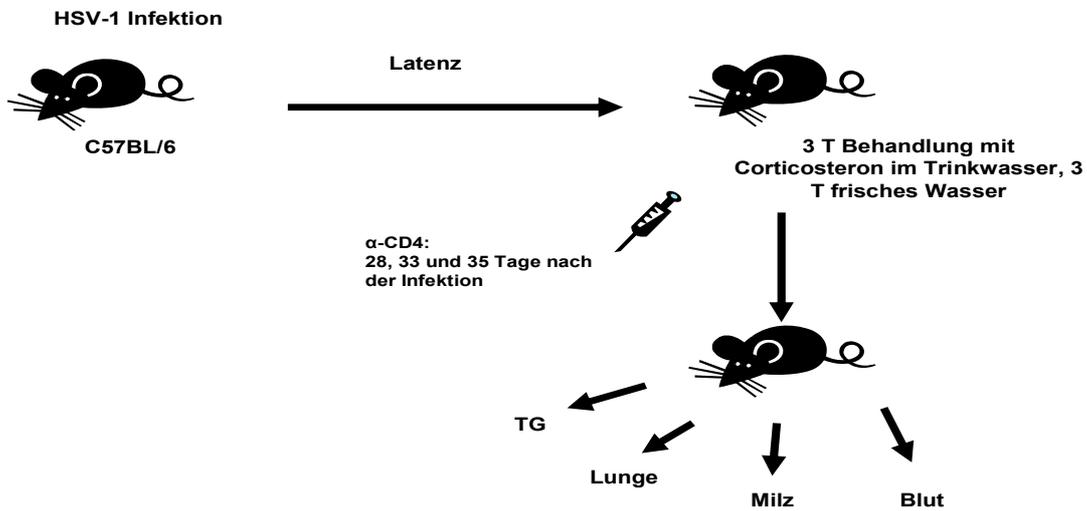
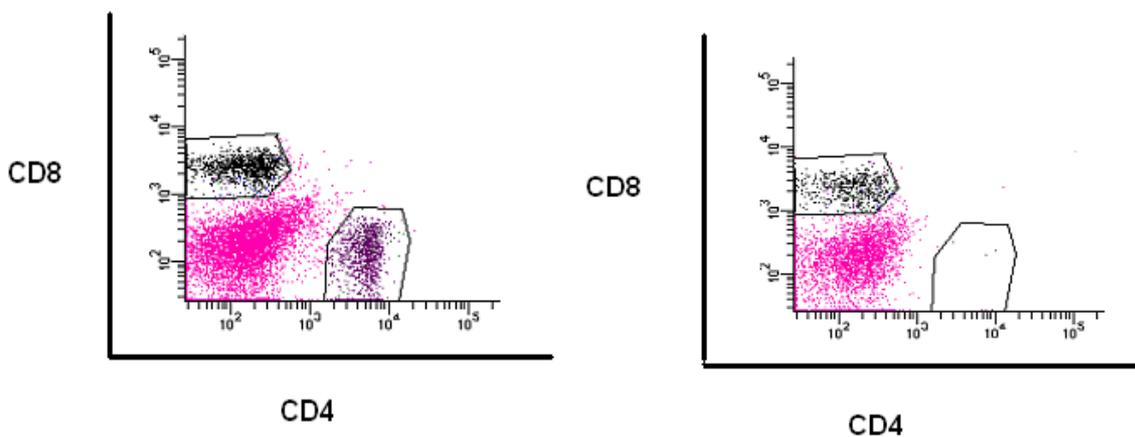


Abbildung 30: Schematische Darstellung des Behandlungsschemas der Mäuse.

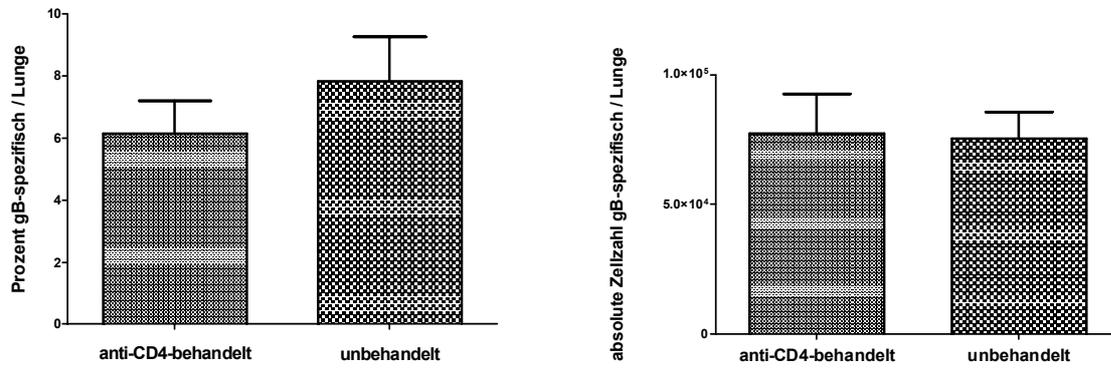
C57BL/6-Mäuse wurden latent mit HSV-1 infiziert. Während der Latenz erhielten diese Mäuse drei Tage lang Corticosteron im Trinkwasser. 28, 33 und 35 Tage nach Infektion erhielten die Mäuse i.v. Injektionen mit einem anti-CD4-Antikörper (Klon GK 1.5). Nach dieser Behandlung wurde ihnen drei Tage lang frisches Wasser gegeben und anschließend wurden die TG, die Lungen, die Milz und das Blut entnommen.

A



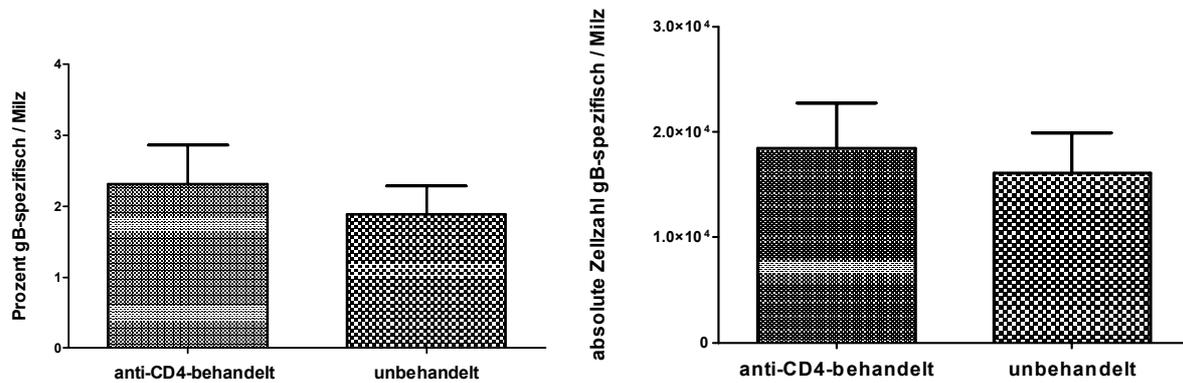
B

Lunge



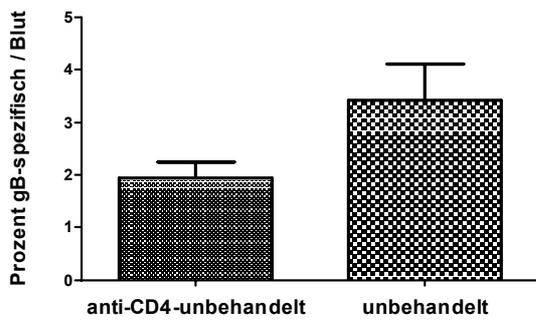
C

Milz



D

Blut



E

TG

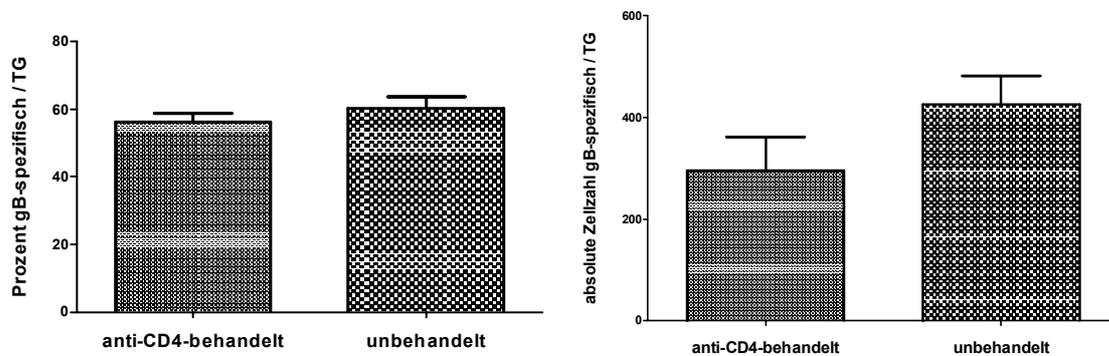


Abbildung 31: Depletion der CD4⁺ T-Zellen beeinflusst nicht die Wiederherstellung der CD8⁺ T-Zell-Population im Corticosteron-behandelten TG

Latent infizierte C57BL/6-Mäuse erhielten Corticosteron im Trinkwasser, gefolgt von drei Tagen frischen Wassers. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhielten die Mäuse eine Injektion mit einem anti-CD4-Antikörper (Klon GK1.5). Anschließend wurden die verschiedenen Gewebe entfernt, Einzel-Zell-Suspensionen hergestellt, mit Antikörpern, die gegen CD8 und CD4 gerichtet sind, gefärbt und mittels FACS-Zytometer analysiert. In (A) ist die erfolgreiche Depletion der CD4⁺ T-Zellen dargestellt.

Die absolute Zellzahl und Prozente an gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Lunge (B), Milz (C), Blut (D) und TG (E) wurde mittels FACS-Zytometer analysiert. Die gezeigten Daten sind als Standardfehler des Median (SEM) für zehn Mäuse pro Gruppe angegeben. Der Student'sche t-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

6. Diskussion

Während einer primären HSV-1 Infektion der Mundschleimhaut gelangt das Virus über retrograden axonalen Transport in die sensorischen Neurone des Trigeminalganglion (TG) und etabliert dort eine lebenslange Latenz [Roizman and Sears 1987]. Für mehrere Jahre wurde angenommen, dass das Latenz-assoziierte Transkript (LAT) das einzige Transkript ist, welches während der Latenz produziert wird. Obwohl LAT nicht translatiert wird, konnten mehrere Studien am HSV-1 Modell und am Menschen zeigen, dass die HSV-1 Latenz von einer chronischen Entzündungsreaktion begleitet wird [Theil *et al.* 2003, Verjans *et al.* 2005]. Die Entzündungsreaktion imponiert durch eine starke Infiltration von CD8⁺ T-Zellen [Liu *et al.* 1996; Shimeld *et al.* 1995, Theil *et al.* 2003, Verjans *et al.* 2007] und einer erhöhten Expression von Chemokinen und Zytokinen [Shimeld *et al.* 1995; Cantin *et al.* 1995; Chen *et al.* 2000; Halford *et al.* 1996; Theil *et al.* 2003]. Im HSV-1 Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Teil der CD8⁺ T-Zellen gegen das Epitop des Glykoproteins B gerichtet ist und einen Gedächtnisphänotyp, der als aktivierte Effektor-Gedächtnis-Zellen beschrieben wird, aufweisen [Khanna *et al.* 2003; van Lint *et al.* 2005]. Eine Beteiligung der CD8⁺ T-Zellen bei der Aufrechterhaltung des latenten Zustands von HSV-1 wird diskutiert [Liu *et al.* 2000; Khanna *et al.* 2003; Liu *et al.* 1996; Shimeld *et al.* 1997]. Während der HSV-1 Latenz behalten die CD8⁺ T-Zellen ihren Aktivierungszustand bei, welcher durch CD69, Granzym B, RANTES/CCL5 und Kv1.3 nachgewiesen werden kann [Liu *et al.* 2001; Wherry *et al.* 2004; Rus *et al.* 2005; Derfuß *et al.* 2007]. Diese spezifischen CD8⁺ T-Zellen bilden eine immunologische Synapse mit den Neuronen [Khanna *et al.* 2003] und können eine HSV-1 Reaktivierung aus der Latenz in *ex vivo* Kulturen von latent infizierten TG über die Produktion von IFN- γ blockieren [Liu *et al.* 2000].

In dieser Studie wurde erstens die Bedeutung der Chemokine (CXCL10 und CCL5) und deren Rezeptoren (CXCR3 und CCR5) bei der Infiltration von CD8⁺ T-Zellen während einer akuten und einer latenten HSV-1 Infektion untersucht. Zweitens wurde untersucht, ob die HSV-spezifische Gedächtnis CD8⁺ T-Zell-Population im latent infizierten TG kompartimentalisiert ist und das Nachfüllen an Zellen aus der Peripherie benötigt.

Eine Reihe von Publikationen haben gezeigt, dass Zytokine und Chemokine sowohl während einer akuten als auch einer latenten Infektion mit HSV-1 im TG bei der Maus exprimiert werden [Halford *et al.* 1996; Shimeld *et al.* 1999; Nansen *et al.* 2000; Carr *et al.* 2003; Cook *et al.* 2004; Carr *et al.* 2006]. Chemokine sind chemotaktische Moleküle, welche die Migration der Leukozyten, sowie deren Aktivierung und Differenzierung durch die Bindung des spezifischen Liganden an den Oberflächenrezeptor an die Zielzelle regulieren. Eine chronische Expression verschiedener Chemokine konnte auch an postmortem Untersuchungen von humanen TG bestätigt werden [Theil *et al.* 2003, Derfuß *et al.* 2007]. Insbesondere Chemokine wie CXCL10 (IP-10) und CCL5 (RANTES) und deren Rezeptoren CXCR3 und CCR5 zeigen ein hohes Expressionsniveau im Tiermodell und beim Menschen [Cook *et al.* 2004; Derfuss *et al.* 2007].

Zudem ist dieser Typ von Chemokinen generell bei viralen Entzündungsprozessen im Gehirn zu finden und scheint für die Akkumulation der CD8⁺ T-Zellen bei viralen und autoimmunen Entzündungen im ZNS mitverantwortlich zu sein [Christensen *et al.* 2004; Liu *et al.* 2000].

Um herauszufinden, ob diese Chemokine die Infiltration von HSV-spezifischen CD8⁺ Effektor-T-Zellen ins TG während einer akuten Phase der Infektion steuern, wurde C57BL/6-Mäusen sechs Tage nach der Infektion eine Injektion mit TAK-779, einem chemischen nicht-peptidischen Inhibitor von CXCR3 und CCR5 [Gao *et al.* 2003], verabreicht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung der Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 die Infiltration von spezifischen CD8⁺ T-Zellen in das akut infizierte TG signifikant reduzieren. Dies deutet daraufhin, dass CXCR3 und CCR5 wichtig für die Anlockung der CD8⁺ T-Zellen in das infizierte TG sind. Die verbleibenden CD8⁺ T-Zellen sind dennoch ausreichend, um die virale Replikation zu unterdrücken. Das Einwandern von geringen Mengen an spezifischen CD8⁺ T-Zellen weist auf die Redundanz der Chemokinexpression und auf die Mitbeteiligung anderer Chemokinrezeptoren bei der Akkumulation der HSV-1 spezifischen CD8⁺ T-Zellen im akuten Infektionsstadium hin. Die meisten Zellen exprimieren verschiedene Rezeptoren für Chemokine. Ist ein Ligand oder Rezeptor nicht funktionell, können alternative Chemokine oder Rezeptoren die biologische Funktion übernehmen, was hier der Fall zu sein scheint.

Um zu bestimmen, ob die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 für die Aufrechterhaltung der CD8⁺ T-Zell-Population während der HSV-1 Latenz wichtig sind, wurden Mäuse 30, 32 und 34 Tage nach der Infektion mit einer Injektion mit TAK-779 behandelt. Es konnte keine Veränderung in der CD8⁺ T-Zell-Zahl im TG nach dieser Behandlung festgestellt werden. Die Viruslast blieb nach der Behandlung mit TAK-779 jedoch unverändert. Somit ist eine Beteiligung dieser Chemokine bei der Aufrechterhaltung der CD8⁺ T-Zell-Population während der Latenz eher unwahrscheinlich.

Die Existenz dieser Chemokine und Chemokin-Rezeptoren, sowie die Anwesenheit eines sehr stabilen CD8⁺ T-Zell-Infiltrats während einer latenten HSV-1 Infektion deutete darauf hin, dass die Aufrechterhaltung des Gedächtnis-CD8⁺ T-Zell-Pools im TG möglicherweise das ständige Nachfüllen an Zellen aus der Peripherie benötigt.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurden HSV-spezifische CD8⁺ T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen, die 30 Tage infiziert waren, isoliert und mittels adoptiven Transfers in latent infizierte CD45.1- transgene Mäuse injiziert. Anhand dieses Modells konnten wir zeigen, dass die HSV-1 spezifischen (gegen das Glykoprotein B gerichteten) CD8⁺ T-Zellen des Spenders in einer hohen Anzahl im Blut und den submandibularen Lymphknoten (DLN) der Empfängermaus aufzufinden sind. Im TG jedoch konnten diese Zellen nicht nachgewiesen werden. Die Präsenz der Spender-Zellen konnte hingegen in verschiedenen Organen (Lunge, Milz und DLN) nachgewiesen werden. Dies war ein Beweis dafür, dass die Spender-Zellen in der Lage waren in Gewebe einzuwandern. Somit kann daraus geschlossen werden, dass kein Nachfüllen an CD8⁺ T-Zellen aus der Peripherie in das TG notwendig ist, sondern es sich eher um eine klonale Expansion der spezifischen CD8⁺ T-Zellen im HSV-1 infizierten TG handelt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Carbone [Wakim *et al.* 2008] überein. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass die CD8⁺ T-Zell-Population innerhalb des HSV-1 infizierten TG kompartimentalisiert ist, sich selbst durch klonale Expansion aufrecht erhält und kein Nachfüllen an zirkulierenden Zellen benötigt [Wakim *et al.* 2008]. Ebenfalls zeigten die infiltrierenden Zellen im humanen TG eine klonale Expansion [Derfuß *et al.* 2007]. Die Gruppe um Carbone wies eine wichtige Rolle der CD4⁺ T-Zellen an der Repopulation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach. In unserem Modell hingegen hatte die Depletion der CD4⁺ T-Zellen keinen Einfluss auf die Wiederherstellung der CD8⁺ T-Zell-Population. Dieser Unterschied könnte am unterschiedlichen

Experimentaufbau liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Proliferation der HSV-1-spezifischen T-Zellen im TG bestimmt. Für diesen Zweck wurden HSV-1 latent infizierten C57BL/6-Mäusen DiD-markierte HSV-1 spezifische CD8⁺ T-Zellen i.v. transferiert. Diesen Mäusen wurde vier Stunden vor Organentnahme BrdU verabreicht. In der FACS-Analyse der gesamten spezifischen CD8⁺ T-Zell-Population der so behandelten C57BL/6-Mäuse, zeigte sich eine erhöhte Proliferationsrate nur bei den unmarkierten spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Insgesamt weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass die Proliferation der CD8⁺T-Zellen nach Antigenpräsentation im TG selbst stattfindet und es nicht zu einer Zufuhr dieser Zellen von außen bedarf. Ebenso scheinen auch die antigenpräsentierenden Zellen parenchymale Zellen zu sein. Daten von Carbones Forschergruppe zeigen, dass eine andauernde Aktivierung der spezifischen CD8⁺ T-Zellen im latent infizierten TG von parenchymalen Zellen (Neuronen und Satelliten-Zellen) abhängig ist und nicht von aus dem Knochenmark stammenden antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen) [van Lint *et al.* 2005]. Eine klonale Expansion und Proliferation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen impliziert, dass virales Antigen im TG produziert wird und dann eine Präsentation an die residenten CD8⁺ T-Zellen erfolgt. Bis jetzt liegen nur wenige oder indirekte Beweise für eine virale Aktivität während der Latenz bei der Maus vor. Feldmann *et al.* (2002) konnten in den TG von HSV-1 infizierten Mäusen lytische Transkripte in vereinzelt Neuronen nachweisen. Feldmann postulierte, dass es bei der Maus ähnlich wie beim Menschen zu einer spontanen HSV-1 Reaktivierung im TG kommt. Weiterhin konnte er zeigen, dass die Neurone, welche lytische Transkripte enthalten, auch von Entzündungszellen umgeben sind [Feldmann *et al.* 2002]. Andere Gruppen konnten lytische Transkripte („immediate early“ und „early“-Gene), Gene die als erstes während einer lytischen Phase transkribiert werden, nachweisen [Chen *et al.* 1997; Kramer *et al.* 1998]. Beim Menschen konnten lediglich Transkripte, die für die ersten lytischen Gene kodieren, aber keine Transkripte, die für virale Strukturproteine kodieren, nachgewiesen werden [Derfuß *et al.* 2007]. Überraschend ist aber, dass ca. 50% der CD8⁺ T-Zellen im TG bei der Maus gegen Glykoprotein B, ein virales Oberflächen-Protein, gerichtet sind. Dies konnte mittels einer Tetramer-Färbung mehrfach bestätigt werden [Khanna *et al.* 2003; van Lint *et al.* 2005; Knickelbein *et al.* 2008]. Außerdem konnte demonstriert werden, dass nur die gB₍₄₉₈₋₅₀₅₎/H-2K^b-spezifischen CD8⁺ T-Zellen Granzym B exprimieren und somit gewappnet sind, virusinfizierte Zellen zu

eliminieren [van Lint *et al.* 2005, Knickelbein *et al.* 2008]. Geringste Mengen an Virusantigen und MHC-I scheinen auszureichen, um CD8⁺ T-Zellen zu „primen“ und zu aktivieren. Dennoch verursachen diese Zellen keinen sichtlichen Schaden im TG. So sind keine apoptotischen Zellen oder sonstige morphologische Veränderungen im TG nachzuweisen [Theil *et al.* 2003; Knickelbein *et al.* 2008]. Neueste Untersuchungen weisen daraufhin, dass Granzym B nicht toxisch auf die infizierten Zellen wirkt, sondern das „*immediate early*“-Protein ICP4 degradiert und somit die virale Replikation blockiert [Knickelbein *et al.* 2008]. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch in den latent mit HSV-1 infizierten TG beim Menschen fungieren. Allerdings sind symptomatische und asymptomatische HSV-1- Reaktivierungen beim Menschen sehr häufig anzutreffen, was eventuell auf eine unzureichende Blockade durch Granzym B zurückzuführen ist. Generell stellen HSV-1 Reaktivierungen keine ernsthafte gesundheitliche Bedrohung für den gesunden Menschen dar. HSV-1- Reaktivierungen sind aber ernstzunehmende Erkrankungen in immunsupprimierten Personen (Chemotherapie, HIV) und deshalb sind Untersuchungen zur Dynamik der CD8⁺ spezifischen T-Zellen von besonderer Bedeutung.

Zusammengefasst unterstreichen diese Daten, dass die spezifischen CD8⁺ T-Zellen während einer akuten HSV-1 Infektion von den Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 in das TG geleitet werden. Die CD8⁺ spezifische T-Zell-Population bleibt während der ganzen Latenzzeit unverändert. Eine Behandlung mit Corticosteron reduziert die Zahl der spezifischen CD8⁺ T-Zellen im TG, dennoch erholt sich diese Population nach geraumer Zeit. Diese Regeneration findet durch eine Proliferation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen im TG selbst statt und nicht über eine Einwanderung der T-Zellen aus der Peripherie, was darauf hindeutet, dass eine Antigenpräsentation und T-Zell Expansion im TG stattfindet. Ob sich diese Situation auch während einer HSV-1 Reaktivierung widerspiegelt, muss weiterhin untersucht werden. Käme es während einer Reaktivierung zu einer Einwanderung von T-Zellen aus der Peripherie, könnte eine Impfstrategie entwickelt werden, bei der die T-Zellen aus der Peripherie geboostet werden.

7. Referenzen

Badovinac, V. P., B. B. Porter, and J. T. Harty. 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat. Immunol.* 3:619-626.

Bjorkman PJ, Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility. *Annu. Rev. Biochem.* 1990;59:253-88. Review.

Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1997 Mar 4;94(5):1925-30.

Böhmer PE, Lehman IR. Herpes simplex virus DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 1997; 66: 347-384.

Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Förster R. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* 2000 Dec 4;192(11):1545-52.

Brissette-Storkus CS, Reynolds SM, Lepisto AJ, Hendricks RL. Identification of a novel macrophage population in the normal mouse corneal stroma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; 43: 2264-2271.

Cantin, E. M., D. R. Hinton, J. Chen, and H. Openshaw. 1995. Gamma interferon expression during acute and latent nervous system infection by herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 69:4898-4905.

Carr, D. J., S. Noisakran, W. P. Halford, N. Lukacs, V. Asensio, and I. L. Campbell. 1998. Cytokine and chemokine production in HSV-1 latently infected trigeminal ganglion cell cultures: effects of hyperthermic stress. *J. Neuroimmunol.* 85:111-121.

Carr, D. J., P. Harle, and B. M. Gebhardt. 2001. The immune response to ocular herpes simplex virus type 1 infection. *Exp. Biol. Med.* (Maywood.) 226:353-366.

Carr, D. J., J. Chodosh, J. Ash, and T.E. Lane. 2003. Effect of anti-CXCL10 monoclonal antibody on herpes simplex virus type 1 keratitis and retinal infection. *J. Virol.* 77:10037-10046.

Carr, D. J., J. Ash, T. E. Lane, and W. A. Kuziel. 2006. Abnormal immune response of CCR5-deficient mice to ocular infection with herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 87:489-499.

Clevers H, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* 1988;6:629-62. Review.

Cook, M. L., V. B. Bastone, and J. G. Stevens. 1974. Evidence that neurons harbor latent herpes simplex virus. *Infect. Immun.* 9:946-951.

Cook, W. J., M. F. Kramer, R. M. Walker, T. J. Burwell, H. A. Holman, D. M. Coen, and D. M. Knipe. 2004. Persistent expression of chemokine and chemokine receptor RNAs at primary and latent sites of herpes simplex virus 1 infection. *Virology* 1:5.

Decman, V., P. R. Kinchington, S. A. Harvey, and R. L. Hendricks. 2005. Gamma interferon can block herpes simplex virus type 1 reactivation from latency, even in the presence of late gene expression. *J. Virol.* 79:10339-10347.

Decman, V., M. L. Freeman, P. R. Kinchington, and R. L. Hendricks. 2005. Immune Control of HSV-1 Latency. *Viral Immunol* 18:466-473.

Deluca NA, McCarthy AM, Schaffer PA. Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J. Virol* 1985; 56: 558-570.

Deluca NA, McCarthy AM, Schaffer PA. Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J. Virol* 1985; 56: 558-570.

Demkowicz WE, Jr., Littaua RA, Wang J, Ennis FA. Human cytotoxic T-cell memory: long-lived responses to vaccinia virus. *J. Virol* 1996; 70: 2627-2631.

Derfuss T, Segerer S, Herberger S, Sinicina I, Hufner K, Ebelt K, Knaus HG, Steiner I, Meinel E, Dornmair K, Arbusow V, Strupp M, Brandt T, Theil D. Presence of HSV-1 immediate early genes and clonally expanded T-cells with a memory effector phenotype in human trigeminal ganglia. *Brain Pathol.* 2007 17(4):389-98

Ellison AR, Yang L, Voytek C, Margolis TP. Establishment of latent herpes simplex virus type 1 infection in resistant, sensitive, and immunodeficient mouse strains. *Virology* 2000; 268: 17-28.

Everett RD, Freemont P, Saitoh H et al. The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J. Virol.* 1998; 72: 6581-6591.

Fehling HJ, von Boehmer H. Early alpha beta T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice. *Curr. Opin. Immunol.* 1997 Apr;9(2):263-75. Review.

Feldman LT, Ellison AR, Voytek CC, Yang L, Krause P, Margolis TP. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc. Natl. Acad. Sc. U S A.* 2002; 99: 978-983.

Freeman, M. L., V. Decman, and R. L. Hendricks. 2005. Neurons and host immunity conspire to maintain herpes simplex virus in a latent state. In *Molecular Pathogenesis of virus infections*. P. Digard, A. A. Nash, and R. E. Randall, eds. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 203-213.

Freeman, M. L., B. S. Sheridan, R. H. Bonneau, and R. L. Hendricks. 2007. Psychological stress compromises CD8+ T cell control of latent herpes simplex virus type 1 infections. *J. Immunol.* 179:322-328.

Gao, P., X.Y. Zhou, Y. Yashiro-Ohtani, Y. F. Yang, N Sugimoto, S. Ono, T. Nakanishi, S. Obika, T. Imanishi, T. Egawa, T. Nagasawa, H. Fujiwara, and T. Hamaoka. 2003. The unique target specificity of a nonpeptide chemokine receptor antagonist: selective blockade of two Th1 chemokine receptors CCR5 and CXCR3. *J. Leukoc. Biol.* 73:273-280.

Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 1994 Jan 28;76(2):287-99. Review.

Gesser RM, Valyi-Nagy T, Fraser NW. Restricted herpes simplex virus type 1 gene expression within sensory neurons in the absence of functional B and T lymphocytes. *Virology* 1994; 200: 791-795.

Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin. Immunol.* 2004; 16: 323-333.

Grubor-Bauk B, Simmons A, Mayrhofer G, Speck PG. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J. Immunol.* 2003; 170: 1430-1434.

Grubor-Bauk B, Simmons A, Mayrhofer G, Speck PG. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J. Immunol.* 2003; 170: 1430-1434.

Halford, W. P., B. M. Gebhardt, and D. J. Carr. 1996. Persistent cytokine expression in trigeminal ganglion latently infected with herpes simplex virus type 1. *J. Immunol.* 157:3542-3549.

Halford WP, Schaffer PA. ICP0 is required for efficient reactivation of herpes simplex virus type 1 from neuronal latency. *J. Virol.* 2001; 75: 3240-3249.

Hardy WR, Sandri-Goldin RM. Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. *J. Virol.* 1994; 68: 7790-7799.

Hikono, H., J. E. Kohlmeier, S. Takamura, S. T. Wittmer, A. D. Roberts, and D. L. Woodland. 2007. Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 204:1625-1636.139

Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* 2002; 14: 354-359.

Hoshino, Y., L. Pesnicak, J. I. Cohen, and S. E. Straus. 2007. Rates of Reactivation of Latent Herpes Simplex Virus from Mouse Trigeminal Ganglia Ex Vivo Correlate Directly with the Viral Load and Inversely with the Number of Infiltrating CD8+T Cells. *J. Virol.*

Ichihashi M, Nagai H, Matsunaga K. Sunlight is an important causative factor of recurrent herpes simplex. *Cutis* 2004; 74: 14-18.

Jackson, S. A. and N. A. DeLuca. 2003. Relationship of herpes simplex virus genome configuration to productive and persistent infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100:7871-7876.

Joshi, N. S., W. Cui, A. Chandele, H. K. Lee, D. R. Urso, J. Hagman, L. Gapin, and S. M. Kaech. 2007. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8(+) T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity*. 27:281-295.

Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 2002; 111: 837-851.

Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat. Immunol.* 2003; 4: 1191-1198.

Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 2002; 2: 251-262.

Khanna KM, Bonneau RH, Kinchington PR, Hendricks RL. Herpes simplex virus-specific memory CD8+ T cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. *Immunity* 2003; 18: 593-603.

Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR, Hendricks RL. Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science*. 2008 Oct 10;322(5899):268-71.

Kodukula P, Liu T, Rooijen NV, Jager MJ, Hendricks RL. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol* 1999; 162: 2895-2905.

Kramer MF, Coen DM. Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J. Virol.* 1995; 69: 1389-1399.

Lafferty WE. The changing epidemiology of HSV-1 and HSV-2 and implications for serological testing. *Herpes* 2002; 9: 51-55.

Lafferty WE, Coombs RW, Benedetti J, Critchlow C, Corey L. Recurrences after oral and genital herpes simplex virus infection. Influence of site of infection and viral type. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316: 1444-1449.

Lang A, Nikolich-Zugich J. Development and migration of protective CD8+ T cells into the nervous system following ocular herpes simplex virus-1 infection. *J. Immunol.* 2005; 174: 2919-2925.

Lau LL, Jamieson BD, Somasundaram T, Ahmed R. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature* 1994; 369: 648-652.

Liesegang TJ. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. *Cornea* 2001; 20: 1-13.

Liu T, Khanna KM, Chen X, Fink DJ, Hendricks RL. CD8(+) T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J. Exp. Med.* 2000; 191: 1459-1466.

Liu T, Tang Q, Hendricks RL. Inflammatory infiltration of the trigeminal ganglion after herpes simplex virus type 1 corneal infection. *J Virol* 1996; 70: 264-271.

Lomonte P, Sullivan KF, Everett RD. Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 5829-5835.

Looker KJ, Garnett GP. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex. Transm. Infect.* 2005; 81: 103-107.

Lowhagen GB, Tunback P, Andersson K, Bergstrom T, Johannisson G. First episodes of genital herpes in a Swedish STD population: a study of epidemiology and transmission by the use of herpes simplex virus (HSV) typing and specific serology. *Sex. Transm. Infect.* 2000; 76: 179-182.

Mantovani A. Chemokines. Introduction and Overview. *Chem. Immunol.* 1999;72:1-6. Review.

Margolis TP, Imai Y, Yang L, Vallas V, Krause PR. Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) establishes latent infection in a different population of ganglionic neurons than HSV-1: role of latency-associated transcripts. *J. Virol.* 2007; 81: 1872-1878.

Margolis, T. P., F. L. Elfman, D. Leib, N. Pakpour, K. Apakupakul, Y. Imai, and C. Voytek. 2007. Spontaneous Reactivation of HSV-1 in Latently Infected Murine Sensory Ganglia. *J.Virol.*

Marrack P, Kappler J. Control of T cell viability. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 765-787.

Masopust, D., V. Vezys, A. L. Marzo, and L. Lefrancois. 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291:2413-2417.

Masopust D, Käch SM, Wherry EJ, Ahmed R. The role of programming in memory T-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 2004; 16: 217-225.

Masopust, D., V. Vezys, E. J. Usherwood, L. S. Cauley, S. Olson, A. L. Marzo, R. L. Ward, D. L. Woodland, and L. Lefrancois. 2004. Activated primary and memory CD8 T cells migrate to nonlymphoid tissues regardless of site of activation or tissue of origin. *J. Immunol.* 172:4875-4882.

Maul GG. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Biössays* 1998; 20: 660-667.

Metcalf JF, Hamilton DS, Reichert RW. Herpetic keratitis in athymic (nude) mice. *Infect. Immun.* 1979; 26: 1164-1171.

Minagawa H, Yanagi Y. Latent herpes simplex virus-1 infection in SCID mice transferred with immune CD4+T cells: a new model for latency. *Arch. Virol.* 2000; 145: 2259-2272.

Mueller, S. N., C. M. Jones, C. M. Smith, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 2002. Rapid cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus. *J. Exp. Med.* 195:651-656.

Mueller, S. N., C. M. Jones, W. Chen, Y. Kawaoka, M. R. Castrucci, W. R. Heath, and F.R. Carbone. 2003. The Early Expression of Glycoprotein B from Herpes Simplex Virus Can Be Detected by Antigen-Specific CD8+ T Cells. *J. Virol.* 77:2445-2451.136

Mueller, S. N., K. A. Hosiawa-Meagher, B. T. Konieczny, B. M. Sullivan, M. F. Bachmann, R. M. Locksley, R. Ahmed, and M. Matloubian. 2007. Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses. *Science* 317:670-674.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2000 Mar;52(1):145-76. Review.

Nahmias AJ, Lee FK, Beckman-Nahmias S. Sero-epidemiological and -sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 1990; 69: 19-36.

Nansen, A., O. Marker, C. Bartholdy, and A. R. Thomsen. 2000. CCR2+ and CCR5+ CD8+ T cells increase during viral infection and migrate to sites of infection. *Eur. J Immunol.* 30:1797-1806.

Nelson PJ, Krensky AM. Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around. *Curr. Opin. Immunol.* 1998 Jun;10(3):265-70. Review.

Niedermann G, King G, Butz S, Birsner U, Grimm R, Shabanowitz J, Hunt DF, Eichmann K. The proteolytic fragments generated by vertebrate proteasomes: structural relationships to major histocompatibility complex class I binding peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1996 Aug 6;93(16):8572-7.

Pereira RA, Scalzo A, Simmons A. Cutting edge: a NK complex-linked locus governs acute versus latent herpes simplex virus infection of neurons. *J. Immunol.* 2001.; 166: 5869-5873.

Preston CM. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *J. Gen. Virol.* 2000; 81: 1-19.

Preston, C. M. 2007. Reactivation of Expression from Quiescent Herpes Simplex Virus Type 1 Genomes in the Absence of Immediate Early Protein ICP0. *J. Virol.*

Rajcani J, Andrea V, Ingeborg R. Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview. *Virus Genes* 2004; 28: 293-310.

- Remeijer L, Osterhaus A, Verjans G. Human herpes simplex virus keratitis: the pathogenesis revisited. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2004; 12: 255-285.
- Reth M. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1992;10:97-121. Review.
- Roberts CM, Pfister JR, Spear SJ. Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sex. Transm. Dis.* 2003; 30: 797-800.
- Roizman B, Sears Å. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annu. Rev. Microbiol.* 1987; 41: 543-571.
- Roizman, B. and D. M. Knipe. 2001. Herpes simplex viruses and their replication. In *Fields Virology*. Fields BN, ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 2399-2459.
- Rossi, D. and A. Zlotnik. 2000. The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18:217-242.137
- Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science.* 1997 Sep 26;277(5334):2005-7.
- Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 1998 Sep;28(9):2760-9.
- Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today.* 1998 Dec;19(12):568-74. Review.
- Sallusto F, Palermo B, Hoy A, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in directing traffic of naïve, type 1 and type 2 T cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999;246:123-8; discussion 129. Review.
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999 Oct 14;401(6754):708-12.
- Samaniego, L. A., L. Neiderhiser, and N. A. DeLuca. 1998. Persistence and expression of the herpes simplex virus genome in the absence of immediate-early proteins. *J. Virol.* 72:3307-3320.
- Sawtell, N. M. 1997. Comprehensive quantification of herpes simplex virus latency at the single-cell level. *J. Virol.* 71:5423-5431.
- Schillinger JA, Xu F, Sternberg MR et al. National seroprevalence and trends in herpes simplex virus type 1 in the United States, 1976-1994. *Sex. Transm. Dis.* 2004; 31: 753-760.
- Schluns, K. S. and L. Lefrancois. 2003. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat. Rev. Immunol.* 3:269-279.

Sciammas R, Kodukula P, Tang Q, Hendricks RL, Blüstone JA. T cell receptor-gamma/delta cells protect mice from herpes simplex virus type 1-induced lethal encephalitis. *J. Exp. Med.* 1997; 185: 1969-1975.

Sheridan, B. S., K. M. Khanna, G. M. Frank, and R. L. Hendricks. 2006. Latent virus influences the generation and maintenance of CD8+ T cell memory. *J. Immunol.* 177:8356-8364.

Shimeld, C., J. L. Whiteland, N. A. Williams, D. L. Easty, and T. J. Hill. 1997. Cytokine production in the nervous system of mice during acute and latent infection with herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 12):3317-3325.

Shimeld C, Efstathiou S, Hill T. Tracking the spread of a lacZ-tagged herpes simplex virus type 1 between the eye and the nervous system of the mouse: comparison of primary and recurrent infection. *J. Virol.* 2001; 75: 5252-5262.

Siegel D, Golden E, Washington A et al. Prevalence and correlates of herpes simplex infections. The population-based AIDS in Multiethnic Neighborhoods Study. *JAMA* 1992; 268: 1702-1708.

Simmons A, Tschärke DC. Anti-CD8 impairs clearance of herpes simplex virus from the nervous system: implications for the fate of virally infected neurons. *J. Exp. Med.* 1992; 175: 1337-1344.

Slifka MK, Whitton JL. Activated and memory CD8+ T cells can be distinguished by their cytokine profiles and phenotypic markers. *J. Immunol.* 2000; 164: 208-216.

Smith, J. S. and N. J. Robinson. 2002. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J. Infect. Dis.* 186 Suppl 1:S3-28.

Stevens, J. G., E. K. Wagner, G. B. Devi-Rao, M. L. Cook, and L. T. Feldman. 1987. RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 235:1056-1059.

Strang, B. L. and N. D. Stow. 2005. Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. *J. Virol.* 79:12487-12494.

Strasser A, Pellegrini M. T-lymphocyte death during shutdown of an immune response. *Trends Immunol.* 2004; 25: 610-615.

Theil D, Derfuss T, Paripovic I et al. Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am. J. Pathol.* 2003; 163: 2179-2184.

Thompson, R. L. and N. M. Sawtell. 1997. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *J. Virol.* 71:5432-5440.

Tumpey TM, Chen SH, Oakes JE, Lausch RN. Neutrophil-mediated suppression of virus replication after herpes simplex virus type 1 infection of the murine cornea. *J. Virol.* 1996; 70: 898-904.

Umene K, Sakaoka H. Evolution of herpes simplex virus type 1 under herpesviral evolutionary processes. *Arch. Virol.* 1999; 144: 637-656.

van Lint, A. L., L. Kleinert, S. R. Clarke, A. Stock, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 2005. Latent infection with herpes simplex virus is associated with ongoing CD8+ T-cell stimulation by parenchymal cells within sensory ganglia. *J. Virol.* 79:14843-14851.

Verjans, G. M., R. Q. Hintzen, J. M. van Dun, A. Poot, J. C. Milikan, J. D. Laman, A. W. Langerak, P. R. Kinchington, and A. D. Osterhaus. 2007. Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S A* 104:3496-3501.

Wade JC, Newton B, McLaren C, Flournoy N, Keeney RE, Meyers JD. Intravenous acyclovir to treat mucocutaneous herpes simplex virus infection after marrow transplantation: a double-blind trial. *Ann. Intern. Med.* 1982; 96: 265-269.

Wakim LM, Waithman J, van Rooijen N, Heath WR, Carbone FR. Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science.* 2008 Jan 11;319(5860):198-202.

Watson RJ, Clements JB. A herpes simplex virus type 1 function continuously required for early and late virus RNA synthesis. *Nature* 1980; 285: 329-330.

Weir JP. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* 2001; 271: 117-130.

Wherry, E. J., V. Teichgraber, T. C. Becker, D. Masopust, S. M. Kaech, R. Antia, U. H. Von Andrian, and R. Ahmed. 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat. Immunol.* 4:225-234.

Wherry, E. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, M. R. van der, and R. Ahmed. 2003. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J. Virol.* 77:4911-4927.

Wherry, E. J., D. L. Barber, S. M. Kaech, J. N. Blattman, and R. Ahmed. 2004. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:16004-16009.

Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin. Infect. Dis.* 1998; 26: 541-553.

Whitley RJ, Levin M, Barton N et al. Infections caused by herpes simplex virus in the immunocompromised host: natural history and topical acyclovir therapy. *J. Infect. Dis.* 1984; 150: 323-329.

Yang, L., C. C. Voytek, and T. P. Margolis. 2000. Immunohistochemical analysis of primary sensory neurons latently infected with herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 74:209-217.

Yewdell JW, Bennink JR. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 51-88.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000 Feb;12(2):121-7. Review.

8. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACAD	activated T cell autonomous death
AICD	activation induced cell death
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zellen
BSA	Bovines Kälberserum
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster Domain
°C	Grad Celcius
CTL	zytotoxische T-Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DLN	Draining Lymph Nodes
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-gene	early-gene
FACS	fluoreszenzaktiviertes Zellsortiergerät
FBS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
gB	Glykoprotein B
Gr. B	Granzym B

HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEV	high endothelial venules
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus 1
HSV-2	Herpes-Simplex-Virus 2
H ₂ O	Wasser
ICP	Infected Cell Protein
IE-gene	immediate early-gene
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP-10	interferon-inducible protein 10 (CXCL10)
I-TAC	interferon-inducible T-cell α -chemoattractant (CXCL11)
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
Kv1.3	voltage gated potassium channel
LAT	Latency Associated Transcript
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
L-gene	late-gene
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Mig	monokine induced by interferon- γ
MIP-1/2	Macrophage Inflammatory Protein 1/2
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
ND10	nuclear domain 10
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
nM	nano-Molar
nm	Nanometer
NO	Nitritoxid

PBS	Phosphatgepufferte Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin-7
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque Forming Unit
PMN	Polymorphnukleäre Zellen
RANTES	regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RBC	Red Blood Cell Lysis Buffer
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	rotations per minute
RT-PCR	Real Time-Polymerase-Ketten-Reaktion
SCID	severe combined immune deficiency
SEM	Standard Error of the Mean
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particles
TAP	transporter associated with antigen processing
TG	Trigeminusganglion
Th 1-Zelle	T-Helfer
TK	Thymidin-Kinase
TNF	Tumornekrosefaktor
WT	Wild-Typ
TZR	T-Zell-Rezeptor
vhs	virus host shutoff
U _L	Unique Long
U _S	Unique short
z.B.	zum Beispiel

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Brandt und Frau PD Dr. Diethilde Theil, die mir ermöglicht haben, meine Doktorarbeit sowohl am Klinikum Großhadern, als auch an der Universität von Pittsburgh durchzuführen.

Bei Frau PD Dr. Christine Falk, Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiss, Herrn Prof. Dr. Jürgen Soll und Herrn Prof. Dr. Heinrich Jung als meine Prüfungskommission möchte ich mich ebenfalls recht herzlich bedanken.

Mein allerherzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Hendricks. Ich möchte ihm für die sehr gute Zusammenarbeit, für seine zahlreichen hilfreichen Diskussionen und für alles, was er für mich getan hat, danken.

Der Arbeitsgruppe in Pittsburgh gilt ebenfalls mein größter Dank. Insbesondere Dawn Maker, Kira Lathrop, Jen Lozano, Jared Knickelbein, Mike Freeman, und Nancy Zurowski.

Der Bayerischen Forschungstiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Zum Abschluss möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglicht und mich vorbehaltlos über die ganzen Jahre hinweg unterstützt haben.

10. Lebenslauf

Name: Himmelein

Vorname: Susanne

Geburtsdatum: 21.02.1976

Geburtsort: Schwäbisch Hall

Wohnort: Heiglhofstr. 74
81377 München

Email-Adresse: susanne.himmelein@web.de

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982–1986	Grund- und Hauptschule Altenmünster
1986-1996	Albert-Schweitzer-Gymnasium Crailsheim
1996	Abitur

Studium:

WS 97/98	Studium Diplom Biologie an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
2000	Vordiplom
Juni/Juli 2003	Diplomprüfungen
August 2003-Juni 2004	Diplomarbeit am Institut für Klinische und Molekulare Virologie, AG Prof. M. Mach

Thema: Die Bedeutung der Variationen des Glykoproteins N des humanen Cytomegalovirus für Komplexbildung, Antigenität und Zelltropismus

Dissertation:

Dez. 2005-Nov. 2008

Stipendium der Bayerischen Forschungstiftung
Neurologisches Forschungshaus: AG Frau PD Dr.
Theil und Prof. Dr. Brandt, Klinikum Grosshadern

1.06.06 – 31.05.08

Eye and Ear Institute University of Pittsburgh, AG
Prof. Dr. Hendricks

11. Erklärung

Ich versichere, dass ich die Arbeit ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen angefertigt habe und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat und von dieser als Teil einer Prüfungsleistung angenommen wurde. Alle Ausführungen, die wörtlich oder sinngemäß übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Susanne Himmelein