

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik mit Friedrich-Baur-Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Univ. Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

**Expression klassischer und nicht-klassischer MHC-Moleküle
sowie Inflammationsproteine in latent HSV-1 infizierten
Neuronen humaner sensorischer Ganglien**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florian Reßle

aus
Schongau

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Strupp

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner
PD Dr. Bettina Zinka

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Susanne Himmelein

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2018

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	III
1	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Charakteristika von Viren.....	1
1.2	Die Familie der humanen Herpesviridae	2
1.2.1	Allgemeine strukturelle Eigenschaften.....	4
1.2.2	Humane Herpesviren.....	5
1.3	Herpes simplex Virus Typ I	8
1.3.1	Charakteristika der Herpes simplex Viren	8
1.3.2	Struktur der Herpes simplex Viren	9
1.3.3	Klinische Bedeutung	10
1.3.4	Eindringen des Virus in Wirtszelle	14
1.3.5	Aktive Infektion und Replikation	15
1.3.6	Latente Infektion	19
1.3.7	Interaktion mit der Wirtszelle	24
1.3.8	Interaktion mit dem Immunsystem.....	25
1.4	MHC (Major Histocompatibility Complex)	27
1.4.1	Klassische MHC I.....	27
1.4.2	Nicht-klassische MHC I	28
1.4.3	MHC Klasse II	30
1.5	Chemokine und ihre Rezeptoren	31
1.5.1	CCL5 und neuronale HSV-1 Infektion	32
1.6	Interleukine und ihre Rezeptoren	32
1.6.1	Interleukin-1 Familie.....	32
1.6.2	Interleukin-1- β	33
2	Zielsetzung	34
3	Material und Methoden	35
3.1	Verwendetes Gewebe.....	35
3.2	Aufbereitung des Gewebes	36
3.2.1	Färbungen.....	36
3.2.2	RNA-Isolierung.....	36
3.2.3	Laser-Cutting-Microdissection	36

3.3	Typisierung der einzelnen Ganglien.....	37
3.3.1	LAT- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	37
3.3.2	Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion	39
3.3.3	Nested-PCR.....	41
3.3.4	Gel-Elektrophorese.....	42
3.4	Gewinnung von RNA, DNA und cDNA.....	43
3.4.1	RNA-Isolierung.....	43
3.4.2	DNA-Isolation	44
3.4.3	Transkription von cDNA.....	45
3.5	Einzelzell-Analyse.....	45
3.5.1	LAT- <i>in-situ</i> Kurzfärbung.....	46
3.5.2	Laser-cutting-Microdissection.....	46
3.5.3	Aufarbeitung des zellulären Genmaterials.....	48
3.5.4	Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion	49
3.6	MHC Färbungen.....	49
3.6.1	HLA-A, -B und -C Immunfluoreszenz	49
3.6.2	HLA-E Immunhistochemie.....	50
3.7	Statistik.....	51
3.8	Lösungen, Geräte und Verbrauchsmaterialien	52
3.8.1	Lösungen und Puffer	52
3.8.2	Chemikalien.....	53
3.8.3	Verbrauchsmaterialien.....	54
3.8.4	Geräte.....	54
3.8.5	Antikörper und Sonden	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Typisierung der Ganglien mittels Nested-PCR und Gelelektrophorese.....	56
4.2	Untersuchung der neuronalen Gen-Expression mittels Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion.....	56
4.2.1	MHC-Moleküle.....	56
4.2.2	Inflamationsproteine.....	59
4.3	Immunhistochemische Färbungen.....	62
4.3.1	HLA-A, -B, -C	62
4.3.2	HLA-E	64
5	Diskussion	65
6	Zusammenfassung.....	70

7	Danksagung	71
8	Literaturverzeichnis	72
9	Eidesstattliche Versicherung	79
	Florian Reßle	79
10	Anhang	80
10.1	Abbildungsverzeichnis.....	80
10.2	Tabellenverzeichnis.....	80

Abkürzungen

HSV	Herpes simplex Virus	
HHV	Humanes Herpesvirus	
DRESS	Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
RNA	Ribonukleinsäure	
mRNA	messenger Ribonuclein-Säure	
miRNA	micro Ribonuclein-Säure	
LAT	Latency associated transcript	
Ori	Origin of replication	
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction	
V	Nervus Trigemini	
V1	1. Trigeminiast	Nervus ophthalmicus
V2	2. Trigeminiast	Nervus maxillaris
V3	3. Trigeminiast	Nervus mandibularis
Min	Minuten	
PFA	Paraformaldehyd	
DEPC	Diethylpyrocarbonat	
PBS	Phosphat-buffered-Saline	
PHO	Prähybridisierungspuffer	
MA	Maleinsäure	
AK	Antikörper	
NBT	Nitroblautetrazoliumamid	
Fluo	Fluoreszenzstärke	
M	Molar	
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserum Albumin)	
rpm	rotations per minute	
HS	Heparansulfat	
GAG	Glykosaminoglykane	
ICP	infected cell proteins	
CD	cluster of differentiation	
HDAC	Histondeacetylase	
LSD	Lysinspezifische-Demethylase	
REST	RE1-silencing-transcription-factor	
LAP	latency associated promoter	
TAP	Transporter associated with Antigen Transport	
GLUL	Glutamat Ammonia Ligase	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	
HLA	Human Leucocyte Antigen	
MHC	Major Histocompatibility Complex	
TNF	Tumornekrosefaktor	
IL	Interleukin	
IFN	Interferon	
RANTES	Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted	
CCL5	CC-chemokine ligand 5	
PMD	Post-mortem delay	

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Charakteristika von Viren

Viren sind die einfachsten aller existenten Lebensformen, da sie keinerlei Merkmale einer pro- oder eukaryoten Zelle wie Kern, Mitochondrien oder Ribosomen enthalten und somit nicht selbstständig lebensfähig sind. Sie bestehen lediglich aus genetischer Information in Form von DNA- oder RNA-Molekülen und fakultativ aus Proteinen und Lipiden, welche als Funktionsmoleküle agieren oder eine Hülle bilden können. Sie besitzen keinen eigenen Stoffwechsel oder Replikationsmechanismus und sind deshalb zur Vermehrung obligat auf Wirtszellen angewiesen.

Aus diesem Grund ist es evolutionär sinnvoll, den jeweiligen Wirt nicht zu töten oder ihn in seiner physiologischen Integrität so stark zu stören, dass er nicht mehr als Replikationsreservoir genutzt werden kann. Das heißt, es ist für den Virus von Vorteil möglichst wenig Symptome und Beeinträchtigungen hervorzurufen, um sich so ungestört wie möglich vermehren zu können. Diese Eigenschaft wurde im Laufe der Zeit immer weiter evolutionär verbessert, umso mehr je stärker das Virus mit einem speziellen Wirt verbunden ist und sich an dessen spezifisches Milieu und Eigenschaften anpassen kann. Dies zeigt sich sehr gut an den humanen Herpesviren, da diese in der Lage sind lebenslang in ihrem Wirt zu verbleiben, ohne diesen besonders zu beeinträchtigen. Als Zeichen der starken evolutionären Anpassung und durch Zuhilfenahme molekulargenetischer Methoden konnte gezeigt werden, dass die Familie der Herpesviren sehr alt ist [1, 2].

Eine Ausnahme der viralen Strategie (auch speziell der Herpesviren) stellt dabei die Primärinfektion dar, bei der es zum Teil zu systemischen Symptomen kommen kann (zum Beispiel der Stomatitis aphthosa bei Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) oder den Varizellen bei Varizella-Zoster-Virus (VZV)) [1].

Unabhängig von ihrem evolutionären Entwicklungsstand haben Viren grundsätzlich drei verschiedene Methoden sich in ihrem Wirt parasitär zu vermehren:

- 1) „Hit-and-run“: Hierbei kommt es zu einer fulminanten Infektion des Organismus mit starker Symptomatik. Dadurch ist es dem Virus möglich, massiv im befallenen Organismus zu replizieren und anschließend ausgeschieden zu werden. Durch Neuinfektion sichert sich das Virus so sein Überleben, wird jedoch vom Immunsystem des Wirtsorganismus komplett eliminiert. Beispiele hierfür sind Influenza- sowie Noroviren.
- 2) „Slow-and-low“: Das Virus repliziert konstant im Wirt, aber in einem für das Immunsystem niederschweligen Ausmaß und wird stetig in minimalen Mengen ausgeschieden. Infektion und Persistenz verlaufen asymptomatisch. Ein Beispiel hierfür ist das humane Spumavirus [3].

- 3) Latenz mit Reaktivierung: Es kommt zu einer mehr oder weniger symptomatischen Erstinfektion mit reaktiver Immunantwort. Danach geht das Virus in eine Latenzphase über in welcher es ohne, oder nur in sehr geringem Ausmaß repliziert und in den Zellen des Wirts verbleibt. Dabei bildet dieser zwar ein immunologisches Gedächtnis in Bezug auf das Pathogen aus, es kommt aber zu keiner Eliminierung von selbigem. Diese Strategie verfolgen unter anderem Herpesviren [4].

Unter gewissen Umständen, wie zum Beispiel einem geschwächten Immunsystem, kann es allerdings zu einer Reaktivierung der Infektion kommen. Dabei kommt es zu einer Steigerung der Replikation und Ausscheidung, welche mit klinischer Symptomatik einhergeht. Bessert sich die immunologische Situation kann das Wiederaufleben der viralen Aktivität beendet werden und es etabliert sich erneut eine Latenz [1].

1.2 Die Familie der humanen Herpesviridae

Historisch gesehen leitet sich das Wort Herpes vom altgriechischen „hérpēs“ ab, was mit „schleichen“ oder „kriechen“ übersetzt werden kann. Diese sehr bildhafte Wortwahl geht auf Hippokrates zurück, welcher damit eine veränderliche und wandernde Hauterscheinung beschrieb, deren Merkmale stark typischen, herpetiformen Effloreszenzen ähneln [5]. Im Lauf der Zeit wurden die Beschreibungen immer akkurater, bis sich schließlich Anfang des 19. Jahrhunderts ein deskriptiv, deterministischer Krankheitsbegriff herauskristallisierte. Nun begann die Wissenschaft sich mit der Ätiologie der Erkrankung auseinander zu setzen. So gelang Anfang des 20. Jahrhunderts, mittels Versuchen an Tier und Mensch der Beweis, dass es sich bei Herpes um eine kontagiöse Virus-Erkrankung handelt [5]. In den 1930ern erfolgte der Nachweis, dass rezidivierende Infektionen nur möglich waren, wenn sich im Organismus virus-spezifische Antikörper nachweisen ließen. Das Konzept der Latenz begann sich so zu etablieren. Seither konnten immer tiefer gehende Erkenntnisse über diese Virusgruppe gewonnen werden, auf die im Folgenden eingegangen wird [5, 6].

Die Familie der Herpesviren umfasst 170 bekannte Arten, davon sind acht humanpathogen (diese werden im Folgenden als humane Herpesviren – HHV bezeichnet). Diese humanen Herpesviren werden anhand ihrer Replikationsstrategien, den von ihnen präferentiell infizierten Zelltypen, Pathogenität und *in-vitro*-Verhalten unterteilt. Die weltweite Durchseuchungsrate ist enorm hoch, so sind nahezu 100% der erwachsenen Weltbevölkerung mit mindestens einem Herpesvirus infiziert [1, 7].

Dabei ergeben sich drei verschiedene Gruppen, die sich anhand von Replikationsart und Infektionsspektrum unterscheiden: α -, β - und γ - Viren. Die zelluläre Tropismus-Präferenz

der einzelnen Gruppen wird dabei von Oberflächenproteinen und intrazellulärem Milieu der jeweiligen Zelltypen determiniert [1]. Die Unterschiede sind wie folgt:

- α -Gruppe: sie weist einen schnellen Replikationszyklus und ein breites Wirts- und Zellspektrum auf und etabliert ihre Latenz vor allem in neuronalen Zellen [1].
- β - und γ -Gruppe: sie verfügen über eine langsamere Replikation und ein engeres Wirts- und Zellspektrum (vor allem Drüsen- und Immunzellen) als die α -Viren. Sie etablieren ihre Latenz vor allem in Zellen des angeborenen sowie erworbenen Immunsystems [7].

Der Typus des Virus sagt etwas über seine Struktur (sowohl genomisch als auch mikrobiologisch) sowie über die von ihm verursachten Krankheitsbilder aus. Eine Übersicht über alle HHV stellt Tabelle 1 dar (modifizierte und erweiterte Form nach [1, 8-11]):

Gruppe	Name	Klinik	Primäre Zielzellen	Hauptorte der Latenz
A	HHV1 HSV Typ I (HSV-1)	<ul style="list-style-type: none"> – Herpes labialis – Stomatitis aphtosa – Genitale Ulzerationen – Enzephalitis – Meningitis 	Mukoepitheliale Zellen von Haut und Atemwegen	Neuronale Zellen der sensorischen Ganglien und Hirnnerven
A	HHV2 HSV Typ II (HSV-2)	<ul style="list-style-type: none"> – Herpes labialis – Genitale Ulzera 	Mukoepitheliale Zellen von Haut und Atemwegen	Neuronale Zellen der sensorischen Ganglien und Hirnnerven
A	HHV3 Varizella-Zoster-Virus (VZV)	<ul style="list-style-type: none"> – Varizellen – Herpes Zoster 	Mukoepitheliale Zellen zumeist des oberen Respirationstrakts	Neuronale Zellen der sensorischen Ganglien und Hirnnerven
Γ	HHV4 Eppstein-Barr Virus (EBV)	<ul style="list-style-type: none"> – Infektiöse Mononukleose – Lymphome – Kutane Symptomatik – Haarzelleuko-plakie – Nasopharyngeale Karzinome – Peridontitis 	B-Zellen Epithelien	B-Gedächtniszellen
B	HHV5 Humanes Cytomegalo-Virus (HCMV)	<ul style="list-style-type: none"> – Mononukleose – Kutane Symptomatik – Okuläre Erkrankungen 	Monozyten Lymphozyten Epithelien	Monozyten Lymphozyten
B	HHV6 – A HHV6 – B	<ul style="list-style-type: none"> – Exanthema subitum – DRESS 	T-Lymphozyten Gering in allen kernhaltigen Zellen	Verschiedene Leukozyten
B	HHV7	<ul style="list-style-type: none"> – Keine spezifische Erkrankung – Evtl. Exanthema subitum 	T-Lymphozyten	T-Lymphozyten Epithel der Speicheldrüsen
Γ	HHV8 Kaposi-Sarkom-assoziiertes Virus	<ul style="list-style-type: none"> – Kaposi-Sarkom – Morbus Castleman 	Lymphozyten Epithelien	B-Lymphozyten

Tabelle 1 - Übersicht über die Familie der Herpesviridae

1.2.1 Allgemeine strukturelle Eigenschaften

Die Herpesviren sind große (100-200nm) doppelsträngige DNA-Viren, deren Genom in eine ikosaedrische Proteinhülle, das Kapsid verpackt ist. Dieses besteht aus 162 Oberflächen-Kapsomeren verschiedenen Aufbaus [12]. Dabei handelt es sich um 150 Kapsomere bestehend aus sechs Molekülen einer Proteinspezies, 11 sind Pentamere des selben Proteins und das letzte wird durch den portalen Komplex gebildet [13].

Das Kapsid wird von einer amorphen Proteinhülle, dem Tegument, eingeschlossen. Es besteht aus ungefähr 20 verschiedenen viralen Proteinen. Diese sind unter anderem zuständig für die Adressierung viraler Komponenten zum und vom Nukleus, der Rekrutierung von zellulären Aktivatoren und dem Zusammenbau der viralen Komponenten während des Eintritts in die Zelle und während der lytischen Replikation. Des Weiteren beeinflussen sie das zelluläre und virale Expressionsmuster [14]. Zusätzlich befinden sich im Virion-Partikel verschiedene Wirtszellproteine in speziesspezifischen Mengen. Dabei handelt es sich vor allem um die Proteine Aktin, Hsp 70/90 (Heat shock protein), Enolase, Ezrin/Moesin, β -Tubulin und Annexin [15]. Neben diesen transkribierten Bestandteilen lassen sich auch virale und zelluläre messenger RNAs (mRNAs) und micro RNAs (miRNAs) finden. Diese sind in großer Menge in der Zelle vorhanden, sodass es nicht klar ist, ob sie lediglich zufällig in das Virion gelangen, oder dort vorsätzlich eingeschleust wurden [15].

An das Tegument schließt sich die äußerste Membran, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht mit eingebetteten Polyaminen und Glykoproteinen an. Diese sind wichtig für die Interaktion des Virus mit seiner Umwelt und sind die immunogenen Komponenten des Virions [12, 13]. Die Herpesviren replizieren im Nukleus der Wirtszelle [7].

Das Genom ist artabhängig unterschiedlich sowohl was die Größe (100 bis 240 Kilo-Basenpaare), als auch die Zusammensetzung der Nukleinsäuren (zwischen 45-70% Cytosin-Guanin-Anteil) betrifft. Es enthält artübergreifend ein aus circa 40 Genen bestehendes Grundmotiv. Dieses ist für die Steuerung des aktiven Replikationszyklus und der Latenz verantwortlich [7, 15].

Mit 70-200 open reading frames (ORFs) handelt es sich um eines der komplexesten humanen Virustypen. Es konnte gezeigt werden, dass kodierende Gene mit einer Dichte von einem auf ungefähr 1,5-2 Kilo-Basenpaaren verteilt sind [13]. Sie werden von der RNA-Polymerase II der Wirtszellen transkribiert [16]. Eine Besonderheit der Herpesviren ist die Vielfalt an Promotern innerhalb des Genoms, sodass ein spezifisches Gen singular durch einen zugehörigen Promoter gesteuert werden kann. Zusätzlich gibt es Polyadenylierungsstellen im 3'-downstream Bereich funktionell zusammenhängender Gene, sodass diese kaskadenartig aktiviert werden können. Dies erlaubt dem Virus ein differenziertes Expressionsmuster und

damit eine gute Kontrolle all seiner Lebenszyklen [7, 13]. Die Spannweite der proteinkodierenden Gene liegt im Bereich von 70 des HHV3 bis zu 165 des HHV5 [13]. Introns stellen im Genom der Herpesviren eine Ausnahme dar, sodass es auch nur in sehr geringem Ausmaß zum Splicing der mRNA kommt [17].

Zusätzlich kodiert das HHV-Genom für eine große Anzahl an nicht-kodierenden RNAs, die regulatorische Funktionen erfüllen. Die wichtigsten sind dabei die „Latency associated transcripts“ (LATs) [13]. Auf diese wird im Rahmen der Darstellung der Latenz noch ausführlicher eingegangen. Mit den nicht-kodierenden RNAs ist es dem Virus möglich die infizierten Zellen und damit auch das komplette Immunsystem zu beeinflussen. Die HHV weisen ein komplexes Muster an Interaktionen mit ihrem Wirt auf [1].

Eine typische Eigenschaft der Herpesviren ist unter gewissen Umständen aus ihrer Latenz auszutreten und wieder eine akute Infektion auszulösen. Dieser Vorgang wird als Reaktivierung bezeichnet. Die Ursachen hierfür können unterschiedlich sein, immer jedoch kommt es dabei zu einer Alteration des Immunsystems. So können Reaktivierungen zum Beispiel durch Stress (sowohl physisch als auch psychisch), transiente oder persistente Immundefizienz, UV-Strahlung, Veränderungen im Sexual-Hormonhaushalt oder lokale Traumata entstehen. Auch hohes Alter und ein damit einhergehender progredienter Abbau der Immunkompetenz stellen einen Reaktivierungsgrund dar [1, 6, 18-24]. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer Reaktivierung auch mit der Erregbarkeit der Neurone zusammenhängt. Herrscht ein hohes Erregungsniveau ist die Reaktivierung unwahrscheinlicher [25].

Zusammenfassend zeigt sich, dass Reaktivierung einerseits durch Alteration des Immunsystems, andererseits durch eine generelle Erhöhung der neuronalen Expression gefördert werden kann [7].

1.2.2 Humane Herpesviren

Im Folgenden wird nun auf die einzelnen Humanen Herpesviren, deren Besonderheiten und klinische Bedeutung eingegangen.

HHV3 wird auch als Varizella-Zoster-Virus bezeichnet, namensgebend sind hier die beiden von ihm ausgelösten Krankheitsbilder: Windpocken und Herpes zoster. Er gehört, wie Herpes-Simplex-Viren, zur α -Gruppe, deren Eigenschaften in 1.2 beschrieben worden sind. Die Durchseuchungsrate des Virus ist extrem hoch (bis zu 95%) [26].

Die Infektion erfolgt in fast allen Fällen innerhalb der ersten 15 Lebensjahre. Sie ist insgesamt in gemäßigten Klimazonen häufiger, mit einem erhöhten Auftreten im Winter und Frühling. Die Übertragung erfolgt entweder durch Kontakt mit virusreicher Flüssigkeit aus akutem

Exanthem oder aerogen. Bedingt durch die immense Kontagiosität kommt es bei Kontakt in fast 35-90% der Fälle zur Transmission und Infektion. Diese verläuft immer klinisch apparent [27]. Nach der Infektion kommt es zur Replikation in der respiratorischen Mukosa der oberen Atemwege. Nach 10-21 Tagen Inkubationszeit tritt das typische disseminierte makulopapulöse Exanthem begleitet von Fieber auf. Eine der Besonderheiten des VZV ist sein T-Zell-Tropismus. Die T-Zellen werden im lymphatischen Gewebe des Waldeyerschen Rachenrings infiziert. Anschließend kommt es zur hämatogenen Virusstreuung in die Haut und zur Infektion der Keratinozyten, woraus das Exanthem resultiert. Die Erkrankung ist normalerweise selbstlimitierend [9, 26].

Nach der akuten Infektion wird das Virus mittels retrogradem axonalem Transport in sensorische Ganglien transportiert. Dort verbleibt es in lebenslanger Latenz.

Vor allem bei einem geschwächten Immunsystem (Alter, Immundefizienz) kann es zur Reaktivierung der Infektion kommen, woraus das Krankheitsbild des Herpes Zoster (Gürtelrose) resultiert. 70% der Erkrankungen erfolgen dabei bei Älteren, das heißt jenseits des 50. Lebensjahres. Die Symptomatik umfasst ein Dermatom bezogenes makulopapulöses Exanthem mit assoziierten, sehr starken Schmerzen. Die Erkrankung ist meist selbstlimitierend, nicht selten kommt es jedoch anschließend zu Komplikationen in Form der Post-Zoster Neuralgie [9, 26, 27].

Seit 1995 steht ein attenuierter Lebend-Impfstoff gegen VZV zur Verfügung. Dabei ist zu beachten, dass auch nach einer Impfung eine virale Latenz etabliert wird und es so auch zu Zoster-Reaktivierungen kommen kann. Das Risiko hierfür ist jedoch um ein vielfaches geringer als nach durchgemachter Infektion [28].

HHV4 wird auch als Epstein-Barr-Virus (EBV) bezeichnet und zeigt weltweit eine Durchseuchungsrate von 90% bei Erwachsenen [29]. Es infiziert primär B-Zellen, aber auch Epithelien. Seine Latenz etabliert das Virus anschließend in B-Gedächtnis-Zellen, hierbei spielt vor allem das virale Protein EBNA-1 eine Rolle [8, 29]. Es wird durch direkten Kontakt mit Speichel, vor allem in der Adoleszenz übertragen (zum Beispiel durch Küssen, daher der Name „kissing disease“).

Nur in einem kleinen Teil der Primärinfektionen kommt es zu einem akuten Krankheitsbild [29]. Dieses stellt sich als infektiöse Mononukleose oder Pfeiffersches Drüsenfieber dar. Eine Erkrankung, welche mit Allgemeinsymptomatik wie Fieber, Abgeschlagenheit und generalisierter Lymphadenopathie einhergeht. Zusätzlich ist EBV ein Karzinogen und geht mit zahlreichen Lymphomformen (wie dem Burkitt-Lymphom, Non-Hodgkin- und Hodgkin-Lymphomen, Magenkarzinomen sowie nasopharyngealen Karzinomen) einher [1, 29]. Bei

Immundefizienten spielt es ebenfalls in der Entstehung von Haarzelleukoplakien und Peridontitis eine Rolle [8].

Eine Besonderheit von EBV ist, dass es für ein virales Analogon zum humanen IL-10 kodiert, welches als vIL-10 bezeichnet wird. Dieses wirkt proinflammatorisch vor allem auf B-Lymphozyten, was die Vermehrung des Virus erleichtert. Dies zeigt die komplexe Interaktion von Herpesviren mit ihren Wirten [8].

HHV5 wird auch als Humanes Cytomegalovirus (HCMV) bezeichnet. Es zeigt eine weltweite Durchseuchungsrate von 50-90% [30]. Die akute Infektion verläuft entweder asymptomatisch, oder geht mit milder Allgemeinsymptomatik einher [30]. Es infiziert primär Lymphozyten und Monozyten, sowie Epithelien. In den oben genannten Zellen der Immunabwehr kommt es anschließend zur Latenzetablierung [1].

Die Persistenz von HCMV in Endothelien und endothel-assoziierten Makrophagen spielt bei der Entstehung von Arteriosklerose und zugehörigen Erkrankungen, wie der koronaren Herzerkrankung, eine Rolle [8, 31]. Es kann vor allem bei Immundefizienten (HIV/AIDS, Transplantationen, Chemotherapie) zu Reaktivierungen des Virus kommen [32]. Da HCMV wie auch EBV onkogenes Potential aufweist, spielt es in diesen Fällen bei der Entstehung verschiedener tumoröser Erkrankungen wie Brust-, Hirn-, Kolon-, Prostata- und Speicheldrüsen-Krebs eine Rolle [30]. Die kongenitale HCMV-Infektion spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Geburtsdefekten [1].

HHV6 umfasst zwei distinkte Virusstämme, 6A und 6B. Die weltweite Durchseuchungsrate ist sehr hoch und beträgt bei Kindern bis zum 2. Lebensjahr 90% [33]. Das Virus infiziert primär T-Lymphozyten, kann aber auch über das ubiquitär vorhandene Oberflächenprotein CD46 in geringem Ausmaß alle kernhaltigen Zellen infizieren [11]. Die beiden Virusstämme unterscheiden sich anhand ihres Pathogenitätsmusters. Dabei spielt HHV6A wahrscheinlich hauptsächlich eine Rolle bei Immundefizienz-Erkrankungen, es wird unter anderem ein synergistischer Effekt mit der HIV-Infektion vermutet [5, 11]. HHV6B hingegen löst die typische Erkrankung des Exanthema subitum aus. Es wird davon ausgegangen, dass HHV6 eine Rolle bei einer Vielzahl von Erkrankungen spielt [11]. Das Virus persistiert in verschiedenen T-Lymphozyten [1]. Eine Besonderheit des HHV6 ist, dass es die Fähigkeit besitzt sein Genom dauerhaft in das des Wirts zu integrieren. Das heißt, dass ungefähr 1% der Weltbevölkerung ein Vererbungsträger für HHV6 ist [8].

Die Primärinfektion wird in der Regel klinisch manifest, im Großteil der Fälle jedoch lediglich durch Allgemeinsymptomatik. Nur bei ungefähr einem Viertel der Fälle zeigt sich die HHV6-spezifische Erkrankung des Exanthema subitum [33].

HHV7 weist mit einer Infektionsrate von über 85% eine sehr hohe Durchseuchung auf [34]. Der primäre Oberflächenrezeptor, den HHV7 als Eintrittspforte benutzt, ist CD4. Dementsprechend infiziert es hauptsächlich T-Zellen. In diesen etabliert es auch seine Latenz, zusätzlich jedoch noch in Epithelien, vor allem der der Speicheldrüsen [1, 10]. Ebenfalls konnte ein Neurotropismus des Virus gezeigt werden [34].

Es ist bisher nicht bekannt, dass HHV7 ursächlich für eine spezifische Erkrankung ist, spielt wahrscheinlich jedoch eine Rolle bei fast allen von HHV6 ausgelösten Pathologien [34].

HHV8 wird auch als Kaposi-Sarkom-assoziiertes Virus bezeichnet. Es ist das am wenigsten verbreitete Herpesvirus, mit einer weltweiten Durchseuchung von lediglich 10%. Die Übertragung erfolgt über Speichel, meist erst im Adoleszenz- und Erwachsenenalter. Ebenfalls wird über eine sexuelle Übertragung spekuliert. Es infiziert primär Lymphozyten und Epithelien, in welchen es auch persistiert [1].

HHV8 ist ursächlich für die Entstehung des Kaposi-Sarkoms, welches sehr typisch für das Vollbild der AIDS-Erkrankung ist. Dies deutet darauf hin, dass, wie bei anderen Herpesviren, eine Immundefizienz eine entscheidende Rolle bei der Reaktivierung spielt [11]. Ebenso ist es ein Faktor bei der Entstehung des Morbus Castleman [8].

1.3 Herpes simplex Virus Typ I

1.3.1 Charakteristika der Herpes simplex Viren

Es gibt zwei verschiedene Herpes simplex Viren, Typ 1 (HSV-1) und Typ 2 (HSV-2). Diese sind sehr eng miteinander verwandt und weisen eine genomische Homologie von 70% auf [12]. Für beide stellt der Mensch das einzige natürliche Erregerreservoir dar. Im Folgenden wird hauptsächlich auf HSV-1 eingegangen, da dieses die entscheidende Rolle bei der Bearbeitung der Fragestellung dieser Arbeit spielt. HSV-1 ist mit einer weltweiten Seroprävalenz von 80-90% ein außerordentlich bedeutendes Pathogen [12, 35]. Geographische Lage, sozioökonomischer Status, Geschlecht und Alter haben Einfluss auf die HSV-1 Infektionsrate. Dabei zeigt sich, dass niedriger sozioökonomischer Status, weibliches Geschlecht, hohes Alter und ein Leben in einem weniger entwickelten Land prädisponierend für eine HSV-1 Seropositivität sind [6]. Die Prävalenz von HSV-1 Positiven steigt mit höherem Alter stetig an, der eindeutig stärkste Anstieg ist jedoch in der Kindheit zu beobachten [36]. In letzter Zeit konnte ein Absinken der HSV-1 Verbreitung vor allem in hochtechnologisierten Ländern beobachtet werden, welche auf verbesserte Hygiene zurückzuführen ist. Ebenso zeigt sich eine immer später im Leben auftretende Primärinfektion. Die HSV-2 Seroprävalenz steigt hingegen, wahrscheinlich aufgrund des sexuellen Übertragungsweges, stetig an [18, 37].

Die Übertragung erfolgt durch direkten Kontakt mit virusausscheidenden Personen. Da HSV-1 zu sehr häufigen Reaktivierungen neigt, kann man davon ausgehen, dass mehr als ein Drittel der Weltbevölkerung als Überträger dienen kann.

1.3.2 Struktur der Herpes simplex Viren

Auf den allgemeinen Aufbau der Herpesviren wurde schon in 1.2.1 eingegangen. Hier sollen nun noch einmal HSV-1 spezifische Eigenschaften aufgezeigt werden.

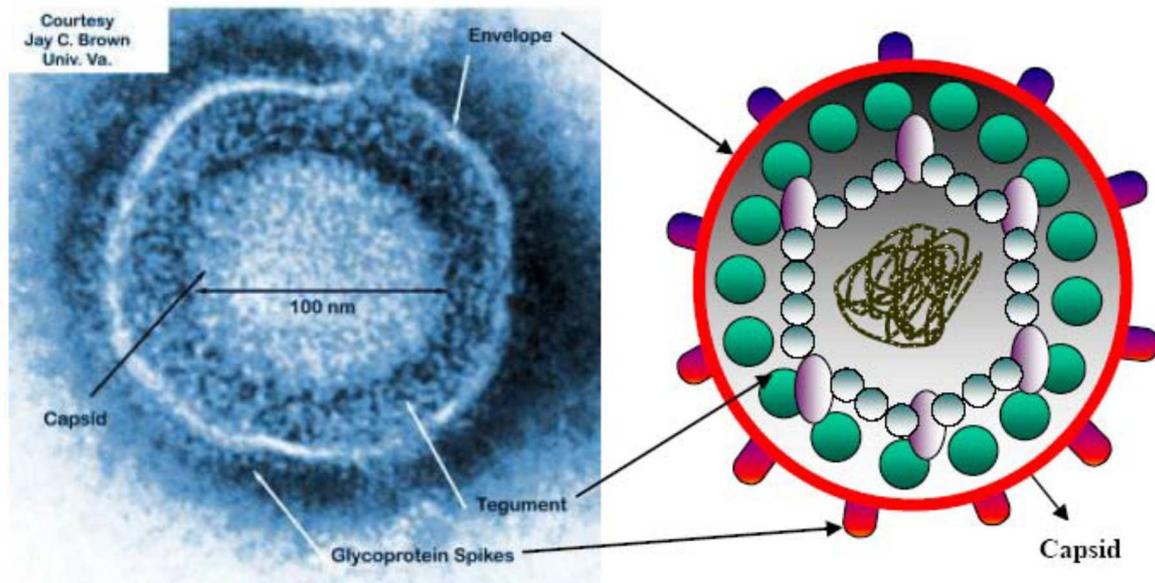


Abbildung 1 – Herpes simplex Virus Typ I

Links ist eine elektronenmikroskopische Darstellung gezeigt; Rechts eine schematische Darstellung (Courtesy Jay C. Brown Univ. Va.)

Das HSV-1 Genom besteht aus mindestens 152 Kilo-Basenpaaren, kann aber aufgrund alternierender Wiederholungszahlen, spezifischer Termini und interner Sequenzen auch größer sein. Es besteht aus zwei kovalent verknüpften Anteilen, die als Long- (L) und Short-Region (S) bezeichnet werden. Jede Komponente besteht aus einer „unique-sequence“ (U), welche als U_L - beziehungsweise U_S bezeichnet wird. Diese werden von relativ langen, umgekehrten Wiederholungs-Regionen flankiert. U_L wird von der Sequenz $a'b'$ und ba umschlossen. U_S von $a'c'$ und ca , sodass sich insgesamt ein Motiv wie folgt ergibt: $a-U_Lb'a'c'-U_S-ca$. Die beiden Komponenten können relativ zueinander verkehrt herum vorliegen. So gibt es also maximal vier verschiedene Konformationen der HSV-1-DNA Struktur [6, 38].

Das Genom kodiert für mindestens 84 Polypeptide. Ihre Gene befinden sich an verschiedenen Stellen: 14 auf U_S , 1 in den U_S -flankierenden Sequenzen, 65 in U_L und 4 in den U_L -flankierenden Regionen. Die Gene, die in den repetitiven Sequenzen kodiert sind, liegen jeweils als Duplikate vor [6]. Das virale Genom enthält drei „origins of replication“ (Ori). Es gibt zwei Oris, die die „short unique sequence“-Ablesung initiieren. Sie befinden sich in der

repetitiven c-Region und werden als Ori_S bezeichnet. Ori_L, zuständig für die Initiation der „long unique region“, befindet sich innerhalb selbiger [6]. Von den 84 kodierten Proteinen sind 45 nicht für den Vorgang der viralen Vermehrung essentiell, nichtsdestotrotz sind sie teilweise unverzichtbar. Sie haben verschiedenste regulatorische Aufgaben, sowohl was die optimale Vermehrung des Virus, als auch die Beeinflussung von Zelle und Immunsystem betrifft [6].

1.3.3 Klinische Bedeutung

HSV-1 Reaktivierungen, unabhängig von Häufigkeit und Schwere, führen zu keinen bleibenden sensorischen Defiziten. Dies deutet darauf hin, dass keine beziehungsweise wenige Neurone abgetötet werden, oder ihre Funktion irreversibel verlieren [12].

1.3.3.1 Epitheliale Erkrankungen

Herpesviren sind in der Lage Epithelzellen von Mukosa und Haut zu infizieren und dort in einen lytischen Infektionszyklus einzutreten (siehe 1.3.4.). Hieraus resultieren die typischen Herpes-Läsionen wie Lippenherpes (*Herpes labialis*) oder Genitalherpes (*Herpes genitalis*). Diese Pathologien sind meist selbstlimitierend und heilen nach 8-10 Tagen ab. Es ist jedoch zu beachten, dass auch einige Tage nach Ende der klinischen Symptomatik noch eine orale Virausscheidung besteht [39]. Die oro-genitale Symptomatik stellt sich wie folgt dar: Nach Primärinfektion oder Reaktivierung entstehen zuerst Oberflächendefekte an der Haut. Aus diesen entwickeln sich vesikuläre Bläschen, welche mit seröser Flüssigkeit gefüllt sind, die eine große Anzahl an Viruspartikeln enthält. Dies stellt einen der Hauptübertragungswege der Viren dar. Nach einer Umwandlung in pustuläre, schließlich verkrustende Strukturen, kommt es zur Abheilung. Begleitend können zervikale Lymphadenopathien, Brennen, Parästhesien und Dysphagie auftreten. Dies ist vor allem bei disseminierten Läsionen wie im Rahmen der Stomatitis aphtosa der Fall [39]. Die Symptomatik kann rekurrent immer wieder auftreten, dabei ist jedoch zu beobachten, dass je länger eine Infektion besteht, desto weniger häufig kommen Reaktivierungs-Episoden vor und desto weniger schwer verlaufen diese. Erstaunlicherweise sind nur 15-40% der Seropositiven jemals von einer Herpes-Reaktivierung betroffen [39]. Der Genitalherpes zeigt weniger Tendenz zu Reaktivierungen, asymptomatische Dauerausscheider sind zahlreicher [1]. Wo früher vor allem HSV-2 für Genitalherpes verantwortlich war, ist heutzutage der Großteil desselbigen durch HSV-1 ausgelöst [1, 40].

Neben den Läsionen an Mukosa sind auch solche an Fingern und Zehen möglich, welche auch als Herpetic whitlow bezeichnet werden [6]. Sie entstehen durch Autoenuklation an

geschädigter Epidermis und stellen eine mögliche Komplikation (durch Virusverschleppung) einer oralen oder genitalen Infektion dar. Das Krankheitsbild ist durch ein abruptes Auftreten von Ödem und Ekzem mit initial vorhandenen kleinen Vesikeln gekennzeichnet, die zusammenschmelzen und schließlich verschwinden. Begleitet sind die Läsionen durch einen dem körperlichen Befund unangemessen starken Schmerz. Die Erkrankung ist selbstlimitierend und heilt in 2-3 Wochen ab. Rekurrente Episoden sind mit 30-50% recht häufig [41].

Außerdem ist es HSV-1 möglich respiratorische Epithelien zu infizieren. Dies kann zu atypischen Bronchitiden und Pneumonien führen [8]. Eine HSV-1 Assoziation zeigte sich vermehrt im Zusammenhang mit dem Acute respiratory distress syndrom (ARDS) [6].

1.3.3.2 Neonatale Erkrankungen

30-65% der Schwangeren weisen genitale Infektionen mit HSV-1 oder -2 auf, davon lässt sich bei ungefähr 10% eine aktive Virusausscheidung nachweisen. Es werden anhand des Zeitpunkts der Krankheitsmanifestation verschiedene Formen des frühkindlichen Herpes unterschieden. Der neonatale Herpes tritt innerhalb von 28 Tagen post partum auf. Seine Inzidenz liegt bei circa 12/100.000/Jahr und ist damit höher als die der kongenitalen Syphilis, der Toxoplasmose oder der kongenitalen Röteln [42].

Die meisten Infektionen erfolgen intrapartem im Geburtskanal, aber auch eine Übertragung in utero und postnatal durch Kontakt mit virusausscheidenden Personen (zum Beispiel bei Lippenherpes) ist möglich. In diesem Fall ist fast ausschließlich HSV-1 für die Infektionen verantwortlich. Das Übertragungsrisiko bei intragravidär neuinfizierten Schwangeren ist mit 25-50% wesentlich höher, als jenes zum Zeitpunkt der Schwangerschaft bereits seropositiven Frauen (<1%). Es wird vermutet, dass dies auf maternale, diaplazentar ans Kind weitergegebene Antikörper zurückzuführen ist. Die Prävalenz der neuinfizierten Frauen ist zwar wesentlich geringer als die der latent Infizierten, durch die höhere Transmissionsrate machen diese Fälle jedoch 50-80% aller neonatalen HSV-1 Infektionen aus. Aktiv virusausscheidenden Frauen wird um eine kindliche Infektion intravaginal zu verhindern, zu einer Sectio caesarea geraten [42].

Kongenitale Infektionen sind selten und gehen mit kindlichen Anomalien wie Mikrocephalie, Chorioretinitis und Hydrocephalus einher. Das Krankheitsbild des neonatalen Herpes lässt sich anhand des Befallmusters in drei Kategorien einteilen. Mit 45% am häufigsten ist die auf die Haut, Mukosa und Augen beschränkte Infektion, ohne Beteiligung innerer Organe. Hierbei kommt es am ganzen Körper zu vesikulären Hauteffloreszenzen. Unter systemischer antiviraler Therapie ist das klinische Outcome jedoch gut, wobei diese Kinder später anfälliger

gegenüber kutanen Reaktivierungen sind. 30% der Infektionen betreffen das zentrale Nervensystem und gehen mit Lethargie, Anfällen und Trinkschwäche einher. Hier sind Hautaffektionen fakultativ. Das Outcome ist selbst unter hochdosierter Therapie eher schlecht, es kommt nämlich in 50% der Fälle zu neurologischen Residuen wie Epilepsie, Entwicklungsverzögerungen oder kognitiven Defiziten. Die schwerste, mit 25% jedoch auch seltenste Verlaufsform, geht mit einer disseminierten Infektion mit Befall multipler Organe einher. Klinisch lässt sie sich nicht von einer bakteriellen Sepsis abgrenzen. Die Letalität ist selbst unter hochdosierter antiviraler Therapie hoch [42].

1.3.3.3 Okuläre Erkrankungen

HSV-1 kann sowohl das okuläre Stroma als auch das Epithel infizieren und stellt eine der weltweit führenden Ursachen für infektiöse Erblindung (meist durch Kornea-Trübung) dar. Die globale Inzidenz des durch HSV-1 ausgelösten Sehverlusts liegt bei 3,75 Millionen (100.000 Neuerblindungen/Jahr). Obwohl die Inzidenz der okulären HSV-1 Infektion weltweit steigt, sinkt die Erblindungsrate durch stetig besser werdende Behandlungsmöglichkeiten.

Grundsätzlich können sowohl HSV-1 wie auch -2 Infektionen des Auges auslösen, HSV-1 ist jedoch wesentlich häufiger. Es kann zu Konjunktividen, Iridocyclitiden, Keratitiden und akuten Retina-Nekrosen kommen. In fast allen Fällen werden diese Krankheitsbilder durch Reaktivierung aus Neuronen des N. trigeminus ausgelöst, aus solchen die die Cornea innervieren. Zusätzlich kann es zur Reaktivierung in Keratinozyten kommen [43].

Die klinisch relevanteste Erkrankung ist der Herpes corneae / Keratitis herpetica. Es wird eine epitheliale Keratitis (häufiger) von der stromalen Keratitis (seltener und schwerer) unterschieden [19]. Das auslösende Moment ist entweder eine Reaktivierung oder eine Kontakt-Infektion. Die epitheliale Form beginnt als punktuelle Läsion und schreitet schließlich zur Keratitis dendritica, eine sich verzweigende, destruierende Infiltration fort. Der Schaden wird durch das Virus an sich, sowie durch die immunologische Reaktion, welche vor allem aus einer CD4-Antwort besteht, verursacht. Es wird eine nicht-nekrotisierende (korneales Ödem, selbstlimitierend) von der nekrotisierenden Form (korneale Infiltrate und disseminierte Inflammation) unterschieden. Beide können jedoch zu Neovaskularisation und Vernarbung in der Kornea und damit zu Sehverlusten führen [18, 19].

1.3.3.4 Nervale Erkrankungen

Die Herpes-Enzephalitis ist die häufigste Entität der spontanen, infektiösen Enzephalitiden (20% aller Fälle) [44]. In 90% der Fälle stellt HSV-1 den auslösenden Erreger dar [12]. HSV-

2 kommt hauptsächlich bei Neugeborenen und Immundefizienten vor [45]. Die Inzidenz beträgt 1/250.000-500.000/Jahr.

Das Virus befällt vor allem Temporal- und/oder Frontallappen, in seltenen Fällen ist der Hirnstamm mitbetroffen. Obwohl die Entzündung meist unilateral auftritt, ist auch ein gleichzeitiger bilateraler Befall möglich. Die Ätiologie der Erkrankung ist noch nicht genau verstanden, es gibt jedoch verschiedene Theorien: 1. trigeminale Reaktivierung mit retrograder Streuung der Viren ins Gehirn entlang des Nervus Trigemimus, 2. zerebrale *in situ* Reaktivierung, da latentes HSV-1 in dortigen Neuronen nachgewiesen werden konnte, 3. Neuinfektion des Gehirns über den Nervus olfactorius oder trigeminus [12]. Damit ist noch nicht endgültig geklärt, ob es sich eher um eine Reaktivierung oder eine primäre oder sekundäre Infektion handelt [44].

Als Prodromus kann eine Infektion des oberen Respirationstrakts auftreten, die dann vom hochakuten Krankheitsbild der HSV-1-Enzephalitis gefolgt wird. Fieber und Cephalgien treten als Allgemeinsymptomatik auf und sind fast immer vorhanden. Spezifischer sind Defizite, die durch Ausfälle in betroffenen Gehirnarealen hervorgerufen werden, wie Persönlichkeitsveränderungen, kognitive Einschränkungen, Verhaltensauffälligkeiten, Aphasie, Krampfanfälle sowie fokale neurologische Defizite [12].

Bei der Behandlung ist eine schnelle, schon bei Verdacht zu beginnende intravenöse antivirale Therapie essentiell. Die Mortalität liegt unbehandelt bei 70%, und kann durch eine schnelle und effektive Therapie auf ungefähr 30% reduziert werden. Jedoch weist ein Großteil der Überlebenden neurologische Residuen, wie kognitive Einschränkungen auf. Insgesamt kann derzeit ein Sinken der Mortalität beobachtet werden [12, 44].

Neuritiden und Funktionsverluste von Hirnnerven

HSV-1 kann in Zellen des Ganglion vestibularis nachgewiesen werden. Es steht mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit in Zusammenhang mit einer durch Reaktivierung ausgelösten Neuritis Nervi vestibularis. Hierbei kommt es zu Störungen des Gleichgewichts und Nystagmen. Ätiologisch ist eine Anastomose zwischen dem Nervus intermedius des Nervus facialis und dem N. vestibularis superior, durch welche es zu einer Einwanderung von Herpesviren in das Ganglion vestibularis kommt, ausschlaggebend [46, 47].

Bei der idiopathischen Fazialisparese handelt es sich um ein akutes Krankheitsbild, welches mit einem meist unilateralen Ausfall der mimischen Muskulatur einhergeht. Dieser ist in 70% selbstlimitierend und heilt mit einer Komplettremission aus. In 30% der Fälle bleiben jedoch zum Teil schwerwiegende Residuen wie andauernde Paralyse und Schmerzen zurück. Bis jetzt ist noch nicht geklärt, ob HSV-1 die entscheidende Rolle als infektiöses Pathogen spielt.

Verschiedenen Studien zufolge kann das Krankheitsbild auf eine Neuritis des N. facialis, ausgelöst durch eine virale Reaktivierung im Ganglion geniculi, zurückgeführt werden. Andere Studien zeigen jedoch keinen kausalen Zusammenhang zwischen HSV-1 und dem Nervenausfall. Eine Tatsache, die unter anderem dadurch bestärkt wird, dass eine antivirale Therapie zu keiner wesentlichen Verbesserung führt [47, 48].

1.3.3.5 Einsatz als Vektor

Neuere Untersuchungen fokussieren sich auf die Möglichkeiten des Einsatzes von Herpesviren als therapeutischen Vektor. HSV-1 ist dazu prädisponiert, da man sehr genaue Kenntnis über seine Funktionsweise, Interaktion mit Zellen und Vermehrungsmechanismen besitzt, so also genau prognostizieren kann, wie und in welche Zellen das zu transportierende Material eingebracht werden kann. Des Weiteren spielt das virale Genom eine Rolle. Hiervon kann bis zu 10% deletiert oder durch andere Gene ersetzt werden, ohne dass das Virus dadurch beeinträchtigt wird. So könnte das Virus zur lytischen Zerstörung von nervalen Tumoren, wie dem Glioblastom, eingesetzt werden [49].

1.3.4 Eindringen des Virus in Wirtszelle

Für HSV-1 konnten bisher zwei verschiedene Infiltrationsstrategien gezeigt werden: 1. die direkte Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran, oder 2. die von einem sauren Milieu abhängige Endozytose und anschließende Fusion der Virushülle mit der Membran des Endosoms [50].

Das Virus ermöglicht sich den Eintritt in die Zelle, indem es mit seinen Glykoproteinen mit Oberflächen-Rezeptoren der Wirtszellen interagiert. Davon sind bisher 10 bekannt: gB bis gM. gB und gC sind verantwortlich für das Andocken an die Zelle. Dies geschieht über eine Bindung an zelluläre Proteoglykane, präferentiell Heparansulfat (HS) und Glykosaminoglykane (GAG). gD ist das Glykoprotein, welches mit zellulären Rezeptoren interagiert. Damit ist es für den Tropismus der einzelnen Herpesviren entscheidend. Zusammen mit einem Heterodimer, bestehend aus gH/gL, führt es zur Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran. Die Glykoproteine B, G, H und L sind für ein Eindringen der Viruszelle essentiell [49].

Gleichzeitig sind die viralen Oberflächenproteine auch Angriffsstellen des Immunsystems und besonders gE und gI bilden einen sehr potenten Fc-Antikörper-Rezeptor. gE spielt ebenfalls eine Rolle beim intrazellulären Transport des Virions und sorgt für eine effektive Expression der gamma-Gene [6, 49, 50].

1.3.5 Aktive Infektion und Replikation

Die Infektion erfolgt meist schon in der Kindheit bei Kontakt mit virusausscheidenden Personen. Sie betrifft die orofaziale Mukosa und verläuft in den meisten Fällen asymptomatisch. Falls es zu einem tatsächlichen Krankheitsausbruch kommt, äußert sich dieser mit singulären oder multiplen (Stomatitis aphthosa) herpetiformen Läsionen [6, 36].

Das Virus repliziert in parabasalen und intermediären Epithelzellen und führt makroskopisch zu vesikulären Strukturen, welche rupturieren und anschließend verschorfen. Die virale Replikation hat verheerende Folgen für die Zellintegrität. Die Chromosomen werden an den Rand des Zellkerns gedrängt und fragmentieren schließlich. Der Golgi-Apparat wird zerstört und das zelluläre Mikrotubuli-Gerüst umgebaut. Dies alles ist darauf ausgelegt, eine möglichst gute Umgebung für die virale Vermehrung zu schaffen und die zellulären Abwehrmechanismen auszuschalten. Insgesamt zeigt sich ein Anschwellen der Zellen und Degeneration ihrer Strukturen. Histopathologisch ist ein Verlust der Integrität der Plasmamembran und multinukleärer Zellen zu erkennen. Kommt es schließlich zur Lyse der Zelle, tritt eine seröse Flüssigkeit in das dermale-epidermale Grenzgebiet aus, welche eine große Anzahl an Viruspartikeln enthält. Begleitend kommt es zu einer starken Inflammation in den oberen Dermissschichten (hauptsächlich dem Corium) [6].

Die lytische Infektion zeigt speziesübergreifend immer denselben Ablauf und führt zur Apoptose der Wirtszelle. Dabei zeigt sich eine zeitliche Kaskade, welche in vier Unterschritte gegliedert werden kann [1, 7]:

Alpha-Gene (α -Gene): Diese sogenannten frühen Gene werden am Anfang transkribiert und translatiert. Hierzu zählen: ICP0, 4, 22, 27, 47 und Us1.5. Alle diese Gene haben das „TAATGARAT VP16-response element (VRE)-Motiv“ in ihren Promotern. VP16 ist ein im Tegument befindliches Struktur-Protein. Durch die Hochregulierung der Expression der α -Gene spielt es eine wichtige, aber nicht entscheidende Rolle beim Eintritt in den lytischen Zyklus. Die α -Gene sind Voraussetzung für die Expression der darauffolgenden beta-Gene. Alle α -Gene dienen (bis auf ICP47 – siehe 1.3.4.) dazu die Zelle auf die Virus-Replikation vorzubereiten und diese zu regulieren. Dabei wird die zelluläre Transkriptionsmaschinerie angeworfen und es kommt zu einer vermehrten Bildung viraler Proteine, sowie zur verminderten von zellulären. Dabei spielen ICP0 und ICP4 eine entscheidende Rolle, indem sie effektiv und weitgreifend zelluläre Repressoren abschalten und die virale Transkriptionsmaschinerie verstärken, ohne die ein Eintritt in den lytischen Replikationszyklus nicht möglich wäre [6, 51, 52]. Dies spiegelt sich in den β -Genen wieder, welche zeitlich nach den α -Genen abgelesen werden.

Andere Tegument-Proteine haben ebenfalls entscheidenden Einfluss auf die Replikation, auf welche in 1.3.4. näher eingegangen wird.

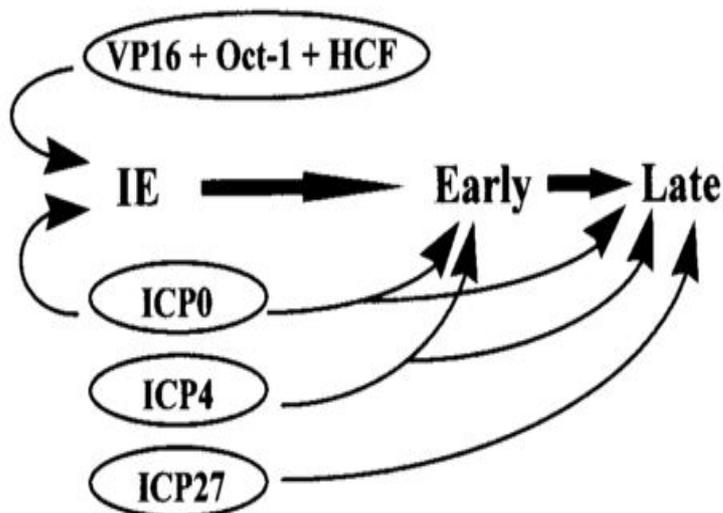


Abbildung 2 - Promoter Kaskade (aus Everett 2000)

„single-strand DNA-binding-protein“ (ICP8/UL29), eine DNA-Polymerase mit zwei Untereinheiten (Pol und UL42), sowie einem dreiteiligen Helikase-/Primase-Komplex (UL5, UL8 und UL52). Das siebte, für HSV-1 spezifische Protein ist UL9, dieses bindet an die für die Replikation entscheidenden „origins of replication“, ist also für die Initiierung von Bedeutung [38, 53].

Die tatsächliche DNA-Vervielfältigung erfolgt im zellulären Nukleus. Dort entstehen globuläre Strukturen, die Replikationszentren, in denen DNA in Form der sogenannten „rolling circle replication“ erzeugt werden, aber auch das Schneiden und Verpacken der viralen Strukturen erfolgt (siehe unten). Man geht davon aus, dass ein einzelnes virales Genom zur Entstehung eines Replikationszentrums führt. Diese können sowohl ihre Ausdehnung als auch Lokalisation ändern und sind in der Lage miteinander zu verschmelzen [38]. Zusätzlich kodieren die β -Gene auch für einige Glykoproteine der Virushülle [13].

Gamma-Gene (γ -Gene): Diese können weiter unterteilt werden in γ -1 („leaky late“, zum Beispiel Glykoprotein B) und γ -2 Gene [51]. Hier werden nun virale Strukturproteine (für Kapsid und Tegument) und solche, die für die Virionassemblierung von Bedeutung sind, kodiert, und in massivem Umfang in der Zelle produziert, zum Beispiel VP16, gD und gC [54].

Es wird intranukleär ein Prokapsid aus Gerüst- und Kapsid-Proteinen gebildet. Das Gerüst besteht aus einer Protease und ihrem Substrat, welches diese im Laufe der Assemblierung

Beta-Gene (β -Gene): Diese stellen vor allem die Proteine und Enzyme dar, welche für die DNA-Replikation benötigt werden [6]. Die Transkriptionsmaschinerie besteht aus sieben Replikationsproteinen, von denen sechs essentiell sind und in allen Herpesviren konserviert vorkommen.

Dabei handelt es sich um das

spaltet. Darin wird die in passende Stücke geschnittene DNA verpackt. Das Virion lagert sich an der nukleären Membran an, in welche es sich einhüllt, um dann in den intermembranösen Raum des Zellkerns zu gelangen. Hier werden die Virionen in Transport-Vesikel, bestehend aus Fragmenten der Golgi-Membran, geladen und aus der Zelle ausgeschleust. Dieser Vorgang dauert insgesamt ungefähr 18 Stunden [6].

Nach der Infektion dringen die Viren in die sich peripher verzweigenden Axone sensorischer Neurone ein und werden retrograd zum Perikaryon transportiert. Dabei können weite Strecken über synaptisch verbundene Nervenzellen zurückgelegt werden. Dadurch erklärt sich auch wie Herpesviren in zentrale, nervale Strukturen gelangen können und warum Virusmaterial in Gehirnzellen nachgewiesen werden kann. Meistens werden nur Kapside des HSV-1 in Ganglien befördert, manchmal können es jedoch auch komplette Viruspartikel sein. Der Transport wird mittels Dynein-Motorstrukturen bewerkstelligt und erfolgt mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 2 $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$ [55]. Nach Erreichen der Neurone etabliert sich nach einer eventuell auftretenden kurzen Phase der erneuten Replikation, die virale lebenslange Latenz [6, 56].

Die folgende Grafik, modifiziert nach Mettenleiter 2009, stellt schematisch den Ablauf vom Eindringen des Virus in die Zelle, dessen Replikation und anschließende Freisetzung dar. Zusätzlich sind die einzelnen Schritte mit elektronenmikroskopischen Bildern dargestellt [15]:

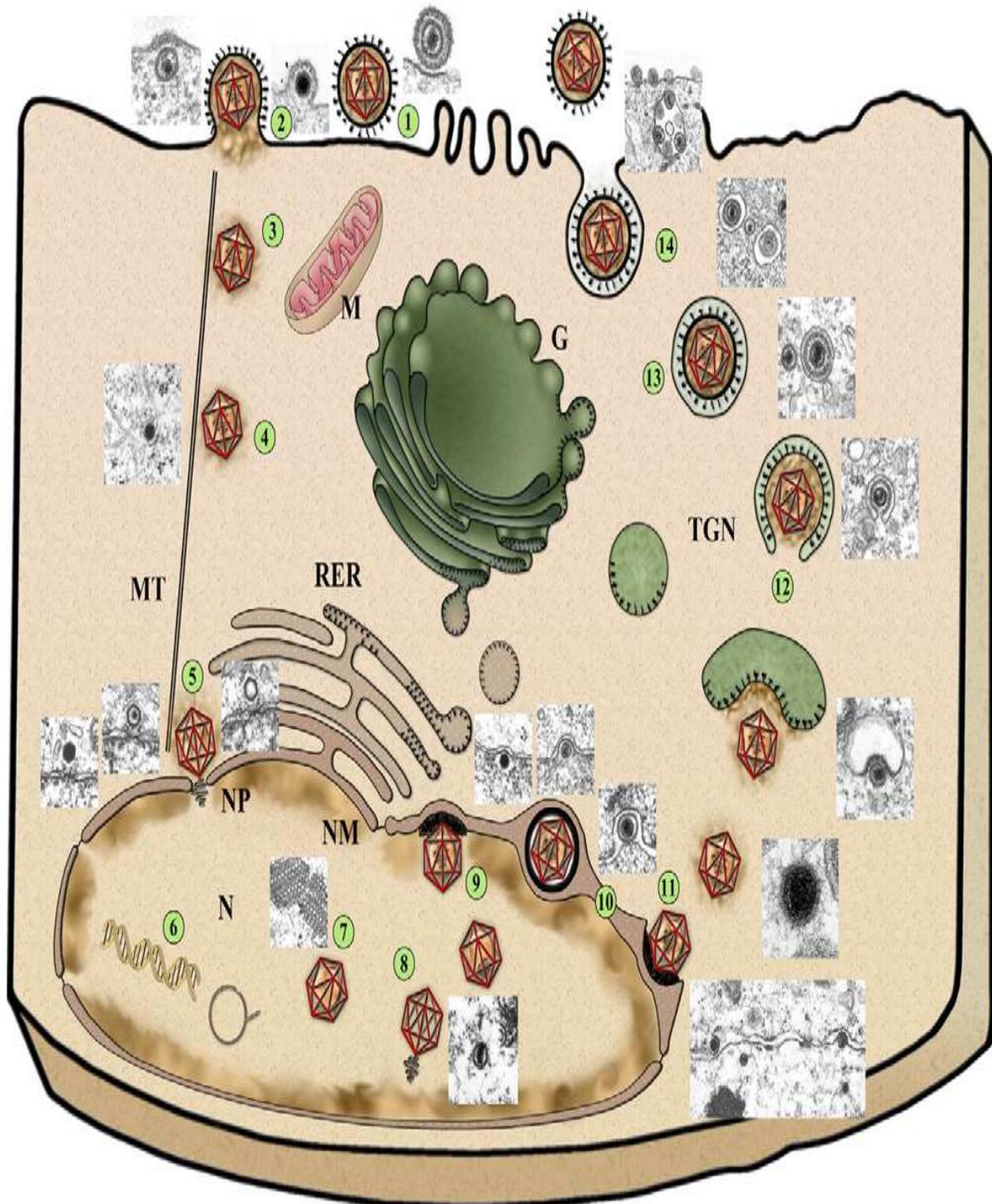


Abbildung 3 - Replikationszyklus der Herpes simplex Viren

Die Grafik stellt den Replikationszyklus eines Herpes simplex Virus dar. Nachdem sich dieses an die Zelle angedockt hat (1), wird es in diese endozytiert (2). Das Capsid wird nun entlang von Mikrotubuli (MT) (4) zum Zellkern transportiert (3). Es dringt durch Kernporen (NP) in den Nukleus (N) ein (5) und setzt das virale Genom frei, welches anschließend repliziert wird (6). Es kommt nun zur Bildung des neuen Capsids und dessen Ausschleusung aus dem Kern durch Transzytose über die nukleäre Membran (NM) hinweg (7-11). Das Capsid wird über den Golgi-Apparat (G) und das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) aus der Zelle herausgeschleust und erhält seine Hülle (12-14) (nach Mettenleiter, 2009).

1.3.6 Latente Infektion

Nach aktiver Infektion wird HSV-1 nicht mehr aus dem Körper eliminiert, sondern geht in einen lebenslangen Latenzzustand über. Das grundlegende Charakteristikum ist das Vorhandensein von viralen Genomkopien, ohne dass eine Vermehrung nachweisbar wäre. Grundsätzlich können aber interne, sowie externe Stimuli jederzeit zu einer Reaktivierung führen [57]. Die folgende Grafik stellt den Zyklus der Latenz dar.

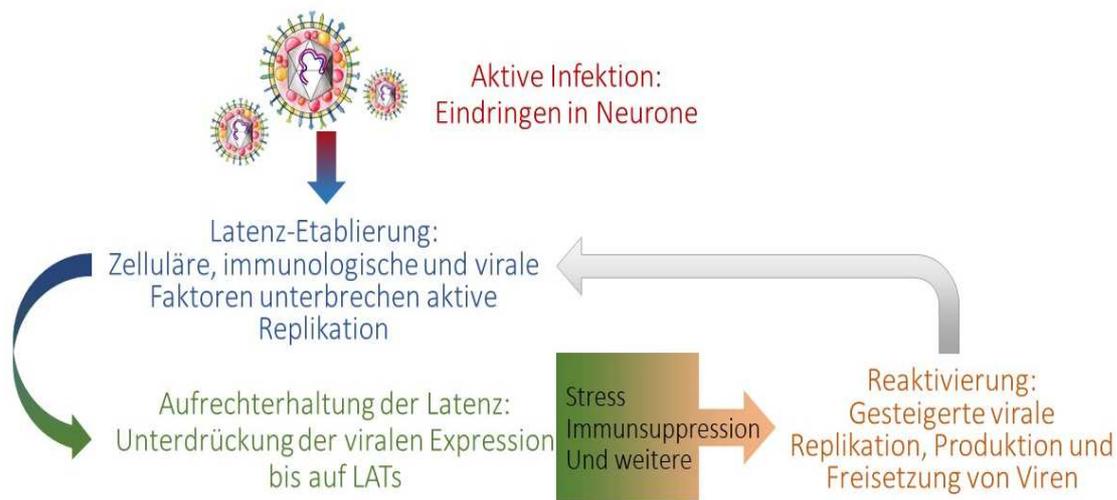


Abbildung 4 - Latenz Zyklus.

Schematische Darstellung des Latenzzyklus der HSV Infektion. Florian Reßle, 2017

Je nach Ort der primären Infektion kommt es dabei zum Verbleib in verschiedenen Regionen des Nervensystems, in den allermeisten Fällen sind jedoch periphere sensorische Ganglien betroffen. Für HSV-1 typisch ist das Trigeminalganglion (V), welches das Gesicht und damit den Ort der häufigsten Primärmanifestation sensorisch versorgt. Dieses ist in circa 90% der Fälle mit HSV-1 infiziert [58]. Es setzt sich aus drei Teilen zusammen, welche die Ausgangspunkte der drei jeweiligen Gesichtsnerven darstellen: Nervus ophthalmicus (V1), maxillaris (V2) und mandibularis (V3). Entsprechend ihres oro-buccalen Versorgungsgebietes zeigt sich eine gehäufte latente Infektion mit HSV-1 in den Ganglien von V2 und V3, eine geringere in V1 [59]. Daneben konnten Viruspartikel auch in sakralen, ciliären, vagalen und vestibulären Ganglien, sowie in Zellen des Rückenmark-Grenzstrangs und des Ganglion geniculi (N. VII) nachgewiesen werden [46, 48, 60]. Neben den bereits erwähnten Strukturen kann aber auch das zentrale Nervensystem, so zum Beispiel Neurone im Gehirn, betroffen sein [61]. Unabhängig vom Ort verbleibt das Virus bei normaler Immunitätslage in der infizierten anatomischen Struktur [12].

Grundsätzlich entsteht die Latenz wie in 1.3.5. beschrieben. Die Mechanismen, die für die Aufrechterhaltung der Latenz verantwortlich sind, sind bisher nur teilweise verstanden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass für die Etablierung der Latenz keine vorhergehende

aktive Replikation erforderlich ist [62]. Generell kann man aber davon ausgehen, dass das Virus selbst daran beteiligt ist, ebenso wie zelluläre und systemisch-immunologische Prozesse. Hier spielen offensichtlich vor allem CD8⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle.

Die einzige zwingend notwendige Voraussetzung für das Entstehen des Latenzzustandes ist das Eindringen des viralen Genoms in den Nukleus. Egal welches Gen in verschiedenen knock-out Mutanten des Virus deletiert wird, ist es diesem grundsätzlich immer möglich in Latenz zu treten [51]. Es gibt also kein stereotypes Muster dieses Vorgangs, sondern er kann auf verschiedensten Wegen und unter multiplen Einflüssen ablaufen. Die Latenz zeigt ein sehr inhomogenes Bild. So liegt die Streuung der in den Neuronen vorhandenen viralen DNA-Kopien zwischen normalerweise 10-100 und 1000. Ebenso ist das Vorhandensein von LAT sehr variabel. Diese werden zu einem beliebigen Zeitpunkt zwar immer transkribiert, sind jedoch bei einer chronologischen Stichprobenuntersuchung mittels Färbemethoden nur in ungefähr einem Drittel der Neurone nachweisbar [25, 51, 63].

Eine aktive Replikation des Virus muss immer gestoppt, beziehungsweise komplett verhindert werden. Sowohl das Virus wird dabei aktiv um den Eintritt in die Latenz zu erreichen, als auch der Wirt. Dieser muss die Infektion auf immunologischem und zellulärem Weg ausreichend eindämmen, ohne jedoch das Virus vollständig zu eliminieren. Mit großer Sicherheit stellt diese Einteilung jedoch keinen dialektischen Algorithmus dar, sondern beide Reaktionsschemata greifen fließend ineinander.

Einen solchen Mechanismus stellt zum Beispiel der primäre Stopp der α -Gen-Expression dar, was eine lytische Replikation weitestgehend unmöglich macht. Dies kann durch verminderte Konzentrationen von zellulären, sowie viralen Promotern erreicht werden. Von Bedeutung ist hier das stark aktivierende VP16-Tetramer, welches aus dem viralen Tegumentprotein VP16 und drei zellulären Proteinen (HCF-1, Oct-1 und LSD1) besteht. VP16 wird beim Eintritt des Virus in die Zelle freigesetzt, wird aber nicht wie das Genom retrograd ins Perykarion transportiert, sondern verbleibt größtenteils an Ort und Stelle. Dadurch können keine ausreichenden Konzentrationen am Ort der Replikation erreicht werden. Das erklärt, warum die Wahrscheinlichkeit eines sofortigen Latenzeintritts größer wird, je weiter entfernt ein Eindringen in das Axon vom Zellkern stattfindet. Dies gilt nicht nur für VP16, sondern auch für andere die aktive Replikation forcierenden viralen Proteine [1]. Auch die anderen Bestandteile des Aktivator-Tetramers können in zu geringer Konzentration am Zellkern vorhanden sein. HCF-1 befindet sich normalerweise hauptsächlich im Zytoplasma und nicht im Kern. Die Expression von Oct-1 ist sogar üblicherweise in neuronalen Zellen herunterreguliert [51].

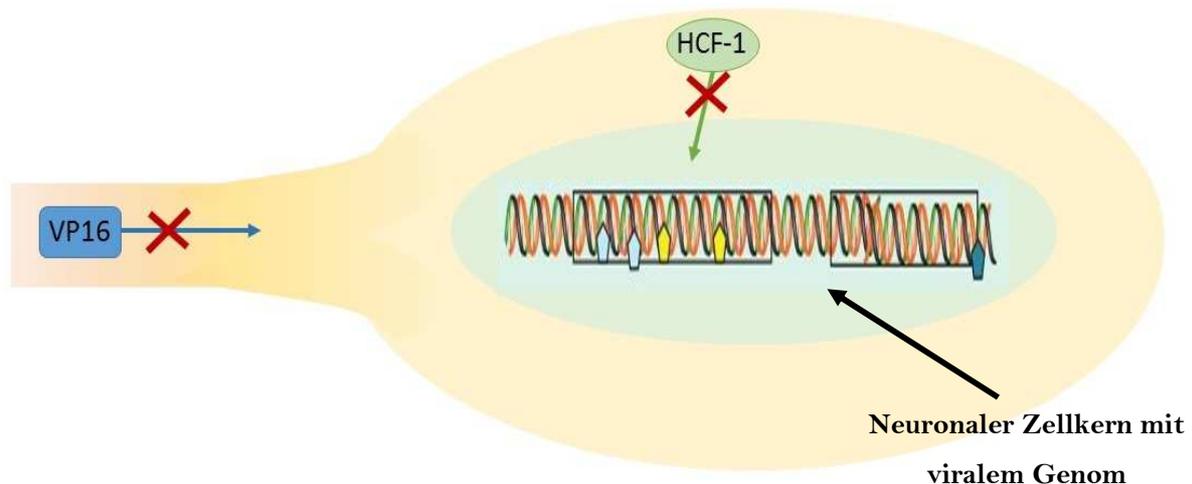


Abbildung 5 - Beginn der zur Latenz führenden Infektion.

Dargestellt ist ein Neuron mit viralem Genom. Falls die Aktivator-Proteine wie VP16 und HCF-1 nicht in den Zellkern eingeschleust werden, unterbleibt eine aktive Replikation und es kommt zur Latenzetablierung. Florian Reßle, 2016

Doch nicht nur die Expression von α -, sondern auch von β -Genen kann verhindert werden. Dies geschieht durch einen Repressor-Komplex bestehend aus HDAC/CoREST/REST/LSD1 [25, 64]. Hierbei ist das entscheidende Moment die Komplexierung und damit Inaktivierung von LSD1, welches ansonsten durch Demethylierung an das HSV-1 Genom angekoppelter Histone zu einer verstärkten Expression von α -Genen führen würde [51].

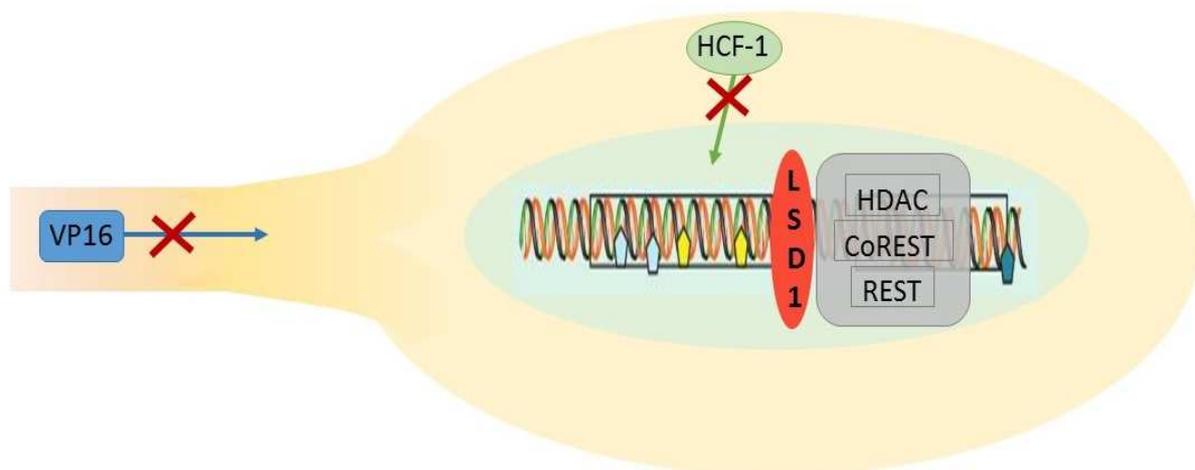


Abbildung 6 - Genom mit Repressor-Komplex.

Schematische Darstellung eines neuronalen Zellkerns mit HSV Genom. Der als graue Block dargestellte Repressor-Komplex (HDAC/CoREST/REST) unterdrückt die Demethylierung des HSV-1 Genoms durch das in rot dargestellte Enzym LSD1 und verhindert so die Ablesung von β -Genen. Florian Reßle, 2016

Auch virale Proteine, beziehungsweise Polynukleotide (wie LAT) können die aktive Replikation unterbrechen. Da bisher keine viralen Komponenten gefunden werden konnten, die direkt zur Latenz führen, ist es wahrscheinlich, dass von Seite des HSV-1 hauptsächlich ein Ausbleiben des Eintritts in die lytische Replikation eine Rolle spielt [7].

Während der Latenz liegt das virale Genom in zirkulärer Form als Episom vor [4]. Dieses lagert sich zu Nukleosomen zusammen und an Histone an, wodurch die Ablesung der viralen DNA erschwert beziehungsweise verhindert wird [51]. Diese Heterochromatinbildung wird von LAT gefördert [25]. Diese kleinen RNA-Moleküle spielen während der Latenz eine besondere Rolle, weswegen nun etwas detaillierter auf sie eingegangen wird.

LATs sind verschieden gespligte Polynukleotide, welche die einzigen, stetig in hohem Level exprimierten Genprodukte des HSV-1 während seiner Latenz darstellen. Sie sind nicht zwingend notwendig für einen Eintritt in die Latenz. Virusmutanten, die kein LAT exprimieren, erreichen ebenfalls eine Latenzetablierung, wenn auch in einer wesentlich geringeren Zahl der Fälle [12]. Zusätzlich zu den LATs können sehr geringe Mengen an α -Genen wie ICP0/4 nachgewiesen werden, worauf aber dank ihrer geringen Bedeutung nicht weiter eingegangen wird [4, 51, 65]. LAT wird nicht polyadenyliert, es akkumuliert im Zellkern [4]. Es besitzt zwar die Möglichkeit sich an Ribosomen anzulagern, wird aber nicht transkribiert, hat also kein Proteinäquivalent [12]. Es wird in allen HSV-1-infizierten Zellen exprimiert, präferentiell jedoch in sensorischen Neuronen [25, 63]. LAT codiert in den repetitiven Sequenzen, welche die U_L -Region flankieren und die Gensteuerung erfolgt mittels zwei Promotern: LAP-1 und -2 („latency-associated promoter“). Diese sind der Grund für die Neuronen-Selektivität der Latenz, da sie überwiegend in neuronalen Zellen aktiviert werden [63]. Bei der Transkription entsteht ein 8,3 kb langes „minor LAT“. Dieses wird anschließend in die beiden „major LATs“ gespligt [51]. Hierdurch entsteht ein 2,0 kb LAT, welches ein stabiles Intron darstellt. Dieses ist auch das immer und in hohen Mengen nachweisbare RNA-Molekül. Zusätzlich kommt es zur Bildung eines 1,5 kb LAT, welches ein Splicing-Produkt ist [12].

LAT spielt auch bei der Reaktivierung eine Rolle. Knock-out Mutanten können reaktivieren, sind aber wesentlich weniger effizient [4, 46]. Die Aufgabe der spontanen Reaktivierung wird vom 1,5 kb Transkript vermittelt [66]. Der genaue Mechanismus dahinter, konnte noch nicht geklärt werden.

Nachdem die Latenz einmal etabliert wurde, muss es das Virus schaffen diese aufrechtzuerhalten, um lebenslang in seiner Wirtszelle verbleiben zu können. Hierfür ist es grundsätzlich notwendig a) das lytische Genprogramm zu unterdrücken und b) den Zelltod zu verhindern [51].

a) Hierbei spielen LATs eine entscheidende Rolle, indem sie die Expression des lytischen Genprogramms breitgefächert unterdrücken [25]. Zusätzlich sind acht (inzwischen konnten sogar 16 nachgewiesen werden) verschiedene miRNAs, welche im (miR-H2, -3, -4, -5, -7, und -8) oder neben (miR-H1 und -6) dem LAT-Lokus kodiert werden, von Bedeutung. Diese sind

ebenfalls auf bisher nicht exakt geklärte Art und Weise an der Unterdrückung des lytischen Programms beteiligt, was dadurch nachgewiesen werden konnte, dass sie in latenten Zellen höher exprimiert werden als in aktiv Replizierenden [25, 51]. Ähnlich wie im Fall von LAT führt ein knock-out dieser miRNAs zu einem geringeren Anteil an erfolgreicher Latenz-Etablierung in Neuronen [25]. Des Weiteren senkt LAT die Expression von ICP4 und 27 um das 3-4 fache, die von ICP0 sogar um das 16fache. Diese α -Gene spielen eine essentielle Rolle bei der Initialisierung des lytischen Replikationsprogramms, dessen Einleitung auf diese Weise verhindert wird [67]. Kürzlich konnten zwei weitere kleine RNA-Moleküle innerhalb des LAT-Lokus nachgewiesen werden, sRNA1 und sRNA2. Deren Funktion besteht ebenfalls in einer Unterdrückung des lytischen Genprogramms, sowie der neuronalen Apoptose [25]. Ein weiterer wichtiger Mechanismus Latenz aufrechtzuerhalten, ist die epigenetische Modifikation des viralen Genoms. Es kommt zu einer starken Anlagerung von Histonen an die Episomen und damit zur Bildung des sogenannten fakultativen „Heterochromatins“. Hierdurch wird das Ablesen der Virusgene stark vermindert [64].

b) Während der aktiven Infektion verhindern verschiedene Proteine die neuronale Apoptose (Glykoprotein gD, gJ, Proteinkinase Us3, ICP27/10). Während der Latenz ist hauptsächlich LAT daran beteiligt [4, 51, 68]. Es konnten bisher bei weitem nicht alle Mechanismen aufgedeckt werden, einen Weg stellt jedoch die Hemmung der intrinsischen Aktivierung dar. LAT verhindert die Apoptose-Aktivierung durch intrinsische Caspase-8 und -9, sowie die durch Granzym B induzierte Caspase-3 [25]. Dies geschieht unter anderem durch eine Erhöhung der Aktivität von BCL-XL, welches Cytochrom C blockiert. Cytochrom C destabilisiert normalerweise die Mitochondrien-Membran, was zur Einleitung der Apoptose führt [69].

Ein herausragendes Charakteristikum der HSV-1 Latenz ist deren Fähigkeit zur Reaktivierung. Die Ursachen hierfür sind für alle Herpesviren ähnlich bis gleich und sind in 1.2.1 bereits beschrieben worden. Die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer Reaktivierung kommt, korreliert positiv mit der Anzahl der infizierten Neurone, sowie der Höhe der LAT-Konzentration [25]. Die Frequenz der Reaktivierungen nimmt mit dem Alter ab, da chronologisch sukzessive weniger virale Genomkopien vorhanden sind [12].

Bei einer Reaktivierung kommt es zu einer erneuten Replikation von viralen α -Genen und es findet eine produktive Virusvermehrung statt. Der grundsätzliche Ablauf ist dabei demjenigen der Primärinfektion entgegengesetzt. Die Virionen werden mittels anterogradem, axonalem Transport in das jeweilige Versorgungsgebiet des sensorischen Neurons transportiert und lösen dort eine rekurrente HSV-1-Infektion aus. Dabei werden wieder Epithelien und Mukosa infiziert, was unter anderem zur Entstehung der typischen „Herpes-

Bläschen“ führen kann. Die Erkrankung kann auch ohne Symptome und lediglich mit klinisch inapparenter Virusausscheidung einhergehen. Dabei treten nur äußerst selten sensorische Defizite auf, was den Schluss nahelegt, dass trotz aktiver Replikation keine oder nur sehr wenige Neurone zu Grunde gehen [25].

1.3.7 Interaktion mit der Wirtszelle

HSV-1 kann auf verschiedenste Art und Weise mit seiner Wirtszelle interagieren. Dies geschieht anhand von Genprodukten wie RNAs oder Proteinen. Es sind noch lange nicht alle Mechanismen geklärt. Im Folgenden soll deswegen beispielhaft auf einige der prominentesten Beispiele eingegangen werden.

HSV-1 ist es möglich den programmierten Zelltod mittels verschiedener Genprodukte zu blockieren. Hierzu zählen: U_s3 , gJ, gD [70]. Mechanistisch verhindern diese die Aktivierung der zellulären Proteinkinase E-IF2 α , welche im aktiven Zustand zu einem Block sämtlicher Protein-Synthese führt [70].

Des Weiteren zerstört HSV-1 zelluläre mRNA, verhindert Transkription und Splicing der Wirtszell-Replikationsmaschinerie [70]. VHS/ U_L41 zum Beispiel ist eine unspezifische RNase, welche messenger RNA verdaut. Da virale Gene sehr viel stärker abgelesen werden als zelluläre, wird dadurch hauptsächlich die Wirtstranskription beeinflusst [6]. ICP27 hemmt die Splicing-Maschinerie, was zu einer bevorzugten Translation der intronlosen (im Gegensatz zu der zellulären mRNA) viralen mRNA führt [6].

Ein weiteres virales Protein, ICP47, hat zwar keinen Einfluss auf die Vermehrungsmechanismen, hemmt allerdings den TAP1/2-Komplex. Dieser ist normalerweise für den Transport von pathogenen Antigen-Fragmenten ins Endoplasmatische Retikulum zuständig (also HSV-1-Peptide). Hier wird der MHC-I-Komplex gebildet, indem sich dessen Untereinheiten zusammenlagern und mit dem jeweiligen Antigen beladen werden. Anschließend wird die Einheit an die Zelloberfläche transportiert und präsentiert dort die als körperfremd erkennbaren viralen Proteinstrukturen. Durch die ICP47 vermittelte Assemblierungshemmung können keine immunologisch wirksamen viralen Komponenten mehr auf der Zelloberfläche präsentiert werden und die Wirtszelle wird nicht vom Immunsystem angegriffen [6, 71, 72].

HSV-1 kodiert für ICP34.5, welches Beclin 1 hemmt, ein für die Autophagozytose essentielles Protein. Dieser Prozess ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität. ICP34.5 knock-out Virusstämme sind nicht in der Lage eine für eine Enzephalitis ausreichende Virulenz zu entwickeln und werden schnell vom Immunsystem eliminiert [73]. Auch auf dieses hat HSV-1 weitgreifende Einflüsse, welche nun näher dargelegt werden.

1.3.8 Interaktion mit dem Immunsystem

Anfangs zielen die systemisch-immunologischen Prozesse darauf ab, etwaige produktive Replikationen in Neuronen zu verhindern, beziehungsweise zu stoppen. Dabei greifen angeborenes und erworbenes Immunsystem ineinander. Innerhalb der ersten Tage (ungefähr 3-5) spielen Zellen des angeborenen Immunsystems, vor allem Makrophagen, NK-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen die Hauptrolle. Diese schütten Zytokine wie $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ und Stickstoffmonoxid (NO) aus und können so bis zum Anlaufen der Antwort des erworbenen Immunsystems einen Großteil der viralen Replikation stoppen [69]. Die erworbene Immunreaktion setzt ab Tag 7 ein. Neben CD8^+ T- und $\text{Mac1-}/\text{TNF-}\alpha$ -exprimierenden Zellen sind erneut die typischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$, IL-10 und CCL5 nachweisbar. Die besondere Rolle der CD8^+ T-Zellen, welche ungefähr 6 Tage nach Infektion im TG nachweisbar sind, zeichnet sich dadurch aus, dass deren Depletion zu einer deutlich verminderten Fähigkeit des Organismus das Virus zu eliminieren, führt [25, 69].

CD8^+ T-Zellen finden sich in V2 und V3 wesentlich häufiger als in V1, nur in den unteren 2 Anteilen exprimieren sie Granzym B [59]. Granzym B führt zum Abbau des α -Produkts ICP4, dadurch ist eine Unterbrechung des aktiven Replikationszyklus möglich, ohne neuronale Zellyse herbeizuführen. Im Mausmodell konnte außerdem gezeigt werden, dass infiltrierende CD8^+ T-Zellen mittels $\text{INF-}\gamma$ und Granzym B eine Reaktivierung verhindern können [25]. CD8^+ T-Zellen sind spezifisch für das Glykoprotein B, nicht aber für α - oder β -Gene. Das bedeutet, dass ein so vermittelter Block erst nach Anlaufen des aktiven Replikationsprogramms erfolgt [51]. CD8^+ T-Zellen greifen nicht nur virusinfizierte Zellen an, sondern führen auch zu einer chronischen Inflammation, was dafürspricht, dass an entsprechenden Krankheiten auch körpereigene Entzündungen beteiligt sind [74].

Während der viralen Latenz sind hauptsächlich Zellen der CD3-Familie, wie die CD8^+ T-Zellen im TG nachzuweisen. CD4^+ T-Zellen werden in wesentlich geringerem Ausmaß gefunden und befinden sich hauptsächlich entlang der Axone [25]. Dies deutet darauf hin, dass es während der Latenz lediglich zu einer geringen Einwanderung von Immunzellen kommt [75]. Spezifiziert durch die Expression der Oberflächenmarker CCR5 und CXCR3, sowie der zugehörigen Liganden CCL5 und CXCL10, weisen die infiltrierenden Zellen einen „Memory-Effector“-Phänotyp auf [76]. Zusätzlich zeigt sich ein Vorhandensein von CD68-Molekülen, die auf einen kürzlich erfolgten Antigenkontakt hinweisen und ein Fehlen solcher auf ein Lymphknoten-Priming hindeuten. Ist das TG latent infiziert, legt diese Molekülexpression nahe, dass dort eine fortwährende Antigen-Stimulation stattfindet [25, 63]. Erstaunlicherweise befinden sich die Lymphozyten nicht ausschließlich um die LAT+, und damit auf jeden Fall infizierten Neurone, sondern umringen auch LAT- und damit

potentiell nicht HSV-1 infizierte Nervenzellen. Dies könnte einerseits darauf hindeuten, dass in diesen Neuronen bereits eine Elimination des Virus erfolgte, oder dass diese T-Zellen nicht pathogen-spezifisch sind, sondern lediglich chemotaktisch angelockt wurden [25, 77].

Obwohl CD8⁺ T-Zellen über ihr komplettes zytotoxisches Potential verfügen, kommt es nur sehr selten bis überhaupt nicht zu einer immunzellvermittelten, neuronalen Apoptose. Dies legt nahe, dass das Virus eine bisher noch nicht genauer aufgedeckte Strategie entwickelt hat, diesen Angriff abzuwehren. Man kann aber davon ausgehen, dass die CD8⁺ T-Zellen durch Ausschüttung von Zytokinen in der Lage sind eine virale Replikation zu verhindern und somit ebenfalls eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Latenz spielen [25].

Im ganzen TG zeigt sich eine hochregulierte Produktion von INF- γ , TNF- α , CXCL10 und CCL5, welche auf infiltrierende CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen ist [25]. So blockt INF- γ zum Beispiel die Expression des, für die aktive Replikation erforderlichen, α -Gens ICP0 [69].

1.4 MHC (Major Histocompatibility Complex)

MHC-Moleküle sind stark polymorphe Zelloberflächen-Moleküle, die auf Chromosom 6 kodiert werden. Sie können grundsätzlich in Typ I und II unterteilt werden und spielen eine entscheidende Rolle im Immunsystem aller Wirbeltiere. Ihre Aufgabe besteht darin Proteine (eigene und fremde) an der Zelloberfläche zu präsentieren. Die Peptide werden intrazellulär in dafür vorgesehene Gruben geladen, wobei jedes MHC-Molekül in der Lage ist, hunderte bis tausende verschiedene Proteine zu binden. Lediglich die dafür bestimmten Bindestrukturen bestimmen die Affinität für die jeweiligen Peptidgruppen [78]. MHCs sind tetramere Protein-Komplexe verschiedener Zusammensetzung, welche nur proteinbeladen eine stabile Form an der Zelloberfläche haben. Die Gruppe der MHC I Proteine kann weiter in klassische (HLA-A/ -B/ -C) und nicht-klassische (HLA-E/ -F/ -G) Vertreter unterteilt werden. Die Klassischen interagieren hauptsächlich mit dem adaptiven, wohingegen die nicht-klassischen hauptsächlich mit dem angeborenen Immunsystem interagieren [79].

1.4.1 Klassische MHC I

Zu den klassischen MHC-Molekülen werden die „Human Leucocyte Antigens“ A, B und C gezählt. Sie befinden sich auf allen kernhaltigen Körperzellen. Neurone allerdings exprimieren sehr wenige klassische HLAs. Verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel Interferon-Exposition führen zur Induktion von MHC-I in Neuronen [80]. Die Faltstruktur der klassischen HLAs besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, welche zu den $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Untereinheiten gespalten wird, die zusammen mit der nicht-polymorphen $\beta 2$ -Mikroglobulin Einheit ($\beta 2$ -MG), das Glykoprotein der Plasmamembran formen [78]. Die MHC-Moleküle dienen der Präsentation von zellinternen, körpereigenen sowie fremden Proteinen. Nach Prozessierung im Proteasom werden die HLAs mit den entstehenden Fragmenten beladen, und stellen diese zur immunologischen Interaktion auf der Zelloberfläche bereit [81].

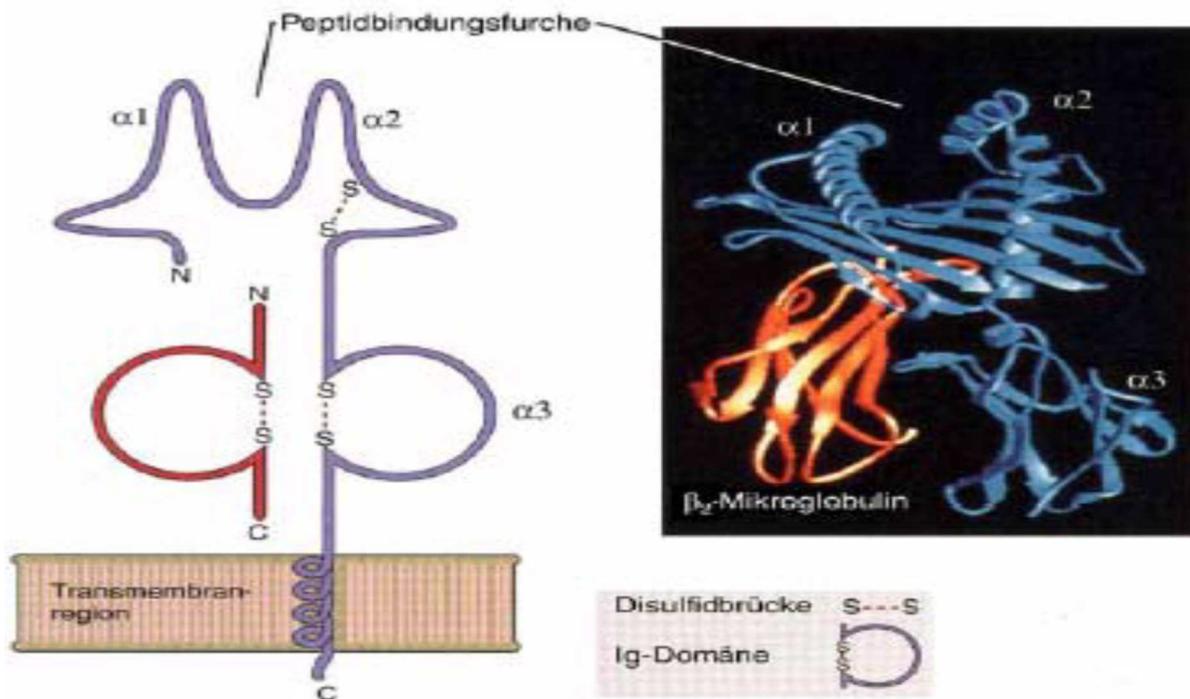


Abbildung 7 – MHC Klasse I Moleküle

Links ist eine schematische Darstellung des MHC-Moleküls zu sehen; rechts ist dessen Faltstruktur dargestellt (aus: Abbas et al., 2000).

Verschiedene virale Infektionen, wie zum Beispiel mit HSV-1 führen zu einer Veränderung der MHC-Präsentation auf Neuronen. Dies stellt einen entscheidenden immunologischen Mechanismus zur Viruseliminierung durch beispielsweise Natürliche Killer Zellen dar [82].

1.4.2 Nicht-klassische MHC I

Die wichtigsten Vertreter sind HLA-E, -F und -G. Ihre Faltstruktur besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten ($\alpha 1$ und $\alpha 2$ plus $\beta 1$) und dem β_2 -MG [83]. Hier soll nun ausschließlich auf HLA-E eingegangen werden.

HLA-E wird zwar ubiquitär in allen Körperzellen transkribiert, kann jedoch nur in sehr geringen Mengen auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden [84]. Es wird auf zwei verschiedenen Allelen exprimiert und besitzt im Gegensatz zu den klassischen MHC-Molekülen nur einen sehr geringen Polymorphismus [85]. Seine hauptsächliche Funktion ist die Präsentation von Polypeptid-Fragmenten klassischer MHC-Moleküle wie HLA-A oder -B [86]. Daneben kann der Oberflächenrezeptor auch noch Teile anderer zellinterner Proteine wie dem Heatshock-Protein 60 präsentieren [85]. HLA-E interagiert mit dem CD94/NKG2A-Rezeptor auf NK- und T-Zellen und entfaltet dort eine inhibitorische Wirkung, schwächt also die Immunreaktion ab [87]. Mit sehr viel geringerer Affinität kommt es zur Bindung an den stimulatorisch wirkenden CD94/NKG2C-Rezeptor. HLA-E kann also

eine immunmodulatorische Wirkung im Schnittfeld des angeborenen und erworbenen Immunsystems entfalten [85].

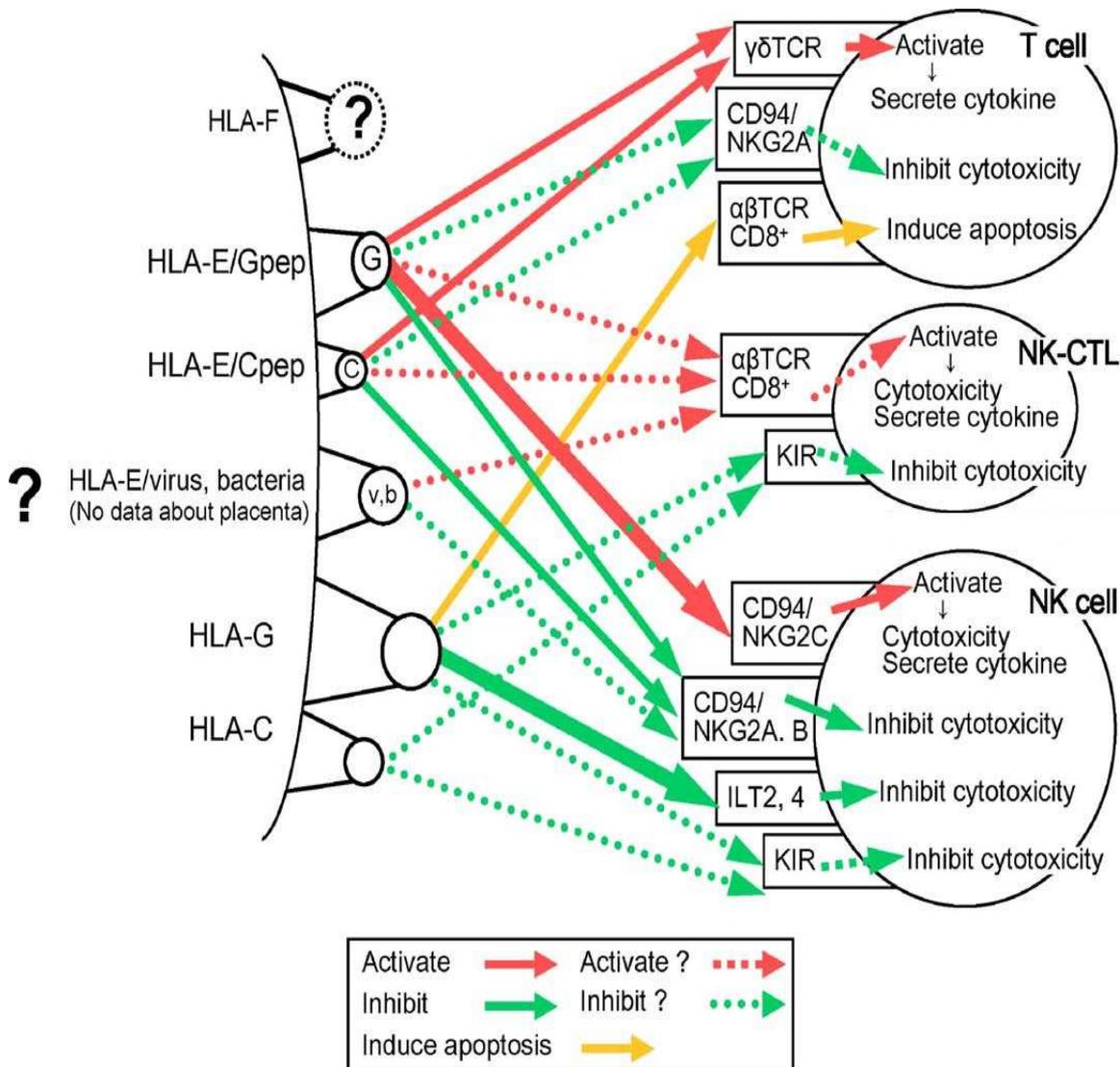


Abbildung 8 – Darstellung der Interaktionsmöglichkeiten nicht-klassischer MHC-Moleküle.

Links ist die den Oberflächenrezeptor exprimierende Zelle abgebildet; rechts die Immunzellen mit den jeweiligen Rezeptoren; rote Pfeile stellen einen aktivierenden, grüne einen inhibierenden Einfluss dar, gelbe Pfeile führen zur Apoptose-Induktion

NK cell: Natürliche Killerzelle, NK-CTL: Zytotoxische T-Zellen, T cell: T-Zelle

(aus: Ishitani et al, 2006 [88])

Es konnte gezeigt werden, dass das Humane Cytomegalo- sowie das Rabies-Virus in der Lage sind, die Expression von HLA-E auf Neuronen zu steigern und dementsprechend der Immunantwort zu entgehen. Auf diese Art und Weise sind die Viren in der Lage einen latenten Infektionsstatus zu erzeugen. Dieser Mechanismus konnte für andere Herpesviren wie HSV-1 bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden [84].

1.4.3 MHC Klasse II

MHC Klasse II Moleküle werden, im Gegensatz zu denjenigen der Klasse I, lediglich auf immunkompetenten Zellen exprimiert. Hierzu zählen unter anderem B-Zellen, Makrophagen sowie dendritische Zellen. Es handelt sich bei den MHC Klasse II Molekülen um glykosilierte heterodimere Transmembranproteine aus einer α - sowie einer β -Kette [89]. Sie werden auf der HLA-D-Region in drei verschiedenen Loci kodiert, nämlich HLA-DR, -DQ und -DP [89].

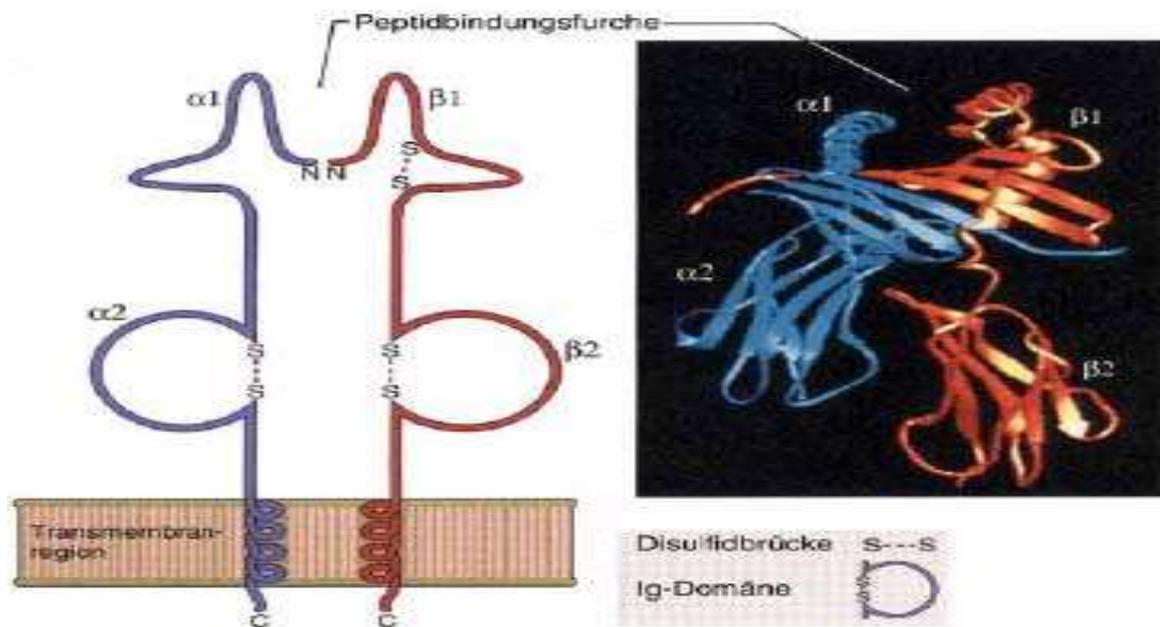


Abbildung 9 - MHC Klasse II Moleküle.

Links ist eine schematische Darstellung des MHC-Moleküls zu sehen; rechts ist dessen Faltstruktur dargestellt

(aus: Abbas et al., 2000).

MHC Klasse II Moleküle präsentieren Antigenfragmente aus intrazellulären Endosomen. Dabei erfolgt eine Aufnahme der Peptide durch Phago- oder Endozytose und ein anschließender Abbau in Lysosomen von antigenpräsentierenden Zellen. Durch Verschmelzung der Lysosomen mit MHC-beladenen Vesikeln kommt es zur nicht-kovalenten Bindung der Peptidfragmente an den Rezeptor und zum anschließenden Transport an die Zelloberfläche [90]. Die Struktur des fertigen Moleküls ist in Abbildung 9 dargestellt. Dort interagieren sie hauptsächlich mit $CD4^+$ T-Zellen und nehmen Einfluss auf das adaptive Immunsystem [91].

1.5 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine sind chemotaktisch, proinflammatorisch wirkende Zytokine, welche vorwiegend auf Lymphozyten wirken. Sie fördern deren Adhäsion, Aktivierung und Migration und können prinzipiell von jeglichem Gewebe produziert werden. Es sind mehr als 50 verschiedene Chemokine bekannt, welche anhand ihrer Proteinstruktur (nämlich ihres Cysteinrestes) in verschiedene Gruppen eingeteilt werden können [92]. Hierzu zählen C-, C-C-, C-X-C- und C-X₃-C-Chemokine (X steht dabei für eine beliebige Anzahl an anderen Aminosäuren) [93].

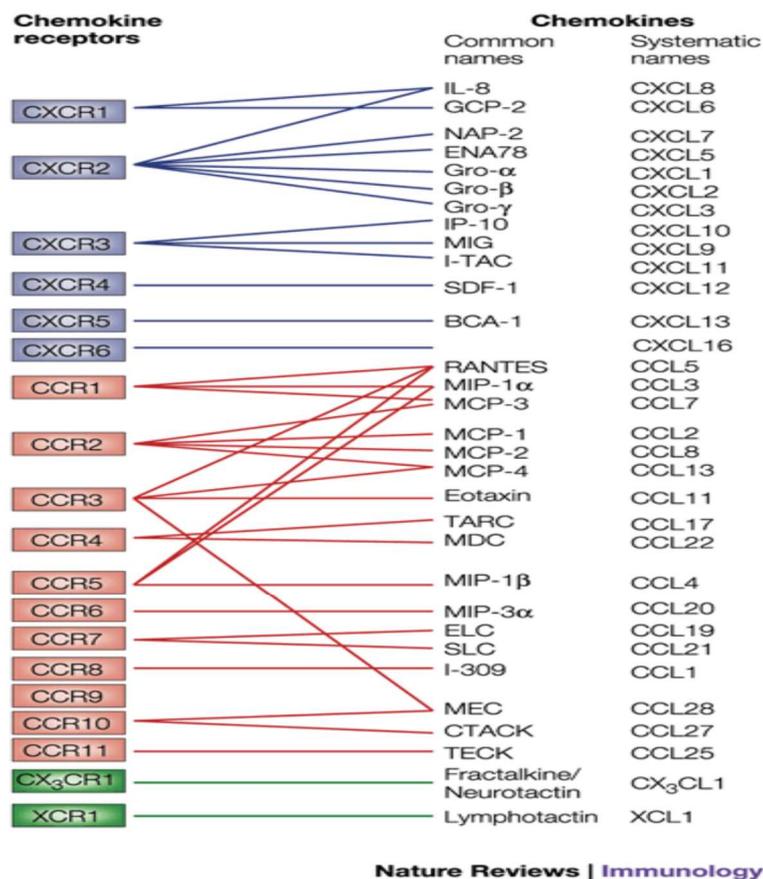


Abbildung 10 – Übersicht über die verschiedenen Chemokine.

Die unterschiedlichen Strukturfamilien sind in verschiedenen Farben dargestellt.

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

Es sind bisher 17 verschiedene Chemokin-Rezeptoren bekannt, bei denen es sich immer um G-Protein gekoppelte Rezeptoren handelt. Diese sitzen zum größten Teil auf immunologisch aktiven Zellen, kommen jedoch auch auf anderen Zellarten wie Neuronen, Astrozyten oder Epithelzellen vor. Sie sind zum Teil konstitutiv exprimiert, jedoch sind einige Rezeptoren auch sehr stark durch andere Zytokine induzierbar. Sie sind generell in nur sehr geringem Maße spezifisch, dies bedeutet, dass verschiedene Chemokine in der Lage sind, an verschiedene Rezeptoren zu binden [93].

1.5.1 CCL5 und neuronale HSV-1 Infektion

Während einer Infektion mit HSV-1 kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Chemokin-Konzentrationen in den betroffenen Ganglien. Dies wird über verschiedene Mechanismen auf transkriptionaler Ebene gesteuert. Der NF κ B-, MAP-Kinase- und Interferon-Regulatory-Factor-Pathway sind darin involviert [94]. CCL5 wird hauptsächlich von Zellen der Makrophagen-Zellreihe (wie etwa Mikroglia) und Astrozyten produziert und stellt einen der Hauptmechanismen dar, um Immunzellen in die infizierten neuronalen Strukturen zu locken und dort eine Immunantwort zu induzieren [95, 96]. Der CCL5-Rezeptor konnte auf CD8⁺ T-Lymphozyten, sowie auf Natürlichen Killerzellen nachgewiesen werden, welche eine essentielle Rolle in der Virusabwehr spielen. Dabei wird der Rezeptor vorrangig auf T-Gedächtnis- und Effektorzellen exprimiert, welche auf die Exposition mit CCL5 hin, stark in das ausschüttende Gewebe migrieren. Naive T-Zellen exprimieren den Rezeptor nicht [97]. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von CCL5 beziehungsweise dessen Rezeptorblockade zu einer signifikanten Verringerung der Immunzellzahl in infizierten Trigeminalganglien führt [75].

1.6 Interleukine und ihre Rezeptoren

Interleukine sind eine Gruppe von kleinen Zytokinen, die eine essentielle Rolle in der Immun- und Entzündungsreaktion spielen. Sie regulieren die Aktivität, Migration und Reifung von Immunzellen. Insgesamt sind 17 Subfamilien der Interleukin Familie bekannt [98].

1.6.1 Interleukin-1 Familie

Die Interleukin-1 (IL-1) Familie besteht aus 11 Proteinen (IL1F 1-11), welche in jeweils eigenständigen Gen-Loci kodiert werden. IL1- β entspricht dabei dem zweiten Interleukin-1 Protein [99]. Ihre Hauptaufgabe ist die Kontrolle der proinflammatorischen Gewebereaktion. Dabei spielen sie vor allem in der Reaktion des angeborenen Immunsystems auf Schädigungen unterschiedlichster Ursache, sowie zum Beispiel durch Pathogene aber auch durch Traumata eine Rolle [100]. Neben den klassisch wirkenden IL-1 Zytokinen, gibt es aber auch solche die eine hauptsächlich antiinflammatorische Wirkung entfalten, wie der IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1-Ra) [100]. Im Gegensatz zu anderen Zytokinen der Interleukin-Gruppe entfalten die IL-1-Botenstoffe eine relativ unspezifische proinflammatorische Wirkung und wirken nicht direkt auf Immunzellen. Dies hat seinen Grund im IL1 Rezeptor. Von diesem sind insgesamt vier bekannt, welche jeweils aus einer extrazellulären immunglobulinähnlichen und einer intrazellulären Domäne bestehen [98]. Der in der Zelle

gelegene Rezeptorteil besitzt eine starke Ähnlichkeit mit Toll-like-Rezeptoren (TLR) und deren ebenfalls breiter aber unspezifischer proinflammatorischer Wirkung [100].

1.6.2 Interleukin-1- β

Hauptproduktionsort von IL1- β sind Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen sowie in geringerem Maße B- und NK-Zellen [100]. In *in vitro* Experimenten konnte die Produktion von IL1- β in Neuronen durch virale Infektionen induziert werden [101]. Daraufhin konnte eine gesteigerte Immunzellinfiltration in das Hirnparenchym nachgewiesen werden [101]. Neben der Expressionsstimulation durch nahezu alle mikrobiellen Substanzen kommt es auch zu einer Autoinduktion durch IL1- β [100, 102]. Das Zytokin wird als inaktiver Vorläufer intrazellulär produziert und muss anschließend durch das Enzym Caspase-1 in die biologisch aktive Form gespalten werden. Caspase-1 ist dabei ein Bestandteil des multienzymatischen Inflammasoms, einer im Zytoplasma gelegenen Struktur, die durch Entzündungen induziert wird [103]. Das fertige Molekül kann über verschiedenste Mechanismen aus der Zelle ausgeschleust werden, so zum Beispiel über die Exozytose von sekretorischen Lysosomen, direkt über spezielle Transporter oder über Exosomen [100].

IL1- β nimmt Einfluss auf die Genregulation im Sinne einer gesteigerten intrazellulären Chemokin-Produktion und Induktion der Cyclooxygenase Typ II. Daneben kommt es zu einer vermehrten Produktion von Adhäsionsmolekülen und somit insgesamt zu einer gesteigerten Chemotaxis von Immunzellen [100].

IL1- β wirkt als Wachstumsfaktor von T- sowie B-Zellen. Diese Aufgabe erfüllt es allerdings indirekt in dem es die Konzentration anderer Interleukine wie IL-2 und -6 erhöht, welche direkt stimulatorisch auf die jeweiligen Immunzellen wirken [100, 104].

Insgesamt spielt IL1- β eine entscheidende Rolle in der Auslösung einer antimikrobiellen Immunreaktion.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Infektion mit HSV-1 dazu führt, dass sich zelluläre immunologische Faktoren verändern. Hierbei war es von besonderem Interesse, ob es eher zu einer die Immunantwort begünstigenden oder abschwächenden Alteration kommt. Es wurden zwei verschiedene Systeme betrachtet und die Zielsetzung wie folgt festgelegt:

1. Zum einen wurde die Expression von Zytokinen und einem Chemokin in mit HSV-1 infizierten Neuronen betrachtet. Untersucht wurden TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , CCL5 und CXCL10. Diese Zytokine wirken alle auf komplexe Art und Weise auf das angeborene sowie das erworbene Immunsystem, führen aber insgesamt zu einer Steigerung der Immunantwort. Um zu eruieren, ob es durch die HSV-1 Infektion zu einer vermehrten Expression der Zytokine kommt, wurden infizierte mit nicht-infizierten Neuronengruppen verglichen. Durch eine Steigerung der Expression wäre es dem Neuron möglich auf einer lokalen, sowie systemischen Ebene zu einer Aktivierung des Immunsystems beizutragen.
2. Zum anderen wurden die „Major Histocompatibility Complexes (MHCs)/Human Leucocyte Antigen (HLAs)“ betrachtet. Immunzellen können mit diesen über eine Rezeptor-Ligand-Reaktion interagieren. Dadurch könnte das Neuron T-Zellen lokal beeinflussen und zu einer gesteigerten Immunantwort gegen HSV-1 beitragen. Es wurde die Expression der klassischen MHC-Moleküle HLA-A, -B und -C untersucht. Hierbei wurden erneut HSV positive und negative Neuronengruppen verglichen.
3. Um zu evaluieren, ob es auch zu einer tatsächlichen Oberflächenexpression der klassischen MHC-Moleküle kommt, wurden verschiedene Färbeprotokolle angewandt. Dies würde nicht nur eine etwaige Veränderung des Expressionsmusters durch eine HSV-1 Infektion nachweisen, sondern auch die tatsächlich stattfindende Interaktion von T-Zellen und Neuronen nahe legen.
4. Um zu untersuchen, auf welche Art und Weise HSV-1 in der Lage ist das Immunsystem soweit zu deprimieren, dass es zu keiner vollständigen Eliminierung kommt, wurden antiinflammatorisch wirkende nicht-klassische MHC-Moleküle betrachtet. Dabei wurde das Expressionsprofil von HLA-E und -G untersucht.
5. Anschließend wurde mittels Immunhistochemie eine etwaige Oberflächenpräsentation von HLA-E und -G analysiert. Hierdurch wäre es infizierten Neuronen möglich eine Immunantwort lokal abzuschwächen und damit die Latenzetablierung von HSV-1 zu unterstützen.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendetes Gewebe

Für alle Analysen wurden humane Trigeminalganglien verwendet. Diese stammten aus Leichen aus der Rechtsmedizin der LMU München. Die Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Susanne Himmelein hat eine Kooperation mit PD Dr. med. Inga Sinicina und konnte so im Rahmen von Obduktionen menschliche Trigeminalganglien gewinnen. Dabei wurde nach Eröffnung des Schädels das rechte sowie das linke Ganglion mitsamt dem Beginn der drei Trigeminasäste entnommen, von überschüssigem Gewebe befreit, in Gefriermedium eingebettet und bei -80°C eingefroren. So war schlussendlich ein Ganglienpaar pro Individuum vorhanden, welches anonymisiert und jeweils mit einem Buchstaben, einer Zahl und ihrer jeweiligen Seite bezeichnet wurde. Sämtliche Versuche wurden von der Ethikkommission der LMU genehmigt.

Für die Versuche wurden Ganglien von 28 Personen verwendet. 15 waren HSV-1 positiv, 13 waren HSV-1 negativ.

Nummer	Geschlecht	Alter	Todesursache	PMD	LAT-Status
1	Männlich	82	Herzinsuffizienz	15h	Positiv
2	Männlich	62	Herzinsuffizienz	13,5h	Positiv
3	Männlich	62	Herzdurchschuss	16h	Positiv
4	Männlich	87	Herzinsuffizienz	24,5h	Positiv
5	Männlich	27	Intoxikation	14,5h	Positiv
6	Männlich	59	Verkehrsunfall	23h	Positiv
7	Männlich	87	Herzinsuffizienz	24h	Positiv
8	Männlich	87	Herzinsuffizienz	15h	Positiv
9	Weiblich	21	Aortenstichverletzung	4h	Positiv
10	Weiblich	82	Ertrinken	23,5h	Positiv
11	Weiblich	77	Leukämie	21,5h	Positiv
12	Männlich	76	Multiorganversagen	18h	Positiv
13	Männlich	29	Intoxikation	13h	Positiv
14	Männlich	30	Intoxikation	7h	Positiv
16	Weiblich	39	Ertrinken	19h	Positiv

Tabelle 2 - Positive Ganglienpaare.

Dargestellt sind die verwendeten Ganglienpaare mit Geschlecht, Alter, Todesursache, sowie „post-mortem-delay“ (PMD), dem Zeitintervall zwischen Obduktion und Zeitpunkt, an dem die betreffende Person das letzte Mal lebend gesehen wurde

Nummer	Geschlecht	Alter	Todesursache	PMD	LAT-Status
1	Männlich	70	Myokardinfarkt	24h	Negativ
2	Weiblich	70	Myokardinfarkt	18,5h	Negativ
3	Weiblich	50	Erstickung	15,5h	Negativ
4	Männlich	42	Polytrauma	5h	Negativ
5	Weiblich	8	Polytrauma	13,5h	Negativ
6	Weiblich	11	Polytrauma	13,5h	Negativ
7	Männlich	61	Polytrauma	24h	Negativ
8	Weiblich	52	Pneumonie	20h	Negativ
9	Männlich	52	Subarachnoidalblutung	21h	Negativ
10	Männlich	43	Kopfschuss	17h	Negativ
11	Männlich	48	Herzinsuffizienz	18h	Negativ
12	Männlich	72	Herzinfarkt	15h	Negativ
13	Männlich	34	Intoxikation	15,5h	Negativ

Tabelle 3 - Negative Ganglienpaare.

Dargestellt sind die verwendeten Ganglienpaare mit Geschlecht, Alter, Todesursache, sowie „post-mortem-delay“ (PMD), dem Zeitintervall zwischen Obduktion und Zeitpunkt, an dem die betreffende Person das letzte Mal lebend gesehen wurde

3.2 Aufbereitung des Gewebes

Das eingefrorene Gewebe wurde abhängig vom späteren Verwendungszweck auf verschiedene Art und Weise geschnitten.

3.2.1 Färbungen

Für alle Färbungen wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 10µm angefertigt. Diese wurden auf positiv geladene Objektträger aufgezogen und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.2.2 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung der kompletten Ganglien wurden jeweils 10 Schnitte mit einer Dicke von 30µm hergestellt. Diese wurden bis zur Weiterverarbeitung in einem Eppendorf-Gefäß bei -80°C eingefroren.

3.2.3 Laser-Cutting-Microdissection

Für die Laser-Cutting-Microdissection wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 16µm angefertigt, welche auf spezielle Membran-Träger aufgezogen wurden. Da hier eine zeitnahe

Weiterverarbeitung nötig war, um eine möglichst gute RNA-Qualität zu gewährleisten, wurden die einzelnen Träger bei -80°C eingefroren bis 5 Schnitte angefertigt worden waren. Danach wurde sofort mit den weiteren Arbeitsschritten begonnen, welche im Folgenden noch genauer aufgelistet sind.

3.3 Typisierung der einzelnen Ganglien

Um festzustellen, ob die Ganglien mit HSV-1 infiziert waren und um eine Einteilung in zwei Vergleichsgruppen zu ermöglichen, wurden verschiedene Testverfahren angewandt. So wurde zuerst eine LAT-*in-situ*-Hybridisierung, aufgrund höherer Sensitivität anschließend noch eine RT-qPCR durchgeführt, um eindeutig zu klären, ob LAT vorhanden war oder nicht. Dementsprechend wurden die Ganglien dann in zwei Vergleichsgruppen eingeteilt (siehe Tabellen 2 und 3).

3.3.1 LAT-*in-situ*-Hybridisierung

Die *in-situ*-Hybridisierung ist ein Färbeverfahren zur Darstellung spezifischer DNA- oder RNA-Abschnitte. Dabei werden zur färbenden Nukleotidsequenz komplementäre DNA-Sonden eingesetzt welche mit einem Hapten, in unserem Fall Digoxigenin, verknüpft sind. Nach dem es zu einer Basenpaarung zwischen Ziel-Sequenz und Sonde gekommen ist, wird diese mit einem Hapten-spezifischen Antikörper nachgewiesen. An diesen ist wiederum ein Enzym gekoppelt – hier die Alkalische Phosphatase - welches einen bei Reaktion kovalent im Gewebe bindenden Farbstoff (Nitroblautetrazoliumamid) umsetzt. Dieser letzte Schritt führt zur letztlichen Darstellung des untersuchten Nukleotidabschnitts.

In unserem Fall wurde diese Methode benutzt um LAT-Moleküle anzufärben, welche als Korrelat einer positiv oder negativ vorhandenen latenten HSV-1 Infektion fungierten. Damit konnte histologisch eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Personen beziehungsweise Ganglien getroffen werden, um diese in die Positiv- oder Negativ-Vergleichsgruppe einzuteilen.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Die Ganglien wurden mit einer Dicke von $10\mu\text{m}$ geschnitten. Die entstandenen Kryoschnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgezogen. Diese wurden dann 15 min bei Raumtemperatur, und anschließend 15 min bei 50°C getrocknet. Nach diesem Schritt wurden die Schnitte 15 min mit 4% PFA fixiert und schließlich zwei Mal jeweils eine Minute in DEPC- H_2O gewaschen. Nun folgte eine Inkubation in verschiedenen Medien: fünf Minuten in 1-fachem PBS, 2 Mal jeweils eine Minute in 2-fachem SSC und sieben Minuten in TEA. Diese Lösung führt zur Acetylierung von Proteinstrukturen im Gewebe und neutralisiert so positive

Ladungen. Dies verhindert unspezifische Bindungen der negativ geladenen RNA-Sonde an komplementär geladene Strukturen. Danach wurde die überschüssige TEA-Lösung mit 2X SSC abgewaschen. Nach dem Abtropfen der SSC-Lösung wurden jeweils 100µl PHO-Lösung auf die Schnitte gegeben und diese dann bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Dieser Schritt verhindert unspezifische Bindungen der Sonde.

Nach dem Abtropfen der Lösung wurde jeder Schnitt mit 100µl Sonden-Lösung bedeckt und über Nacht bei 37°C im Inkubator belassen. Dabei wurde eine Sonden-Verdünnung von 1:250 (250ng/ml) in PHO verwendet.

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte in absteigenden Konzentrationen SSC-Lösung gewaschen (für jeweils 10 min in 2-, 1- und schließlich 0,1-facher Verdünnung). Um weitere Nukleotid-Interaktionen jedweder Art zu verhindern, wurden die Schnitte für 30 min mit einer Blocking-Lösung inkubiert, bestehend aus 5ml Blocking Solution, 45ml 1-fachem MA-Puffer und 500µl TWEEN20.

Nach diesem Nukleotid-Block erfolgte die Bindung des AP-markierten Antikörpers an die Sonde. Dafür wurde eine 1:500-Verdünnung des Antikörpers in Blocking Solution hergestellt, wovon 100µl auf jeden Schnitt gegeben wurden und diese bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubierten.

Abwaschen des AK mit 1-fachem MA-Puffer für zwei Mal jeweils 10 min, anschließende Überführung in Detektionspuffer und schließlich Zugabe von jeweils 100µl einer NBT-Lösung (1ml Detektionspuffer + 20µl NBT) stellten die letzten Schritte des Protokolls dar.

Nach Gegenfärbung mit Hämalaun für circa 10 Sekunden und anschließendem Eindecken mittels Kaisers Glycerine stellten sich die Zellkerne der LAT-positiven Neurone lila-bläulich dar (siehe **Abbildung 11**), da dort die LAT-Transkripte zu finden sind.

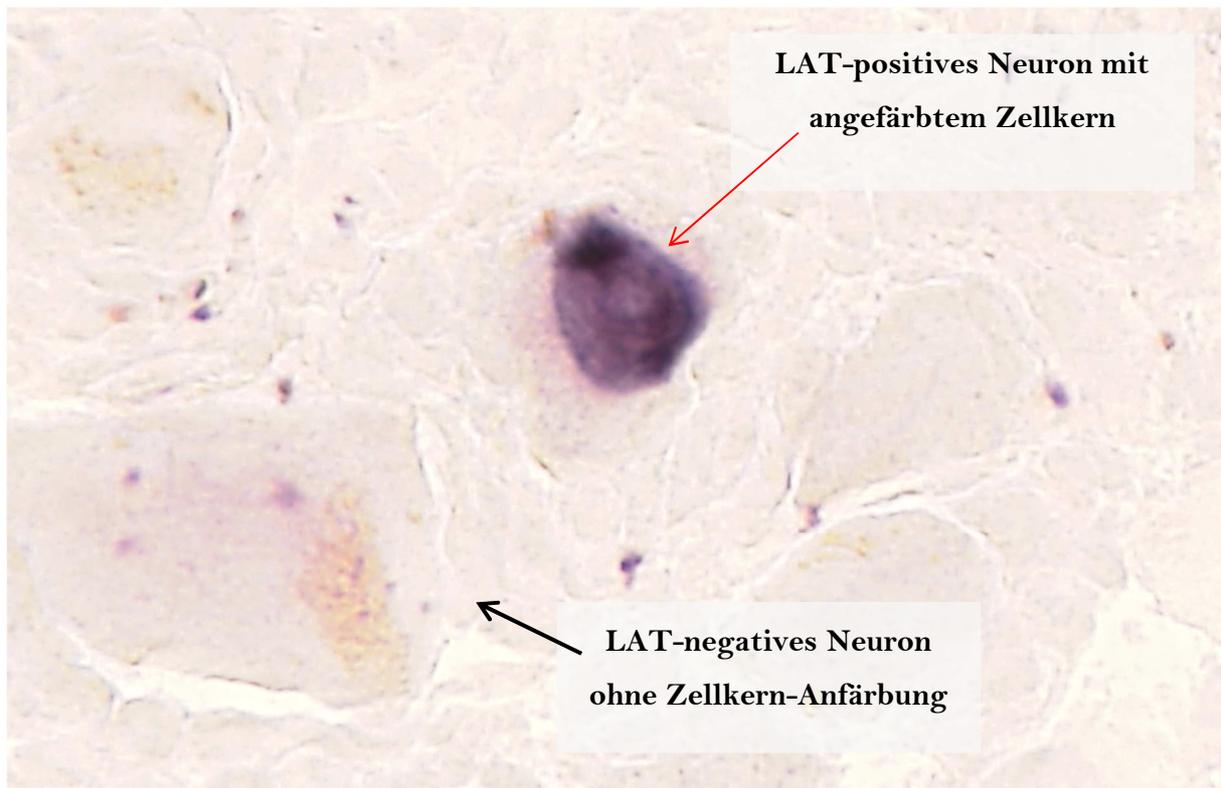


Abbildung 11 - LAT-*in situ*-Hybridisierung eines Gewebeschnittes in einem Trigeminalganglion.

Dunkel zur Darstellung kommt der Zellkern eines LAT-positiven Neurons (roter Pfeil), wohingegen das daneben gelegene Perykarion (schwarzer Pfeil) keine Anfärbung und damit keinen LAT-Gehalt zeigt.

3.3.2 Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur spezifischen Amplifizierung von DNA-Abschnitten.

Die eigentliche Reaktion besteht aus dem zyklischen Ablaufen verschiedener Temperaturstufen: 95°C (Denaturierung der DNA), 56°C (Primerhybridisierung) und schließlich 72°C (Elongation). Bei den dabei verwendeten Reagenzien handelt es sich neben dem zu amplifizierenden DNA-Abschnitt um ein Enzym, Primer, Nukleotiden und Pufferlösung.

Die DNA-Polymerase aus *Thermus Aquaticus* Bakterien wird als Enzym verwendet, da dieses auch bei den für den Reaktionsablauf benötigten hohen Temperaturen noch nicht denaturiert und funktionsfähig bleibt. Die eigentliche Amplifikation benötigt spezifische Primer, kurze Nukleotidsequenzen, welche den einschlägigen DNA-Abschnitt auf beiden Strängen flankieren. Diese Hybridisierung dient als Anlagerungs- und damit Startpunkt der Reaktion. Da die Primer nur die entsprechende Region einschließen, kommt es im Verlauf auch nur zur Amplifikation selbiger.

Im Vergleich zur konventionellen PCR ist das primäre Ziel der RT-qPCR nicht die Vervielfältigung der Matrize, sondern die Bestimmung der relativ vorhandenen Ausgangsmenge verschiedener ausgewählter DNA-Abschnitte durch Vergleich von Fluoreszenzsignalen. Nichtsdestotrotz bleibt der grundsätzliche Ablauf der Reaktion unverändert.

Der Unterschied besteht darin, dass bei der RT-qPCR zusätzlich Reporter-Systeme eingesetzt werden. Diese bestehen aus Nukleotidsequenzen (im weiteren Sonden), die wie die Primer komplementär zu Abschnitten der zu untersuchenden DNA-Sequenzen sind, jedoch innerhalb der von den Primern eingeschlossenen Region hybridisieren. An die Sonden sind fluoreszierende Moleküle gebunden, je ein Reporter und ein Quencher. Dabei wird der Reporter von einer Lichtquelle angeregt, gibt selbst Lichtenergie ab, welche wiederum den Quencher zur Fluoreszenz anregt.

Diese Anregung funktioniert jedoch nur falls sich beide Moleküle nah beieinander befinden, die Sonde also intakt ist. Da die verwendete Polymerase auch eine 5'-Exonuklease-Aktivität besitzt, kommt es bei der Amplifikation des DNA-Abschnitts zum Abbau der Sonde, und damit zur Trennung von Reporter und Quencher. Je mehr DNA-Matrize vorhanden ist, desto mehr Amplifikation läuft ab und desto mehr Reporter-Systeme werden dementsprechend abgebaut. Das heißt wiederum, dass im Verlauf der Reaktion das Signal des Quenchers immer weiter abnimmt, während das des Reporters zunimmt.

Diese Änderung des Fluoreszenzsignals kann detektiert werden (siehe **Abbildung 12**). Hieraus kann auf die anfänglich vorhandene Menge der analysierten DNA geschlossen werden. Je schneller

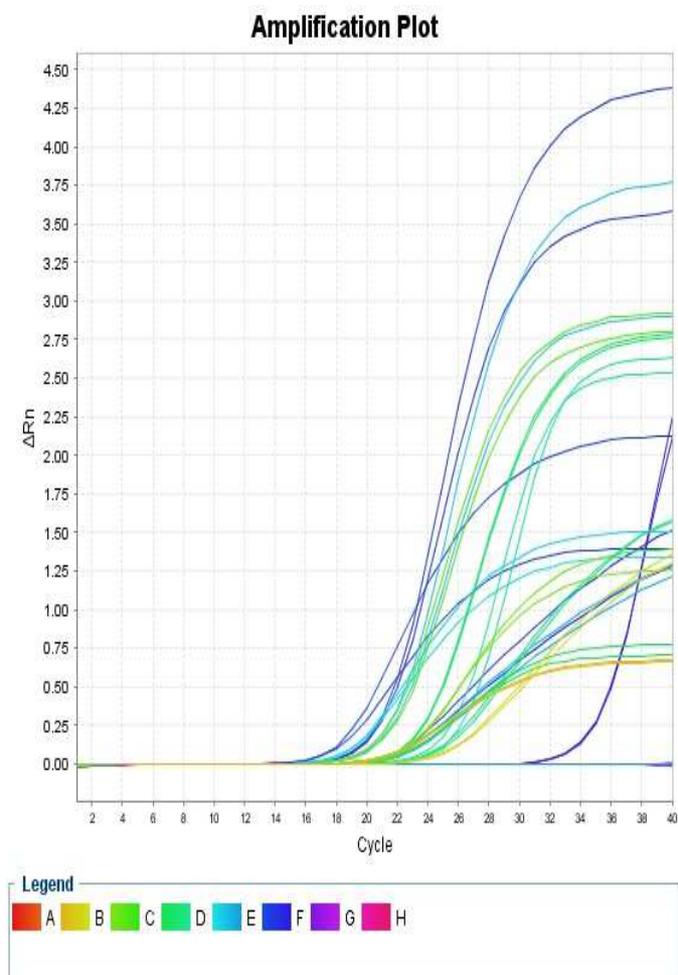


Abbildung 12 - Beispielkurve einer PCR Amplifikation

Abzisse: Zyklusnummer innerhalb der RT-PCR
 Ordinate: ΔR_n , zur Darstellung kommt die Steigerung des Fluoreszenzsignals und damit die Anzahl der vervielfältigten Nukleotidsequenzen in Abhängigkeit der Dauer der PCR; aus StepOne Plus RT-PCR-Systems Software, Applied Biosystems, Carlsbad USA

beziehungsweise ausgeprägter die Signaländerung erfolgt, desto mehr Matrize war ursprünglich vorhanden.

Dieser Unterschied wird anhand des sogenannten R_n -Wertes quantifiziert. Dieser ist die Stärke des Fluoreszenzsignals des Reporters bezogen auf diejenige des Quenchers.

Von Bedeutung für die spätere Auswertung ist jedoch der sogenannte C_T -Wert. Dabei handelt es sich um den sogenannten „threshold-cycle“, also Zyklusnummer im Verlauf von 40 bei der die Fluoreszenzänderung einen spezifischen Negativ-Kontrollpunkt überschreitet. Je früher diese Detektion erfolgt beziehungsweise je niedriger der C_T -Wert ist, desto mehr Anfangsmenge der DNA war vorhanden.

Mit dieser Methode wurde untersucht, ob und in welcher Stärke gewisse RNAs vorhanden waren. Da die Polymerase jedoch keine RNA verwerten kann, musste diese erst in cDNA umgeschrieben werden (siehe 3.4.3), welche als Ausgangsmaterial für alle PCRs dient.

Um zu untersuchen, ob Neurone in den jeweiligen Ganglien latent mit HSV-1 infiziert waren, wurde nach der LAT-*in-situ*-Hybridisierung eine RT-qPCR mit dem genetischen Material der gesamten Ganglien durchgeführt. Diese Methode war aufgrund ihrer deutlich höheren Sensitivität gut geeignet, den endgültigen Beweis einer latenten Infektion zu erbringen.

3.3.3 Nested-PCR

Schließlich wurde noch mittels Nested-PCR, HSV-1-DNA im Gewebe nachgewiesen. Dazu wurde DNA aus gesamten Ganglien verwendet, welche mit dem unten beschriebenen Verfahren isoliert worden war (siehe 3.4.2).

Dieses Verfahren beruht auf einer PCR, wobei diese zwei Mal nacheinander mit demselben Sample durchgeführt wurde, jedoch jeweils mit unterschiedlichen Primer-Paaren.

In der ersten Reaktion wurden sogenannte „Outer-Primer“ verwendet, welche den viralen Genomabschnitt weit umspannen. Um zu überprüfen, ob die Amplifikation in der ersten Runde erfolgreich war, wurde im Anschluss eine Gel-Elektrophorese durchgeführt (siehe 3.3.4.). Falls sich dies bestätigte, wurde eine weitere PCR durchgeführt. Hierbei wurde als Sample ein Teilvolumen der ersten Reaktion verwendet. Als Primer kamen sogenannte „Inner-Primer“ zum Einsatz. Diese umschlossen eine virale Sequenz die innerhalb derjenigen lag, die von den „Outer-Primern“ eingegrenzt worden war.

So konnte trotz sehr gering vorhandener Mengen an viraler DNA durch aufeinander folgende Amplifikationsschritte eine immense Vervielfältigung erreicht werden. Zum Nachweis der HSV-1-DNA wurde schlussendlich eine Gel-Elektrophorese durchgeführt.

Um zu bestätigen, ob in den Proben überhaupt DNA vorhanden war, wurden vor der spezifischen HSV-1-PCR, Nachweise des Housekeeping-Genes H1L1 erbracht.

Es wurde das Kit „Taq DNA Polymerase“ von Peqlab verwendet. Für die erste PCR wurde ein Mastermix aus jeweils 5µl 10X Puffer Y, 1µl 10mmol dNTPs, 0,5µl Forward-Primer, 0,5µl Backward-Primer, 0,5µl Taq-Polymerase, 40,5µl H₂O hergestellt. Diesem wurden 2µl des DNA-Samples zugefügt und anschließend die erste PCR mit dem hergestellten 50µl Ansatz durchgeführt. Das Protokoll hierfür war wie folgt:

1. 2 Minuten bei 95° C
2. 30 Sekunden bei 95° C
3. 30 Sekunden bei 60° C
4. 1 Minute bei 72° C Schritte 2-4 wurden 30 Mal wiederholt
5. 5 Minuten bei 72°C

Anschließend wurde ein neuer Mastermix mit insgesamt 50µl hergestellt. Dieser war fast gleich zusammengesetzt, es wurden lediglich nur 37,5µl H₂O, dafür aber 5µl des Samples verwendet. Zusätzlich fanden nun die Inner-Primer Verwendung. Das PCR-Protokoll war dasselbe wie bei der ersten Runde.

3.3.4 Gel-Elektrophorese

Zur Bestätigung des Ergebnisses der Nested-PCR wurde eine Gel-Elektrophorese mit deren Produkt durchgeführt. Das Gel wurde aus 4,5g Biozym-Agarose und 150ml TBE-Puffer hergestellt. Diese Mischung wurde für fünf Minuten gekocht, nach Abkühlung wurden 5µl Ethidiumbromid zugegeben. Danach ließ man es in einer geeigneten Gelkammer aushärten. Die einzelnen Proben wurden auf das Gel, zusammen mit einer Negativ (H₂O)- und einer Positiv (H1L1)-Kontrolle aufgetragen. Mit einer Spannung von 25 Volt wurde in einer mit TBE-Puffer gefüllten Kammer die Gel-Elektrophorese durchgeführt. Als DNA-Leiter wurde Puk verwendet.

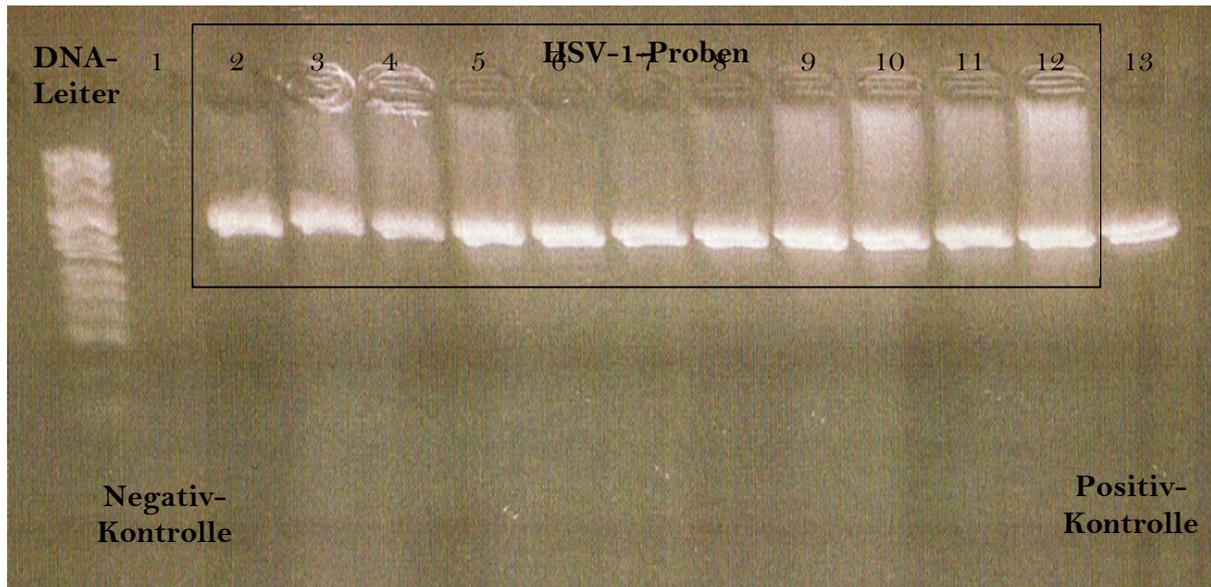


Abbildung 13 - Gel-Elektrophorese.

Links auf dem Bild kommt die DNA-Vergleichsleiter mit Nukleotiden spezifischer Sequenzen zur Darstellung. Feld 1: Negativkontrolle ohne Nukleotide. Felder 2-12: HSV-1 positiven Proben mit dem HSV-1 spezifischen Bandenmuster. Feld 13: Positivkontrolle .

3.4 Gewinnung von RNA, DNA und cDNA

Es musste, um Ausgangsmaterial für die oben genannten Versuche zu erhalten, RNA und DNA aus den Trigeminalganglien gewonnen werden. Da für die Realtime-qPCR lediglich cDNA Verwendung fand, musste eine Transkription dieser aus der gewonnenen RNA erfolgen.

3.4.1 RNA-Isolierung

Aus den in Kapitel 3.2.2. beschriebenen Gewebeschnitten wurde die gesamte RNA isoliert. Hierzu wurde QIAzol® anhand des vom Hersteller bereitgestellten Protokolls verwendet [105].

Die QIAzol Lösung enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat. Letzteres denaturiert Proteine inklusive RNAsen und verhindert so den Abbau der Ribonukleinsäuren. Die Proteine werden in Phenol suspendiert und durch Zentrifugation lässt sich so eine Trennung der verschiedenen Bestandteile erreichen, wobei sich die RNA in der wässrigen, die DNA in der Inter- und die Proteine sich in der organischen Phase befinden. Durch Zugabe von Isopropanol wird eine Präzipitation der RNA erreicht, die anschließend wieder resuspendiert werden kann [106].

Die einzelnen Schritte wurden dabei wie folgt durchgeführt: Das geschnittene und in Eppendorfgefäßen befindliche Gewebe wurde auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1ml QIAzol® -Lösung versehen. Anschließend wurde die Lösung im Homogenisator zwei Mal für jeweils 20 Sekunden homogenisiert, um eine maximale Zerkleinerung des Gewebes zu

erreichen. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten wurden 200µl Chloroform hinzugegeben und weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einer Zentrifugation bei 14000rpm und 4°C für 15 Minuten konnte eine Trennung der oben beschriebenen Phasen erreicht werden. Zur RNA-Isolierung wurde nun die obere wässrige Phase abpipettiert. Der Rückstand wurde zur Weiterverwendung bei -20° C eingefroren.

Nun wurden 10µl Glykogen zur wässrigen Lösung gegeben und anschließend für acht Sekunden mittels eines Vortexers vermischt. Nach Zugabe von 700µl 70%-igem Isopropanol wurde erneut mit einem Vortexer für acht Sekunden vermischt. Anschließend erfolgte eine Lagerung in einem -20° C Gefrierschrank für 20 Minuten.

Daraufhin wurde eine erneute Zentrifugation (14000rpm, 4° C für 20 Minuten) durchgeführt, was zur Bildung eines weißlichen, die zu isolierende RNA und verunreinigende Rückstände enthaltenden Pellets am Boden des Eppendorfgefäßes führte. Der wässrige Überstand wurde verworfen. Um die Verunreinigung zu minimieren, erfolgte ein Waschschriff mit 80%-igem Ethanol. Hiervon wurde 1ml zugegeben und nach vorsichtigem Schütteln wurde bei 14000rpm und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Dies ergab erneut ein Pellet mit wässrigem Überstand, der verworfen wurde.

Das nun weitestgehend von Verunreinigungen befreite Pellet wurde luftgetrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde die RNA in 20µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Anschließend wurde die Konzentration der RNA mittels des Spektralphotometers Nanodrop 2000 bestimmt.

3.4.2 DNA-Isolation

Um die verschiedenen Nested-PCRs durchführen zu können, wurde DNA benötigt. Diese konnte aus der bei der RNA-Isolierung (siehe Kapitel 3.4.1.) zurückbleibenden Interphase gewonnen werden.

Der aufgetaute Rückstand wurde bei 14000rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Dadurch ergab sich eine Trennung in eine die DNA enthaltende und in eine RNA enthaltende wässrige Phase. Da RNA nicht mitisoliert werden sollte, wurde die wässrige Phase verworfen.

Nun wurden 500µl Back-Extraction-Buffer (BEB-Puffer) zugegeben und durch schütteln vermischt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter intermittierendem Schütteln. Anschließend wurde eine Zentrifugation bei 14000rpm und Raumtemperatur für 30 Minuten durchgeführt. Hierdurch konnte eine wässrige, die DNA enthaltene Phase, von Verunreinigungen getrennt werden.

Zur wässrigen Phase wurden 10µl Glycogen hinzugefügt und nach Vermischen für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 400µl 100% Isopropanol zugegeben und erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesen Waschschrritten erfolgte eine erneute Zentrifugation (14000rpm, 4°C für 15 Minuten). Dadurch bildete sich ein Pellet, welches die DNA enthielt.

Der verunreinigte wässrige Überstand wurde verworfen und anschließend das Pellet mit 1ml 75% Ethanol gewaschen, um etwaige Protein-Verunreinigungen zu eliminieren. Nun wurde mit 14000rpm bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und die flüssige Phase verworfen. Diese beiden Schritte wurden drei Mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.

Um die DNA nun in eine gelöste Form zu überführen wurden 30 µl reines Wasser hinzugegeben und mittels eines Vortexers vermischt. Nach 2 Minuten Inkubation bei 55°C und einer anschließenden Zentrifugation mit 14000rpm bei 4°C für 5 Minuten war alle DNA gelöst und konnte weiterverwendet werden.

3.4.3 Transkription von cDNA

Bei cDNA („complementary DNA“) handelt es sich mittels reverser Transkription aus mRNA hergestellte Polynukleotid-Sequenzen. Diese stellen ein Abbild der für die jeweiligen Gene kodierenden Introns dar, das heißt also sie bilden die translatierten Genabschnitte.

Das Ausgangsmaterial stellt die isolierte RNA dar (siehe 3.4.1). Zu dieser wurden 1µl Random Primer hinzugegeben. Dieser ist unspezifisch und ermöglicht so eine Amplifikation sämtlicher vorhandener Polynukleotid-Sequenzen. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 70° C erhitzt und anschließend für 2 Minuten auf Eis gegeben. Nach kurzer Zentrifugation wurden 8µl Mastermix zugegeben. Dieser setzte sich zusammen aus:

1. 4,5µl 5X First Strand Buffer
2. 2µl 0,1 DTT
3. 1µl 10mM dNTPs
4. 1µl RNase-Inhibitor

Nach 2 Minuten im 42° C warmen Wasserbad wurde 1µl SuperScriptII zugegeben und für eine Stunde weiter inkubiert. Die cDNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20° C tiefgefroren.

3.5 Einzelzell-Analyse

Der Vergleich der Genexpression zwischen HSV-1 infizierten und nicht-infizierten Neurone erfolgte mittels Einzelzell-Analyse. Dazu mussten aus den Gewebeschnitten Neurone

gewonnen werden. Dies geschah mittels „Laser-cutting-Microdissection“ (LCM). Anschließend wurden die Zellen aufbereitet und mit ihrem Genmaterial eine quantitative PCR durchgeführt. Die aufeinanderfolgenden Schritte sollen nun kurz dargestellt werden.

3.5.1 LAT-*in-situ* Kurzfärbung

Die auf spezielle Membranträger aufgezogenen Schnitte wurden direkt nach dem Schneiden mit der LAT-*in-situ*-Färbung gefärbt. Diese entspricht allerdings nicht dem ansonsten angewandten Protokoll, sondern wurde zu einer Kurzform abgeändert. Der prinzipielle Unterschied zwischen Lang- und Kurzprotokoll besteht in einer weniger langen Dauer fast sämtlicher Arbeitsschritte. Vor allem die Inkubation mit der LAT-Sonde erfolgte nicht über Nacht, sondern lediglich für 5 Stunden. Nach der Färbung wurden die Schnitte sofort bei -80°C eingefroren.

3.5.2 Laser-cutting-Microdissection

Aus den gefärbten Schnitten wurden jeweils 30 Neurone ausgelasert. Diese wurden am Computer per Hand markiert. Hierfür wurde eine Live-Mikroskopie Übertragung mit einer Leica DFC 490 Kamera benutzt.

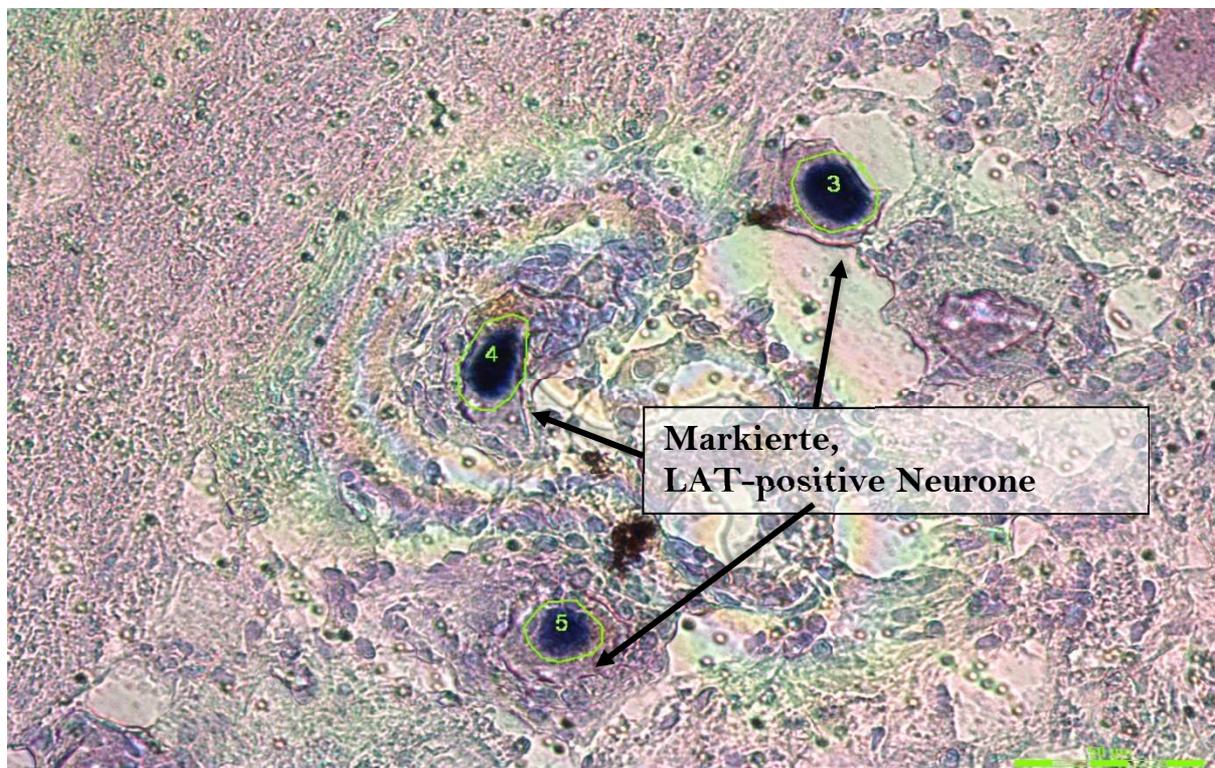


Abbildung 14 - Laser cutting microdissection.

Schnitt durch ein Trigeminalganglion nach LAT *in situ* Hybridisierung. Grün markiert sind die auszuschneidenden Neurone mit angefärbtem Zellkern.

Die markierten Zellen wurden nun von einem Laserstrahl entlang der gezeichneten Linie aus dem Schnitt ausgelasert. Dafür wurde das Gerät der Firma Leica CTR 6500 verwendet. Unter

dem Schnitt wurden Eppendorfgläser positioniert. Durch einen zusätzlichen Laser-Impuls, der am Ende des Schnittvorgangs abgegeben wurde, fielen die Zellen nach unten in die Deckel der betreffenden Eppendorfgläser.

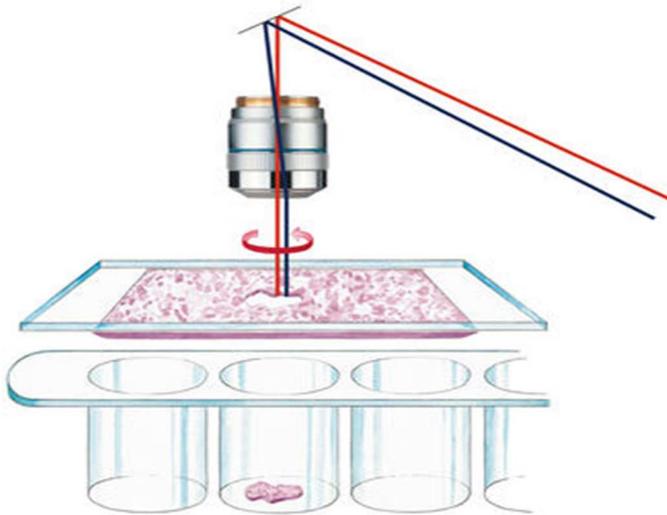


Abbildung 15 – Schematische Abbildung des Ablaufs der Laser Microdissection.

Oben ist das Mikroskopobjektiv mit eingebautem Laser zu sehen. Darunter der gefärbte Gewebeschnitt. Durch Gravitation fällt der Gewebeschnitt in das Auffanggefäß. Aus Leica Microsystems Brochure, 2006

Das Prinzip der Laser-Microdissektion ist, dass die ausgeschnittenen Neurone, primär durch die Schwerkraft in die Eppendorfgläser fallen. Im Vergleich zu einem alleinig impulsbeförderten Herauslösen werden weniger unerwünschte Gewebeteile mitgenommen.

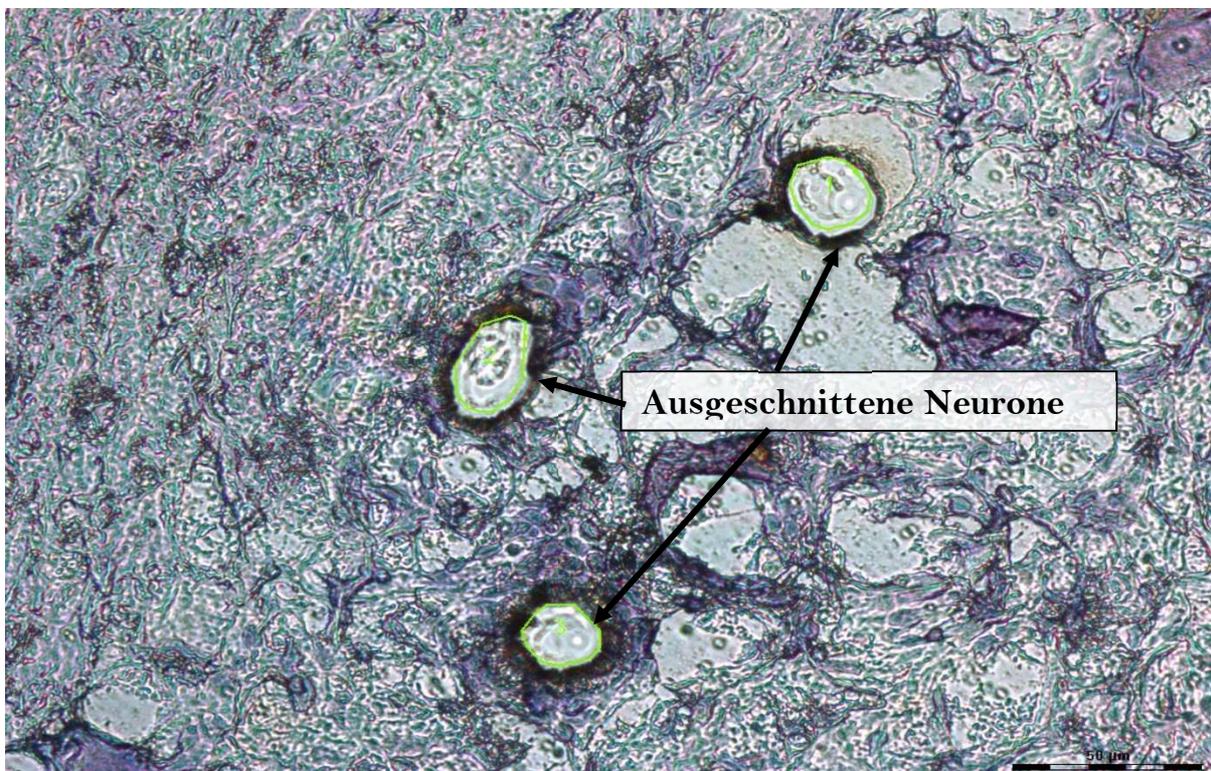


Abbildung 16 - Laser cutting microdissection.

Schnitt durch ein Trigeminalganglion. Zu sehen ist der selbe Schnitt wie Abbildung 15 nach der Laser Microdissection. Grün Markiert sind die ausgeschnittenen Zellkerne.

Nachdem die Neurone ausgeschnitten waren, wurden sie sofort bei -80°C eingefroren, um eine möglichst gute RNA-Qualität zu gewährleisten.

3.5.3 Aufarbeitung des zellulären Genmaterials

Um PCRs mit genomischem Material der Zellen durchführen zu können, musste aus der RNA cDNA erzeugt werden. Hierfür wurde das „Single-Cell-to-Ct-Kit“ der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Mit diesem kann mittels drei Schritten cDNA hergestellt werden.

Im ersten Schritt wurden die Zellen lysiert und DNA abgebaut. Zu den im Eppendorfgefäß-Deckel befindlichen Zellen wurden 1µl SingleCell-DNase I und 9µl SingleCell-Lysis-Solution gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Reaktionen mit 1µl SingleCell-Stop-Solution beendet. Nach 2 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung für 5 Minuten bei 12000rpm und 4° C zentrifugiert.

Nun schloss sich die reverse Transkription der zellulären RNA an. Hierzu wurden zu jedem Ansatz 4,5µl eines Mastermixes gegeben, welcher sich aus 3µl SingleCell-VILO-RT-Mix und 1,5µl SingleCell-SuperScript-RT zusammensetzte. Nun wurde in einer PCR-Maschine die reverse Transkription durchgeführt. Das Protokoll bestand aus folgenden Schritten:

1. 10 Minuten bei 25° C
2. 60 Minuten bei 42° C
3. 5 Minuten bei 85° C

Nun war sämtliche RNA in cDNA umgeschrieben worden. Um aber für eine PCR ausreichende Mengen zu erhalten, wurde die cDNA primerspezifisch präamplifiziert. Dadurch konnte die Menge an untersuchungsfähigem Material selektiv stark vervielfältigt werden. Hierfür wurde zuerst eine 1:100 Verdünnung der später für die PCR verwendeten TaqMan-Assays hergestellt. Da diese die spezifischen Primer enthalten, konnten sie auch für die Präamplifikation Verwendung finden. Der Mastermix setzte sich aus 5µl SingleCell-PreAmp-Mix und 6µl der Assay-Verdünnung zusammen. Diese wurden zu dem Versuchsansatz gegeben, mit welchem anschließend eine PCR durchgeführt wurde. Das Protokoll war wie folgt:

1. 10 Minuten bei 95° C
2. 15 Sekunden bei 95° C
3. 4 Minuten bei 60° C Schritte 2 und 3 wurden 14 Mal wiederholt
4. 10 Minuten bei 99° C

Damit war die Präamplifikation abgeschlossen. Im Ansatz war nun eine immense Menge an cDNA der zu untersuchenden Gene vorhanden. Für die PCR wurde eine 20fache Verdünnung des nach der Präamplifikation vorhandenen Ansatzes verwendet.

3.5.4 Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit dem Genmaterial der einzelnen Zell-Pools wurden für verschiedene Targets RealTime-qPCRs durchgeführt. Es wurden Zytokine, Oberflächenproteine, zelluläre Funktionsproteine sowie Marker für unterschiedliche Zellpopulationen untersucht. Im Einzelnen handelte es sich um:

- HLA-Proteine: HLA-A, -B, -C, -E, -G
- Zytokine: TNF- α , IFN- γ , IL1- β , CCL5/RANTES, CXCL10
- Zellmarker: LAT (zum Nachweis einer HSV-1-Infektion in den Zellen), CD3 (für T-Zellen), GLUL (für Glia-Zellen)
- Funktionsproteine: TAP1, β 2-Mikroglobulin

Um eine Normalisierung der Ergebnisse erreichen zu können, wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in jeder PCR als Referenzgen verwendet. Dieses wurde verwendet, da davon ausgegangen werden kann, dass es in allen Zellen in ungefähr konstanter Höhe exprimiert wird.

3.6 MHC Färbungen

3.6.1 HLA-A, -B und -C Immunfluoreszenz

Um eine Präsentation von klassischen HLA-Molekülen auf Neuronen nachzuweisen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierfür wurden fluoreszenzmarkierte Maus-Antikörper gegen die klassischen HLA-Proteine A, B und C verwendet. Es wurde folgendes Protokoll verwendet:

Die Ganglien wurden mit einer Dicke von 10 μ m geschnitten und anschließend auf Objektträger aufgezogen. Diese wurden zuerst für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 10 Minuten in Aceton fixiert. Es erfolgte die Pufferung mit dreimalig PBS für jeweils drei Minuten. Anschließend erneute Fixierung und Peroxidaseblock in 97% Methanollösung für 10 Minuten. Erneuter Waschschrift mit dreimalig PBS für jeweils 3 Minuten. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 5% Normal-Rabbit-Serum (50 μ l NRS in 1ml PBS) für 20 Minuten um eine unspezifische Antikörperreaktion zu verhindern. Es erfolgte nun die Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern in einer Verdünnung von 1:10 mit PBS für 26 Stunden bei 37°C. Anschließend Abwaschen der restlichen Lösung dreimalig mit jeweils 3 Minuten PBS.

Anschließend wurden die muralen Antikörper mit einem Biotin gekoppelten rabbit-anti-mouse-Antikörper in einer Verdünnung von 1:300 in PBS für 30 Minuten inkubiert. Nun erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen für jeweils drei Minuten mit PBS. Die Schnitte

wurden mit Streptavidin-HRP in einer 1:300-Verdünnung inkubiert. Nach erneutem Waschen für jeweils drei Mal drei Minuten erfolgte die Färbung mit 100µl DAB-Lösung für 2 Minuten. Anschließend wurde der Färbevorgang mit Wasser abgestoppt und die Schnitte mit Methylengrün gegengefärbt.

3.6.2 HLA-E Immunhistochemie

Um zu überprüfen, ob die Neurone im Trigeminalganglion auf ihrer Oberfläche HLA-E präsentieren, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Hierbei wurde ein HLA-E spezifischer Maus-Antikörper verwendet, welcher an etwaig vorhandene HLA-E Moleküle bindet. Diese Antikörperbeladung wurde dann in einem zweiten Schritt sichtbar gemacht. Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zuerst wurden die Ganglien mit einer Dicke von 10µm geschnitten und anschließend auf Objektträger aufgezogen. Diese wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 10 Minuten bei 37°C getrocknet. Es erfolgte eine Fixierung in Aceton für 10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte jeweils drei Mal für 3 Minuten mit TBS Puffer behandelt. Es erfolgte eine erneute Fixierung und Peroxidaseblock für 10 Minuten in einer 97%-Methanollösung. Anschließend erneut dreimalige Pufferung für jeweils 3 Minuten in TBS. Nach diesen Wasch- und Fixierungsschritten erfolgte die Inkubation mit 5% Normal-Rabbit-Serum (Verdünnung von 50µl NRS und 1ml PBS) um eine unspezifische Antikörper Reaktion zu verhindern. Im Folgenden erfolgte die Inkubation mit dem HLA-E-Antikörper in einer 1:10-Verdünnung mit PBS bei 37°C für 26 Stunden.

Nun wurde die restliche Antikörper-Lösung mit einer dreimaligen, jeweils dreiminütigen Behandlung mit TBS abgewaschen. Im nun folgenden zweiten Färbeschritt wurde der HLA-E-Antikörper sichtbar gemacht, indem bei 37°C ein Biotin-gekoppelter rabbit-anti-mouse Antikörper in einer 1:200-Verdünnung mit PBS für 2 Stunden mit den Schnitten inkubiert wurde. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift mit dreimalig 3 Minuten TBS. Anschließend wurden die Schnitte bei 37°C für 1 Stunde mit Streptavidin-HRP in einer 1:200 Verdünnung mit TBS inkubiert. Nach einem Waschen mit drei Mal 3 Minuten TBS erfolgte die Färbung mit 100µl DAB-Lösung bis ein ausreichender Färbungsgrad vorlag. Anschließend wurde der Vorgang mit Wasser abgestoppt und die Schnitte mit Hämatoxyllin-Eosin gegengefärbt und fixiert.

3.7 Statistik

Die statistische Analyse wurde mittels Microsoft Excel, SPSS und REST® („relative expression software tool“) durchgeführt. Dabei erfolgte ein Vergleich der relativen Expressionsprofile innerhalb der HSV positiven und negativen Vergleichsgruppen bezogen auf das Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Quantifizierung der relativen Expression erfolgte anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode [107]. Die Testresultate wurden in ein 95% Konfidenzintervall eingeteilt um Extrema aus der Analyse auszuschließen. Bei einer nicht normalverteilten Grundgesamtheit wurden zwei Tests zur statistischen Analyse herangezogen, zum einen der Mann-Whitney-U-Test zum anderen der „Pairwise fixed Reallocation Randomisation Test“ [108]. Der Mann-Whitney-U-Test ist ein parameterfreier Test für nicht normalverteilte Stichproben, welcher eine Aussage über die Signifikanz der Übereinstimmungen zweier Verteilungen erlaubt. Er war besonders für die statistische Analyse folgender Arbeit geeignet, da eine nicht normalverteilte Grundgesamtheit mit starker Wertstreuung vorlag, welche durch die beim Mann-Whitney-U-Test verwendete Rangeinteilung besser auswertbar gemacht wurde.

Der „Pairwise fixed Reallocation Randomisation Test“ ist ein parameterfreier Test der unabhängig von jeder Verteilung angewandt werden kann. Er beruht auf der zufälligen repetitiven Zuordnung der einzelnen Stichproben innerhalb der Vergleichsgruppen und der Analyse des sich daraus ergebenden Effekts auf das Expressionsprofil. Er erlaubt dadurch eine besonders genaue Aussagekraft im Vergleich zu herkömmlichen Testmethoden bei stark varianten nicht normalverteilten Grundgesamtheiten, wie sie in dieser Arbeit vorliegt [108]. Es erfolgte die Berechnung von p-Werten und die Festlegung eines Signifikanzniveaus zur Verwerfung der Nullhypothese von $p < 0,05$ für alle Untersuchungen.

Korrelationsanalysen wurden mittels Microsoft Excel und SPSS durchgeführt. Dabei wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 in Excel berechnet und es erfolgte eine Überprüfung auf statistische Signifikanz mittels Spearman Analyse in SPSS. Diese wurde verwendet da es sich um eine nicht normal verteilte Grundgesamtheit in ordinaler Skalierung handelt. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,01$ definiert.

3.8 Lösungen, Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.8.1 Lösungen und Puffer

Detektionspuffer 1 Liter

LAT-in-situ-Hybridisierung

100ml 1M TrisHCl pH 9,5

33ml 3M NaCl

Ad 1 Liter Aqua

PHO-Lösung

LAT-in-situ-Hybridisierung

4ml 20X SSC

0,2ml 100X Denkhart's Solution

0,2ml 10µg/ml Herring Sperm DNA

100mg Natrium-Pyrophosphat

0,1ml TrisHCl pH 7,5

15,5ml DEPC-H₂O

2X MA-Puffer

LAT-in-situ-Hybridisierung

23,2g Maleinsäure

17,4g NaCl

800ml H₂O

pH-Einstellung auf 7,5

DEPC-H₂O 1 Liter

Allgemeine Verwendung

1ml Diethylpyrocarbonat

1l destilliertes Wasser

10x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

1,4 M Natriumchlorid

0,027 M Kaliumchlorid

0,1 M di-Natriumhydrogen-phosphat

0,018 M Kaliumdihydrogenphosphat

20x SSC (Natriumcitrat-Salzlösung)

3 M NaCl

0,3 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat

pH 7,0

10x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)

0,5 M TrisHCl pH 8,

1,5 M NaCl

pH 7,6

1 M TrisHCl

1 M Trizma® basisch

HCl auf pH 8,0

4% PFA

für Gewebe-Fixierung

4% Paraformaldehyd

1x PBS

pH 7,0

100x Denhardt's Lösung

Für Prähybridisierungspuffer

1% Ficoll®

2% Polyvinylpyrrolidon

1% BSA

Back-Extraction-Buffer (BEB)*Für DNA-Isolation*

118,2g Guanidin-Thiocyanit

3,68g Natrium Citrat

30,29g TrisBase

Ad 250ml Wasser

10X TBE-Puffer 2 Liter*Für Gel-Elektrophorese*

217,8g TrisBase

111,3g Borsäure

74,4g EDTA

3.8.2 Chemikalien

1 Molare Trizma Base, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

20X Saline Sodium Citrat, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Aceton, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Blocking Reagent, Roche, Mannheim, Deutschland

Borsäure, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Bovine Serum Albumin Fraction V, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Chloroform, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Cryo Glue Einbettmedium, SLEE Medical GmbH, Mainz, Deutschland

DEPC, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Desoxy-NukleotidTriPhosphate, MP Biomedicals, Santa Ana, USA

Essigsäure Anhydrid, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ethanol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ethidiumbromid-Solution 10mg/dl, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

EthylenDiaminTetraessig-(Acid)-säure, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Ficoll 400, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Glycogen for mol. Biol. Roche, Mannheim, Deutschland

Herring Sperm DNA, Promega, Madison, USA

Isopropanol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Kaisers Glyceringelatine, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

KaliumChlorid, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Kaliumhydrogenphosphat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

LowMelt Agarose, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland

Maleinsäure Reagent Plus, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Methanol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Natrium Pyrophosphat, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

NatriumChlorid Rotipuran, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Natrium-Citrat-Dihydrat, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Natriumhydrogenphosphat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Nitroblautetrazoliumamid (NBT), Roche, Mannheim, Deutschland

Normal Rabbit Serum X0902, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Paraformaldehyd, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Polyvinylpyrrolodin, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Quiazol Lysis Reagent, Qiagen Sciences, Maryland, USA

SuperScript II, life technologies, Carlsbad, USA

Triethanolamin, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

TWEEN 20, EMD Chemicals, San Diego, USA

Wasserstoffperoxid, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

3.8.3 Verbrauchsmaterialien

Leica 818 Microtome Blades, Leica, Nussloch, Deutschland

Lysing matrix tubes 2ml, MP Biosystems, Solon, USA

Membrane Slides PEN-Membrane 2,0µm, MicroDissect GmbH, Herborn, Deutschland

Menzel Gläser 24x32mm Stärke 1, ThermoScientific, Braunschweig, Deutschland

MicroAmp 96-well Platte, Applied Biosystems/life technologies, Carlsbad, USA

Objekträger Superfrost Plus, ThermoScientific, Braunschweig, Deutschland

Optical adhesive film, Applied Biosystems/life technologies, Carlsbad, USA

PCR Kit Taq-DNA-Polymerase, Peq-Lab, Erlangen, Deutschland

TaqMan® Gene Expression Mastermix, AP, Foster City, USA

Single Cell-toCT qRT-PCR Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tissue-Tek-Cryomold, Sakura Finetek Europe, Aalphen aan den Rijn, Niederlande

Xµl Bevelled Filter Tips TipOne RPT, StarLab, Hamburg, Deutschland

3.8.4 Geräte

- Zentrifugen und Diverses

Centrifuge 5430 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Fast-Prep 24, MP Biosystems, Solon, USA

NanoDrop 2000c Spectrophotometer, ThermoScientific, Braunschweig, Deutschland

Sprout, HS, China

Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Vortex-Mixer 7-2020, Neo-Lab, Heidelberg, Deutschland

Z233 MK-2, Hermle, Wehingen, Deutschland

- PCR

Agagel-Midi-Wide, Biometra, Göttingen, Deutschland

Aura PCR Bench, Bioair/EuroClone, Milan, Italien

StepOne Plus RT-PCR-Systems, Applied Biosystems/life technologies, Carlsbad, USA

T-Personal, Biometra, Göttingen, Deutschland

- Laser

CryLas FTSS365-50, CryLas, Berlin, Deutschland

Leica CTR6500, Leica, Nussloch, Deutschland

Leica DFC 490 Kamera, Leica, Nussloch, Deutschland

- Pipetten

10/20/100/200/1000µl Pipetman, Gilson, Middleton, USA

10/20/100/200/1000µl Pipetten, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Mikroskope

Biozerø, Keyence, Osaka, Japan

Olympus BX41, Olympus, Hamburg, Deutschland

3.8.5 Antikörper und Sonden

Rabbit- α -Mouse Biotin Polyclonal, Dako, Glostrup, Dänemark

HLA-A/-B/-C Alexa488, SeroTec, Raleigh, USA

Streptavidin-HRP, BioLegend, San Diego, USA

Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche, Mannheim, Deutschland

DAB+ Chromogen, Dako, Glostrup, Dänemark

DAB+ Substrate Buffer, Dako, Glostrup, Dänemark

HLA-G: Monoclonal Mouse Antibody Clone 87G, Exibo, Prag, Tschechien

HLA-E: Monoclonal Mouse Antibody Clone 87G, Exibo, Prag, Tschechien

LAT-Sonde: LAT-Dig, Eurofins, Luxemburg, Luxemburg

Sequenz: 5'-CAT AGA GAG CCA GGC ACA AAA ACA C-3'

4 Ergebnisse

4.1 Typisierung der Ganglien mittels Nested-PCR und Gelelektrophorese

Die verschiedenen verwendeten Ganglien wurden mittels Gelelektrophorese auf das Vorhandensein von HSV-1 DNA überprüft. Anhand des Ergebnisses wurden sie anschließend den beiden Vergleichsgruppen zugeordnet (siehe 3.1).

4.2 Untersuchung der neuronalen Gen-Expression mittels Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion

Um eine Aussage über die Veränderung der neuronalen Genexpression durch eine HSV-1-Infektion treffen zu können, wurden HSV-1 infizierte Neurone mit nicht infizierten Neuronen verglichen. Es wurde eine Single-Cell-Real-Time-PCR durchgeführt und anschließend der Unterschied im Expressionsniveau statistisch bestimmt. Dabei wurden verschiedene MHC-Moleküle (A-G), sowie Inflammationsparameter untersucht.

Es wurden dabei initial zwei verschiedene HSV-1-negative Kontrollgruppen verwendet. Zum einen negative Neurone aus insgesamt HSV-1-positiven Trigeminalganglien. Zum anderen HSV-1-negative Neurone aus insgesamt HSV-1-negativen Trigeminalganglien. Aufgrund der höheren Aussagekraft der zweiten Vergleichsgruppe, wurde diese letztlich ausschließlich zur Analyse verwandt.

4.2.1 MHC-Moleküle

Es stellte sich die Frage, ob unter einer HSV-1-Infektion eine Alteration des neuronalen Expressionsprofils von MHC-Molekülen stattfindet. Hierbei war zum einen von Interesse, ob Neurone in der Lage sind selbstständig vermehrt proinflammatorisch wirksame Oberflächenproteine wie HLA-A, HLA-B oder HLA-C zu exprimieren, um so zu einer schnellen Infektionsabwehr beizutragen. Zum anderen wurde der Frage nachgegangen, ob HSV-1 zu einer Suppression oben genannter MHCs führt, beziehungsweise ob es zu einer vermehrten Produktion des primär anti-inflammatorischen Oberflächenproteins HLA-E kommt.

4.2.1.1 MHC-Moleküle werden in Großteil der Neurone exprimiert

In einem Großteil der Neurone zeigte sich eine prinzipielle Expression der MHC-Moleküle. Dabei war lediglich ein statistisch nicht signifikanter Unterschied zwischen der HSV-positiven und -negativen Vergleichsgruppe fest zu stellen:

HLA-A	Positive Neurone (n=24)	Negative Neurone (n=19)
Exprimierende	17	13
Nicht-Exprimierende	7	6
Relativer Anteil	71%	68%

Tabelle 4 – Anteil der HLA-A exprimierenden Neurone.

Darstellung der absoluten Zahlen der Neuronengruppen die HLA-A exprimieren (obere Zeile) und nicht exprimieren (mittlere Zeile). In der untersten Zeile ist der relative Anteil aller Neurone angegeben, welche HLA-A exprimieren. Die rechte Spalte stellt die HSV-1 negativen und die linke Spalte die HSV-1 positiven Neurone dar. Zur statistischen Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

HLA-B	Positive Neurone (n=24)	Negative Neurone (n=19)
Exprimierende	17	7
Nicht-Exprimierende	7	12
Relativer Anteil	71%	37%

Tabelle 5 – Anteil der HLA-B exprimierenden Neurone.

Darstellung der absoluten Zahlen der Neuronengruppen die HLA-B exprimieren (obere Zeile) und nicht exprimieren (mittlere Zeile). In der untersten Zeile ist der relative Anteil aller Neurone angegeben, welche HLA-B exprimieren. Die rechte Spalte stellt die HSV-1 negativen und die linke Spalte die HSV-1 positiven Neurone dar. Zur statistischen Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

HLA-C	Positive Neurone (n=24)	Negative Neurone (n=19)
Exprimierende	19	9
Nicht-Exprimierende	5	10
Relativer Anteil	79%	47%

Tabelle 6 – Anteil der HLA-C exprimierenden Neurone.

Darstellung der absoluten Zahlen der Neuronengruppen die HLA-C exprimieren (obere Zeile) und nicht exprimieren (mittlere Zeile). In der untersten Zeile ist der relative Anteil aller Neurone angegeben, welche HLA-C exprimieren. Die rechte Spalte stellt die HSV-1 negativen und die linke Spalte die HSV-1 positiven Neurone dar. Zur statistischen Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

HLA-E	Positive Neurone (n=28)	Negative Neurone (n=24)
Exprimierende	26	22
Nicht-Exprimierenden	2	2
Relativer Anteil	93%	92%

Tabelle 7 – Anteil der HLA-E exprimierenden Neurone.

Darstellung der absoluten Zahlen der Neuronengruppen die HLA-E exprimieren (obere Zeile) und nicht exprimieren (mittlere Zeile). In der untersten Zeile ist der relative Anteil aller Neurone angegeben, welche HLA-E exprimieren. Die rechte Spalte stellt die HSV-1 negativen und die linke Spalte die HSV-1 positiven Neurone dar. Zur statistischen Analyse wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Eine besonders hohe Expressionsrate zeigten die Neuronengruppen für HLA-E, mit einem jeweiligen Anteil von 92% beziehungsweise 93%. Dies deutet darauf hin, dass die MHC-Moleküle konstitutiv in Neuronen exprimiert werden. Um eine etwaige Oberflächenpräsentation und damit biologische Wirksamkeit nachzuweisen, wurden verschiedene Färbungen durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.).

4.2.1.2 MHC-Expression ist unabhängig von HSV-1 Infektion

Nach Analyse der PCR-Daten, ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen. Dabei wurde lediglich die relative Stärke der Expression der einzelnen HLA-Moleküle verglichen, nicht aber das absolute Expressionsmuster. Das Signifikanzniveau wurde dabei als ein p-Wert von kleiner als $p = 0,05$ angenommen. Die errechneten p-Werte waren dabei wie folgt:

HLA-Molekül	A	B	C	E
p-Wert	0,42	0,32	0,19	0,1

Tabelle 8 – p-Werte der MHC-Expressionsanalyse.

Dargestellt sind die p-Werte für die Signifikanz-Testung mittels des Mann-Whitney-U-Tests. Für keine der Vergleichsgruppen und untersuchten HLA-Moleküle ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der relativen Genexpression.

Dies zeigte, dass die Infektion mit HSV-1 in den Neuronen nicht zu einer Veränderung der Genexpression der untersuchten MHC-Gene führt. Die Neurone sind also nicht in der Lage ihre Erkennbarkeit für Immunzellen zu verbessern, indem sie ihre Oberflächenproteine verändern. Andererseits führt eine HSV-1 Infektion ebenfalls zu keiner gesteigerten HLA-E Expression. Somit macht sich das Virus diesen Mechanismus, einer Immunantwort zu entgehen, nicht zunutze.

Es wurde ebenfalls eine Korrelationsanalyse durchgeführt, um einen etwaigen Zusammenhang zwischen der Höhe der Expression der HLAs und dem Grad der Infizierung der Neurone mit HSV-1 (anhand der LAT-Werte) aufzudecken. Hierbei ergaben sich folgende Werte für die jeweiligen Korrelationen:

HLA-A: Bestimmtheitsmaß $R^2=0,0001$, $p=0,55$, $n=30$

HLA-B: Bestimmtheitsmaß $R^2=0,0126$, $p=0,5$, $n=24$

HLA-C: Bestimmtheitsmaß $R^2=0,0013$, $p=0,75$, $n=28$

HLA-D: Bestimmtheitsmaß $R^2=0,1375$, $p=0,35$, $n=48$

Zusammenschauend besteht für keines der HLA-Moleküle eine statistisch signifikante Korrelation.

4.2.2 Inflammationsproteine

Es wurde untersucht, ob die mit HSV-1 infizierten Neurone in der Lage sind, proinflammatorische Proteine wie Interleukin zu produzieren, um so eine Verstärkung der Immunantwort zu erreichen. Dabei wurde die Expression von TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , CCL5 und CXCL10 analysiert.

Da sich im Trigeminalganglion auch T-Zellen befinden, wäre eine Kontamination der untersuchten Neurone mit Immunzellmaterial denkbar. Um dies auszuschließen wurde der T-Zell Marker CD3 mitanalysiert. Es wurden nur die Daten solcher Proben für die Analyse verwendet, bei denen keinerlei CD3-Amplifikation nachgewiesen werden konnte. Somit ist sicher gestellt, dass es sich lediglich um neuronale Expression handelt.

4.2.2.1 Kein signifikanter Unterschied von TNF- α , IFN- γ und CXCL10

Insgesamt zeigte sich lediglich eine sehr geringe Expression der Chemokine TNF- α , IFN- γ sowie CXCL10 (TNF- α : 1/19 positiven Ganglien, 1/17 negativen Ganglien; IFN- γ : 3/19 positiven Ganglien, 1/17 negativen Ganglien; CXCL10: 3/19 positiven Ganglien, 1/17 negativen Ganglien). Dementsprechend erlaubt eine statistische Auswertung nur eine sehr begrenzte Aussagekraft. Die nichtsdestotrotz durchgeführte Analyse zeigte aufgrund zu hoher p-Werte keinen statistisch signifikanten Unterschied für die relative Expression der Chemokine TNF- α , IFN- γ sowie CXCL10. Die Ergebnisse waren stets über einem Wert von $p=0,05$.

Auch für die drei oben genannten Chemokine wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Es konnte ebenso kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von TNF- α , IFN- γ und CXCL10 und dem Grad einer HSV-1-Infektion gezeigt werden.

Am ehesten lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass Neurone keine, beziehungsweise nur eine sehr geringe Expression von TNF- α , IFN- γ und CXCL10 zeigen.

4.2.2.2 Expression von Interleukin-1- β ist signifikant gesteigert

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von IL1- β innerhalb der HSV-1 positiven Neurone signifikant höher lag als diejenige in HSV-1 negativen Neuronen. Dabei ergab sich eine relative Steigerung der Genexpression um den **Faktor 2,7**. Der p-Wert der relativen IL1- β Expression lag bei $p = 0,05$.

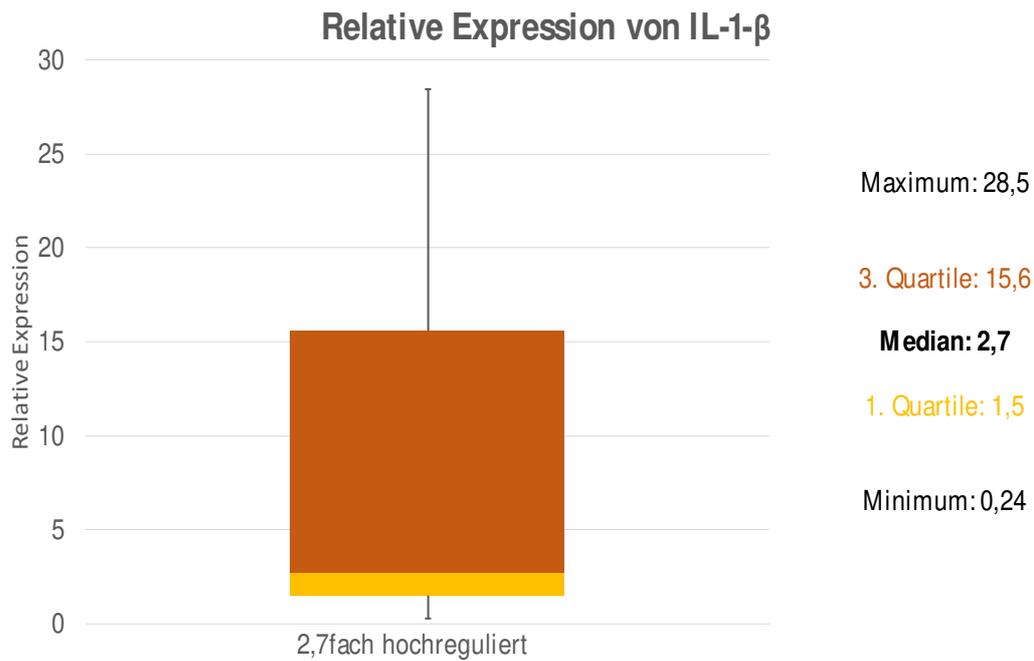


Abbildung 17 – Relative Genexpression von IL1-β.

Der Boxplot stellt die relative Genexpressionssteigerung in HSV-1 positiven Neuronen im Vergleich zu HSV-1 negativen Neuronen dar. Insgesamt ergibt sich eine statistisch signifikante Steigerung um den Faktor 2,7. Zur statistischen Auswertung wurde der „Pairwise fixed Reallocation Randomisation Test“ verwendet [108].

Um einen etwaigen Zusammenhang zwischen der Höhe der Expression von IL1-β und dem Grad der Infektion des Neurons mit HSV-1 festzustellen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt.

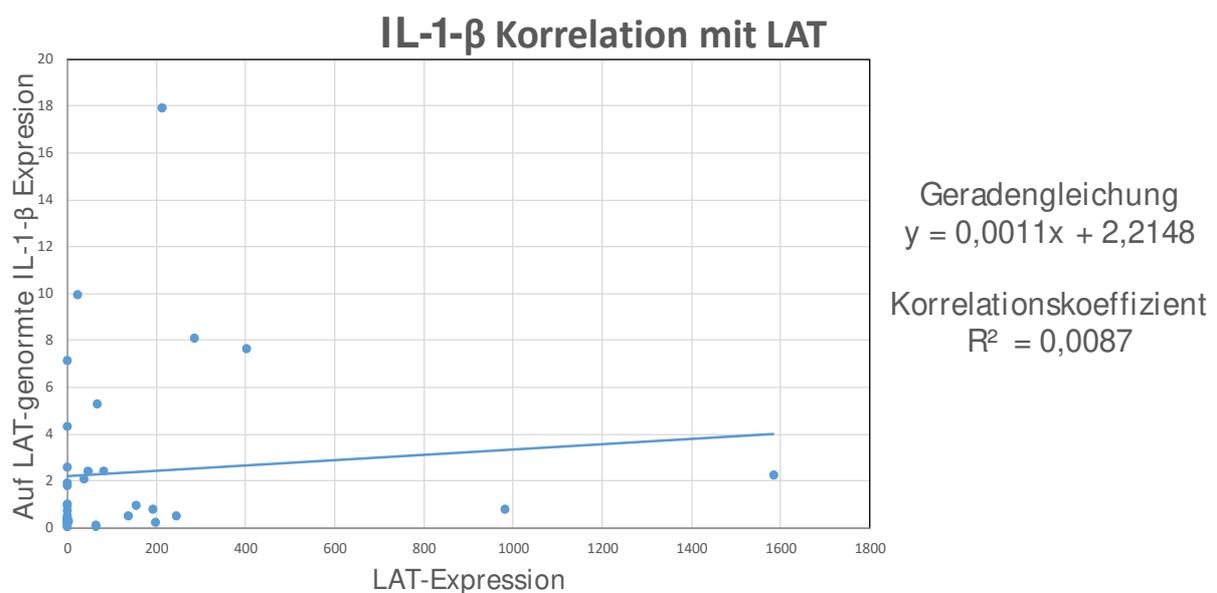


Abbildung 18 – Korrelation zwischen IL1-β und LAT

Es konnte eine schwache Trendlinie ermittelt werden, welche einen grundsätzlichen Zusammenhang zwischen dem Infektionsgrad und der Zytokinexpression impliziert.

Aufgrund des niedrigen Korrelationskoeffizienten bleibt diese jedoch statistisch nicht signifikant.

4.2.2.3 Expression von CCL5 ist signifikant gesteigert

Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit HSV-1 in den betroffenen Neuronen zu einer signifikant gesteigerten Expression von CCL5 führt. Im Vergleich zu komplett HSV-1 negativen Nervenzellen war die Expression um den **Faktor 3,5** höher. Die statistische Signifikanz war bei einem p-Wert von $p=0,034$ sichergestellt.

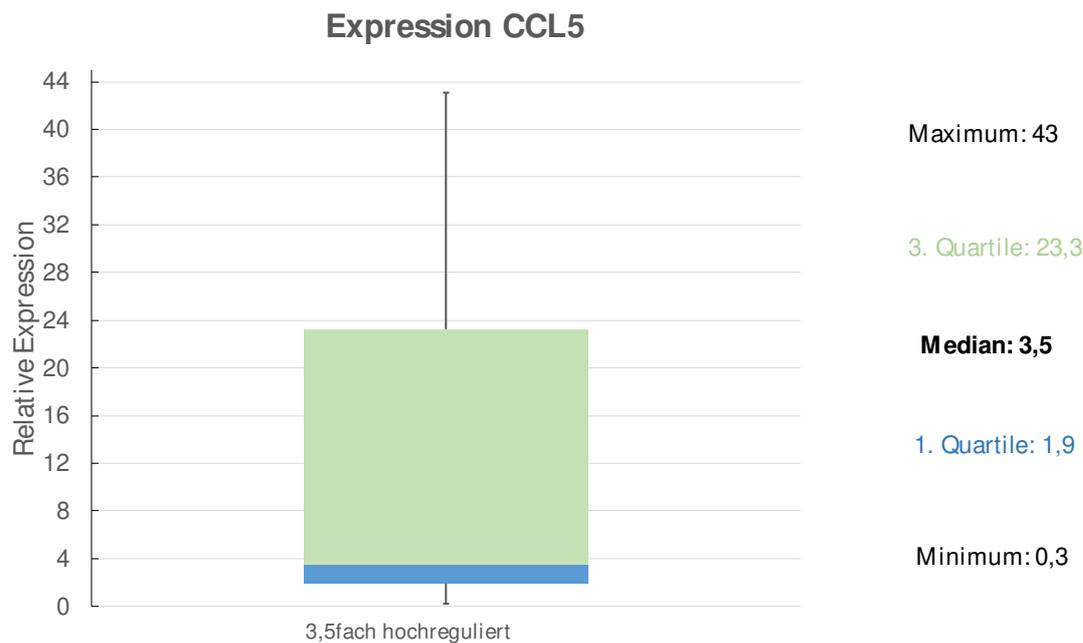


Abbildung 19 – Relative Genexpression von CCL5.

Der Boxplot stellt die relative Steigerung der Genexpression zwischen HSV-1 negativen und positiven Neuronen dar. Insgesamt ergibt sich eine statistisch signifikante Steigerung um den Faktor 3,5. Zur Auswertung wurde der „Pairwise fixed Reallocation Randomisation Test“ verwendet [108].

Anhand einer Korrelationsanalyse wurde untersucht, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem Grad der HSV-1-Durchseuchung und der Höhe der CCL5-Expression feststellen lässt.

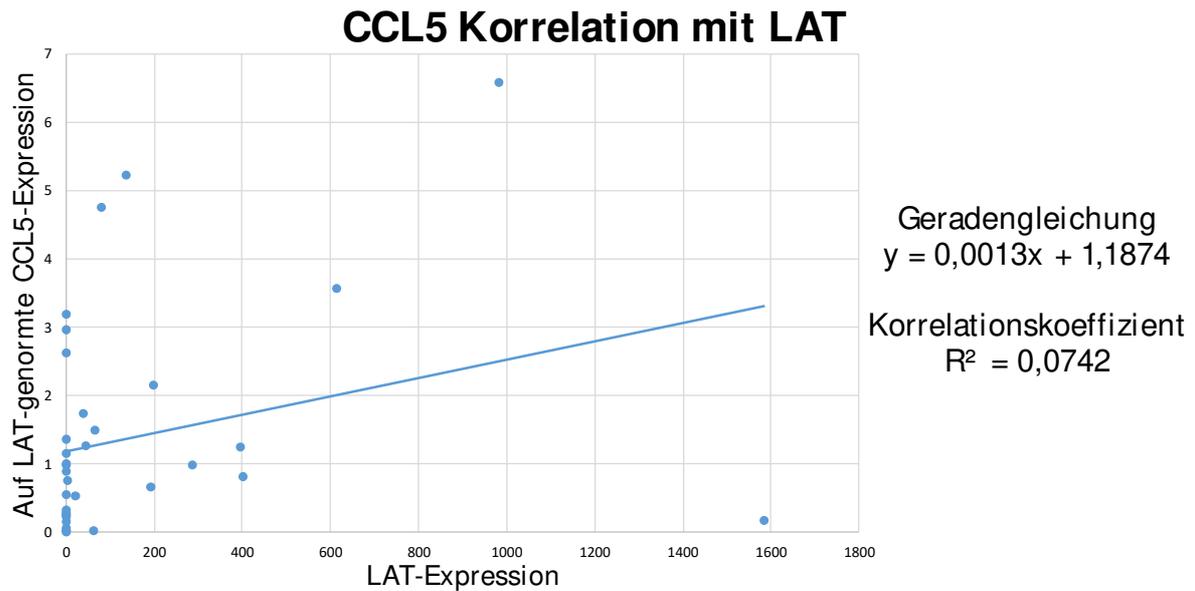


Abbildung 20 – Korrelation zwischen CCL5 und LAT

Die Analyse ergab eine Trendkurve, welche impliziert, dass je stärker die Neurone mit HSV-1 infiziert sind, desto mehr CCL5 von ihnen produziert wird. Aufgrund des sehr niedrigen Korrelationskoeffizienten hat diese Aussage jedoch keine valide Signifikanz.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass nicht nur Mikroglia und Astrozyten in der Lage sind CCL5 zu produzieren, auch die mit HSV-1 infizierten Neurone können vermehrt Chemokine herstellen. Dies könnte ein möglicher Mechanismus sein, wie auch diese Zellen an der Etablierung, beziehungsweise Aufrechterhaltung der antiviralen Immunantwort beteiligt sind.

4.3 Immunhistochemische Färbungen

4.3.1 HLA-A, -B, -C

Um eine Präsentation von MHC-Molekülen auf Neuronen nachzuweisen, wurden verschiedene Färbeprotokolle durchgeführt, die jeweils gleichzeitig die verschiedenen MHC-I Moleküle A, B und C mittels Immunfluoreszenz anfärben. Im Folgenden sind nicht-fluoreszierende Gewebeschnitte und die jeweilige Fluoreszenz-Aufnahme zu sehen.

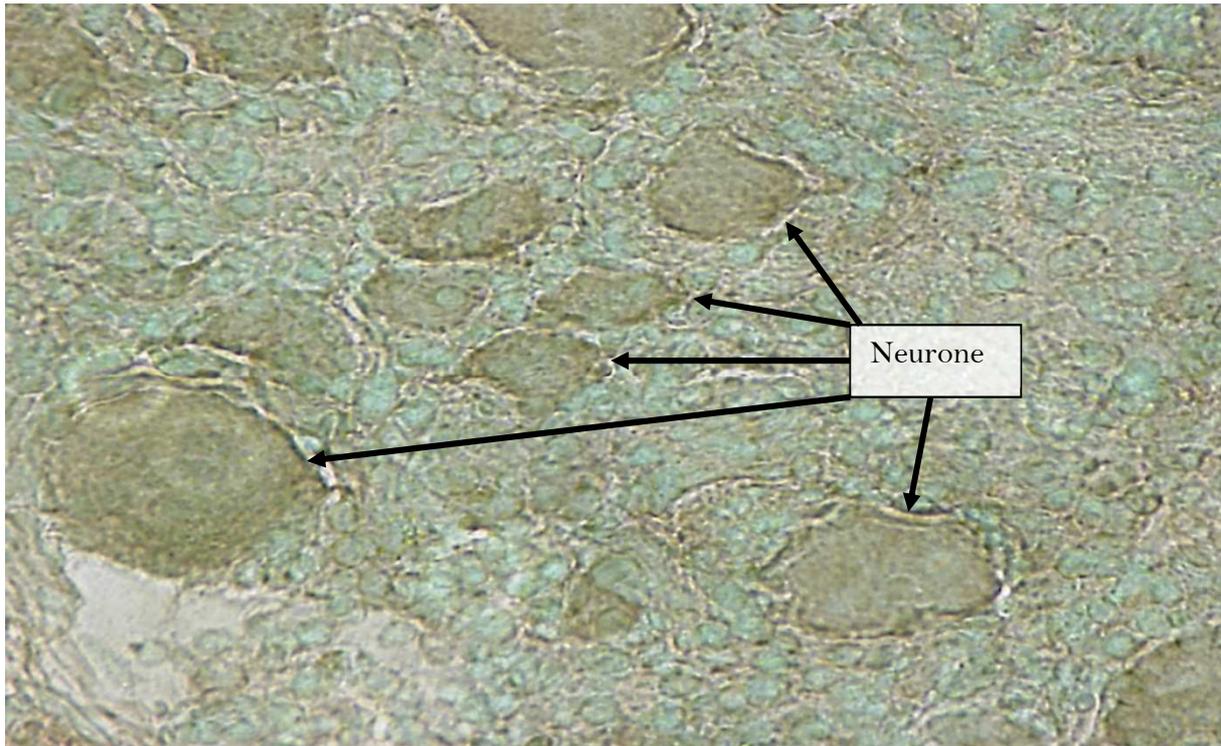


Abbildung 21 – Immunfluoreszenz-Färbung von HLA-A, -B und -C ohne Fluoreszenz zur Identifizierung von Neuronen

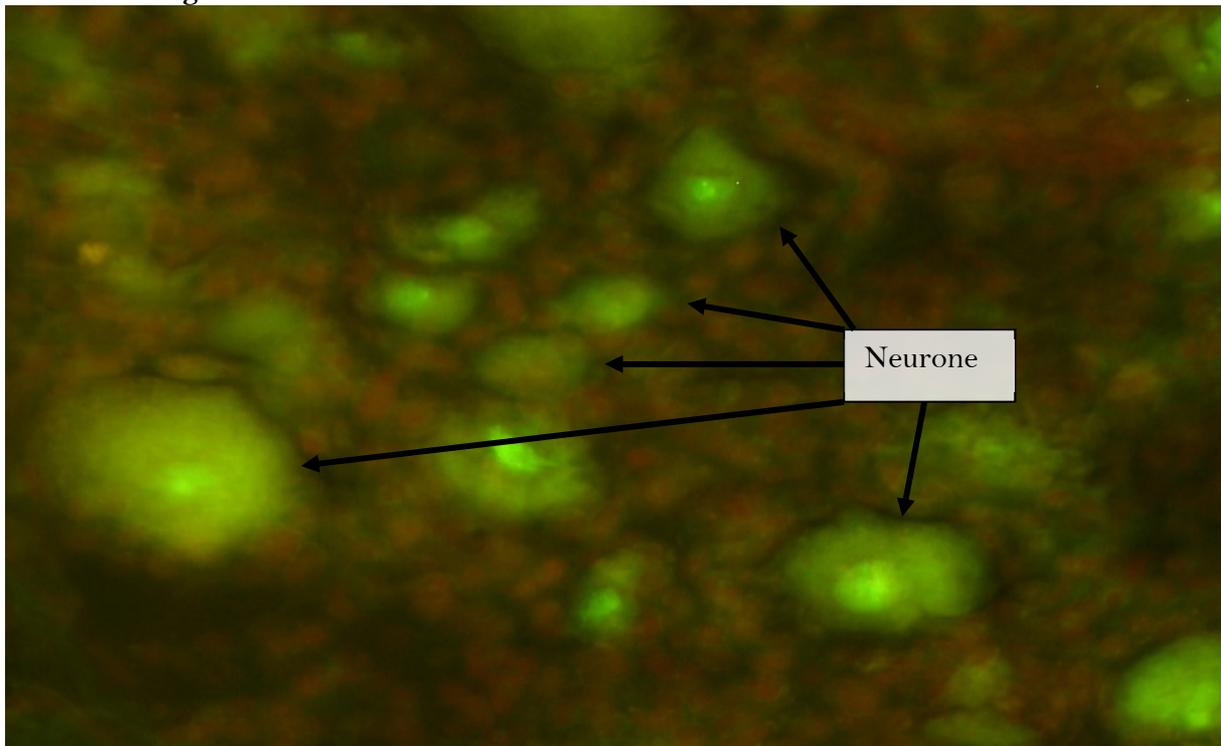


Abbildung 22 – Immunfluoreszenz-Färbung von HLA-A, -B und -C mit Fluoreszenz.

Die Neuronenmembranen kommen homogen fluoreszierend zur Darstellung.

In der Immunfluoreszenz zeigte sich eine homogene Anfärbung der Neuronenmembranen.

Diese war unabhängig davon, ob die Nervenzellen mit HSV-1 infiziert waren oder nicht. Diese Ergebnisse implizieren, dass auf Neuronen MHC- Moleküle zumindest in geringer Anzahl präsentiert werden.

4.3.2 HLA-E

Aufgrund der hohen Expressionsrate von HLA-E in den untersuchten Neuronen wurde mittels verschiedener Färbeprotokolle versucht, diese auf den Neuronen darzustellen.

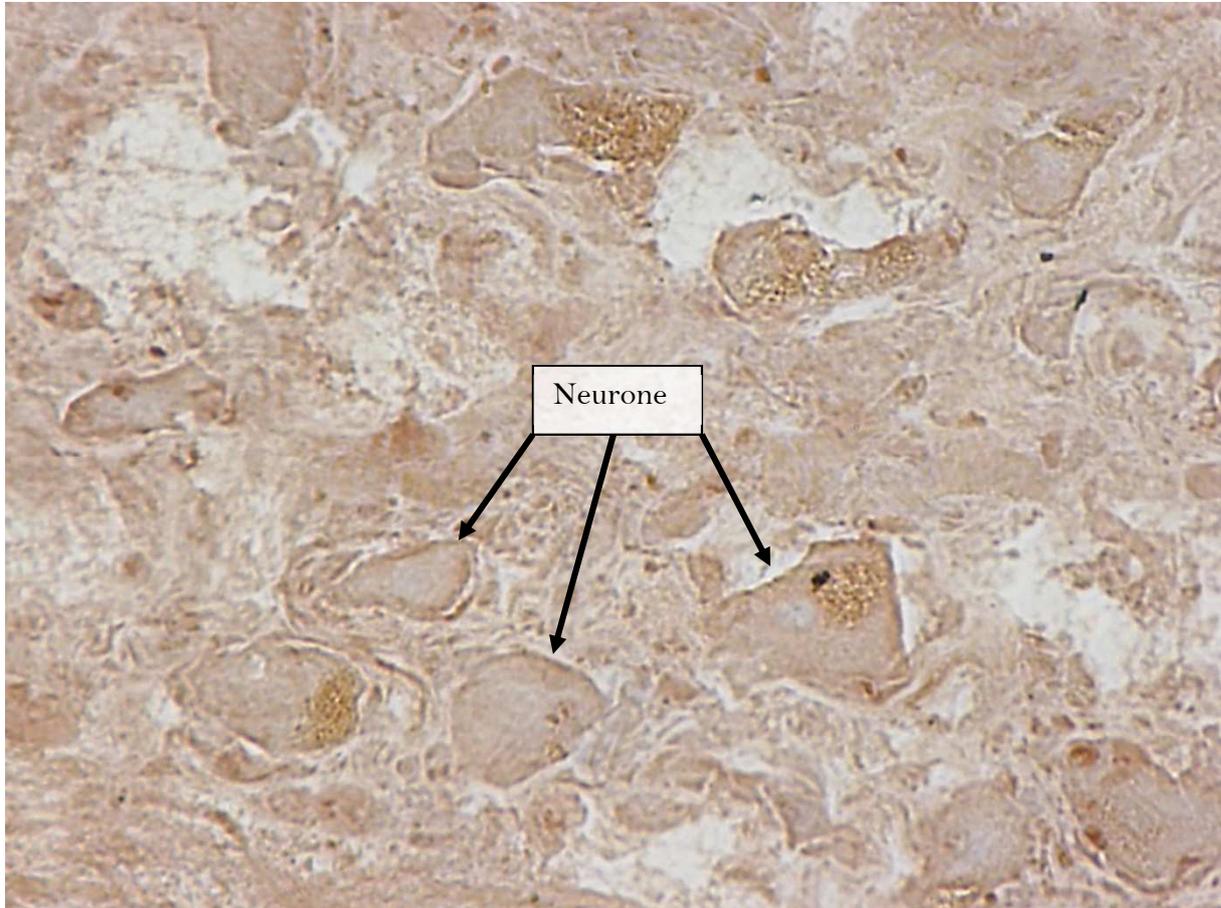


Abbildung 23 – Immunhistochemische Färbung von HLA-E.

Es zeigt sich keine dezidierte Anfärbung der Oberflächenmembran der Neurone.

Leider konnte HLA-E weder auf HSV-1 positiven noch auf HSV-1 negativen Neuronen sichtbar gemacht werden. Dies impliziert, dass es zwar zu einer Transkription des betroffenen Gens kommt, die tatsächliche Oberflächenpräsentation aufgrund bisher unbekannter Mechanismen jedoch unterbleibt.

5 Diskussion

Nach einer primären Infektion der oralen Mukosa etabliert HSV-1 eine lebenslange Latenz in neuronalen Zellen des Trigeminalganglions [109]. Obwohl eine latente Infektion nur bei Reaktivierung mit klinischer Symptomatik einhergeht, ist sie von einer andauernden Entzündungsreaktion begleitet. Diese zeigt sich sowohl durch Immunzellinfiltrate in den Ganglien, als auch durch eine erhöhte Expression von Zyto- und Chemokinen [110, 111]. Bisher wurde die Frage nach der Rolle der infizierten Neurone in der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion wenig betrachtet. In dieser Studie wurden zwei verschiedene immunologische Systeme in trigeminalen Nervenzellen untersucht. Zum einen war die Frage, ob es zu einer Veränderung des Expressionsmusters immunologischer Botenstoffe wie IL1- β und CCL5 kommt. Zum anderen wurde sowohl die Expression als auch die tatsächliche Präsentation von MHC Klasse I Molekülen auf Neuronen untersucht.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass es durch eine Infektion mit HSV-1 zu einer gesteigerten Expression von CCL5 im gesamten Trigeminalganglion kommt [77, 110]. Dabei wird das Chemokin sowohl in neuronalen Zellen als auch in Glia- und Immunzellen exprimiert [112]. Es spielt durch seine chemotaktische Wirkung eine entscheidende Rolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung der Immunreaktion innerhalb des Trigeminalganglions und stellt einen der entscheidenden Migrationsreize für CD8⁺ T-Zellen dar [113]. Für das Japanische Enzephalitis Virus konnte bereits eine Steigerung der CCL5 Expression in Neuronen nachgewiesen werden [114]. Um zu untersuchen, ob auch eine HSV-1 Infektion eine derartige Reaktion in den Nervenzellen hervorruft, wurde deren Expressionsmuster mittels Single-Cell Real-Time-PCR untersucht. Dabei ergab sich eine signifikante Steigerung der Transkription von CCL5 in mit HSV-1 infizierten Neuronen im Vergleich zu solchen, die nicht mit dem Virus infiziert waren. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur Stroma- und Immunzellen proinflammatorisch wirksame Chemokine ausschütten und damit eine Immunantwort auf die HSV-1 Infektion induzieren, sondern dass auch die betroffenen Neurone selbst diesen Weg der Infektabwehr einschlagen. In einer früheren Studie konnte in neuronalen Zellkulturen, die *in vitro* mit HSV-1 infiziert wurden, keine Produktion von CCL5 nachgewiesen werden [95]. Dies impliziert, dass es eventuell trotz der gesteigerten Transkription zu keiner tatsächlich gesteigerten Sekretion des Chemokins aus den Neuronen kommt. Dies könnte auf eine Blockade der Ausschüttung durch das Virus zurückzuführen sein, um einer Immunantwort entgegen zu wirken. Eine andere Möglichkeit könnte die gesteigerte intrazelluläre Prozessierung des translatierten Proteins darstellen.

Welche entscheidende klinische Rolle CCL5 in der Immunantwort auf HSV-1 Infektionen im zentralen Nervensystem spielt, konnte in Mausexperimenten nachgewiesen werden. So

zeigten CCR2-Rezeptor defiziente Mäuse sowohl einen schwereren Krankheitsverlauf, als auch eine reduzierte Migration und Aktivität der antiviral agierenden Immunzellen im ZNS. Dementsprechend stellt eine funktionierende CCL5-Sekretion einen essentiellen Bestandteil der Immunantwort auf eine HSV-1 Infektion dar [115].

IL1- β ist ein breit wirkendes Zytokin mit multiplen proinflammatorischen Eigenschaften. Seine Produktion wird durch verschiedenste Pathogene hervorgerufen, unter anderem auch durch HSV-1 [116]. Es steht häufig am Beginn der postinfektiös einsetzenden Entzündungskaskade und spielt dementsprechend eine wichtige Rolle im immunologischen System des Körpers [100]. Auch HSV-1 als ubiquitäres Pathogen kann eine Reaktion hervorrufen. Um eine Steigerung der IL1- β in mit HSV-1 infizierten Neuronen nachzuweisen, wurden in dieser Studie Single-Cell-RT-PCR Untersuchungen durchgeführt. Dabei ergab sich eine signifikante Steigerung der IL1- β Produktion in mit HSV-1 infizierten Nervenzellen. Andere Studien konnten eine entscheidende Rolle von IL1- β in der Regulation der Immunantwort nachweisen, hauptsächlich eine Produktion in dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Zellen. Durch diese Autoinduktion der Immunzellen ist der Körper in der Lage eine suffiziente Immunantwort gegen das Virus zu generieren [117]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie implizieren darüber hinaus, dass nicht nur Makrophagen und andere Immunzellen diesen Inflammationsmechanismus auslösen können, sondern auch die infizierten Neurone selbst. Dementsprechend tragen die von der Infektion betroffenen Zellen selbst dazu bei, eine Immunantwort und Elimination des Antigens auszulösen. Nichtsdestotrotz konnte in einer Studie gezeigt werden, dass mit HSV-1 infizierte Neuronenkulturen *in vitro* kein IL1- β produzieren [95]. Dementsprechend muss ein viraler Mechanismus vorliegen, der die Sekretion des Zytokins aus Neuronen reduziert oder ganz verhindert. Der Grund hierfür könnte sein, dass HSV-1 in der Lage ist, den intrazellulären Mechanismus zur Prozessierung des Zytokins in Fibroblasten zu inhibieren, und damit die Ausschüttung des biologisch aktiven Botenstoffs deutlich zu reduzieren [118]. Eine weitere Möglichkeit bestünde in einem gesteigerten intrazellulären Abbau oder einer verminderten Translation des Zytokins. Dementsprechend könnte es zwar zu einer Steigerung der Transkription von IL1- β in Neuronen kommen, jedoch durch virale Ausweichmechanismen zu keiner tatsächlich erhöhten Ausschüttung des Botenstoffs. Welche Mechanismen das Virus genau anwendet, um einer gesteigerten Immunantwort entgegenzuwirken, müsste in zukünftigen Studien evaluiert werden. Hierbei könnte sowohl IL1- β als auch CCL5 untersucht werden, da in beiden Zytokinsystemen trotz gesteigerter Transkription, das Effektorprotein nicht vermehrt nachgewiesen werden konnte. Eine Klärung der vom Virus verwandten Mechanismen zur Umgehung der gesteigerten proinflammatorischen

Zytokinlage im extraneuronalen Raum, würde etwaige neue therapeutische Ansätze, wie die gezielte Verwendung rekombinanter Zytokine ermöglichen.

Klinisch ist die IL1- β vermittelte Immunantwort von großer Bedeutung. So konnte in einer Studie (*in vitro*) durch Stimulation mit dem Zytokin eine HSV-1 spezifische T-Zellpopulation aus peripherem Blut kultiviert werden [119]. Auf diese Art und Weise könnte in Zukunft eine Immuntherapie mit körpereigenen T-Zellen initiiert werden.

Neben Entzündungsmediatoren hat sich die aktuelle Studie auch mit einem weiteren immunologischen System beschäftigt, nämlich den MHC-Molekülen. Die zwei Hauptklassen umfassenden Zelloberflächen-Rezeptoren spielen eine essentielle Rolle in jeglicher Immunantwort. Die klassischen MHCs sind dabei vor allem für die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Proteinen durch Immunzellen von Bedeutung [81]. Als Oberflächenrezeptoren stellen sie den primären Angriffspunkt der antiviral wirkenden CD8⁺ T-Zellen und Natürlichen Killerzellen dar und sind somit essentiell an der Immunantwort gegen HSV-1 beteiligt [82]. Normalerweise exprimieren Neurone MHC Klasse I Moleküle lediglich in sehr geringem Maße, wobei es durch verschiedene Infektionen, sowie durch Zytokinexposition zu einer Expressionssteigerung kommt [80, 120]. Wären Neurone in der Lage auf die Infektion mit HSV-1 durch eine gesteigerte MHC Oberflächenpräsentation zu reagieren, könnten sie so eine Steigerung der Immunabwehr und eine verbesserte Virusabwehr erreichen. Dies wurde in der vorliegenden Studie untersucht. Dabei wurde zuerst ein Vergleich der Expression der klassischen HLA-Moleküle A, B und C zwischen einer HSV-1 positiven und negativen Neuronengruppe durchgeführt. Hier zeigte sich in beiden Gruppen eine durchgehend hohe Expressionsrate. Interessanterweise konnte aber kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression zwischen HSV-1 infizierten und nicht-infizierten Nervenzellen festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass beinahe alle Neurone das genetische Programm der MHC Moleküle exprimieren, dies aber unabhängig von einem etwaig auslösenden Pathogen geschieht. Durch Fluoreszenzfärbung konnte des Weiteren der Nachweis von klassischen MHCs auf Neuronenmembranen erbracht werden. Auch hier zeigte sich keine Abhängigkeit vom Infektionsstatus der Nervenzellen. Alles in allem konnte die Studie, die bereits durch andere wissenschaftliche Ergebnisse erbrachte Erkenntnis untermauern, dass Neurone sowohl klassische MHC-Moleküle exprimieren, als auch diese auf ihrer Oberfläche präsentieren [80]. Obwohl dies nur in geringem Maße erfolgt, sind sie somit in der Lage aktiv in immunologische Prozesse einzugreifen.

Neben den klassischen MHCs war in dieser Arbeit vor allem das nicht-klassische MHC I Molekül HLA-E von großem Interesse. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass es in mit CMV infizierten Zellen zu einer Herunterregulierung der Expression klassischer

MHC Oberflächenrezeptoren kommt, wohingegen HLA-E vermehrt auf der Oberfläche präsentiert wird [87]. HLA-E spielt im Gegensatz zu seinen klassischen Verwandten vor allem eine antiinflammatorische Rolle, indem es die Funktion des angeborenen Immunsystems hemmt [87]. Diese Erkenntnis brachte die Frage auf, ob das derselben Virusfamilie entstammende HSV-1 den gleichen Mechanismus anwendet, um eine Immunantwort abzuschwächen. Um dies zu beweisen wurde sowohl die Gentranskription untersucht, als auch Färbungen durchgeführt. Die PCR-Analyse ergab keinen Unterschied in der Expression des HLA-Moleküls zwischen HSV-1 positiven und negativen Neuronen. HSV-1 scheint also nicht über dieselbe Möglichkeit wie CMV zu verfügen, dem Angriff des Immunsystems zu entgehen. Nichtsdestotrotz ergab sich eine hohe Rate an Neuronen, die HLA-E exprimieren. Deswegen wurde versucht dieses auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Die Tatsache, dass dies mittels immunhistochemischen Färbungen nicht gelang, impliziert, dass es zwar zu einer Transkription des Gens kommt, der weitere Prozessierungsvorgang bis zur tatsächlichen Oberflächenpräsentation jedoch bei mindestens einem Schritt unterbrochen wird. Dies könnte auf unterschiedlichsten Ebenen geschehen. Zum einen könnte die Translation unterbrochen werden, sodass keine intrazellulären Proteine entstehen. Zum anderen könnten Schritte in der komplexen, intrazellulären Prozessionskaskade inhibiert werden und so eine extrazelluläre Präsentation verhindern. Da allerdings weder die Transkription, noch die Oberflächenpräsentation von HLA-E durch eine HSV-1 Infektion beeinflusst wird, scheint HSV-1 diesen Weg der Suppression einer Immunantwort nicht zu verwenden.

Zusammengefasst stellen diese Daten neue Erkenntnisse der Beteiligung der Neurone an der Aufrechterhaltung, beziehungsweise Etablierung einer antiviralen Immunantwort dar. Sie sind nicht nur passive Wirte der HSV-1 Infektion, sondern können über verschiedene Mechanismen aktiv immunmodulatorisch agieren. Dabei spielen vor allem die Entzündungsmediatoren eine entscheidende Rolle. Um das Ausmaß der neuronieninduzierten Förderung der Immunantwort zu begreifen, müssten noch weitere Studien angestellt werden, welche die weitere Prozedur der Transkripte von CCL5 und IL1- β innerhalb der Neurone nachverfolgen. So könnte evaluiert werden, in welchem Ausmaß die infizierten Zellen selbst an der Etablierung eines proinflammatorischen Milieus beteiligt sind. Diese Ergebnisse könnten auch neue klinische Perspektiven in der Behandlung von HSV-Infektionen im ZNS eröffnen. So könnte über den Einsatz von rekombinanten Zyto- und Chemokinen nachgedacht werden, um die Immunreaktion zu verstärken. Des Weiteren könnte versucht werden mit einer „targeted therapy“ die viralen Mechanismen auszuschalten, welche die anschließende

vermehrte Ausschüttung der Entzündungsmediatoren hemmen. Dies alles könnte zu einer suffizienteren Behandlung oft schwer zu kontrollierender Herpesinfektionen, vor allem bei multimorbiden Patienten, für welche der Einsatz von konventionellen nebenwirkungsreichen Virostatika Gefahren birgt, beitragen.

Es konnte auch erneut das langjährige Dogma, der außerhalb der Reichweite der herkömmlichen Immunmechanismen gelegenen Neuronen durch den Nachweis von MHC I widerlegt werden. So ist für die Zukunft von Interesse, in welcher Art und Weise Neurone in der Lage sind mit zytotoxischen Immunzellen zu interagieren. Liegt ein genaueres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen, Strukturen und Abläufe vor, könnten daraus neue therapeutische Ansätze abgeleitet werden. Ein Beispiel hierfür wäre die Aphaese und anschließendes Priming körpereigener T-Zellen auf HSV-spezifische Antigene. Diese Zellen könnten dann als HLA-idente Immuntherapie bei HSV-Infektionen eingesetzt werden.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer latenten HSV-1 Infektion in sensorischen Neuronen auf deren inflammatorisches Milieu hin untersucht. Dabei wurden zum einen Entzündungsmediatoren und deren Expression in infizierten Neuronen untersucht, zum anderen wurden pro- und antiinflammatorisch wirksame MHC-Moleküle analysiert. Als Vergleichsgruppen wurden dabei HSV-1 infizierte und nicht infizierte Neuronen verwendet. Die wesentlichen Befunde stellen sich hierbei wie folgt dar:

1. Es kommt zu einer signifikanten Steigerung der Expression von CCL5 und Interleukin-1- β in HSV-1 infizierten Neuronen.
2. Ein Großteil der Neurone exprimiert klassische MHC-Moleküle. Diese werden zumindest in geringem Ausmaß an der Zelloberfläche präsentiert.
3. Fast alle Neurone exprimieren das antiinflammatorische MHC-Molekül HLA-E. Dabei kommt es allerdings zu keiner Oberflächenpräsentation.

Diese Ergebnisse haben folgende Bedeutung:

- a) Neurone sind selbstständig in der Lage durch Produktion von Zytokinen ein proinflammatorisches Milieu in ihrer Umgebung zu erzeugen. Hiermit sind sie in der Lage selbst an der Kontrolle einer HSV-1-Infektion mitzuwirken. Ebenso spielen sie eine Rolle in der Latenzetablierung und -aufrechterhaltung.
- b) Neurone sind für Immunzellen aufgrund der MHC-Expression erkennbar. Dies könnte vor allem auch bei Infektionen mit intrazellulär replizierenden Erregern wie HSV-1 eine entscheidende Rolle in der Immunogenität der Infektion spielen.
- c) Das Herpes simplex Virus Typ 1 führt zu keiner Expression von antiinflammatorischen MHC-Molekülen. Damit benutzt es diesen Weg der Ausschaltung des Immunsystems um einer Elimination zu entgehen nicht.

7 Danksagung

Mein größter Dank gilt meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Susanne Himmelein. Nicht nur konnte ich von ihr alle praktischen Fertigkeiten für diese Arbeit lernen, sondern sie war auch danach im langen Prozess der theoretischen Aufarbeitung immer ansprechbar und stets mit schnellem Rat und Tat zur Stelle.

Ebenfalls möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Strupp für die konstruktive Zusammenarbeit und die Hilfe im Rahmen dieser Arbeit danken.

Frau Privatdozentin Dr. med. Katharina Hüfner möchte ich dafür danken, dass sie, obwohl schon in einer anderen Stadt arbeitend, doch noch bereit war, mir bei der Durchführung meiner Arbeit zu helfen.

Frau Dr. rer. nat. Kathrin Held danke ich für die Unterstützung in der technischen Durchführung meiner Arbeit und ihren Rat.

Ich möchte ebenfalls der neurologischen Klinik der LMU München meinen Dank aussprechen für die Bereitstellung der nötigen Räumlichkeiten und Technik zur Durchführung meiner Arbeit.

Dem Programm zur Förderung von Forschung und Lehre der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Ermöglichung und Unterstützung meiner Promotion. Außerdem möchte ich meiner Familie danken, die mich während meines gesamten Studiums und dieser Arbeit stets begleitet und unterstützt hat.

8 Literaturverzeichnis

1. Grinde, B., *Herpesviruses: latency and reactivation - viral strategies and host response*. J Oral Microbiol, 2013. **5**.
2. McGeoch, D.J. and S. Cook, *Molecular phylogeny of the alphaherpesvirinae subfamily and a proposed evolutionary timescale*. J Mol Biol, 1994. **238**(1): p. 9-22.
3. Lindemann, D. and A. Rethwilm, *Foamy virus biology and its application for vector development*. Viruses, 2011. **3**(5): p. 561-85.
4. Cohrs, R.J. and D.H. Gilden, *Human herpesvirus latency*. Brain Pathology, 2001. **11**(4): p. 465-474.
5. Roizman, B. and R.J. Whitley, *The nine ages of herpes simplex virus*. Herpes, 2001. **8**(1): p. 23-7.
6. Whitley, R.J., D.W. Kimberlin, and B. Roizman, *Herpes simplex viruses*. Clinical Infectious Diseases, 1998: p. 541-553.
7. Wagner, E.K. and D.C. Bloom, *Experimental investigation of herpes simplex virus latency*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(3): p. 419-43.
8. Dreyfus, D.H., *Herpesviruses and the microbiome*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(6): p. 1278-86.
9. Zerboni, L., et al., *Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(3): p. 197-210.
10. Lusso, P., et al., *CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: interference with human immunodeficiency virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3872-6.
11. Wolz, M.M., G.F. Sciallis, and M.R. Pittelkow, *Human herpesviruses 6, 7, and 8 from a dermatologic perspective*. Mayo Clin Proc, 2012. **87**(10): p. 1004-14.
12. Steiner, I., P.G. Kennedy, and A.R. Pachner, *The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster*. Lancet Neurol, 2007. **6**(11): p. 1015-28.
13. McGeoch, D.J., F.J. Rixon, and A.J. Davison, *Topics in herpesvirus genomics and evolution*. Virus Research, 2006. **117**(1): p. 90-104.
14. Kelly, B.J., et al., *Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1*. Virus Research, 2009. **145**(2): p. 173-186.
15. Mettenleiter, T.C., B.G. Klupp, and H. Granzow, *Herpesvirus assembly: An update*. Virus Research, 2009. **143**(2): p. 222-234.
16. Alwine, J.C., W.L. Steinhart, and C.W. Hill, *Transcription of herpes simplex type 1 DNA in nuclei isolated from infected HEp-2 and KB cells*. Virology, 1974. **60**(1): p. 302-7.
17. Wagner, E.K., *Regulation of HSV transcription*. J Invest Dermatol, 1984. **83**(1 Suppl): p. 48s-52s.
18. Farooq, A.V. and D. Shukla, *Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update*. Surv Ophthalmol, 2012. **57**(5): p. 448-62.
19. Rowe, A.M., et al., *Herpes keratitis*. Prog Retin Eye Res, 2013. **32**: p. 88-101.

20. Blyth, W.A., et al., *Reactivation of herpes simplex virus infection by ultraviolet light and possible involvement of prostaglandins*. J Gen Virol, 1976. **33**(3): p. 547-50.
21. Bonneau, R.H., et al., *Stress-induced modulation of the primary cellular immune response to herpes simplex virus infection is mediated by both adrenal-dependent and independent mechanisms*. J Neuroimmunol, 1993. **42**(2): p. 167-76.
22. Openshaw, H., et al., *Acute and latent infection of sensory ganglia with herpes simplex virus: immune control and virus reactivation*. J Gen Virol, 1979. **44**(1): p. 205-15.
23. Padgett, D.A., et al., *Social stress and the reactivation of latent herpes simplex virus type 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 7231-5.
24. Vicetti Miguel, R.D., et al., *17-beta estradiol promotion of herpes simplex virus type 1 reactivation is estrogen receptor dependent*. J Virol, 2010. **84**(1): p. 565-72.
25. Held, K. and T. Derfuss, *Control of HSV-1 latency in human trigeminal ganglia--current overview*. J Neurovirol, 2011. **17**(6): p. 518-27.
26. *Varicella and herpes zoster vaccines: WHO position paper, June 2014*. Wkly Epidemiol Rec, 2014. **89**(25): p. 265-87.
27. Arvin, A.M., *Varicella-zoster virus*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(3): p. 361-81.
28. Yawn, B.P. and D. Gilden, *The global epidemiology of herpes zoster*. Neurology, 2013. **81**(10): p. 928-30.
29. Coghill, A.E. and A. Hildesheim, *Epstein-Barr Virus Antibodies and the Risk of Associated Malignancies: Review of the Literature*. Am J Epidemiol, 2014.
30. Herbein, G. and A. Kumar, *The oncogenic potential of human cytomegalovirus and breast cancer*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 230.
31. Sessa, R., et al., *Infectious burden and atherosclerosis: A clinical issue*. World J Clin Cases, 2014. **2**(7): p. 240-9.
32. Goodrum, F., K. Caviness, and P. Zagallo, *Human cytomegalovirus persistence*. Cell Microbiol, 2012. **14**(5): p. 644-55.
33. Zerr, D.M., et al., *A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 768-76.
34. Dewhurst, S., *Human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 infections of the central nervous system*. Herpes, 2004. **11 Suppl 2**: p. 105a-111a.
35. Mitchell, B.M., et al., *Herpes simplex virus-1 and varicella-zoster virus latency in ganglia*. J Neurovirol, 2003. **9**(2): p. 194-204.
36. Smith, J.S. and N.J. Robinson, *Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review*. J Infect Dis, 2002. **186 Suppl 1**: p. S3-28.
37. Wutzler, P., et al., *Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in selected German populations--relevance for the incidence of genital herpes*. J Med Virol, 2000. **61**(2): p. 201-7.
38. Weller, S.K. and D.M. Coen, *Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a013011.

39. Fatahzadeh, M. and R.A. Schwartz, *Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2007. **57**(5): p. 737-763.
40. Roberts, C.M., J.R. Pfister, and S.J. Spear, *Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students*. Sex Transm Dis, 2003. **30**(10): p. 797-800.
41. Clark, D.C., *Common acute hand infections*. Am Fam Physician, 2003. **68**(11): p. 2167-76.
42. Corey, L. and A. Wald, *Maternal and neonatal herpes simplex virus infections*. N Engl J Med, 2009. **361**(14): p. 1376-85.
43. Farooq, A.V. and D. Shukla, *Corneal latency and transmission of herpes simplex virus-1*. Future Virol, 2011. **6**(1): p. 101-108.
44. Kennedy, P.G. and I. Steiner, *Recent issues in herpes simplex encephalitis*. J Neurovirol, 2013. **19**(4): p. 346-50.
45. Kennedy, P.G. and A. Chaudhuri, *Herpes simplex encephalitis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2002. **73**(3): p. 237-8.
46. Theil, D., et al., *Prevalence of HSV-1 LAT in Human Trigeminal, Genuiculate, and Vestibular Ganglia and Its Implication for Cranial Nerve Syndromes*. Brain Pathology, 2001. **11**(4): p. 408-413.
47. Arbusow, V., et al., *Distribution of herpes simplex virus type 1 in human geniculate and vestibular ganglia: implications for vestibular neuritis*. Ann Neurol, 1999. **46**(3): p. 416-9.
48. Kennedy, P.G., *Herpes simplex virus type 1 and Bell's palsy—a current assessment of the controversy*. J Neurovirol, 2010. **16**(1): p. 1-5.
49. Campadelli-Fiume, G., et al., *The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell*. Reviews in Medical Virology, 2007. **17**(5): p. 313-326.
50. Arii, J., et al., *Entry of herpes simplex virus 1 and other alphaherpesviruses via the paired immunoglobulin-like type 2 receptor α* . Journal of virology, 2009. **83**(9): p. 4520-4527.
51. Nicoll, M.P., J.T. Proenca, and S. Efstathiou, *The molecular basis of herpes simplex virus latency*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(3): p. 684-705.
52. Everett, R.D., *ICP 0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection*. Bioessays, 2000. **22**(8): p. 761-770.
53. Boehmer, P.E. and I.R. Lehman, *Herpes simplex virus DNA replication*. Annu Rev Biochem, 1997. **66**: p. 347-84.
54. Aubert, M., S.A. Rice, and J.A. Blaho, *Accumulation of herpes simplex virus type 1 early and leaky-late proteins correlates with apoptosis prevention in infected human HEP-2 cells*. J Virol, 2001. **75**(2): p. 1013-30.
55. Granstedt, A.E., B.W. Brunton, and L.W. Enquist, *Imaging the transport dynamics of single alphaherpesvirus particles in intact peripheral nervous system explants from infected mice*. MBio, 2013. **4**(3): p. e00358-13.

56. Kramer, T. and L.W. Enquist, *Directional spread of alphaherpesviruses in the nervous system*. *Viruses*, 2013. **5**(2): p. 678-707.
57. Decman, V., et al., *Immune control of HSV-1 latency*. *Viral Immunol*, 2005. **18**(3): p. 466-73.
58. Hill, J.M., et al., *The high prevalence of herpes simplex virus type 1 DNA in human trigeminal ganglia is not a function of age or gender*. *J Virol*, 2008. **82**(16): p. 8230-4.
59. Hufner, K., et al., *Fewer latent herpes simplex virus type 1 and cytotoxic T cells occur in the ophthalmic division than in the maxillary and mandibular divisions of the human trigeminal ganglion and nerve*. *J Virol*, 2009. **83**(8): p. 3696-703.
60. Arbusow, V., et al., *Detection of herpes simplex virus type 1 in human vestibular nuclei*. *Neurology*, 2000. **55**(6): p. 880-882.
61. Baringer, J.R. and P. Pisani, *Herpes simplex virus genomes in human nervous system tissue analyzed by polymerase chain reaction*. *Annals of neurology*, 1994. **36**(6): p. 823-829.
62. Steiner, I., et al., *A herpes simplex virus type 1 mutant containing a nontransducing Vmw65 protein establishes latent infection in vivo in the absence of viral replication and reactivates efficiently from explanted trigeminal ganglia*. *J Virol*, 1990. **64**(4): p. 1630-8.
63. Perng, G.C. and C. Jones, *Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle*. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2010. **2010**: p. 262415.
64. Roizman, B. and R.J. Whitley, *An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation*. *Annu Rev Microbiol*, 2013. **67**: p. 355-74.
65. Stevens, J.G., et al., *RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons*. *Science*, 1987. **235**(4792): p. 1056-9.
66. Perng, G.C., et al., *The spontaneous reactivation function of the herpes simplex virus type 1 LAT gene resides completely within the first 1.5 kilobases of the 8.3-kilobase primary transcript*. *J Virol*, 1996. **70**(2): p. 976-84.
67. Mador, N., et al., *Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts suppress viral replication and reduce immediate-early gene mRNA levels in a neuronal cell line*. *Journal of virology*, 1998. **72**(6): p. 5067-5075.
68. Perng, G.C., et al., *Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript*. *Science*, 2000. **287**(5457): p. 1500-3.
69. Divito, S., T.L. Cherpes, and R.L. Hendricks, *A triple entente: virus, neurons, and CD8+ T cells maintain HSV-1 latency*. *Immunol Res*, 2006. **36**(1-3): p. 119-26.
70. Whitley, R.J. and B. Roizman, *Herpes simplex virus infections*. *The Lancet*, 2001. **357**(9267): p. 1513-1518.
71. Hill, A., et al., *Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity*. *Nature*, 1995. **375**(6530): p. 411-415.
72. Fruh, K., et al., *A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation*. *Nature*, 1995. **375**(6530): p. 415-8.

73. Orvedahl, A., et al., *HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein*. Cell Host Microbe, 2007. **1**(1): p. 23-35.
74. Arbusow, V., et al., *Latency of herpes simplex virus type-1 in human geniculate and vestibular ganglia is associated with infiltration of CD8+ T cells*. J Med Virol, 2010. **82**(11): p. 1917-20.
75. Himmelein, S., et al., *Circulating herpes simplex type 1 (HSV-1)-specific CD8+ T cells do not access HSV-1 latently infected trigeminal ganglia*. Herpesviridae, 2011. **2**(1): p. 5.
76. Derfuss, T., et al., *The presence of lytic HSV-1 transcripts and clonally expanded T cells with a memory effector phenotype in human sensory ganglia*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1164**: p. 300-4.
77. Derfuss, T., et al., *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): p. 389-98.
78. Adams, E.J. and A.M. Luoma, *The adaptable major histocompatibility complex (MHC) fold: structure and function of nonclassical and MHC class I-like molecules*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 529-61.
79. Sullivan, L.C., et al., *A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity*. Trends in Immunology, 2006. **27**(9): p. 413-420.
80. Neumann, H., et al., *Induction of MHC class I genes in neurons*. Science, 1995. **269**(5223): p. 549-552.
81. Niedermann, G., et al., *The proteolytic fragments generated by vertebrate proteasomes: structural relationships to major histocompatibility complex class I binding peptides*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(16): p. 8572-8577.
82. Brutkiewicz, R.R. and R.M. Welsh, *Major histocompatibility complex class I antigens and the control of viral infections by natural killer cells*. Journal of virology, 1995. **69**(7): p. 3967.
83. Paul, P., et al., *HLA-G,-E,-F preworkshop: tools and protocols for analysis of non-classical class I genes transcription and protein expression*. Human immunology, 2000. **61**(11): p. 1177-1195.
84. Megret, F., et al., *Modulation of HLA-G and HLA-E expression in human neuronal cells after rabies virus or herpes virus simplex type 1 infections*. Hum Immunol, 2007. **68**(4): p. 294-302.
85. Kraemer, T., R. Blasczyk, and C. Bade-Doeding, *HLA-E: a novel player for histocompatibility*. J Immunol Res, 2014. **2014**: p. 352160.
86. Lee, N., et al., *HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences*. The Journal of Immunology, 1998. **160**(10): p. 4951-4960.
87. Gong, F., et al., *Human leukocyte antigen E in human cytomegalovirus infection: friend or foe?* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012. **44**(7): p. 551-4.
88. Ishitani, A., N. Sageshima, and K. Hatake, *The involvement of HLA-E and -F in pregnancy*. J Reprod Immunol, 2006. **69**(2): p. 101-13.

89. Todd, J.A., et al., *A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity*. Science, 1988. **240**(4855): p. 1003-1009.
90. Castellino, F. and R.N. Germain, *Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments*. Immunity, 1995. **2**(1): p. 73-88.
91. Cresswell, P., *Assembly, transport, and function of MHC class II molecules*. Annual review of immunology, 1994. **12**(1): p. 259-291.
92. Nelson, P.J. and A.M. Krensky, *Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(3): p. 265-70.
93. Luster, A.D., *Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation*. New England Journal of Medicine, 1998. **338**(7): p. 436-445.
94. Melchjorsen, J., *Induction of RANTES/CCL5 by herpes simplex virus is regulated by nuclear factor B and interferon regulatory factor 3*. Journal of General Virology, 2003. **84**(9): p. 2491-2495.
95. Lokensgard, J.R., et al., *Robust expression of TNF α , IL-1 β , RANTES, and IP-10 by human microglial cells during nonproductive infection with herpes simplex virus*. Journal of neurovirology, 2001. **7**(3): p. 208-219.
96. Dahm, T., et al., *Neuroinvasion and Inflammation in Viral Central Nervous System Infections*. Mediators of Inflammation, 2016. **2016**.
97. Glass, W.G. and T.E. Lane, *Functional expression of chemokine receptor CCR5 on CD4+ T cells during virus-induced central nervous system disease*. Journal of virology, 2003. **77**(1): p. 191-198.
98. Yao, M., et al., *Cytokine Regulation of Metastasis and Tumorigenicity*. Adv Cancer Res, 2016. **132**: p. 265-367.
99. Pizarro, T.T. and F. Cominelli, *Cloning IL-1 and the birth of a new era in cytokine biology*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5411-2.
100. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 519-50.
101. Griffin, D.E., *Cytokines in the brain during viral infection: clues to HIV-associated dementia*. Journal of Clinical Investigation, 1997. **100**(12): p. 2948.
102. Weber, A., P. Wasiliew, and M. Kracht, *Interleukin-1 (IL-1) pathway*. Sci Signal, 2010. **3**(105): p. cm1.
103. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
104. Antoni, G., et al., *A short synthetic peptide fragment of human interleukin 1 with immunostimulatory but not inflammatory activity*. J Immunol, 1986. **137**(10): p. 3201-4.
105. QIAgen®, *QIazol® Handbook*. Sample and Assay Technologies, 2009.
106. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.

107. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.* *methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
108. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST[©]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.* *Nucleic acids research*, 2002. **30**(9): p. e36-e36.
109. Roizman, B. and A.E. Sears, *An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency.* *Annual Reviews in Microbiology*, 1987. **41**(1): p. 543-571.
110. Theil, D., et al., *Latent Herpesvirus Infection in Human Trigeminal Ganglia Causes Chronic Immune Response.* *The American Journal of Pathology*, 2003. **163**(6): p. 2179-2184.
111. Chen, S.H., et al., *Persistent elevated expression of cytokine transcripts in ganglia latently infected with herpes simplex virus in the absence of ganglionic replication or reactivation.* *Virology*, 2000. **278**(1): p. 207-16.
112. Adler, M.W., et al., *Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain,* in *Drug Addiction*. 2008, Springer. p. 127-138.
113. Liu, T., et al., *CD8+ T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons.* *The Journal of experimental medicine*, 2000. **191**(9): p. 1459-1466.
114. Chen, C.J., et al., *Upregulation of RANTES gene expression in neuroglia by Japanese encephalitis virus infection.* *J Virol*, 2004. **78**(22): p. 12107-19.
115. Menasria, R., et al., *Both Cerebral and Hematopoietic Deficiencies in CCR2 Result in Uncontrolled Herpes Simplex Virus Infection of the Central Nervous System in Mice.* *PLoS One*, 2016. **11**(12): p. e0168034.
116. Hill, J.M., et al., *HSV-1 infection of human brain cells induces miRNA-146a and Alzheimer-type inflammatory signaling.* *Neuroreport*, 2009. **20**(16): p. 1500-5.
117. Lucinda, N., et al., *Dendritic cells, macrophages, NK and CD8+ T lymphocytes play pivotal roles in controlling HSV-1 in the trigeminal ganglia by producing IL1-beta, iNOS and granzyme B.* *Virol J*, 2017. **14**(1): p. 37.
118. Johnson, K.E., L. Chikoti, and B. Chandran, *Herpes simplex virus 1 infection induces activation and subsequent inhibition of the IFI16 and NLRP3 inflammasomes.* *J Virol*, 2013. **87**(9): p. 5005-18.
119. Ma, C.K., et al., *Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) specific T-cell generation from HLA-A1- and HLA-A2-positive donors for adoptive immunotherapy.* *Cytherapy*, 2017. **19**(1): p. 107-118.
120. Neumann, H., et al., *Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α .* *The Journal of experimental medicine*, 1997. **185**(2): p. 305-316.

9 Eidesstattliche Versicherung

Florian Reßle

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Expression klassischer und nicht-klassischer MHC-Moleküle
sowie Inflammationsproteine in latent HSV-1 infizierten
Neuronen humaner sensorischer Ganglien**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 12.12.2018

Ort, Datum

Florian Reßle

Autor

10 Anhang

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Herpes simplex Virus Typ I	9
Abbildung 2 - Promoter Kaskade (aus Everett 2000).....	16
Abbildung 3 - Replikationszyklus der Herpes simplex Viren	18
Abbildung 4 - Latenz Zyklus.....	19
Abbildung 5 - Beginn der zur Latenz führenden Infektion.....	21
Abbildung 6 - Genom mit Repressor-Komplex.....	21
Abbildung 7 – MHC Klasse I Moleküle.....	28
Abbildung 8 – Darstellung der Interaktionsmöglichkeiten nicht-klassischer MHC-Moleküle.....	29
Abbildung 9 - MHC Klasse II Moleküle.....	30
Abbildung 10 – Übersicht über die verschiedenen Chemokine.....	31
Abbildung 11 - LAT- <i>in situ</i> -Hybridisierung eines Gewebeschnittes in einem Trigeminalganglion.....	39
Abbildung 12 - Beispielkurve einer PCR Amplifikation	40
Abbildung 13 - Gel-Elektrophorese.....	43
Abbildung 14 - Laser cutting microdissection.....	46
Abbildung 15 – Schematische Abbildung des Ablaufs der Laser Microdissection.....	47
Abbildung 16 - Laser cutting microdissection.....	47
Abbildung 17 – Relative Genexpression von IL1- β	60
Abbildung 18 – Korrelation zwischen IL1- β und LAT	60
Abbildung 19 – Relative Genexpression von CCL5.....	61
Abbildung 20 – Korrelation zwischen CCL5 und LAT	62
Abbildung 21 – Immunfluoreszenz-Färbung von HLA-A, -B und -C ohne Fluoreszenz zur Identifizierung von Neuronen	63
Abbildung 22 – Immunfluoreszenz-Färbung von HLA-A, -B und -C mit Fluoreszenz.....	63
Abbildung 23 – Immunhistochemische Färbung von HLA-E.....	64

10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Übersicht über die Familie der Herpesviridae.....	3
Tabelle 2 - Positive Ganglienpaare.....	35
Tabelle 3 - Negative Ganglienpaare.....	36
Tabelle 4 – Anteil der HLA-A exprimierenden Neurone.....	57
Tabelle 5 – Anteil der HLA-B exprimierenden Neurone.....	57
Tabelle 6 – Anteil der HLA-C exprimierenden Neurone.....	57
Tabelle 7 – Anteil der HLA-E exprimierenden Neurone.....	57
Tabelle 8 – p-Werte der MHC-Expressionsanalyse.....	58