

Aus dem Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum  
des Klinikums der Universität München

Direktor:

Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Brandt, FRCP, FEAN

# **Herpes simplex Virus Typ 1 Latenz in humanen Hirnnervganglien als virale Pathogenese der akut unilateralen Vestibulopathie**



**Dissertation**

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Anja Lindemann

aus Weilheim i.Obb.

2019

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Strupp, FANA, FEAN
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Friedrich Ihler Prof. Dr. rer. nat. Karl-Klaus Conzelmann
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. rer. nat. Susanne Himmelein
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	14.05.2019

## Eidesstattliche Versicherung

Ich, **Anja Lindemann**, erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „**Herpes simplex Virus Typ 1 Latenz in humanen Hirnnervganglien als virale Pathogenese der akut unilateralen Vestibulopathie**“ 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.

---

Dachau, 16.05.2019

Ort, Datum

---

Anja Lindemann

Ein Weg entsteht, wenn man ihn geht.

dt. Sprichwort



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1. Zusammenfassung .....	11
2. Einleitung .....	12
2.1 Schwindel .....	12
2.1.1 Vestibularsystem.....	12
2.1.1.1 Vestibularorgan.....	12
2.1.1.2 Zentrale, vestibuläre Projektionen.....	14
2.1.2 Vestibulärer Schwindel .....	17
2.1.3 Akut unilaterale Vestibulopathie .....	18
2.1.3.1 Pathophysiologie.....	18
2.1.3.2 Ätiologie .....	18
2.1.3.3 Diagnostik.....	19
2.1.3.4 Therapie .....	19
2.3 Herpesviren .....	20
2.3.1 Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1).....	20
2.3.2 Morphologie von HSV-1 .....	21
2.3.3 HSV-1-Genom.....	22
2.3.4 Lytischer Replikationszyklus.....	22
2.3.5 Latenz .....	23
2.3.6 Reaktivierung .....	24
2.4 Immunsystem.....	26
2.4.1 Angeborenes Immunsystem .....	26
2.4.2 Toll-ähnliche Rezeptoren .....	26
2.4.2.1 Signalweg nach Virusinfektion .....	27
2.4.2.2 MyD88-abhängiger Signalweg .....	28
2.4.2.3 TRIF-abhängiger Signalweg .....	28
2.4.3 Toll-ähnliche Rezeptoren im ZNS.....	30
2.4.4 Beteiligung der TLRs an ZNS-Pathologien .....	31

2.5 Apoptose .....	32
2.5.1 Extrinsischer Signalweg .....	32
2.5.2 Intrinsischer Signalweg .....	33
2.6 Fragestellung .....	33
3. Material und Methoden .....	34
3.1 Geräte .....	34
3.2 Chemikalien .....	34
3.3 Medien und Puffer .....	35
3.4 Materialien .....	37
3.5 Primer, Sonden und Antikörper .....	37
3.6 Humanes Gewebe .....	38
3.6.1 Präparation .....	38
3.6.2 Dünnschnitte .....	38
3.7 <i>In-situ</i> -Hybridisierung .....	38
3.8 RNA-Extraktion .....	39
3.9 Reverse Transkription .....	40
3.10 DNA-Isolation .....	40
3.11 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) .....	41
3.12 Einzelzellanalyse .....	42
3.13 Nested PCR .....	43
3.14 Gel-Elektrophorese .....	43
3.15 Auswertung .....	44
4. Ergebnisse .....	45
4.1 Trigeminalganglien .....	45
4.1.1 Latenz als Apoptosesuppression .....	46
4.1.1.1 Analyse ganzer Ganglien .....	46
4.1.1.2 Einzel-Zell Analyse .....	49
4.1.1.3 Statistische Analyse .....	51
4.1.2 Neuronale TLR-Expression .....	52
4.1.2.1 Analyse ganzer Ganglien .....	52
4.1.2.2 Einzel-Zell Analyse .....	54
4.1.2.3 Statistische Analyse .....	56
4.2 Vestibularganglien .....	57

## Inhaltsverzeichnis

---

5.	Diskussion.....	60
5.1	Trigeminusganglion.....	60
5.1.1	Apoptosesuppression.....	60
5.1.2	Neuronale TLR-Expression .....	62
5.2	Vestibularganglion .....	64
5.3	Fazit.....	65
6.	Literaturverzeichnis.....	66
7.	Danksagung.....	76
8.	Anhang .....	77
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	77
8.2	Tabellenverzeichnis.....	78

## Abkürzungsverzeichnis

[h]	Stunden (Zeiteinheit)
AP-1	Activator protein 1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bid	BH3 interacting domain death agonist
bp	Basenpaare
BPPV	Benign Paroxysmal Positional Vertigo
CCL	chemokine (C-C motif) ligand
cFLIP	Cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein
ciAP	zelluläre Apoptose-inhibitorische Proteine
CMV	Zytomegalievirus
CpG-ODN	Oligodesoxynukleotide mit hohem Cytosin und Guanin Anteil, verbunden durch Phosphorsäure)
CTCF	CCCTC-bindenden Faktorproteins
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang RNA
DVN	Nucleus vestibularis inferior oder descendens
EBV	Epstein-Barr Virus
E-Gene	early Gene
FADD	Fas-associated protein with death domain
FR	Formatio reticularis
gB	Glykoprotein B
GrB	Granzyme B
HHV6	Humane Herpesvirus Typ 6
HMGB-1	High-Mobility-Group-Protein B1
HSP60	60-kDa-Hitzeschockproteine
HSV1	Herpes simplex Virus Typ 1
IAP	Apoptose-inhibitorische Proteine
ICP	Infected Cell Protein
IE-Gene	immediate early Gene
IFN	Interferon
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen
IRF3	Interferon regulatory factor 3
IRF5	Interferon regulierende Faktor 5
LAT	Latenz assoziierte Transkript
L-Gene	late Gene
LRR	Leucine-rich Repeats
LVN	Nucleus vestibularis lateralis
M	männlich
MAP	mitogen-activated protein
MAP3K	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
miRNA	micro ribonucleic acid
MKK6	MAPK Kinase 6

## Abkürzungsverzeichnis

---

MVN	Nucleus vestibularis medialis
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
Pam3CSK4	synthetisches triacyliertes Lipopeptid
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMD	post-mortem delay
PRR	Pattern Recognition Receptors
RIP1	Receptor-interacting serine/threonine-protein 1
RLR	RIG-I-like Rezeptoren
RNA	ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	real-time quantitative PCR
SD	Standarddeviation, Standardabweichung
Stat1	Signal transducer and activator of transcription 1
SVN	Nucleus vestibularis superior
TAB	TAK1-binding protein
TAK1	TGF-beta-activated kinase 1
tBid	truncated BH3 interacting domain death agonist
TBK1	TANK-binding kinase 1
TG	Trigeminusganglion
TGF	Transforming Growth Factor
TIF	Trans Inducing Factor
TIR	Toll/IL-1R homology domain
TIRAP	toll-like receptor adaptor protein
TK	Thymidin-Kinase
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	TNFR1-assoziertem Todesdomänenprotein
TRAF	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierter Faktor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
UL-Region	unique long
US-Region	unique short
vhs	virion host shut-off
VOR	vestibulookulärer Reflex
VZV	Varizella Zoster Virus
W	weiblich
ZNS	zentrales Nervensystem

## 1. Zusammenfassung

Jährlich sind etwa 11 % der Bevölkerung von Schwindel betroffen. 8 % dieser Schwindelpatienten leiden an akut unilateraler Vestibulopathie, auch als Neuritis Vestibularis bekannt. Die akut unilaterale Vestibulopathie äußert sich durch heftigen Drehschwindel mit Oszillopsien, der akut einsetzt und über mehrere Tage bis Wochen andauert. Gang- und Standunsicherheiten mit Fallneigung zur betroffenen Seite, vegetative Begleitsymptomatik wie Übelkeit und Erbrechen und horizontaler Rotationsnystagmus zur gesunden Seite, runden die Symptomatik ab. Der Schwindel entsteht durch ungleiche Übertragung von Signalen der Vestibularorgane oder der Vestibularnerven an die Vestibularkerne, die sich in der Medulla oblongata befinden. Die Ursache der Entstehung einer akut unilateralen Vestibulopathie konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Sehr wahrscheinlich ist, dass sie durch eine Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1)-Infektion des Vestibularganglions oder der Vestibularkerne verursacht wird.

Zirka 85 % der Bevölkerung sind mit HSV-1 infiziert. Bei dem Erreger handelt es sich um ein doppelsträngiges DNA-Virus, das nach einer primären Infektion eine Latenz in den sensorischen Neuronen des Trigeminalganglions (TG) etablieren kann. Durch Stress, UV-Strahlung, Immunsuppression und weiterer Faktoren kann es zu einer Reaktivierung kommen, wobei die Viren auf anterogradem Weg zur Hautoberfläche gelangen. Vom TG aus kann über den Nervus lingualis das Ganglion geniculi (GG) und über facio-vestibuläre Anastomosen Neurone im superioren Vestibularganglion infiziert werden.

Da eine aktive Infektion mit einer Reaktion des Immunsystems einhergeht, wird schnellstmöglich der Zustand der Latenz wieder hergestellt.

Der Organismus kann zur Einschränkung der Pathogenvermehrung Apoptose einleiten. Durch das programmierte Absterben infizierter Zellen wird eine weitere Virusproduktion verhindert. Die Aktivierung bestimmter Caspasen spielt dabei eine wichtige Rolle. Da selbst nach einer HSV-1-Reaktivierung keine sensorischen Defizite auftreten, liegt die Vermutung nahe, dass das Virus zur Suppression der Apoptose fähig ist. Diese Arbeit soll Unterschiede im Expressionsniveau von Caspase-3 zwischen HSV-1-infizierten und nicht-infizierten Ganglien bzw. Neuronen aufzeigen, um dadurch Rückschlüsse auf apoptotische Prozesse zu ermöglichen.

Während der Erstinfektion wird zunächst das angeborene Immunsystem, welches rezeptorvermittelte Phagozytose beinhaltet, aktiviert, bevor die erworbene Immunität spezifisch auf den Erreger reagieren kann. Dabei spielt die Differenzierung körpereigener und fremder Substanzen eine wesentliche Rolle. Für die Unterscheidung zuständig sind Mustererkennungsrezeptoren, zu denen auch die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) gehören. Diese werden auf der Oberfläche von dendritischen Zellen, T- und B-Zellen, Natürlichen Killerzellen, Monozyten und Granulozyten exprimiert, sind jedoch auch im zentralen Nervensystem des Menschen auffindbar. Ziel dieser Arbeit ist es den Nachweis von TLRs in humanem neuronalem Gewebe zu erbringen sowie einen Unterschied zwischen HSV-1-infizierten und nicht-infizierten Ganglien bzw. Neuronen aufzuweisen.

In dieser Arbeit soll außerdem die Infektionsfrequenz des Vestibularganglions überprüft werden.

## 2. Einleitung

### 2.1 Schwindel

Schwindel ist neben Kopfschmerzen das am häufigsten genannte neurologische Symptom und zählt zu den Kernsymptomen in der klinischen Praxis [1]. Die jährliche Inzidenz von Schwindel liegt bei über 11 % und die Sterberate der Betroffenen ist im Vergleich zu Gesunden 1,7-fach erhöht [2]. Während ihres gesamten Lebens erkranken mindestens 30 % der Bevölkerung an Schwindelsymptomen, wobei ältere Personen häufiger betroffen sind [3]. Eine Erkrankung führt bei den Betroffenen zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität [4].

Schwindel dient als Oberbegriff für multisensorische und sensomotorische Syndrome unterschiedlicher Ätiologie und Pathogenese [5]. Man unterscheidet vier Formen:

1. Störungen des peripheren vestibulären Systems, die das Innenohr und/oder den Gleichgewichtsnerv betreffen.
2. Zentralen vestibulären Störungen, die den Hirnstamm oder das Kleinhirn betreffen.
3. Funktioneller Schwindel, wie den phobischen Schwankschwindel.
4. Andere Ursachen wie Blutdruckregulationsstörungen oder Nebenwirkungen von Medikamenten. [6]

Bei der Anamnese können Schwindelsyndrome durch Dauer und Art der Symptome, modulierende Faktoren wie Auslösbarkeit, Verstärkung und Abschwächung und mögliche Begleitsymptome richtig eingeordnet werden [6].

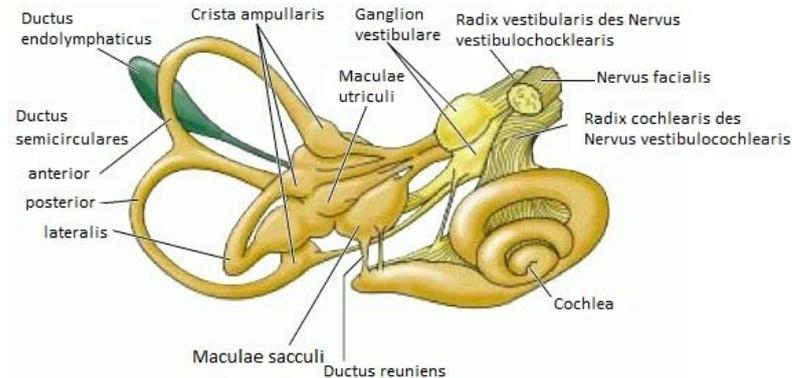
#### 2.1.1 Vestibularsystem

##### 2.1.1.1 Vestibularorgan

Das Vestibular- oder Gleichgewichtsorgan ist neben der Cochlea, welche das Hörorgan darstellt, in der Felsenbeinpyramide (*Pars petrosa*) des Schläfenknochens (*Os temporale*) lokalisiert und Teil des Innenohrs [7]. Es setzt sich aus drei Bogengängen, dem Ductus semicircularis anterior, lateralis und posterior und aus dem Maculae utriculi und sacculi zusammen. Es ist für die Raumorientierung, die Regulation der Körperhaltung, die Stabilisierung des Blickes und der Wahrnehmung von Beschleunigung zuständig [8].

Die äußere Struktur dieses komplexen Hohlraumsystems ist das knöcherne Labyrinth [9]. Es ist mit Perilymphe gefüllt. Perilymphe ist ein kaliumarmes Ultrafiltrat des Blutplasmas, welches über den Ductus perilymphaticus in die Subarachnoidalräume abgesondert wird [10, 11]. In diesem knöchernen Labyrinth ist das häutige Labyrinth mittels Bindegewebsfasern aufgehängt. Dieses enthält Endolymphe, welche in der Stria vascularis gebildet und im Saccus endolymphaticus resorbiert wird. Im Gegensatz zur Perilymphe ist die Endolymphe kaliumreich und natriumarm. Dieser Konzentrationsunterschied wird durch spezielle Kaliumpumpen aufrechterhalten und weist eine positive Ladung im Millivoltbereich auf [10].

Die drei Bogengänge stehen entsprechend der drei Raumebenen im rechten Winkel zueinander. Der Durchmesser eines Bogenganges beträgt etwa 0,4 mm. Der ampullär erweiterte Abschnitt eines Bogenganges, die Crista ampullaris, ist das eigentliche Sinnesorgan und beinhaltet einige tausend Haarzellen. Die Haarzellen sind umgeben von Stützzellen und haben an ihrer Oberfläche etwa 60 bis 100 Stereozilien und ein exzentrisch positioniertes Kinozilium [12]. Diese sind orgelpfeifenähnlich angeordnet und über dünne Proteinfäden, sogenannte ‚tip links‘, miteinander verbunden [13].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Innenohrs, übernommen aus [14].**

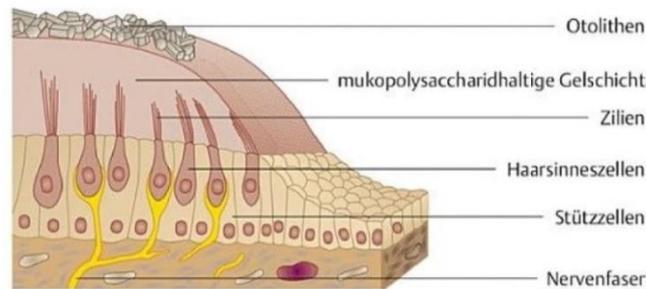
Innenohr mit Cochlea und dem auditiven Anteil des VIII. Hirnnervs, sowie dem Vestibularorgan bestehend aus drei Bogengängen, dem Ductus semicirculares anterior, lateralis und posterior und dem Maculae utriculi und sacculi und deren Innervation des vestibulären Teils des VIII. Hirnnervs.

Der Crista ampullaris sitzt die Cupula auf. Dies ist eine gallertartige Masse, eine mukopolysaccharidhaltige Gelschicht. Diese reicht bis zur anderen Seite der Crista und hat die Funktion einer elastischen Trennwand. Kommt es nun zu einer Drehbeschleunigung wird aufgrund der Trägheit der Endolymphe eine Endolymphströmung in den einzelnen Bogengängen verursacht, was eine Auslenkung der Cupula und der darin eingebetteten Stereozilien herbeiführt. Eine Auslenkung in Richtung des Kinoziliums führt zu einer Öffnung von Kaliumkanälen, in die Gegenrichtung werden die Kanäle geschlossen [15]. Diese Reizinformation wird über den Nervus vestibularis ins zentrale Nervensystem (ZNS) weiter geleitet. Dort wird die Information der Bogengänge beider Seiten ausgewertet [8].

Kurze Drehbewegungen führen zu einer Auslenkung der Cupula, die nach Abbremsung wieder in ihre ursprüngliche Ausrichtung einnimmt. Längere Drehbewegungen führen dazu, dass der Druckunterschied aufgrund der Massenträgheit, der zu einer Auslenkung der Cupula führt, abklingt. Das Stoppen der Drehbewegung baut diesen Druckunterschied wieder auf, was vom Gehirn irrtümlich als Gegenbewegung gedeutet wird. [11, 15]

Die Makulaorgane befinden sich innerhalb des Utriculus und Sacculus. Diese wiederum befinden sich innerhalb des Vestibulums und stehen fast senkrecht zueinander. Sie dienen zur Wahrnehmung der Schwerkraft und linearer Beschleunigungen. Dabei registriert der Utriculus die horizontale, der Sacculus die vertikale Beschleunigung [14]. Die regelmäßig angeordneten Haarzellen, aus denen das Sinnesfeld besteht, entsprechen den Haarzellen der Bogengänge. Auch sie reichen in eine gallertartige Masse. Diese weist jedoch aufgrund kleiner Calciumcarbonatkristalle auf ihrer Oberfläche, den Otolithen, eine erhöhte spezifische Dichte gegenüber der Endolymphe auf. Durch Gravitation oder Translationsbeschleunigungen kommt es durch diese Otolithenmembran zu einer Auslenkung der Stereozilien, was eine Änderung des Aktivitätszustands der Haarzellen bedingt. Durch die Information der Makulaorgane beider

Innenohren, die über den jeweiligen Vestibularnerv ins ZNS gelangen, können die Stellung des Kopfes im Raum berechnet und Translationsbeschleunigungen registriert werden [11, 15].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Makulaorgans, übernommen aus [15].**

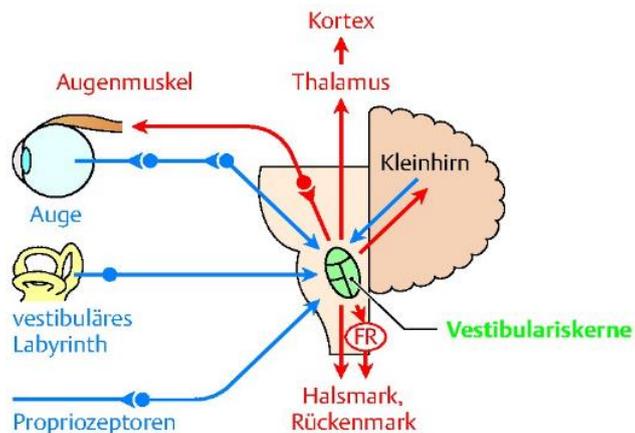
Haarsinneszellen, eingebettet in Stützzellen, deren Zilien in eine gallertartige Masse reichen. Diese Gelschicht ist mit Otolithen bedeckt. Eine Auslenkung der Haarsinneszellen führt zu einer Signalweiterleitung in den Nervenfasern.

### 2.1.1.2 Zentrale, vestibuläre Projektionen

Der Nervus vestibulocochlearis stellt den VIII. Hirnnerv dar. Es handelt sich hierbei um einen rein speziell somatosensiblen Nerv, der über den Kleinhirnbrückenwinkel in den Hirnstamm eintritt. Er tritt durch den Porus acusticus internus in den Meatus acusticus internus, den inneren Gehörgang. Dort teilt er sich in den Nervus vestibularis und den Nervus cochlearis. Die Zellkörper des bipolaren Nervus vestibularis befinden sich im Ganglion vestibulare am Boden des inneren Gehörgangs. Der Nervus vestibularis unterteilt sich peripher in einen Pars superior und einen Pars inferior. Aufgrund der Fasern aus den Ampullen des anterioren und des lateralen Bogenganges und aus der Macula utriculi wird der Pars superior auch Nervus utriculoampullaris genannt. Der Pars inferior setzt sich aus afferente Fasern aus dem posterioren Bogengang (Nervus ampullaris posterior) und aus dem Sacculus (Nervus saccularis) zusammen. [10, 11]

Die Informationen aus dem Gleichgewichtsorgan werden über den Nervus vestibularis an die vier vestibulären Kerne, dem Nucleus vestibularis superior (SVN; Bechterew-Kern), dem Nucleus vestibularis inferior oder descendens (DVN; Roller-Kern), den Nucleus vestibularis medialis (MVN; Schwalbe-Kern) und den Nucleus vestibularis lateralis (LVN Deiters-Kern) weitergeleitet. Die vestibulären Kerne befinden sich in der Medulla oblongata am Boden der Rautengrube. Im superioren und medialen Kern enden die Afferenzen aus den Crista ampullares. Die Afferenzen des Utriculus enden im medialen Kern und die Afferenzen aus dem Sacculus im inferioren Kern. Ein kleiner Teil der vestibulären Projektionen verläuft direkt in das Vestibulocerebellum. [10, 11, 16, 17]

Die Vestibularkerne wiederum unterhalten reziproke Verbindungen zum Rückenmark, ins Vestibulocerebellum, zu den Augenmuskelkernen, zum Thalamus sowie zu den Vestibularkernen der Gegenseite. Informationen bezüglich der Lage und Bewegung des Körpers können über diese Faserinfiltration reguliert und korrigiert werden [17, 18].



**Abbildung 3: Darstellung der Verschaltung der Vestibularkerne, übernommen aus [19].**

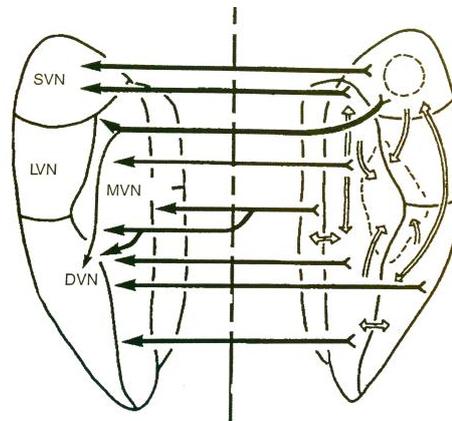
Vestibularkerne erhalten Afferenzen aus dem Vestibularorgan, Rückenmark, Augen und Kleinhirn und leiten Efferenzen an Thalamus, Kleinhirn, Augenmuskelkerne und das Rückenmark weiter.

Bewusst gesteuerte Motorik und Muskeltonus-Regulation werden durch den Tractus reticulospinalis und des Tractus vestibulospinalis harmonisiert. Die Tractus vestibulospinalis lateralis, medialis und inferior leitet Informationen zu den Motoneuronen des Halsrückenmarks und der Skelettmuskulatur von Rumpf und Extremitäten weiter. Über den Tractus reticulospinalis reticularis gelangen Informationen aus dem Kleinhirn zum Formatio reticularis (FR), was wiederum über die Aktivierung der Motoneurone zur Auslösung vestibulärer Reflexe führt. [11, 16]

Durch ipsilaterale und über Kommissurenfasern kontralaterale Verbindungen der Vestibularkerne werden Informationen der Vestibularorgane verglichen. Dadurch kann eine entsprechende Körperreaktion erfolgen. Kommt es zu einem Ungleichgewicht der Informationen, kann neben Schwindel auch über weitere Signale im Hypothalamus Übelkeit und Erbrechen ausgelöst werden. Bei längerem Bestehen eines Ungleichgewichts können Kompensationsvorgänge eingeleitet werden, die aufgrund der hohen neuronalen Plastizität zu einer neuen Bewertung der neuronalen Information führt. [11, 16]

Die Kontrolle der Okulomotorik, ohne die Beteiligung des Kortex, ist ein bedeutender Teil der vestibulären Verschaltung. Hierbei gelangen Projektionen über den Fasciculus longitudinalis medialis direkt zu den Augenmuskelkernen und kontrollieren somit die Blickstabilisierung [20]. Die Nuclei vestibulares verbinden Gleichgewichtsorgan über die Augenmuskelkerne N. oculomotorius (III. Hirnnerv), N. trochlearis (IV. Hirnnerv) und N. abducens (VI. Hirnnerv) mit der Augenmuskulatur. Dieser sogenannte vestibulookuläre Reflex (VOR) löst eine

Gegenbewegung der Augen zur Kompensation der Kopfbewegung aus, um ein stabiles Bild auf der Retina aufrecht zu erhalten. [11, 19]



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der ipsilateralen und kontralateralen Verbindungen, übernommen aus [20].**

Ipsilaterale Verbindungen (nicht ausgefüllte Pfeile) innerhalb der einzelnen Kerne. Kontralaterale Verbindungen der Vestibularkerne (schwarze Pfeile) kreuzen die Mittellinie der Medulla oder verlaufen durch das Cerebellum. Die superiores (SVN), inferiores (DVN) und medialen (MVN) Vestibularkerne weisen eine Vielzahl ipsilateraler und kontralateraler Verbindungen auf. Die lateralen Vestibularkerne (LVN) zeigen keine kontralateralen Verbindungen.

Das Kleinhirn, das sowohl sensorische als auch motorische Informationen verarbeitet, erhält Afferenzen aus den Vestibularkernen und direkt aus dem Labyrinth. Dort findet die Feinabstimmung für Bewegung und Wahrnehmung statt [20]. Die Informationen werden im Vestibulocerebellum, bestehend aus Nodus, Uvula, Flocculus und Paraflocculus, verarbeitet. Von dort gehen Purkinje-Fasern zurück zum vestibulären Kernkomplex. Dies dient der Steuerung der Körperhaltung und der Zielmotorik [21, 22].

Weitere afferente Bahnen ziehen von den Vestibularkernen über den Thalamus in spezifische Kortexteile. Der Thalamus fungiert hierbei als Relaiszentrum der vestibulären Bahnen. Sein posterolateraler Anteil hat die Aufgabe der funktionellen Verarbeitung vestibulärer Informationen [23]. Zusammen mit den aus dem Kleinhirn stammenden, vestibulären Informationen wird eine bewusste Wahrnehmung der Körperlage und Bewegung ermöglicht [17].

Vestibularkerne projizieren direkt in die genannten Regionen. Dadurch können vestibuläre Reflexe schnell und ohne Verzögerung durch bewusste Steuerung ablaufen [15].

Die stark konvergierende und multimodale zentrale Verarbeitung von Informationen ist eine bedeutende Eigenschaft des vestibulären Systems und unterscheidet sich erheblich von anderen Organsystemen. Es hat Funktionen inne, die von einfachen Reflexen bis hin zur Wahrnehmungs- und Bewusstseinssebene reichen [8].

### 2.1.2 Vestibulärer Schwindel

Vestibulärer Schwindel zählt zu den häufigsten Schwindelformen und lässt sich durch eine direkte oder indirekte Störung des Gleichgewichtsorgans erklären [1]. Hierbei kommt es durch vestibuläre, visuelle und propriozeptive Afferenzen zu einer nicht adäquaten Korrelation, was eine Störung der Raumorientierung, Blickstabilisierung und Körperhaltung zur Folge hat [24]. Ursächlich für diese Störungen sind Fehlfunktionen des Labyrinths, des Nervus vestibularis oder der zentral-vestibulären Bahnen.

Bei Läsionen, die das Labyrinth oder den Nervus vestibularis betreffen, spricht man von peripher vestibulärem Schwindel. Sind jedoch zentral neuronale Bahnen betroffen, werden diese als zentral vestibuläre Störungen klassifiziert [25].

Ischämische Läsionen im Bereich des Hirnstamms und okulomotorische Störungen, wie Downbeat- und Upbeat-Nystagmus, sind häufige Ursachen für zentral vestibulären Schwindel. Therapeutisch wird vor allem Kaliumkanalblocker wie 4-Aminopyridin eingesetzt. Durch die Blockade von Kaliumkanälen werden Purkinjezellen aktiviert. Dies verstärkt den Einfluss von inhibitorisch wirkenden Neurotransmittern auf vestibuläre und cerebelläre Kerngebiete, woraus eine Normalisierung der spontanen Entladungsrates zerebellärer Purkinjezellen folgt [6, 26]. Bei vestibulärer Migräne werden Betablocker empfohlen, die sich bei der herkömmlichen Migräneprophylaxe bewährt haben.

Der benigne periphere paroxysmale Lagerungsschwindel (BPPV) ist mit einer relativen Häufigkeit von 17,1 % die häufigste Ursache für peripher vestibulären Schwindel, vor allem im höheren Alter [6]. Es kommt zu kurzen Drehschwindelattacken und Nystagmus. Hierbei handelt es sich pathophysiologisch um eine Canalolithiasis [27]. Darunter versteht man ein pathologisches Vorkommen von freien Otolithen im Bogengangssystem [6, 28]. Das übersteigerte Drehempfinden kommt von der durch das Vorhandensein der freien Otolithen starken Endolymphströmung. Als Therapie wird das Sémont- oder Epley-Manöver durchgeführt. Hierbei wird durch schnelle, gezielte Kopfbewegung die Ansammlung der Otolithen aus dem Bogengang herausgespült [29].

Mit einer relativen Häufigkeit von 10 % ist Morbus Menière eine weitere, sehr häufige Erkrankung, die das peripher vestibuläre System betrifft. Die Schwindelattacken sind zwischen 20 Minuten und 12 Stunden lang und mit einer nachgewiesenen Hörminderung bei Tönen über 2000 Hz und einer Minderung von 30 dB assoziiert. Häufig kommt es auch zu Tinnitus oder Druckgefühlen im betroffenen Ohr. Weiteren Hinweise auf andere Auslöser sind nicht gegeben [6]. Als Ursache für die Menière-Erkrankung wird ein endolymphatischer Labyrinthhydrops angenommen. Durch periodisch auftretende Rupturen der Trennmembran zwischen den Räumen der Endolymph und Perilymphe kommt es zu oft Stunden andauernden Schwindelattacken. Gelangt die kaliumreiche Endolymph in den Perilymphraum, kommt es zu einer kaliuminduzierten Depolarisation des Nervus vestibulocochlearis mit einer auslösenden vorübergehenden Übererregung und anschließendem Leitungsblock. Durch die stärkere Depolarisation können die schnelleren Natriumkanäle in einen aktivierbaren Zustand übergehen [30]. Durch salzfreie Kost, Diuretika und transtympanale Gentamycingabe wird versucht eine Minderung des Endolymphhydrops zu erreichen. Auch Betahistidin kann durch eine Verbesserung der Mikrozirkulation im Innenohr und gleichzeitig regulatorischem Einfluss zu einer Reduktion der Flüssigkeitsansammlung führen [31].

Die dritthäufigste und für diese Arbeit relevante peripher vestibuläre Schwindelerkrankung ist die akut unilaterale Vestibulopathie, die auch unter dem veralteten Namen Neuritis vestibularis bekannt ist. Auf diese Erkrankung wird im folgenden Kapitel ausführlich eingegangen.

### **2.1.3 Akut unilaterale Vestibulopathie**

Über 8 % aller Schwindelpatienten, einschließlich Kinder, leiden unter einem akut einseitigen Ausfall des Gleichgewichtsorgans, auch akute unilaterale Vestibulopathie oder Neuritis vestibularis genannt [32, 33]. Meist beginnen die Symptome zwischen 30 und 60 Jahren, wobei Frauen und Männer gleichermaßen betroffen sind [34].

Erkrankte Personen leiden unter heftigem, akut einsetzendem und über mehrere Tage bis Wochen anhaltenden Drehschwindel mit Oszillopsien. Gang- und Standunsicherheiten mit Fallneigung zur betroffenen Seite, vegetative Begleitsymptomatik wie Übelkeit und Erbrechen und horizontaler Rotationsnystagmus zur gesunden Seite sind ebenso deutliche Anzeichen [35].

#### 2.1.3.1 Pathophysiologie

Unter statischen Bedingungen sind die Signale, die durch die Vestibularorgane erzeugt werden, auf beiden Seiten gleich. Durch einen pathologischen Prozess im vestibulären Endorgan oder im Vestibularnerv werden unterschiedliche Signale an die Vestibularkerne übertragen. Dieses Tonungleichgewicht kann als Ursache für die Symptome der akut unilateralen Neuropathie angesehen werden [36].

Es konnte nachgewiesen werden, dass es bei der akut unilateralen Vestibulopathie hauptsächlich zu einer partiellen vestibulären Läsion kommt [37]. Der superiore Teil des Vestibularnervs, der durch den horizontalen und anterioren Bogengang, die Makula des Utriculus und den anteriosuperioren Teil des Sacculus innerviert wird, ist dabei hauptsächlich betroffen [36]. Da der N. vestibularis inferior, der durch den posterioren Bogengang und den posteroinferioren Teil des Sacculus innerviert wird, nicht betroffen ist, führt dies zu einer selektiven superioren akut einseitigen Vestibulopathie [36].

#### 2.1.3.2 Ätiologie

Die Ursache für das Entstehen einer akut unilateralen Vestibulopathie konnte noch nicht abschließend belegt werden. Die virale Hypothese, die als populärste Theorie gilt und die durch mehrere Studien gestützt wird, besagt, dass die akut unilaterale Vestibulopathie durch die Infektion des Vestibularganglions (VG) oder der Vestibularkerne mit Herpes simplex Virus Typ 1 verursacht wird [38, 39]. Unterschiedliche Befunde deuten darauf hin, dass die Vestibularganglien ebenso wie andere Hirnnervganglien latent mit Herpes simplex Viren infiziert sein können [36]. Histopathologische Untersuchungen des Vestibularnervs bei akut einseitiger Vestibulopathie zeigten Homologien zu Untersuchungen des Schläfenbeins bei Herpes Zoster Oticus Infektionen [40]. Außerdem wurde HSV-1-DNA mittels Polymerasekettenreaktion in etwa 70 % der humanen vestibulären Ganglien gefunden [38, 41]. Für die virale Hypothese spricht auch das örtlich begrenzte Auftreten zu bestimmten Jahreszeiten [42]. Durch eine plötzlich einsetzende Reaktivierung des Virus kommt es zu Entzündungen und

Ödemen, die eine sekundäre Zellschädigung der vestibulären Ganglienzellen und Axone verursachen können [36].

### 2.1.3.3 Diagnostik

Bei der akut unilateralen Vestibulopathie findet sich ein peripherer vestibulärer Spontannystagmus zur nicht betroffenen Seite. Der Nystagmus kann mittels M-Brille oder Frenzelbrille leicht erkannt werden. Dieses Untersuchungsinstrument ermöglicht mithilfe einer vergrößernden Fresnel-Linse (+20dpt.) die Reduzierung der visuellen Fixationssuppression, die typischerweise einen peripheren vestibulären Spontannystagmus unterdrückt. Außerdem erleichtert diese Brille die Beobachtung der Augenbewegung des Patienten. [6]

Mittels Kopfpulstest findet sich ein pathologischer vestibulookulärer Reflex auf der betroffenen Seite. Außerdem ist eine Fallneigung und eine Verschiebung der subjektiven visuellen Vertikalen zur betroffenen Seite zu erkennen [43].

Die betroffene Seite zeigt bei einer kalorischen Prüfung, bei der über eine Temperaturänderung im äußeren Gehörgang die Funktion der Bogengänge, Sacculus und Utriculus seitengetrennt überprüft werden kann, eine Unter- und/oder Unerregbarkeit. Die Änderung der Temperatur sollte einen Reiz auslösen, der über den Nervus vestibularis an das Gehirn weitergeleitet und über den VOR einen Nystagmus auslösen würde. Auch kann eine deutliche Asymmetrie bei der Auswertung von vestibulär evoziertem myogenem Potential (VEMPs), bei dem mittels akustischen Reizes das Gleichgewichtsorgan getestet wird, vorliegen. [36, 44] Zentrale vestibuläre oder okuläre motorische Dysfunktionen können ausgeschlossen werden [35].

### 2.1.3.4 Therapie

Schwere Übelkeit und Erbrechen wird bei betroffenen Patienten mittels Antivertiginosa nur innerhalb der ersten Tage behandelt, da sie die zentrale Kompensation verzögern [6].

Die virale Hypothese legt die Vermutung nahe, dass Valaciclovir für die kausale Therapie geeignet ist. Studien konnten diese Annahme jedoch nicht stützen und zeigten, dass Glukokortikoide wie Methylprednisolon, im Gegensatz zu Valaciclovir, die Wiederherstellung der peripheren vestibulären Funktion bei Patienten mit akut unilateraler Vestibulopathie signifikant verbessern konnten [45].

Mithilfe spezifischer vestibulärer Übungen soll außerdem die zentrale Kompensation gefördert werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Training des Gleichgewichts eine Beschleunigung der vestibulospinalen Kompensation bewirkt [46].

## 2.3 Herpesviren

Herpesviren gehören zu den meist verbreiteten humanpathogenen Erregern weltweit. Sie wurden in allen Ordnungen der Wirbeltiere und sogar bei Wirbellosen nachgewiesen [47]. Es existieren über 90 unterschiedliche Spezies, von denen acht Humanpathogene sind [48]. Zu diesen humanpathogenen Viren zählen Herpes simplex Viren Typ 1 und Typ 2 (HSV-1 und HSV-2), Varizella Zoster Viren (VZV), Epstein-Barr Viren (EBV), Zytomegalieviren (CMV), Humane Herpesviren 6 und 7 (HHV-6 und HHV-7) und Kaposi-Sarkom assoziierte Humane Herpesviren 8 (HHV-8) [49]. Ihr Genom besteht aus DNA und sie haben eine ähnliche Virusmorphologie. Herpesviren persistieren im infizierten Organismus in einem latenten Stadium, es kann jedoch jederzeit zu einer Reaktivierung kommen. Während dieser Reaktivierung findet ein lytischer Replikationszyklus statt, bei dem die Wirtszelle zerstört werden kann. [50]

Aufgrund verschiedener Eigenschaften können Herpesviren in drei Unterfamilien eingeteilt werden. Bei der Unterteilung spielen Wirtsspektren, Replikationsdauer, Pathogenität und Latenzmechanismen eine Rolle [50].

$\alpha$ -Herpesviren, zu denen HSV-1, HSV-2 sowie VZV gehören, besitzen ein breites Wirtsspektrum, einen kurzen Replikationszyklus und einen schnell eintretenden zytopathischen Effekt. Die Persistenz findet hauptsächlich in sensorischen Ganglien statt [51].

$\beta$ -Herpesviren infizieren im Gegensatz zu  $\alpha$ -Herpesviren nur bestimmte Zelltypen und haben einen längeren Replikationszyklus. Sie persistieren latent in Zellen von lymphoretikulären Organen, wie etwa Lymphknoten, Milz, Speicheldrüse, Nieren oder anderem Gewebe. Humane Vertreter der  $\beta$ -Herpesviren sind Zytomegalieviren, deren Primärinfektion meist asymptomatisch verläuft. Für immunsupprimierte Personen und Neugeborene können sie jedoch ein erhebliches Gesundheitsrisiko darstellen [51, 52].

$\gamma$ -Herpesviren, zu denen das Epstein-Barr Virus und HHV8 zählen, weisen einen langen Replikationszyklus und ein sehr enges Zellspektrum auf. Sie sind spezifisch für B- und T-Lymphozyten, infizieren aber auch Epithelzellen oder Fibroblasten. [50, 53]

Da für diese Arbeit ausschließlich HSV-1 relevant war, wird im Weiteren speziell auf diesen eingegangen.

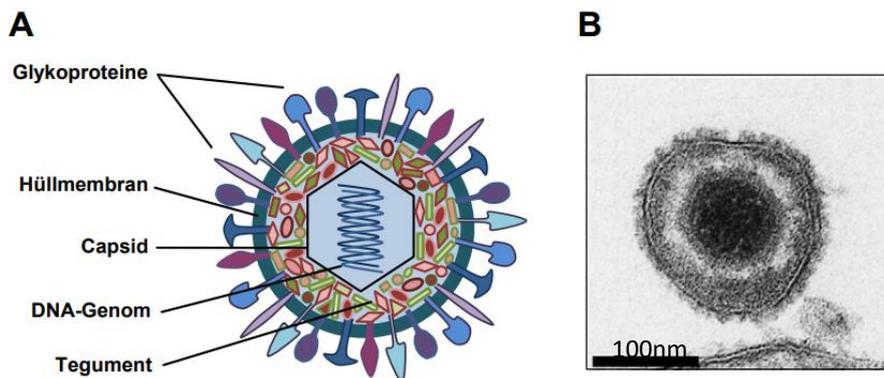
### 2.3.1 Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1)

Mit einer Infektionsrate von etwa 85 % ist Herpes simplex Virus Typ 1 eines der häufigsten humanen Krankheitserreger weltweit [54]. Die Erstinfektion findet meist durch Schmierinfektion in jungen Jahren statt [55]. Die Infektion verläuft meist asymptomatisch oder als typischer bläschenförmiger Hautausschlag im Bereich der Lippen und Mundschleimhaut [56]. Im Sekret dieser Bläschen befindet sich eine hohe Viruskonzentration. HSV-1 gelangt während einer akuten Infektion von den Epithelzellen über direkten Zellkontakt in freie Nervenendigungen am Infektionsort und wandern von dort mittels retrogradem axonalem Transport in das Trigeminusganglion [57]. Dort persistiert es lebenslang und bleibt in einem latenten Zustand bis eine Reaktivierung durch Faktoren wie beispielweise Stress, UV-Strahlung oder Immunsuppression ausgelöst wird. Auf anterogradem Weg gelangen die Viren während dieser Reaktivierung erneut zur Hautoberfläche, wodurch es zu HSV-1 typischen Symptomen kommt. Behandelt werden kann eine HSV-1-Infektion lokal oder systemisch durch ein Virostatikum wie

Aciclovir, welches anstelle von Guanosin bei der Virusreplikation eingebaut wird und aufgrund der fehlenden Ribose zum Kettenabbruch führt [58].

### 2.3.2 Morphologie von HSV-1

Durch morphologische Kriterien können Viren einer bestimmten Familie zugeordnet werden. Ein typisches Virion (Viruspartikel) hat einen Durchmesser von bis zu 300 nm. Die DNA im Virus-Kern ist mit einer fibrillären Proteinmatrix assoziiert, die elektronenmikroskopisch einer Spule ähnelt [59]. Dieser Kern wird von einem ikosaedrischen Kapsid, das aus 162 Kapsomeren besteht, umhüllt [60]. Kern und Kapsid bilden gemeinsam ein etwa 110 nm großes Nukleokapsid, das von einem aus Phosphoproteinen bestehenden Tegument umgeben ist. Tegument bedeutet Bedeckung, dabei handelt sich um eine Proteinmatrix, die bis zu 20 regulatorische Virusproteine enthält und eher unstrukturiert und asymmetrisch erscheint [50]. Die Virushülle, die den Abschluss des Partikels bildet, besteht aus einer zelleigenen Lipiddoppelschicht, die bei der Knospung des Virus aus der Wirtszelle entsteht. Diese Membran enthält bis zu 12 virale Glykoproteine, die der Anheftung an die Wirtszelle und der Penetration der Zellmembran dienen [61, 62].



**Abbildung 5: Aufbau eines Herpes Simplex Virus Typ 1, übernommen aus [63].**

(A) Schematische Darstellung eines Virions, bestehend aus dem linearen, doppelsträngigen DNA-Genom, umgeben von einem ikosaedrischen Kapsid, um das sich das Tegument mit zahlreichen Strukturproteinen anordnet. Die Hüllmembran mit den eingelagerten Glykoproteinen bildet den Abschluss. (B) Aufnahme eines reifen HSV-1 mittels Elektronenmikroskop.

### 2.3.3 HSV-1-Genom

Im Virion liegt das Genom als lineare, doppelsträngige DNA (dsDNA) vor und hat eine Länge von 152000 bp. Das Molekulargewicht beträgt etwa  $100 \times 10^6$  Dalton und es kodiert für über 70 Genprodukte [58, 64]. Das HSV-1-Genom besteht aus mindestens 84 offenen Leserahmen und einem Abschnitt mit einheitlicher Sequenzfolge, einer langen  $U_L$ -Region (unique long) mit 126 kbp und einer kurzen  $U_S$ -Region (unique short) mit 26 kbp, die von repetitiven Sequenzen getrennt sind [65]. Diese können abermals in interne und terminale Wiederholungen unterteilt werden [66]. Während die  $U_L$ -Region 56 virale Gene enthält, sind es in der  $U_S$ -Region lediglich 12 Gene [58].

### 2.3.4 Lytischer Replikationszyklus

Die Produktion infektiöser Nachkommen und die eventuelle Lyse der Wirtszelle finden während der produktiven oder lytischen Infektion statt. Ein vollständiger Replikationszyklus dauert meist zwischen 18 und 20 Stunden. Nach Adhäsion von HSV-1 an die Zellmembran der Wirtszelle beginnt der virale Replikationszyklus, der eine Verschmelzung der Virushülle und der Plasmamembran nach sich zieht. Anschließend wird das Viruskapsid in das Zytoplasma freigesetzt [67, 68]. Dafür sind wahrscheinlich mindestens drei Hüllglykoproteine nötig, die durch das virale Genom kodiert werden [69]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die als gB, gD und gH bezeichneten Glykoproteine für den Eintritt des Virus in die Zelle erforderlich sind [70]. Weitere bekannte Glykoproteine sind scheinbar für die Virusreplikation entbehrlich, wie Versuche an kultivierten Zellen zeigten [71]. Nachdem das Kapsid in das Zytoplasma freigesetzt wurde, folgt der Transport zum Zellkern entlang der Mikrotubuli. Durch das Binden an den Kernporenkomplex wird die DNA in den Zellkern freigesetzt um dort zu zirkularisieren [72]. Ein Teil der Tegumentproteine, wie zum Beispiel das vhs (virion host shut-off) verbleiben im Zytoplasma. Vhs ist eine RNase, die die Synthese wirtseigener Proteine stoppt und bereits vorhandene mRNA zerstört [73]. Viraler Proteine werden mittels RNA-Polymerase II transkribiert, was durch  $\alpha$ -TIF (Trans Inducing Factor), einem weiteren Tegumentprotein, initiiert wird. Hierbei können drei Arten viraler Gene hinsichtlich ihrer zeitlich versetzten Expression und Synthese unterschieden werden. Die Proteinsynthese wird dabei kaskadenartig reguliert. Die frühen Genprodukte aktivieren nachfolgende Gene, während späte Proteine die frühe Gentranslation reguliert. [74]

Nach der Zirkularisation beginnt die Expression der „immediate early“ (IE)- oder auch  $\alpha$ -Gene genannt. Diese Proteine wirken hauptsächlich regulatorisch. Etwa zwei bis vier Stunden nach der Infektion werden fünf  $\alpha$ -Genprodukte, nämlich ICP4 (Infected Cell Protein 4), ICP0, ICP27, ICP47 und ICP22 exprimiert.

Es folgt die Transkription der „early“ (E)- oder auch  $\beta$ -Gene nach drei bis sechs Stunden, deren Genprodukte für die Replikation und die Aktivierung der späten Gene notwendig sind [75]. Hierbei spielt ein  $\beta$ -Genprodukt für neuronale Zellen eine entscheidende Rolle. Es handelt sich um die Thymidin-Kinase (TK), die im Gegensatz zu anderen Zellen in Neuronen nicht enthalten ist.

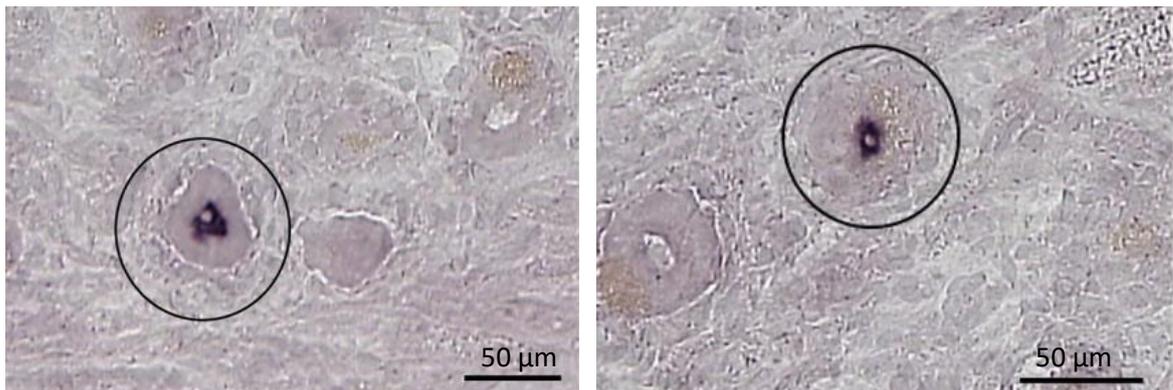
Zuletzt werden die „late“ (L)- oder  $\gamma$ -Gene exprimiert, welche für Glykoproteine und andere Strukturproteine kodieren.

Aufgrund der Zirkularisation des DNA-Genoms im Zellkern erfolgt die Replikation im

sogenannten „rolling-circle“-Modus. Hierbei entstehen geschnittene DNA-Konkatemere, die in das Kapsid gepackt werden [75]. Die Mechanismen der Entstehung der Virushülle sind weitestgehend unbekannt. Die verbreitetste Theorie stammt aus dem Jahr 1969 und wurde von Christopher W. Stackpole entwickelt. Die innere Kernmembran dient dabei der ersten Umhüllung des Viruskapsids, während diese an der äußeren wieder entfernt wird. [76]. Die endgültige Virushülle entsteht in einem zytoplasmatischen Kompartiment, das noch weitgehend unerforscht ist [77].

### 2.3.5 Latenz

Bei der Erstinfektion mit HSV-1 findet eine Virusreplikation am Eintrittsort statt. Über freie Nervenendigungen, die innerhalb des Epithels liegen, werden die Nukleokapside aufgenommen und mittels retrograden axonalen Transport zu dem jeweiligen sensorischen Ganglion befördert [78]. Bei HSV-1 handelt es sich hierbei um das Trigeminusganglion (TG). Auch dort kann eine Replikation von Virus-DNA mit anschließender Zelllyse vorkommen. Da eine aktive Infektion mit Mechanismen des Immunsystems oder einer Beteiligung interner Signalgebungen, die zur Apoptose führen, einhergeht, etabliert das Virus einen latenten Zustand [79, 80]. In menschlichen Trigeminusganglien persistiert HSV-1-DNA in einer nicht-integrierten Form, höchstwahrscheinlich als zirkularisiertes Episom der genomischen Einheit oder Genomkonkatemere, die zum größten Teil transkriptionell stumm sind [59, 81]. Bei der Latenz wird die virale DNA durch zelluläre DNA-Polymerasen zusammen mit den Chromosomen während der Mitose kopiert. Im Gegensatz dazu sind bei der lytischen Replikation virale DNA-Polymerasen beteiligt, was eine virale Übernahme der Zelle widerspiegelt [59]. Die Latenz assoziierten Transkripte (LAT) sind am stärksten vertreten. Neben ihnen können wenig weitere Gentranskripte und Proteine gefunden werden. Diese viralen Expressionsprodukte sind zum Beispiel ICP4, Haupttranskriptionsregulationsproteine und Thymidin-Kinase [82]. LATs sind Introns, die aus dem primären 8,3 kb LAT-Transkript gespleißt werden [83]. Aufgrund einer Spleißstelle, deren intronisch flankierende Sequenz nicht der GU-AG-Regel folgt, bleibt das 1,5 kb große HSV-1-LAT im neuronalen Kern erhalten. Dort weist es eine lassoartige Struktur auf, die auch als Lariat bezeichnet wird. Die Halbwertszeit beträgt 24 Stunden [84, 85]. Neurone, die LAT enthalten, sind gelegentlich von CD8<sup>+</sup> T-Zellen umgeben, die in der Peripherie geprimt wurden [86, 87]. LAT wird dabei mehrere Funktionen zugeschrieben. Es soll zum Schutz der Neuronen vor Granzym B-induzierter und Caspasen-induzierter Apoptose und der Umgehung der Immunerkennung dienen [88-90].



**Abbildung 6: Visualisierung von LAT-positiven Neuronen, entnommen aus [91].**

Lichtmikroskopische Aufnahme zeigt einen Ausschnitt eines mittels *in-situ*-Hybridisierung angefärbten Trigeminalganglions. LAT-positive Neurone zeigen dabei eine dunkle Verfärbung des Zellkerns (eingekreist).

Die DNA-Sequenz von LAT geht auf dem komplementären Basenstrang in zwei  $\alpha$ -Gene über, die für ICP0 und ICP34,5 kodieren, was für eine effektive Reaktivierung wichtig sein könnte [92]. Für die Etablierung der Latenz spielt LAT keine Rolle. Durch Methylierung von Lysin 9 auf Histon H3, einer posttranslationalen Modifikation von Heterochromatinstrukturen, erleichtert es das Abschalten der lytischen Genpromotoren von HSV-1 [93].

HSV-1 kodiert außerdem für 16 microRNAs (miRNA), die durch Deep-Sequencing-Studien von virusinfizierten Zellen identifiziert wurden [87]. Elf dieser miRNAs sind innerhalb oder in der Nähe des LAT-Gens kodiert [94]. Drei HSV-1 miRNAs sind antisense und reduzieren die Expression von Virusgenen, die an der Initiation von Virus-Gentranskription (ICP4), Neurovirulenz (ICP34.5) und Inaktivierung von antiviralen Wirtswegen (ICP0/RL2) beteiligt sind [95, 96]. HSV-1 LAT-kodierte miRNAs dienen dem Erhalt der Latenz [97]. Auch neuronenspezifische miRNA kann auf die Genexpression von HSV-1 Einfluss nehmen. miR-138 zielt auf Sequenzen innerhalb von HSV-1 ICP0/RL2 ab, was die ICP0-Expression und somit die Expression der meisten lytischen Virusgene reduziert [98].

### 2.3.6 Reaktivierung

Durch verschiedene endogene und exogene Faktoren, wie ein verminderter Immunstatus, UV-Strahlung, Hormone, emotionaler und physischer Stress, sowie physikalische Reize ist eine Reaktivierung aus dem latenten Stadium möglich [99, 100].

Während der Latenz wird HSV-1-DNA in verschiedene Regionen des neuronalen Kerns partitioniert, wo die Transkription von Virusgenen teilweise durch spezifische posttranslationalen Acetylierung und Methylierung von gebundenen Histonen gesteuert wird. Aktiv transkribierte euchromatische Virus-DNA-Regionen enthalten Nukleosomen mit Histon-Protein H3. Dies ist posttranslational modifiziert durch Acetylierung an den Lysinen 9 und 14 (H3K9ac /14ac) und Dimethylierung an Lysin 4 (H3K4me<sup>2</sup>) [101, 102]. In ähnlicher Weise sind die posttranslationalen Modifikationen in Nukleosomen vorhanden, die auf Promotoren von

transkriptionell stillen heterochromatischen Virusgenen gefunden wurden [103]. Die Grenze zwischen Euchromatin und Heterochromatin wird durch die Wirkung des CCCTC-bindenden Faktorproteins (CTCF) aufrechterhalten [104].

Während der Organismus Stress ausgesetzt ist, wird CTCF aus dem latenten Virusgenom freigesetzt. Es folgt die Wiederherstellung der Enhancer-Aktivität und die Transkription des ICP0/RL2-Gens [105]. Zusammen mit ICP0/RL2 werden auch mehrere frühe und späte Virusgene transkribiert [106]. Diese verallgemeinerte Deregulierung der Gentranskription erfordert keine virale Proteinsynthese. Insgesamt ist die epigenetische Regulation der latenten HSV-1-Gentranskription ein feiner Mechanismus, durch den das Virus als Antwort auf zellulären Stress eine schnelle Dynamik durchlaufen kann, was zur Transkription mehrerer Gene unabhängig von der *de-novo*-Proteinsynthese führt [107].

Der Reaktivierung folgt die Initiierung der lytischen Genexpressionskaskade, was mit einer erneuten Produktion infektiöser Viren einhergeht [95, 108]. Es wird davon ausgegangen, dass die Expression von ICP0 den ersten Schritt der Reaktivierung darstellt, allerdings sind die exakten molekularen Mechanismen der Reaktivierung größtenteils unbekannt.

Durch die Reaktivierung gelangen die Viren erneut über anterograden axonalen Transport zu den freien Nervenendigungen in das Epithel [78].

## 2.4 Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen durch verschiedene Pathogene ohne dabei eigene Strukturen anzugreifen. Aufgrund der großen Variabilität dieser Krankheitserreger, die vor allem aus Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen bestehen, haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Systeme entwickelt, um auf diese Erreger reagieren zu können [109].

Bei höheren Wirbeltieren kann zwischen der angeborenen Immunität, die von Geburt an zur Verfügung steht und die erste Verteidigungslinie bildet, und der erworbenen Immunität, welche nach Aktivierung ganz spezifisch auf Erreger reagieren kann, unterschieden werden [110]. Beide Arten der Immunabwehr besitzen sowohl zelluläre als auch lösliche Komponenten. Da es in dieser Arbeit jedoch hauptsächlich um das angeborene Immunsystem geht, wird im Folgenden speziell auf dieses eingegangen.

### 2.4.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem hat sich deutlich früher entwickelt als das erworbene Immunsystem. Dies lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass man bestimmte Komponenten der angeborenen Immunität, wie zum Beispiel Toll-ähnliche-Rezeptoren (engl. Toll-like Rezeptor, TLR), bereits in Invertebraten und Pflanzen finden kann [111].

Das angeborene Immunsystem besteht aus löslichen und zellulären Bestandteilen. Zu den löslichen Komponenten gehören unter anderem das Komplementsystem, Akut-Phase-Proteine und Zytokine. Phagozytierende Zellen bzw. Phagozyten (Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten), Zellen, die inflammatorische Mediatoren freisetzen (Basophile, Eosinophile und Mastzellen) und Natürliche Killerzellen bilden dabei die zelluläre Komponente [109].

Die angeborene Immunabwehr beinhaltet die rezeptorvermittelte Phagozytose durch Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen sowie die Vernichtung von Fremdkörpern. Durch Opsonierung (Antigenpräsentation), Chemotaxis und Phagozytose findet eine Kommunikation mit der spezifischen Immunabwehr statt.

### 2.4.2 Toll-ähnliche Rezeptoren

Die Erkennung mikrobieller Pathogene, einschließlich Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten ist ein Mechanismus, der zum Einschreiten des angeborenen Immunsystems führt.

Zur Unterscheidung von Krankheitserregern und Wirtsbestandteilen befinden sich auf der Zelloberfläche keimbahnkodierte Rezeptoren, die Mustererkennungsrezeptoren (engl. Pattern Recognition Receptors, PRR). Diese erkennen die für das Überleben oder die Funktion des Erregers zwingend notwendigen molekularen Strukturen, die als pathogenassoziierte molekulare Muster (engl. Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) bezeichnet werden [112]. Diese initiieren eine Signalkaskade, die zur Expression von antimikrobiellen Produkten, inflammatorischen Zytokinen und/oder Chemokinen führen [113, 114].

Zu den PRRs gehören neben RIG-I-ähnlichen Rezeptoren (RLRs), NOD-ähnlichen Rezeptoren, C-Typ Lektin-Rezeptoren und Sequestosome 1/p62-ähnlichen Rezeptoren auch die Toll-ähnlichen Rezeptoren [115]. Toll-Rezeptoren wurden zunächst in *Drosophila* gefunden und stellten sich für die Abwehr von Pilzinfektionen als wichtig heraus [116]. Homolog zu diesen Toll-Rezeptoren wurden zehn humane (TLR1-10) und zwölf murine (TLR1–9 und TLR11–13) Toll-ähnliche Rezeptoren charakterisiert [114]. Diese TLRs sind Typ-I-Transmembranproteine, die unterschiedliche PAMPs mittels N-terminalen Leucin-reichen LRR-Sequenzen (Leucine-rich Repeats) erkennen und über eine Transmembrandomäne und eine TIR-Domäne (Toll/IL-1R homology domain) die Downstream-Signaltransduktion aktivieren [117].

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 befinden sich auf der Zelloberfläche, während TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 auf der Membran von intrazellulären Vesikeln, wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER), den Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen lokalisiert sind [118].

Basierend auf ihren primären Sequenzen können TLRs in mehrere Unterfamilien unterteilt werden, welche jeweils ähnliche PAMPs identifizieren können [119]. TLR1, TLR2 und TLR6 detektieren Lipoproteine, TLR3 doppelsträngige (ds) RNA, TLR4 Lipopolysaccharide, TLR5 Flagellin, TLR7 und TLR8 einzelsträngige (ss) RNA und TLR9 vermittelt die Erkennung unmethylierter 2'-desoxyribo-Cytidin-Phosphat-Guanosin (CpG) DNA-Motive [65, 114].

Speziell für die Erkennung viraler PAMPs sind folgende TLRs von Bedeutung: TLR2 und TLR4 detektieren virale strukturelle und nichtstrukturelle Proteine. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 erkennen verschiedene Formen von viralen Nukleinsäuren in endolysosomalen Kompartimenten [120].

### 2.4.2.1 Signalweg nach Virusinfektion

Durch das Erkennen von PAMPs durch TLRs werden verschiedene intrazelluläre Signalwege ausgelöst, die eine Interferon- und/oder eine inflammatorische Zytokinausschüttung nach sich ziehen [121]. Dabei kommt es auf die Lokalisation der TLRs an. Während TLRs, die auf Zellorganellen lokalisiert sind, sowohl eine Interferon- als auch eine inflammatorische Zytokininduktion hervorrufen können, können an der Zelloberfläche lokalisierte TLRs ausschließlich entzündliche Reaktionen, jedoch keine Interferonausschüttung bewirken [122]. Dies liegt darin begründet, dass der für die Interferoninduktion essentielle Faktor TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3) keinen direkten Zugriff auf den Plasmamembran-Signalkomplex hat [123, 124].

Man unterscheidet zwei TLR-Signalwege, die anhand ihrer Haupt-TIR-Domäne differenziert werden [122]. Zum einen MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88), welches bis auf TLR3 von allen TLRs verwendet wird und über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ('kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und der MAP-Kinase (mitogen-activated protein) zu einer Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen führt [114].

TLR3 und TLR4 verwenden hingegen TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ), um über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRF3 (Interferon regulatory factor 3) die Induktion von Typ-I-Interferon und inflammatorische Zytokinproduktion hervorzurufen [114]. TLR2 und TLR4 verwenden TIRAP (toll-like receptor adaptor protein) als zusätzliche Verbindung zu MyD88, TRAM (TRIF-related adaptor molecule) fungiert als Brücke zwischen TLR4 und TRIF [114].

### 2.4.2.2 MyD88-abhängiger Signalweg

Durch die Bindung eines Pathogens an die TLRs kommt es zu einer Dimerbildung und einer Konformationsänderung, die die Rekrutierung des MyD88 erlaubt. MyD88 besitzt eine C-terminale TIR-Domäne und eine N-terminale Todesdomäne und bindet an die zytoplasmatische TIR-Domäne der TLRs. Bei TLR2 und TLR4 wird diese Interaktion durch das Adapterprotein TIRAP (toll-like receptor adaptor protein) vermittelt. [125] Nach der Stimulation rekrutiert MyD88 die IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen IRAK1, IRAK2, IRAK4 und IRAK-M durch homophile Interaktion der Todesdomänen beider Moleküle und erleichtert die IRAK-4-vermittelte Phosphorylierung von IRAK-1. [125].

Es folgt die Bindung des TRAF6 (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor assoziierter Faktor 6), eine Ubiquitin-Ligase, die mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzymkomplex Ubc13/Uev1A eine spezielle Polyubiquitinkette bilden kann und regulatorische Funktionen hat [126]. Diese Polyubiquitinkette ist an den Ubiquitin-Lysinrest 63 gebunden und markiert somit nicht zum proteasomalen Abbau [127, 128]. Nach der Ubiquitylierung von TRAF6 folgt die Aktivierung und Rekrutierung der zur Familie der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Kinase-Kinasen (MAP3K) gehörenden TAK1 (TGF-beta-activated kinase 1) und dessen Bindungspartneure TAB1 und TAB2/3 [129, 130], welche zu einer Phosphorylierung der MKK6 (MAPK Kinase 6) führt. Über die MAP-Kinasen p38 und Jnk kommt es dann zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator Protein 1) [131].

TAK1 phosphoryliert außerdem die katalytische Untereinheit IKK $\beta$  des I $\kappa$ B-Kinase (IKK) – Komplexes. Der IKK-Komplex besitzt eine weitere katalytische Untereinheit IKK $\alpha$  und eine regulatorische Untereinheit IKK $\gamma$  [132]. Die Phosphorylierung des IKK-Komplexes führt zu einer weiteren Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ . I $\kappa$ B $\alpha$  interagiert mit dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und wird durch die Phosphorylierung für den proteasomalen Abbau mittels K48- Polyubiquitierung markiert. Durch diesen Abbau kommt es zu einer Freisetzung und einer Kerntranslokation von NF- $\kappa$ B [125, 133-135].

Es gibt noch einen weiteren Transkriptionsfaktor der den MyD88-abhängigen Signalweg aktiviert, den Interferon regulierenden Faktor 5 (IRF5). Durch TLR-Stimulation mittels Pathogen kommt es zu einer Komplexbildung aus MyD88, TRAF6 und IRF5, was zu einer Aktivierung von IRF5 und dessen Translokation in den Zellkern führt [136].

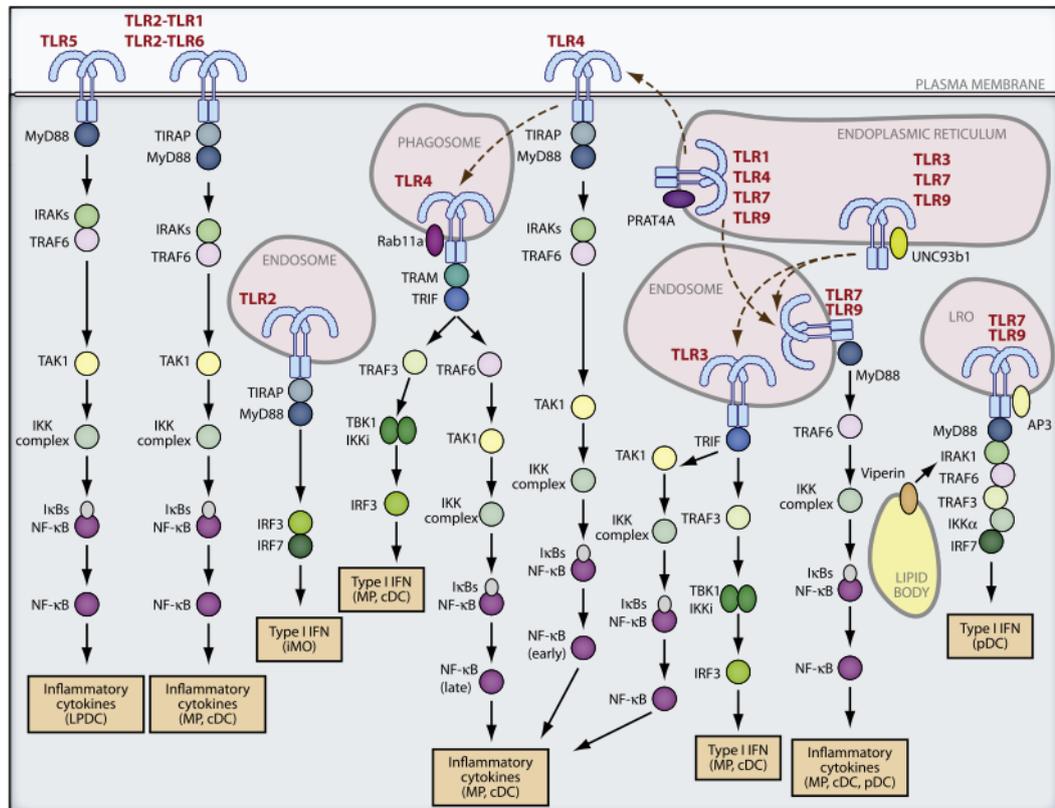
Studien an MyD88-defizienten Mäusen konnten die Bedeutung dieses Proteins zum Vorschein bringen. Es kam hierbei zu keiner inflammatorischen Zytokinproduktion als Reaktion auf TLR-Liganden [137].

### 2.4.2.3 TRIF-abhängiger Signalweg

Im Gegensatz zur MyD88-vermittelten Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen wird TRAF6 nicht von IRAKs rekrutiert, sondern mithilfe der Bindung von RIP1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein 1) an TRIF [138]. Nach Rekrutierung des Komplexes, der TRAF6 und TAK1 beinhaltet, erfolgt die weitere Aktivierung der Enzyme.

Eine TLR4 induzierte Aktivierung von IRF-3 führt zur Produktion von IFN- $\beta$  (Interferon-beta). Hierbei wird über TRIF der TNFR-assoziierte Faktor 3 (TRAF3), TBK1 (TANK-binding kinase 1) und IKK rekrutiert, was eine Phosphorylierung des IFN-regulierenden Faktors 3 (IRF3) nach sich zieht. IRF3 dimerisiert infolgedessen und gelangt so in den Zellkern. Neben AP-1 und NF- $\kappa$ B sind IRFs essenzielle Transkriptionsfaktoren für die Induktion von Typ I IFN und IFN-abhängigen

Genen [114, 123, 139]. IFN- $\beta$  wiederum aktiviert Stat1 (Signal transducer and activator of transcription 1) und induziert mehrere IFN-induzierbare Gene [140].



**Abbildung 7: Signalwege der TLRs, entnommen aus [114].**

Die Bindung von PAMPs induziert Konformationsänderungen von TLRs, die homo- oder heterophile Wechselwirkungen von TLRs und die Rekrutierung von Adapterproteinen wie MyD88, TIRAP, TRIF und TRAM ermöglichen. Je nach Adapterprotein kommt es zum MyD88- oder zum TRIF-abhängigen Signalweg.

Nach einer viralen Infektion oder durch dsRNA wird ebenfalls IRF-3 aktiviert, was zu dem Schluss führt, dass neben TLR4 auch TLR3 zu einer MyD88-unabhängigen Induktion von IFN- $\beta$  fähig ist [141].

Neben der Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen über die TAK1-induzierte Phosphorylierung des IKK-Komplexes und der damit verbundenen NF- $\kappa$ B-Freisetzung kommt es also nach Pathogenbindung an TLR3 zu einer Interferonausschüttung, wie bereits für TLR4 beschrieben.

In MyD88-defizienten Makrophagen kann keine TLR4 Liganden-induzierte Produktion von inflammatorischen Zytokinen verzeichnet werden, jedoch wird die Aktivierung von NF- $\kappa$ B mit verzögerter Kinetik beobachtet [142]. Dies weist auf die Existenz einer MyD88-unabhängigen Komponente in der TLR4 Signalgebung hin. Es konnte gezeigt werden, dass TLR4 Stimulation zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3, sowie zur Aktivierung der späten Phase von NF- $\kappa$ B, unabhängig von MyD88, führt [143].

### 2.4.3 Toll-ähnliche Rezeptoren im ZNS

TLRs werden hauptsächlich auf Dendritischen Zellen, T- und B-Zellen, Natürlichen Killerzellen, Monozyten und Granulozyten exprimiert [144]. Mehrere *in-vitro* und *in-vivo* Studien konnten die Existenz von mRNA und Protein von TLRs und ihren verwandten Signalproteinen im ZNS von Menschen und Maus nachweisen. Die TLR-Expression wird während der Entwicklung des Gehirns [145] und während pathologischer Zustände im Gehirn, wie Schlaganfall, Infektion, ZNS-Autoimmunität und neurodegenerativen Erkrankungen dynamisch reguliert [146, 147]. Außerdem weisen Zellen des zentralen Nervensystems ihre eigenen zelltypspezifischen TLR- und Adaptermoleküle auf. Dies ermöglicht eine deutliche zelltypspezifische Antwort auf TLR-Stimuli, wie es bei peripheren Immunzellen der Fall ist [148].

Mikrogliazellen, die Immuneffektorzellen des ZNS, exprimieren TLR1 bis TLR9 [149-151]. Die Stimulation von gereinigten Mikrogliazellen mit TLR-Liganden führt zu einer Entzündungsreaktion mit der Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und hochreaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6, IL-10, IL-12, IL-18, IFN - $\alpha$ , IFN- $\beta$ , CCL2, CCL3, CCL5 und NO [152]. Darüber hinaus werden Proliferation und Phagozytose induziert [153]. Die Expression von TLR1 bis TLR9 wird auch über Astrozyten berichtet. Bis auf TLR3, der einen hohen Spiegel aufweist, war das Expressionsniveau deutlich geringer [149-151]. Nach TLR3 Stimulation zeigten humane Astrozyten eine deutlich verstärkte Transkription entzündungshemmender und neuroprotektiver Mediatoren, während die Reaktion auf TLR4 Aktivierung minimal war [154]. Darüber hinaus waren Astrozyten im Vergleich zu Mikrogliazellen langsamer in der Regulation von TLRs und immunstimulierende Mediatoren, was auf eine Rolle in einer nachfolgenden Reparaturantwort hinweist [154]. Allerdings produzierten Astrozyten, die mit dem gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus* oder dessen Zellwandprodukt Peptidoglykan stimuliert wurden, pro-inflammatorische Mediatoren, wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und CCL2 auf [155], was auf ein Mitwirken von Astrozyten bei TLR-vermittelten entzündlichen Immunantworten hinweist.

Über TLR-Expression und Funktion in Oligodendrozyten ist wenig berichtet. TLR2 und TLR3 sind, im Gegensatz zu TLR4, vorhanden [149]. Die Aktivierung von TLR2 auf kultivierten Oligodendrozyten fördert Differenzierung, Überleben und Myelinisierung, während TLR3 ein starker Apoptoseinduktor ist [156].

Sogar Neurone weisen TLRs auf. Während der embryonalen Hirnentwicklung bei Mäusen spielt TLR8 eine wichtige Rolle [157]. In humanen Neuronen konnte in Abwesenheit von Gliazellen eine intrinsische Maschinerie festgestellt werden, die eine inflammatorische, chemoaktive und antivirale Antwort auslösen kann [158].

Eine TLR-Expression konnte auch in Schwann'schen Zellen, in Neuronen der Nebennierenrinde und in Trigemini-neuronen nachgewiesen werden [159-161]. In *knock-out*-Experimenten mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass TLR2 dazu beitragen kann, eine HSV-1-Infektion im Trigemini-ganglion zu kontrollieren [162]. TLRs spielen auch bei anderen Virusinfektionen eine Rolle. Eine Influenza-Virusinfektion wird durch die Beteiligung mehrerer TLRs kontrolliert [163]. Durch die Aktivierung von TLRs kommt es bei einer WestNile-Virus-Infektion zur Restriktion der Virusreplikation in Makrophagen und Neuronen bei gleichzeitiger Modulierung von Chemokinen in Gliazellen, was die Migration von Immunzellen im ZNS begünstigt [164].

Die Aktivierung von TLR3, TLR7 und TLR8 verursacht unter anderem das Kollabieren des Wachstumskegels, die Hemmung von Neuritenwachstum und Apoptose.

Dabei ist der TLR-Signalweg unabhängig von NF- $\kappa$ B, der der klassische terminale Effektor des Mikroglia-Signalwegs und Entzündung ist. Somit fördern TLRs in Neuronen eher den Zelltod als eine Entzündungskaskade zu initiieren, wie es für die angeborene Immunantwort bekannt ist [157, 165, 166].

Es verdichten sich die Hinweise darauf, dass TLRs nicht nur an der peripheren angeborenen Immunität beteiligt sind, sondern auch eine Rolle bei der Entwicklung und Regulierung von ZNS-Entzündung, Neurodegeneration und Hirntrauma spielen könnten [167].

### 2.4.4 Beteiligung der TLRs an ZNS-Pathologien

Da TLRs Pathogen-Erkennungsrezeptoren sind, ist ihre Rolle während Infektionen des ZNS von großem Interesse. Studien zeigten, dass die Injektion von *Streptococcus pneumoniae* in das ZNS von TLR2-negativen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu einer höheren Anfälligkeit für Infektionen führt. TLR2-negative Mäuse entwickelten schwerere klinische Symptome, zeigten eine höhere bakterielle Belastung des ZNS, eine massive Leukozyteninfiltration und eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke [168, 169]. Diese Studien weisen auf die Notwendigkeit von TLRs im ZNS zur Bekämpfung von Infektionen hin.

TLRs können außerdem Neuroinflammation induzieren. Eine intrathekale Injektion des TLR2 Liganden Pam3CSK4 kann bei TLR2-negativen Mäusen Anzeichen einer Meningitis, wie z. B. Leukozyteninflation, erhöhten regionalen zerebralen Blutfluss und intrakraniellen Druck auslösen [170]. Eine intrazisternale Injektion des TLR9 Liganden CpG-ODN (Oligodesoxynukleotide mit hohem Cytosin und Guanin Anteil) kann vergleichbare Symptome einer Meningitis verursachen [171].

Auch der Beitrag von TLRs in nicht-infektiösen ZNS-Verletzungen, wie Schlaganfall, Trauma und Alzheimer wurde in zahlreichen Studien untersucht. Mäuse, die kein TLR2 [172, 173] oder TLR4 [174] exprimierten, wiesen kleinere Infarkte als Wildtyp-Mäuse auf, wenn sie einen experimentellen Schlaganfall bekamen. TLRs scheinen an der Linderung von ZNS-Gewebeschäden nach Ischämie beteiligt zu sein [175]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Minderung einer Ischämie-induzierten Hirnverletzung auf das Fehlen einer mikroglialen TLR-vermittelten proinflammatorischen Antwort zurückzuführen ist [176]. Dies deutet auf endogene Liganden hin, die TLR-induzierte Entzündungen und Rekrudescenz von Gewebeerletzung verursachen. Im Serum und Liquor von Schlaganfallpatienten wurden hohe Werte der endogenen TLR-Liganden, wie zum Beispiel HMGB-1, Fibronectin und HSP60 gefunden, die mit Parametern der Entzündung und der Schwere der Erkrankung korrelieren [177].

Auch traumatische Verletzungen des ZNS zeigen, dass TLRs zu entzündungsbedingten sekundären Hirnschäden beitragen. Werden in Tierexperimenten die Nerven durchtrennt oder eine Kontusionsverletzung herbeigeführt, so führt dies zu erhöhten TLR2 und/oder TLR4 Spiegel im Bereich der Läsionsstelle und assoziierten Bereichen [178]. Dies zeigte sich vorwiegend durch aktive Mikrogliazellen. Im Gegensatz dazu zeigten sich in TLR2-negativen Mäusen deutlich weniger aktive Gliazellen, niedrigere Konzentrationen verschiedener Entzündungsmediatoren und eine verzögerte Rekrutierung von Leukozyten [179]. Potentielle endogene Aktivator von TLR2 und TLR4 konnten jedoch nicht-identifiziert werden. Mikrogliazellen und TLRs vermittelte Neuroninflammation scheinen auch kritische Faktoren bei der Pathogenese der Alzheimer Krankheit zu sein [180].

## 2.5 Apoptose

Eine weitere wirksame Maßnahme zur Einschränkung der Replikation und Vermehrung von viralen Pathogenen ist der programmierte Zelltod oder auch Apoptose genannt. Durch das gezielte Absterben wird verhindert, dass eine infizierte Zelle weitere virale Nachkommen produzieren kann [181].

Bei der Apoptose wird zwischen dem extrinsischen Signalweg, der den Zelltod durch externe Signale vermittelt und dem intrinsischen oder mitochondrialen Signalweg, der durch DNA-Schäden, osmotischem Stress oder Wachstumsfaktor-Entzug ausgelöst werden kann, unterschieden [182, 183]. Eine entscheidende Rolle bei der Regulierung dieser Signalwege spielen Caspasen. Sie gehören zur Familie der Cystein-Proteasen und werden aktiviert, um sicherzustellen, dass der programmierte Zelltod das umliegende Gewebe nicht beschädigt und dass der Prozess gut reguliert ablaufen kann [184]. In Zellen existieren Caspasen als Zymogene, die nur in Anwesenheit geeigneter Stimuli aktiviert werden können [185].

### 2.5.1 Extrinsischer Signalweg

Der extrinsische Signalweg wird durch Bindung von Todes-Liganden der Tumornekrosefaktor/Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF/TNFR) Superfamilie von Zytokinen an sogenannte Todes-Rezeptoren ausgelöst. Diese Todes-Liganden schließen unter anderem auch TNF- $\alpha$ , den Tumornekrosefaktor-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden TRAIL, sowie CD95 (APO-1/Fas) ein [186, 187].

Bei Bindung von TNF- $\alpha$  an den Todes-Rezeptor TNFR1 (Tumornekrosefaktor-Rezeptor) wird die Bildung eines Membran-Signal-Komplexes (Komplex I) gefördert. Dieser Komplex besteht aus TNFR1-assoziiertem Todesdomänenprotein (TRADD), TNFR-assoziiertem Faktor 2 (TRAF2), RIP1 und zellulären Inhibitoren der Apoptose (cIAPs) [188]. Der Komplex I dient der nuklearen Translokation des Kernfaktors  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), wodurch der NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert wird [181]. Aktiviertes NF- $\kappa$ B löst die Expression von anti-apoptotischen Genen aus.

Außerdem löst der Komplex I während der Apoptose die Bildung eines weiteren Signal-Komplexes aus, der als Komplex II bezeichnet wird und aus Fas-assoziiierter Todesdomäne (FADD), RIP1 und Pro-Caspase-8 besteht [189]. Durch diesen Prozess kommt es zu einer Spaltung und Aktivierung von Caspase-8, was wiederum die Spaltung und Aktivierung von nachfolgenden Caspasen wie Caspase-3 und Caspase-7 initiiert [90, 189]. Zur Verstärkung des Signals kann es auch zur Spaltung des zytosolischen Proteins Bid (BH3 interacting domain death agonist) und damit zur Bildung von tBid (truncated Bid) kommen, wodurch der intrinsische Apoptose-Signalweg aktiviert wird [190].

Der extrinsische Apoptoseweg kann durch Apoptose-inhibitorische Proteine (IAP), die an Caspasen binden und somit ihre Aktivität blockieren können und Cellular FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme)-inhibitory protein (cFLIP), das mit Pro-Caspase-8 ein Heterodimer bildet und somit eine hemmende Wirkung ausübt, negativ reguliert werden [191, 192].

### 2.5.2 Intrinsischer Signalweg

Der mitochondriale Signalweg wird durch intrinsische Stimuli initiiert [193]. Durch diesen apoptotischen Stimulus wird die äußere Mitochondrienmembran permeabilisiert, was wiederum die Freisetzung von Cytochrom C zur Folge hat. Cytochrom C bildet mit dem apoptotischen Protease-Aktivierungsfaktor-1 (Apaf-1) und der Pro-Caspase-9 einen Proteinkomplex, der als Apoptosom bezeichnet wird und dessen Bildung zur Aktivierung von Caspase-9 führt [181, 194, 195]. Wie auch Caspase-8 löst die aktivierte Caspase-9 eine Caspasen-Kaskade aus, die Apoptose zur Folge hat [196].

Der intrinsische Apoptose-Signalweg wird von Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie streng reguliert [197].

### 2.6 Fragestellung

In diese Arbeit sollen folgende Aspekte untersucht werden:

1. Es sollen Unterschiede zwischen LAT-positiven und LAT-negativen Ganglien bezüglich der Caspase-3-Expression aufgedeckt werden, da LAT die Fähigkeit der Apoptose-suppression zugeschrieben wird. Auch in einzelnen Neuronen, die aus dem Zellverbund LAT-positiver und LAT-negativer Ganglien isoliert wurden, soll die Anzahl der Transkripte von Caspase-3 gegenübergestellt werden.
2. Es soll herausgefunden werden, ob es Unterschiede in der TLR-Expression zwischen latent HSV-1-infizierten und nicht-infizierten Ganglien gibt. Mittels Einzelzellanalyse soll zudem festgestellt werden, ob TLRs auf Neuronen des Trigeminalganglions exprimiert werden und ob sich LAT-positive und LAT-negative Neurone unterscheiden.
3. Die in älteren Studien publizierten Vorkommen von HSV-1-infizierten Vestibularganglien soll mittels moderner Methoden überprüft werden.

Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, weitere Aussagen bezüglich einer Infektion der Vestibularganglien mit HSV-1 als Ursache für die akut unilaterale Vestibulopathie treffen zu können.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 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  
Kryostat 3050S, Leica Microsystems, Nussloch Deutschland  
Schüttler  
Sterielbank

#### 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

Pipetman, Gilson, Middleton, USA (10/20/100/200/1000 µl)  
Pipetten, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland (10/20/100/200/1000 µl)

#### Mikroskope

Biozerø, Keyence, Osaka, Japan  
Olympus BX41, Olympus, Hamburg, Deutschland

### 3.2 Chemikalien

20X Saline Sodium Citrat, Sigma Aldrich, St. Louis, USA  
Aceton, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland  
Blocking Reagent, Roche, Mannheim, Deutschland  
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  
Dithiothreitol (DTT), Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Germany  
Essigsäure Anhydrid, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ethanol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland  
Ethidiumbromid-Solution 10mg/dl, Sigma Aldrich, St. Louis, USA  
Frirststrand Buffer, Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Germany  
Glycogen for mol. Biol. Roche, Mannheim, Deutschland  
Herring Sperm DNA, Promega, Madison, USA  
Hämatoxylin-Eosin,  
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  
Qiazol Lysis Reagent, Qiagen Sciences, Maryland, USA  
Random Primer, Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Germany  
RNAse Inhibitor, Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Germany  
SuperScript II, life technologies, Carlsbad, USA  
Triethanolamin, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland  
TWEEN 20, EMD Chemicals, San Diego, USA

### 3.3 Medien und Puffer

#### Detektionspuffer

100 ml	1MTrisHCl pH 9,5
33 ml	3M NaCl

#### PHO-Lösung

4 ml	20× SSC
0,2 ml	100× Denkhart's Solution
0,2 ml	10 µg/ml Herring Sperm DNA
100 mg	Natrium-Pyrophosphat
0,1 ml	TrisHCl pH 7,5
15,5 ml	DEPC-H <sub>2</sub> O

2× MA-Puffer

23,2 g Maleinsäure  
17,4 g NaCl  
800 ml H<sub>2</sub>O

pH 7,5

DEPC-H<sub>2</sub>O

1 ml Diethylpyrocarbonat  
1 l destilliertes Wasser

10× 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  
1,5 M NaCl

pH 7,6

1 M TrisHCl

1 M Trizma® basisch

pH 9,5

TEA

745 mg Trietanolamin  
50 ml DEPC  
auf pH 7,5 einstellen

125 µl Essigsäureanhydrid

100× Denhardt's Lösung

1 % Ficoll®  
2 % Polyvinylpyrrolidon  
1 % BSA

10× TBE-Puffer

217,8 g TrisBase  
111,3 g Borsäure  
74,4 g EDTA

### 3.4 Materialien

Leica 818 Microtome Blades, Leica, Nussloch, Deutschland  
 Lysing matrix tubes 2 ml, MP Biosystems, Solon, USA  
 Membrane Slides PEN-Membrane 2,0 µm, MicroDissect GmbH, Herborn, Deutschland  
 Menzel Gläser 24x32mm Stärke 1, ThermoScientific, Thermo Scientific  
 MicroAmp 96-well Platte, Applied Biosystems/life technologies, Carlsbad, USA  
 Objektträger 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  
 Tissue-Tek-Cryomold, Sakura Finetek Europe, Aalphen aan den Rijn, Niederlande  
 X µl Bevelled Filter Tips TipOne RPT, StarLab, Hamburg, Deutschland  
 Reaktionsgefäße 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 3.5 Primer, Sonden und Antikörper

LAT-Sonde: LAT-DIG, Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland  
 Sequenz: 5'-CAT AGA GAG CCA GGC ACA AAA ACA C-3'

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

Tabelle 1: TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany)

	<b>Assay-ID</b>	<b>Katalog-Nr.</b>
GAPDH	Hs02758991_g1	4448489
Caspase-3	Hs00234387_m1	4331182
TLR2	Hs01014511_m1	4331182
TLR3	Hs01551077_m1	4331182
TLR4	Hs00152939_m1	4331182
TLR9	Hs00152973_m1	4331182

Tabelle 2: LAT TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany)

	<b>Sequenz</b>
Forward-Primer	CCCACGTACTCCAAGAAGGC
Backward-Primer	AGACCCAAGCATAGAGAGCCAG
Probe	CCCACCCCGCCTGTGTTTTGTGT

### 3.6 Humanes Gewebe

#### 3.6.1 Präparation

Die Verwendung der Autopsieproben wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

Die Entnahme der Trigemini- und Vestibularganglien erfolgte durch PD Dr. med. Inga Sinicina (Institut für Rechtsmedizin) und Dr. rer. nat. Susanne Himmelein (Klinikum der Universität München). Die Gewebeentnahme fand maximal 24 Stunden post-mortem im Institut für Rechtsmedizin in München statt. Bis zur Einbettung wurden die Ganglien auf Eis gelagert.

Im Gefrier-Einbettmedium (SLEE Medical GmbH, Mainz, Deutschland) wurden die Ganglien eingebettet und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

#### 3.6.2 Dünnschnitte

Für die Durchführung der Versuche musste das eingebettete Gewebe zunächst geschnitten werden. Die Dünnschnitte wurden mittels Kryostat 3050S (Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland) bei einer Temperatur zwischen -17 °C und -20 °C angefertigt. Für die *in-situ*-Hybridisierung wurden 10 µm dicke Schnitte auf Objektträger (SuperFrost® Plus, ThermoScientific, Braunschweig, Deutschland) gezogen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Anwendungen der membrangestützten Mikrodissektion wurden 16 µm dicke Schnitte auf spezielle Membrane Slides (PEN-Membrane 2,0 µm, MicroDissect GmbH, Herborn, Deutschland) aufgebracht und bei -80 °C gelagert.

Für die Isolierung von RNA und DNA aus dem Gewebe wurden zehn 30 µm dicke Schnitte aus verschiedenen Bereichen des Ganglions in 1,5 ml Eppendorfgläser gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.7 *In-situ*-Hybridisierung

Mittels *in-situ*-Hybridisierung können Nukleinsäuren in Zellen von histologischen Schnittpräparaten nachgewiesen werden. Hier wurde diese gängige molekularbiologische Methode zum Nachweis von LAT verwendet.

Bis zur Hybridisierung wurde RNase freies Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) verwendet, um sowohl Sonde als auch RNA zu schützen. DEPC blockiert das aktive Zentrum der RNasen, was zu einer vollständigen Inhibierung führt.

Nachdem die bei -20 °C gelagerten Dünnschnitte 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut wurden, wurden sie anschließend für weitere 15 Minuten bei 50 °C in einem Inkubator getrocknet. Die nachfolgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur und auf dem Schüttler durchgeführt. Die Fixierung der Schnitte erfolgte mittels 4 % Paraformaldehyd. Es folgten zwei Waschstschritte mit DEPC-H<sub>2</sub>O für je eine Minute, ein fünfminütiger Waschstschritt mit PBS-DEPC und zwei für jeweils eine Minute mit 2×SSC. Dann wurden die Schnitte für sieben

Minuten in Trietanolamin (TEA) inkubiert. Durch diese Acetylierung wurde eine spätere Anlagerung der negativ geladenen Sonde an unspezifische positiv geladene Strukturen verhindert. Danach wurden die Präparate zweimal für je eine Minute mit 2×SSC gewaschen.

Im Anschluss an die Acetylierung folgte eine einstündige Prähybridisierung mit PHO-Lösung und eine zwölfstündige Hybridisierung mit der LAT Oligo Sonde (4 ng/μl) bei 37 °C in einer Feuchtkammer. Die Sonde ist ein synthetisch hergestellter Basenstrang, der komplementär zu der nachzuweisenden Zielfrequenz ist. Bei der Hybridisierung gehen die komplementären Basenpaare eine Bindung ein. Die hier verwendete Sonde war mit einem Steroidhapten, dem Digoxigenin (DIG) versehen (5'-CAT AGA GAG CCA GGC ACA AAA ACA C-3' mit 3'DIG). Der Hybridisierung folgten drei Posthybridisierungsschritte mit 2×SSC, 1×SSC und 0,1×SSC für je 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Durch diesen Gradienten konnten nicht vollständig synthetisierte Stränge wieder getrennt werden. Im Anschluss wurde das Gewebe für 30 Minuten in einer Lösung bestehend aus 10 % Blocking Reagent, 0,1 % Tween 20 und PBS inkubiert. Hierbei wurde verhindert, dass der sekundäre Antikörper unspezifische Bindungen eingeht. Die Detektion der Sonde erfolgte mittels Anti-Digoxigenin-Antikörper (anti-DIG-AP) bei RT für zwei Stunden in einer Feuchtkammer. Anschließend wurde zur Entfernung des nicht-gebundenen sekundären Antikörpers das Gewebe zweimal mit 1×MA-Puffer für je 10 Minuten auf dem Schüttler und bei RT gewaschen. Dem folgte eine zweiminütige Inkubation in 1× Detektionspuffer. Der Farbumschlag erfolgte während der Behandlung mit einer Lösung aus Detektionspuffer und 2 % Nitroblautetrazoliumamid (NBT) (Roche, Mannheim, Deutschland). Hierbei war eine Abschirmung des Lichtes notwendig. Der Verlauf des Farbumschlags wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und bei gewünschter Intensivität mit H<sub>2</sub>O abgestoppt. Die Schnitte wurden anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gegengefärbt und mit Kaisers Glycergelatine (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

### 3.8 RNA-Extraktion

Für eine bessere Ausbeute wurden, sofern nicht anders angegeben, alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

Die Extraktion der RNA erfolgte aus zehn 30 μm-Schnitten. Zunächst wurde das Gewebe in spezielle Gefäße (Lysing matrix tubes, 2 ml, MP Biosystems, Solon, USA), die mit 1 ml Qiazol versehen waren, überführt und manuell im Homogenisator (Fast-Prep 24, MP Biosystems, Solon, USA) aufgeschlossen. Qiazol sorgte hierbei für eine effiziente Lyse und eine höhere Ausbeute von RNA aus dem Gewebe. Als nächstes folgte eine Überführung des homogenen Überstands in Eppendorfgefäße. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurden 200 μl Chloroform hinzugefügt und 15 Sekunden leicht geschüttelt, im Anschluss wurde wieder 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Chloroform löst Membranlipide aus der Zellmembran und dient somit zusätzlich zu einem effizienteren Zellaufschluss. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation (Centrifuge 5430 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 4 °C und 14000 rpm. Während der Zentrifugation fand eine Trennung in zwei Phasen statt, wobei sich die RNA in der klaren oberen Phase ansammelte. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für die Isolierung der RNA weiterverwendet. Die untere Phase wurde für die DNA-Extraktion bei -20 °C gelagert.

Der oberen Phase wurden 10 µl Glykogen (Roche, Mannheim, Deutschland) zugefügt und mittels Vortex-Mixer 7-2020 (Neo-Lab, Heidelberg, Deutschland) gut durchmischt. Dann wurden 400 µl 70 %-iges Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben, mittels Vortex-Mixer erneut durchmischt und für 20 Minuten bei -20 °C inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 4 °C für 20 Minuten mit 14000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 80 %-igem Ethanol gewaschen und für 5 Minuten zentrifugiert (4 °C, 14000 rpm). Auch dieser Überstand wurde verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Das zunächst weiße Pellet wurde nach vollständiger Trocknung transparent. Im Anschluss wurde das Pellet in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80 °C gelagert.

Um für den nächsten Schritt den RNA-Gehalt der Proben anzugleichen wurden die Konzentrationen mit dem NanoDrop 2000c Spectrophotometer (ThermoScientific, Braunschweig, Deutschland) bestimmt und entsprechend mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt, um eine Konzentration von 0,5 µg/µl zu erhalten.

### 3.9 Reverse Transkription

Während der reversen Transkription wurde mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus der isolierten RNA cDNA (complementary DNA) hergestellt. Die cDNA ist ein einsträngiges DNA-Molekül, welches die komplementäre Basensequenz zur RNA aufweist.

10 µl der verdünnten RNA (0,5 µg/µl) wurde mit 1 µl Random Primer versehen und für zehn Minuten bei 70 °C im Thermomixer compact (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Dann wurde der Mix zwei Minuten auf Eis heruntergekühlt und im Anschluss abzentrifugiert, damit das Kondensat dem Rest wieder zugeführt werden konnte. Nun wurden 8 µl des Mastermixes dazu gegeben. Dieser Mastermix bestand aus 1 µl Desoxy-Nukleotid-TriPhosphate, 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 1 µl RNase Inhibitor und 4 µl 5× Firststrand Buffer (MP Biomedicals, Santa Ana, USA). DTT wurde verwendet, um Disulfidbindungen in RNasen zu reduzieren, wodurch deren Aktivität zusätzlich inhibiert wurde. Nach zwei Minuten bei 42 °C im Wasserbad wurde 1 µl der Reversen Transkriptase SuperScript II (life technologies, Carlsbad, USA) beigefügt und für 60 Minuten bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Synthese der cDNA. Zur Aufbewahrung wurde die cDNA anschließend bei -20 °C gelagert.

### 3.10 DNA-Isolation

Aus der zurückgebliebenen Interphase der RNA-Isolierung konnte die DNA-Isolation erfolgen. Diese wurde aufgetaut und bei 14000 rpm und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Es ergab sich eine weitere Phasentrennung. Die obere RNA-enhaltende wässrige Phase wurde verworfen, da nur die untere DNA-enhaltende Phase benötigt wurde. Es folgte die Zugabe von 500 µl Back-Extraction-Buffer (BEB-Puffer). Der Ansatz wurde durch Schütteln vermischt und anschließend bei RT für 10 Minuten unter intermittierendem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde eine 30-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und RT durchgeführt. Hierbei teilte sich die wässrige, DNA-enhaltende Phase von Verunreinigungen.

Der wässrigen Phase wurde 10 µl Glycogen zugefügt und nach Vermischen für 5 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 400 µl 100 %-iges Isopropanol zugegeben und erneut für 5 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C für 15 Minuten). Der wässrige Überstand wurde verworfen und das gebildete Pellet, welches die DNA enthielt, mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Dies diente der Eliminierung möglicher Protein-Verunreinigungen.

Nun wurde mit 14000 rpm bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und die flüssige Phase verworfen. Diese beiden Schritte wurden drei Mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet bei RT getrocknet.

Die DNA wurde nun in eine gelöste Form überführt, indem sie mit 30 µl reinem Wasser versetzt wurde. Mittels Vortexer wurde dies vermischt und nach 2 Minuten Inkubation bei 55 °C und einer anschließenden Zentrifugation (14000 rpm bei 4 °C für 5 Minuten) war die DNA gelöst und konnte weiterverwendet werden.

### **3.11 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)**

Die zuvor synthetisierte cDNA wurde als Matrize für die RT-qPCR verwendet. RT-qPCR steht für Real Time quantitative PCR und ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren. Es handelt sich um eine klassische Polymerase-Kettenreaktion, die eine zusätzliche Quantifizierung des PCR-Produkts ermöglicht. Diese Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenzmessung, die in Echtzeit erfasst wird. Dabei wird das Fluoreszenzsignal in der exponentiellen Phase ermittelt, da aufgrund der optimalen Reaktionsbedingungen nur hier eine korrekte Quantifizierung möglich ist. Das Fluoreszenzsignal nimmt dabei proportional mit der Menge des PCR-Produktes zu.

Der Ansatz der PCR erfolgte unter der Sterilbank (Aura PCR Bench, Bioair/EuroClone, Milan, Italien). Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden zuvor 25 Minuten mit UV bestrahlt, um mögliche RNasen zu zerstören. Die cDNA wurde mit DEPC-H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:1,5 verdünnt. Für jeden Ansatz wurden 10 µl TaqMan® Gene Expression Mastermix (AP, Foster City, USA), 7 µl DNase-freies Wasser, 2 µl verdünnte cDNA und 1 µl des jeweiligen TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany) in ein Well einer MicroAmp 96-well Platte (Applied Biosystems/life technologies, Carlsbad, USA) überführt und mit Optical adhesive Film (Applied Biosystems/life technologies, Carlsbad, USA) verschlossen. TaqMan® Gene Expression Assays bestehen aus einem Paar unmarkierter PCR-Primer und einer TaqMan®-Sonde, die mit FAM/VIC-Farbstoff markiert war. Das in dieser Studie verwendete maßgeschneiderte Primer- und Sonden-Set war LAT (F: CCCACGTACTCCAAGAAGGC; R: AGACCCAAGCATAGAGAGCCAG; Sonde: CCCACCCGCCTGTGTTTTGTGT).

Die MicroAmp 96-well Platte wurde zentrifugiert, damit keine Luftblasen im Ansatz verblieben. Anschließend konnte die RT-qPCR im StepOne Plus RT-PCR-Systems (Applied Biosystems/life technologies, Carlsbad, USA) gestartet werden.

Wasser diente als Negativkontrolle, um Kontamination und Verschleppung aufzuzeigen.

Als Positivkontrolle diente GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Assay ID: Hs02758991\_g1, Catalog #: 4448489), ein Enzym der Glykolyse. Die Produktion dieses Gens ist für den Zellerhalt unumgänglich. Es wird unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren

Einflüssen exprimiert und wird deswegen als house-keeping gene (Haushaltsgen) bezeichnet. Es sollte also mittels RT-qPCR immer detektierbar sein und war somit die ideale Validitätskontrolle. Alle Ergebnisse wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf GAPDH normiert.

### 3.12 Einzelzellanalyse

Um einzelne Zellen kontaminationsfrei vom umliegenden Gewebe zu trennen, wurde die Laser-Capture-Mikrodissektion durchgeführt. Hierbei wurden die Schnitte auf den Membrane Slides (PEN-Membrane 2,0 µm, MicroDissect GmbH, Herborn, Deutschland) verwendet. Damit die LAT-positiven Neuronen von den LAT-negativen Neuronen der Trigeminalganglien unterschieden werden konnten, wurde wie bereits in Kapitel 3.7 beschrieben, eine *in-situ*-Hybridisierung mit einer LAT Oligo Sonde durchgeführt. Zur Schonung des Gewebes wurden jedoch die meisten Inkubationen verkürzt. Nachdem der Farbumschlag der Detektion erfolgte, wurde mit H<sub>2</sub>O abgestoppt. Die Schnitte wurden mit 100 %-igem Isopropanol getrocknet und bei -80 °C gelagert. Die Vestibularganglien wurden ungefärbt verwendet, da hier keine *in-situ*-Hybridisierung funktionierte. Es wurden alle Neurone gelasert, somit fand keine Unterscheidung zwischen LAT-positiven und LAT-negativen Nervenzellen statt.

Für die Laser-Capture-Mikrodissektion wurden die Schnitte nach dem Auftauen erneut mit 100 %-igem Isopropanol getrocknet, damit sich die Neurone besser vom umliegenden Gewebe herauslösen ließen. Nachdem LAT-positive und LAT-negative Neurone elektronisch markiert wurden, konnten diese mikrodisseziert und mittels Laser-Capture in einzelne Reaktionsgefäße befördert werden. Im Anschluss wurden die Zellen sofort auf Trockeneis bzw. bei -80° bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Es folgten die Zell-Lyse und die Reverse Transkription mittels Ambion Kit (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) gemäß Herstellerangaben. Für den Aufschluss der Zellen wurden 1 µl Single-Cell-DNase und 9 µl Single-Cell Lysis Solution auf die Zellen gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dieser Prozess mithilfe von Single-Cell Stop Solution gestoppt. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 4 °C und 12000 rpm.

Für die Reverse Transkription wurde ein Mastermix bestehend aus 3 µl Single-Cell VILO RT Mix und 1,5 µl Single-Cell SuperScript RT dem Zell-Lysat zugefügt. Die Synthese der cDNA erfolgte unter folgenden Temperaturänderungen: 10 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C und 5 min bei 85 °C.

Ein Mastermix bestehend aus 5 µl Single-Cell PreAmp Mix und 6 µl 0,2XPppld Taq-Man-Assay wurde für die Präamplifikation hergestellt und der Mischung beigefügt. Das Programm, das der PCR zu Grunde lag, beinhaltete eine Enzymaktivierung bei 95 °C (10 Minuten), 14 Zyklen bei denen sich eine Denaturierung bei 95 °C (15 Sekunden) und eine Annealing/Amplifikation bei 60 °C (4 Minuten) abwechselten, und eine abschließende Enzymdeaktivierung bei 99 °C für 10 Minuten.

Bei den einzelnen Zellen wurde die synthetisierte cDNA im Verhältnis 1:20 verdünnt und 4 µl dieser Verdünnung für den RT-qPCR-Ansatz verwendet. Das Expressionsniveau verschiedener Zielgene wurde wie bereits beschrieben mit TaqMan® Genexpressions-Assays (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) mit der RT-qPCR bewertet.

### 3.13 Nested PCR

Die nested PCR wurde durchgeführt, um HSV-1-DNA aus dem Gewebe nachzuweisen. Hierbei wurden zwei PCR-Reaktionen nacheinander durchgeführt, wobei das erste Amplifikat als Matrize für die folgende PCR diente. Während dieser zweiten PCR wurde mithilfe eines zweiten Primerpaares, welches weiter innen auf dem gewünschten DNA-Abschnitt bindet, ein kürzeres DNA-Fragment amplifiziert. Dies erhöhte die Selektivität, indem unspezifische PCR-Produkte aus der ersten Runde nicht weiter amplifiziert wurden.

Die genaue Durchführung, sowie die verwendeten Primer richteten sich nach dem Protokoll, dass der Publikation von Derfuss et. al. (2007) entnommen wurde [198]. Die nested PCR wurde mittels Peqlab-Kit „Taq DNA Polymerase“ durchgeführt. Für den Reaktionsansatz wurden 5 µl 10×Buffer Y, 1 µl dNTPs (10 mmol), je 0,5 µl Taq-Polymerase, äußerer Forward- und Backward-Primer, 2 µl Sample und 40,5 µl H<sub>2</sub>O in ein PCR-Gefäß gegeben und in einem T-Personal (Biometra, Göttingen, Deutschland) amplifiziert. 5 µl des neu entstandenen PCR-Produkts (1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt) wurden mit 5 µl 10×Buffer Y, 1 µl dNTPs (10 mmol), je 0,5 µl Taq-Polymerase, inneren Forward- und Backward-Primer sowie mit 37,5 µl H<sub>2</sub>O für die zweite PCR eingesetzt.

Das Protokoll beider PCRs war wie folgt:

1. 120 Sekunden bei 95 °C
2. 30 Sekunden bei 95 °C
3. 30 Sekunden bei 60 °C
4. 60 Sekunden bei 72 °C      Schritte 2-4 wurden 30 Mal wiederholt
5. 300 Sekunden bei 72 °C

### 3.14 Gel-Elektrophorese

Mit dem finalen Amplifikat wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt, die das Ergebnis bestätigen sollte. Dafür wurde ein 2 %-Agarose-Gel (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) in 150 ml TBE Puffer hergestellt, dem nach Abkühlung 5 µl Ethidiumbromid zugegeben wurde. Im Anschluss ließ man das Gemisch in einer geeigneten Gelkammer aushärten.

Zusammen mit einer bekannten DNA-Leiter (pUC Mix Marker, 8, ready-to-use, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Germany) und einer Positiv- und einer Negativkontrolle wurden die einzelnen Proben auf das Gel aufgetragen und mit einer Spannung von 25 Volt in einer mit TBE-Puffer gefüllten Kammer nach ihrer Größe aufgetrennt. Anhand der DNA-Leiter konnte man die Größe des Fragments ablesen. Nach dem das Gel ausreichend lang gelaufen war, wurde es aus der Gelkammer genommen und auf einen UV-Tisch gelegt und fotografiert.

### **3.15 Auswertung**

Die statistische Analyse wurde mittels SPSS® durchgeführt, wobei ein p-Wert kleiner 0,05 als statistisch signifikant angesehen wurde. Mittels Shapiro-Wilk-Test wurde die Verteilung der Daten überprüft. Bei der Auswertung der Studienergebnisse wurden Gruppenunterschiede mittels Mann-Whitney-U-Test getestet. Dies ist ein parameterfreier statistischer Test und dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen [199].

Korrelationsanalysen wurden nach Spearman durchgeführt, wobei ein p-Wert kleiner 0,01 als signifikant angesehen wurde.

Mittelwerte, Mediane und weitere Berechnungen wurden mit Microsoft Excel 2010 erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Trigeminalganglien

Die verwendeten Gewebeproben wurden von PD Dr. med. Inga Sinicina und Dr. rer. nat. Susanne Himmelein am Institut für Rechtsmedizin in München entnommen und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden elf LAT-positive und zehn LAT-negative Ganglien verwendet. Der Nachweis von LAT wurde optisch mittels *in-situ*-Hybridisierung erbracht. Zwischen dem Todeszeitpunkt und der Entnahme der Ganglien lagen maximal 24 Stunden. Dies entspricht dem ‚post-mortem delay‘ (PMD).

In Tabelle 3 sind die verwendeten Ganglien mit dazugehörigem LAT-Status, dem Geschlecht der Verstorbenen und deren Alter, sowie dem Zeitraum zwischen eingetretenem Tod und der Gewebeentnahme aufgeführt.

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Ganglien mit LAT-Status, Geschlecht und Alter des Verstorbenen, sowie der Zeitspanne zwischen Tod und Gewebeentnahme (PMD)

Probennummer	LAT-Status	Geschlecht	Alter	PMD [h]
1	positiv	M	75	18
2	positiv	W	94	20
3	positiv	W	63	16
4	positiv	M	30	16
5	positiv	M	55	18
6	positiv	W	86	20
7	positiv	M	76	19
8	positiv	M	29	13
9	positiv	W	71	18
10	positiv	W	77	21
11	positiv	M	29	15
12	negativ	M	52	21
13	negativ	M	48	19
14	negativ	W	52	21
15	negativ	M	44	22
16	negativ	M	61	24
17	negativ	W	50	16
18	negativ	M	49	16
19	negativ	W	70	19
20	negativ	W	11	14
21	negativ	W	32	12

Für die LAT-positiven Ganglien lag der Zeitpunkt des Todes zwischen 13 und 22 Stunden (PMD: 13 - 22 Stunden;  $17 \pm 2,5$  Stunden (Mittelwert  $\pm$  SD)), bei den LAT-negativen Ganglien zwischen 12 und 24 Stunden (PMD: 12 - 24 Stunden;  $18 \pm 4$  Stunden (Mittelwert  $\pm$  SD)). Das Alter der Verstorbenen mit negativem LAT-Status lag zwischen 11 und 70 Jahren (Alter: 11 - 70 Jahre;  $47 \pm 16$  Jahre (Mittelwert  $\pm$  SD)). Gestützt von der Annahme, dass die Wahrscheinlichkeit einer

HSV-1-Infektion im Laufe des Lebens steigt, lag das Alter der positiv getesteten Personen zwischen 29 und 94 Jahren (Alter: 29 - 94 Jahre;  $62 \pm 23,5$  Jahre (Mittelwert  $\pm$  SD)). Die Geschlechterverteilung war bei den LAT-negativen Ganglien ausgeglichen. Bei den LAT-positiven waren fünf Personen weiblich und sechs männlich. Es wurden zufällig linke oder rechte Ganglien verwendet.

### 4.1.1 Latenz als Apoptosesuppression

Die Apoptose ist ein integraler Bestandteil der Verteidigung gegen eindringende zelluläre Pathogene. Sie führt dazu, dass sich die Replikationszahl der Erreger verringert und gleichzeitig entzündliche Prozesse und das angeborene Immunsystem aktiviert werden. Dieser programmierte Zelltod ist ein hochregulierter Prozess.

Auf der anderen Seite können Viren inhibitorisch wirkende Proteine synthetisieren, welche die Immunantwort der Wirtszelle während der Infektion untergraben sollen. Damit wird ihre eigene Replikation und die Persistenz erleichtert [200].

Es stellt sich also die Frage, ob infizierte und nicht-infizierte Neurone bzw. infizierte und nicht-infizierte Ganglien Unterschiede bei apoptotischen Prozessen aufzeigen. Geeignete Indikatoren, die Rückschlüsse auf den programmierten Zelltod zulassen, sind der TUNEL-Assay und der Nachweis von Caspasen. Für diesen Versuch wurde die Anzahl der Replikate von Caspase-3 untersucht, da diese sowohl beim extrinsischen als auch beim mitochondrialen Signalweg eine entscheidende Rolle spielt [90].

#### 4.1.1.1 Analyse ganzer Ganglien

Nachdem mittels *in-situ*-Hybridisierung eine latente HSV-1-Infektion festgestellt oder ausgeschlossen werden konnte, wurde die RNA aus zehn 30  $\mu$ m-Schnitten pro Ganglion extrahiert. Dem folgte die reverse Transkription, bei der mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus der isolierten RNA cDNA hergestellt wurde. Die cDNA diente als Matrize für die RT-qPCR. Jede Messung erfolgte in Duplikaten. Mittels Primer für LAT und Caspase-3 konnte die Anzahl der Transkripte bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden auf GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase), einem Haushaltsgen, normiert.

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten ganzen Ganglien mit LAT-Status und der Anzahl der Transkripte für LAT und Caspase-3

Probennummer	LAT-Status	Anzahl der Transkripte für	
		LAT	Caspase-3
1	positiv	8378,5528	203,6975
2	positiv	16631,0049	811,1905
3	positiv	1663,5635	187,9460
4	positiv	2609,1905	314,4310
5	positiv	2256,9668	48,3542
6	positiv	1938,2056	239,5514
7	positiv	9459,4893	224,5556
8	positiv	208,4755	2871,7419
9	positiv	6468,8414	1508,5252
10	positiv	10158,5042	279,1355
11	positiv	99824,5827	180,1929
12	negativ	0,7972	76,7156
13	negativ	0,2206	100,6125
14	negativ	1,5925	96,1774
15	negativ	2,2142	267,2538
16	negativ	3,4079	1782,1047
17	negativ	24,2379	77,0910
19	negativ	4,2960	451,2126
20	negativ	0,2282	539,4279

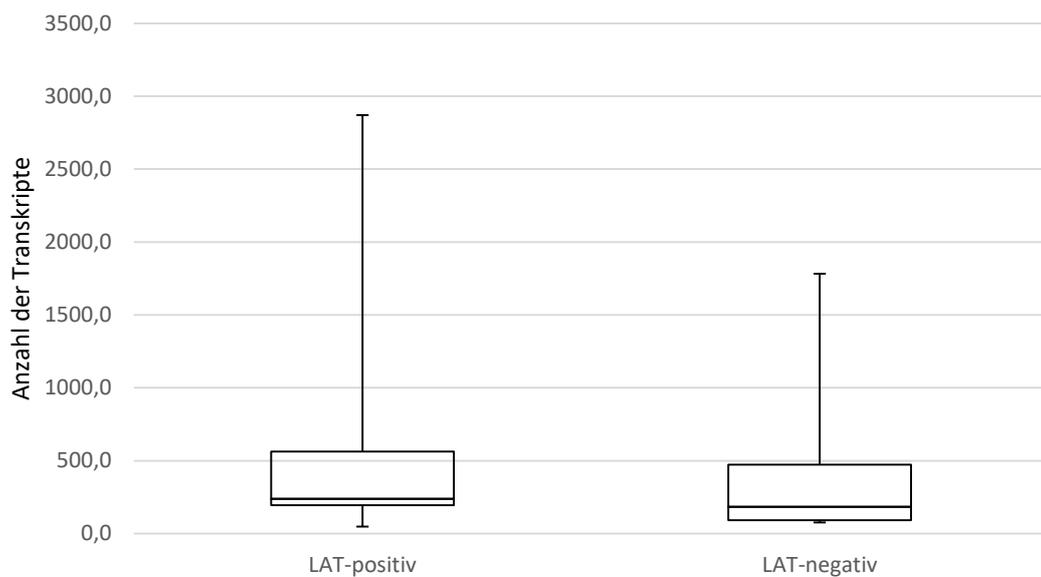
Tabelle 4 ist zu entnehmen, dass diesem Versuch elf LAT-positive und acht LAT-negative Ganglien zugrunde lagen. Mittels Test auf Normalverteilung wurden die Daten auf ihre Gauß'sche Verteilung hin untersucht. Da bei den ermittelten Werten keine Normalverteilung vorlag, musste ein nicht-parametrischer Test zur Ermittlung der Signifikanz verwendet werden. Zur Visualisierung der Werte wurde ein Boxplot erstellt (siehe Abbildung 8). Bei nicht-parametrischen Tests entspricht der Median dem Mittelwert, die Quartile der Standardabweichung.

Für die statistische Auswertung wurde der Median, die Quartile und der Minimal- und Maximalwert bestimmt. Diese sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Statistische Berechnung, die den Boxplots (Abbildung 8) zugrunde liegt

	LAT-positiv	LAT-negativ
Minimum	48,4	76,7
Q1	195,8	91,4
Median	239,6	183,9
Q3	562,8	473,3
Maximum	2871,7	1782,1

Zur Visualisierung der Daten wurden Boxplots erstellt. Diese bieten eine hohe Informationsdichte, indem sie das Zentrum, Streuung und Form der Verteilung darstellen. Abbildung 8 zeigt zwei Boxplots zur Caspase-3-Expression in LAT-positiven und LAT-negativen Ganglien. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Transkripte abzulesen.



**Abbildung 8: Caspase-3-Expression in ganzen Ganglien.**

Diese Boxplots zeigen die unterschiedlichen Caspase-3-Expressionen von LAT-positiven und LAT-negativen Ganglien. Beide Boxen werden durch ein oberes und ein unteres Quartil begrenzt, die Linie innerhalb der Boxen beschreibt den Median. Die Antennen oder Whiskers beschreiben hier den Minimal- und Maximalwert. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Transkripte abzulesen. Sämtliche Proben wurden in Duplikaten hergestellt und auf das Haushaltsgen GAPDH normiert.

## 4.1.1.2 Einzel-Zell Analyse

Mittels Laser-Capture-Mikrodissektion wurden einzelne Neurone vom umliegenden Gewebe isoliert. Zur Unterscheidung von LAT-positiven und LAT-negativen Neuronen wurde eine *in-situ*-Hybridisierung durchgeführt. Zur Schonung des Gewebes und der RNA wurde jedoch eine verkürzte Versuchsdurchführung vorgenommen. Nach Zelllyse und reverser Transkription fand eine Präamplifikation statt. Das Expressionsniveau wurde erneut mit der RT-qPCR bestimmt und auf GAPDH normiert. Die Messung fand in Duplikaten statt. Aus elf LAT-positiven und zehn LAT-negativen Ganglien wurden hierfür Neurone isoliert.

Tabelle 6 zeigt die verwendeten Proben mit LAT-Status und Anzahl an Transkripten für LAT und Caspase-3.

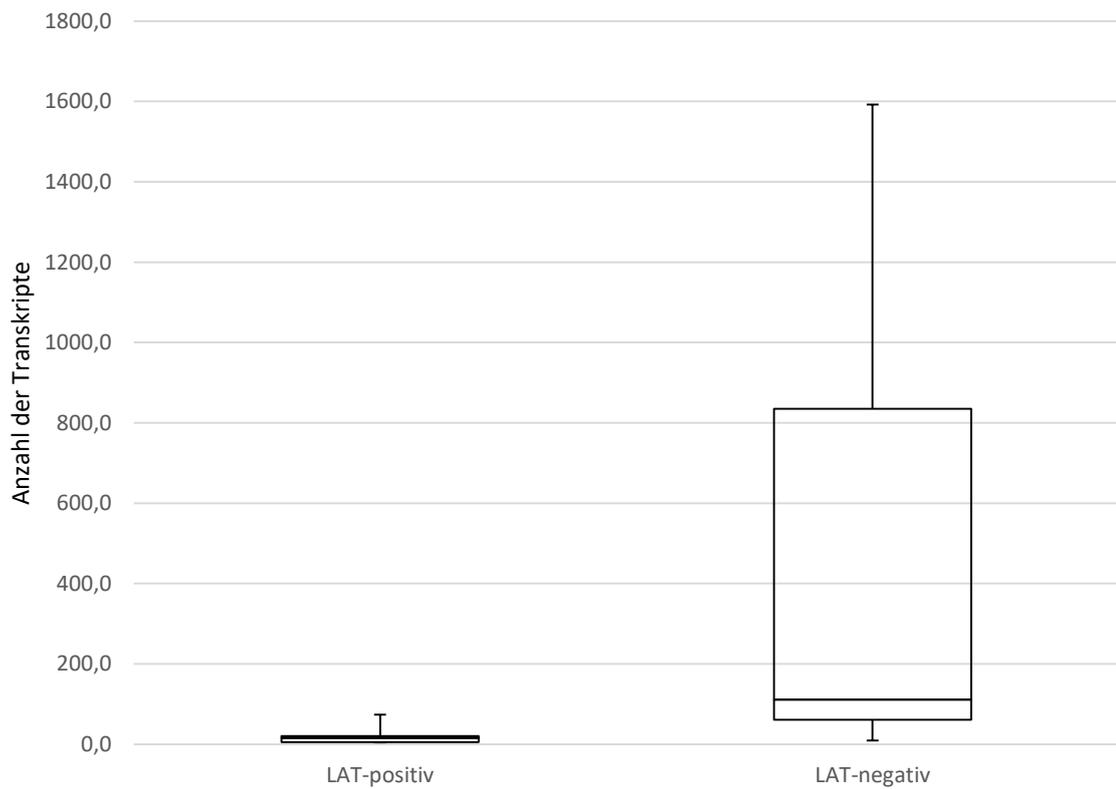
Tabelle 6: Einzel-Zell-Analyse - Aufgeführt sind der LAT-Status und die Anzahl der Transkripte für LAT und Caspase-3

Probennummer	LAT-Status	Anzahl der Transkripte für	
		LAT	Caspase-3
1	positiv	3395701,6854	20,4240
2	positiv	437885,9478	73,6583
3	positiv	61903089,6345	15,8677
4	positiv	36152294,4264	47,8406
5	positiv	10122937,8927	6,7966
6	positiv	7018347,6215	4,6076
7	positiv	8625198,3280	13,6646
8	positiv	5418760,7044	20,1425
9	positiv	7099853,4017	3,4205
10	positiv	3550482,8961	0,9433
11	positiv	6841388,0367	15,3151
12	negativ	5,5006	57,2473
13	negativ	0,1969	9,3208
14	negativ	8,1876	10,5789
15	negativ	0,2951	73,7360
16	negativ	0,3112	72,8317
17	negativ	18,4017	1591,9417
18	negativ	0,3166	222,0202
19	negativ	4,6934	1502,2577
20	negativ	2,7749	148,5366
21	negativ	0,0690	1039,4625

Da auch diese ermittelten Werte keine Normalverteilung zeigten, wurden erneut Boxplots erstellt (siehe Abbildung 9). Der Median, die Quartile sowie der minimale und maximale Wert sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Statistische Berechnung, die den Boxplots (Abbildung 9) zugrunde liegt

	LAT-positiv	LAT-negativ
Minimum	0,9	9,3
Q1	5,7	61,1
Median	15,3	111,1
Q3	20,3	835,1
Maximum	73,7	1591,9



**Abbildung 9: Caspase-3-Expression in einzelnen Neuronen.**

Diese Boxplots zeigen die unterschiedliche Caspase-3-Expression von LAT-positiven und LAT-negativen Neuronen. Beide Boxen werden durch ein oberes und ein untere Quartil begrenzt, die Linie innerhalb der Boxen beschreibt den Median. Die Antennen oder Whiskers beschreiben hier den Minimal- und Maximalwert. Sämtliche Proben wurden in Duplikaten hergestellt und auf das Haushaltsgen GAPDH normiert.

## 4.1.1.3 Statistische Analyse

Die Gauß'sche Verteilung zeigt, dass bei den Caspase-3 Messungen keine Normalverteilung vorliegt. Darum wurde ein parameterfreier Test für die Statistik verwendet. Für die Überprüfung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Eine statistische Signifikanz liegt bei einem p-Wert unter 0,05 vor. Die statistische Analyse erfolgte mittels SPSS®.

Tabelle 8: Auswertung der Caspase-3 Daten unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests

<b>Nullhypothese <math>N_0</math></b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanz</b>	<b>Entschluss</b>
LAT-positive und LAT-negative Ganglien zeigen keinen Unterschied in der Caspase-3-Expression.	0,545		<b><math>N_0</math></b> akzeptiert
LAT-positive und LAT-negative Neurone zeigen keinen Unterschied in der Caspase-3-Expression.	0,005	*	<b><math>N_0</math></b> abgelehnt
LAT-positive Ganglien und Neurone zeigen keinen Unterschied in der Caspase-3-Expression.	< 0,0001	*	<b><math>N_0</math></b> abgelehnt
LAT-negative Ganglien und Neurone zeigen keinen Unterschied in der Caspase-3-Expression.	0,360		<b><math>N_0</math></b> akzeptiert

Die Statistik stützt den vermuteten Effekt, den auch die Boxplots aus den Abbildungen 8 und 9 zeigen. Das Vorhandensein von LAT führt in ganzen Ganglien zu keinem signifikant erhöhten Caspase-3-Expressionsniveau. Die Annahme liegt nahe, dass durch die Vielzahl unterschiedlicher Zellen im Ganglion Differenzen im Expressionsniveau von Caspase-3 verdeckt werden, wodurch ein Effekt maskiert wird.

Es konnten auch keine Unterschiede zwischen ganzen Ganglien und einzelnen Neuronen festgestellt werden, wenn keine HSV-1-Infektion vorlag.

Betrachtet man hingegen einzelne Neurone mit unterschiedlichem LAT-Status, so sind signifikante Unterschiede bei der Expression von Caspase-3 festzustellen. LAT-positive Neurone weisen im Vergleich zu LAT-negativen Neuronen eine geringere Anzahl an Caspase-3 Transkripten auf.

Ein signifikanter Unterschied zwischen LAT-positiven Neuronen und LAT-positiven ganzen Ganglien und die damit verbundene Ablehnung der Nullhypothese konnte ebenfalls ermittelt werden. Hier liegt jedoch der Verdacht nahe, dass die Vielzahl an LAT-negativen Neuronen in einem infizierten Ganglion diesen Unterschied herbeigeführt haben. Ein Zellverbund mit vielen LAT-negativen Neuronen und nur wenig LAT-positiven Neuronen unterscheidet sich signifikant von ausschließlich LAT-positiven einzelnen Neuronen.

#### 4.1.2 Neuronale TLR-Expression

TLRs kommen hauptsächlich auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems vor, sind jedoch auch im ZNS auffindbar. Durch die Expression von TLRs sind humane Neurone in der Lage eine antivirale Antwort auszulösen. In humanen Neuronen konnten intrinsische Maschinerien festgestellt werden, die sowohl eine inflammatorische, chemoaktive als auch antivirale Antwort auslösen können [158].

Es soll herausgefunden werden, ob TLRs in humanen Trigeminalganglien exprimiert werden und ob es einen Unterschied zwischen LAT-positiven und LAT-negativen Ganglien bzw. Neuronen hinsichtlich ihrer TLR-Expression gibt. Für dieses Experiment wurden TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 gewählt, da diese Rezeptoren für die Erkennung viraler PAMPs zuständig sind. Die TaqMan-Genexpressionsassays für die genannten TLRs wurden von ThermoFisher Scientific, Darmstadt hergestellt. Die Assay-ID sowie die Katalog-Nummern sind in Tabelle 1 aufgeführt.

##### 4.1.2.1 Analyse ganzer Ganglien

Das Expressionsniveau für TLRs wurde mittels quantitativer RT-qPCR ermittelt. Hierfür wurde RNA aus zehn 30 µm-Schnitten extrahiert und mittels reverser Transkription cDNA hergestellt. Die Messungen erfolgten in Duplikaten und wurden auf GAPDH normiert. In Tabelle 9 sind die verwendeten Proben mit LAT-Status und der Anzahl an Transkripten für LAT und TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 dargestellt.

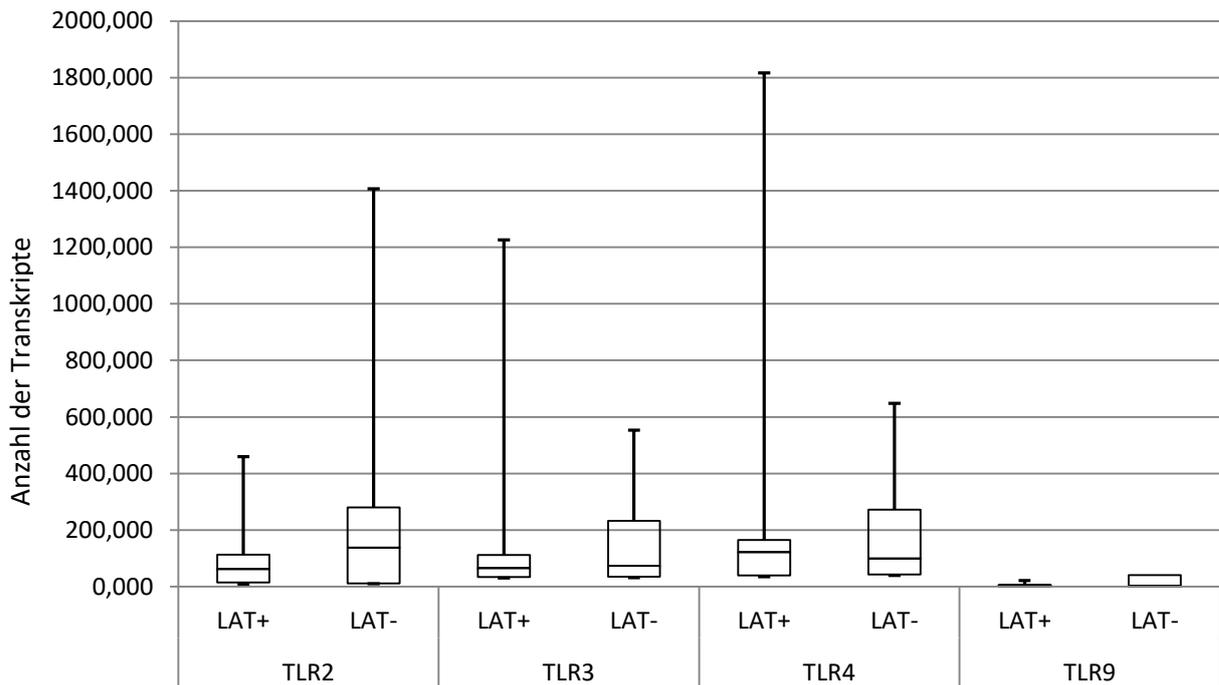
Tabelle 9: Verwendete Ganglien mit LAT-Status und Anzahl der Transkripte für LAT, TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9

Proben-Nr.	LAT-Status	Anzahl der Transkripte für				
		LAT	TLR2	TLR3	TLR4	TLR9
1	positiv	295,423	5,906	3,357	5,115	0,04
2	positiv	1438,494	64,729	115,676	165,001	4,336
3	positiv	2749,291	14,009	383,148	54,717	5,386
4	positiv	400,589	8,445	19,631	20,049	0,376
5	positiv	3279,583	31,54	84,447	125,933	1,9
6	positiv	22,273	142,808	49,083	45,766	0,377
7	positiv	3372,273	82,825	66,11	164,016	6,508
8	positiv	157,665	15,555	19,452	34,04	0,401
9	positiv	6468,841	324,145	1226,545	679,227	5,209
10	positiv	1092,462	62,463	65,694	121,676	21,295
11	positiv	42289,61	459,345	107,987	1816,289	9,903
12	negativ	0,282	12,33	73,804	52,267	1,5
13	negativ	0,015	1,856	3,93	3,138	0,016
14	negativ	0,591	402,972	-	80,955	-
15	negativ	0,791	1406,919	553,201	432,287	153,932
16	negativ	1,704	239,632	337,226	648,125	1,704
17	negativ	21,85	87,5	57,547	117,795	17,266
19	negativ	63,28	189,186	128,74	218,336	63,28
20	negativ	0,114	10,194	13,023	16,646	0,114

Tabelle 10: Statistische Berechnung, die den Boxplots (Abbildung 10) zugrunde liegt

	TLR2		TLR3		TLR4		TLR9	
	LAT <sup>+</sup>	LAT <sup>-</sup>						
Minimum	5,906	1,856	3,357	3,930	5,115	3,138	0,040	0,016
Q1	14,782	11,796	34,357	35,285	39,903	43,362	0,389	0,807
Median	62,463	138,343	66,110	73,804	121,676	99,375	4,336	1,704
Q3	112,816	280,467	111,832	232,983	164,509	271,824	5,947	40,273
Maximum	459,345	1406,919	1226,545	553,201	1816,289	648,125	21,295	153,932

Den in Abbildung 10 dargestellten Boxplots liegen die berechneten Werte aus Tabelle 10 zugrunde. Es wurden LAT-positive und LAT-negative Ganglien hinsichtlich ihres Expressionsniveaus von TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 gegenüber gestellt. Die statistische Analyse folgt in Kapitel 4.1.2.3 .



**Abbildung 10: TLR-Expressionsniveau ganzer Ganglien.**

Diese Boxplots zeigen die unterschiedliche Expression von TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 zwischen LAT-positiven und LAT-negativen Ganglien. Die Boxen werden durch ein oberes und ein unteres Quartil begrenzt, die Linie innerhalb der Boxen beschreibt den Median. Die Antennen oder Whiskers beschreiben hier den Minimal- und Maximalwert. Sämtliche Proben wurden in Duplikaten hergestellt und auf das Haushaltsgen GAPDH normiert.

## 4.1.2.2 Einzel-Zell Analyse

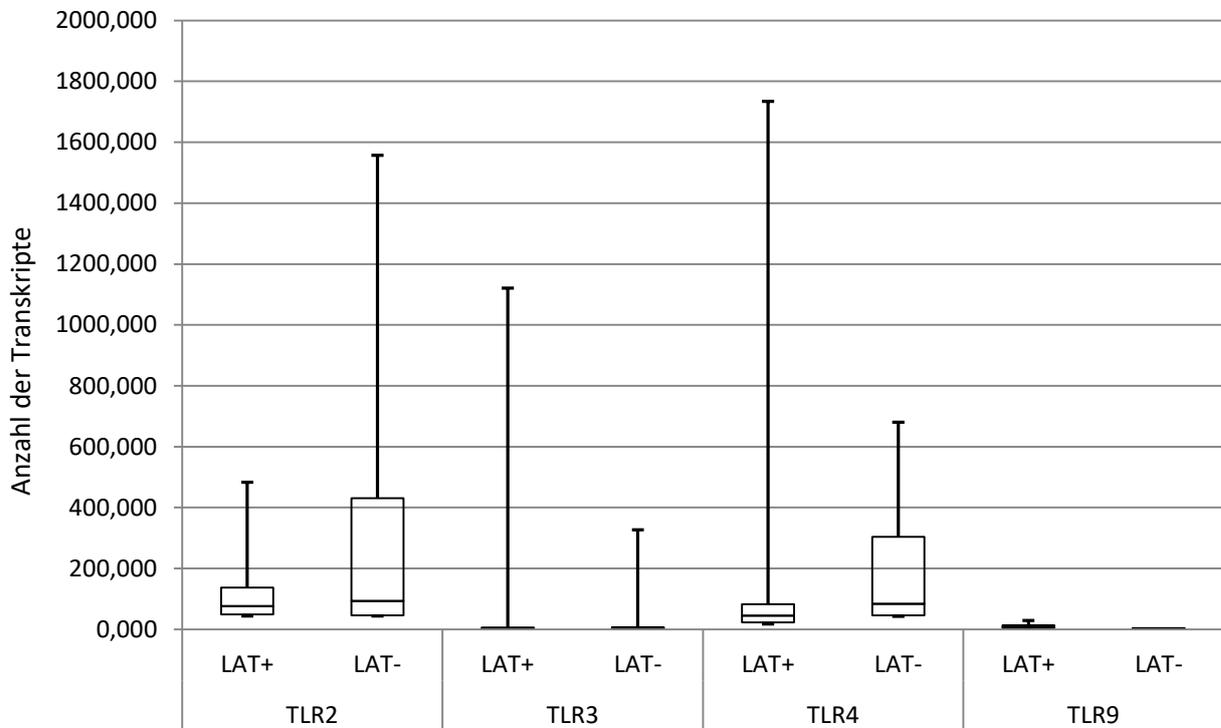
Die Isolierung einzelner Neurone fand mithilfe der Laser-Capture-Mikrodissektion statt. Zur Unterscheidung von LAT-positiven und LAT-negativen Neuronen wurde eine verkürzte *in-situ*-Hybridisierung durchgeführt. Der Zellyse und der reversen Transkription folgte die Präamplifikation. Das Expressionsniveau wurde mit der RT-qPCR bestimmt und auf GAPDH normiert. Die Messung fand in Duplikaten statt. In Tabelle 11 sind die für diesen Versuch verwendeten Proben mit LAT-Status und der Anzahl an Transkripte für LAT und Caspase-3 dargestellt.

Tabelle 11: Einzel-Zell Analyse - Verwendete Ganglien und die Anzahl der Transkripte für LAT, TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9

Proben-Nr.	LAT-Status	Anzahl der Transkripte für				
		LAT	TLR2	TLR3	TLR4	TLR9
1	positiv	3395701,69	161,223	8,529	17,664	7,159
2	positiv	437885,948	61,694	1,485	26,793	1,028
3	positiv	61903089,6	15,868	15,868	371,572	15,868
4	positiv	36152294,4	43,326	29,381	45,364	12,18
5	positiv	10122937,9	76,218	1,726	26,789	8,399
6	positiv	7018347,62	1031,7	4,608	240,634	7,063
7	positiv	8625198,33	1,8	0,45	10,956	15,131
8	positiv	5418760,7	80,919	0,389	19,449	62,592
9	positiv	7099853,4	194,644	3,421	76,349	3,421
10	positiv	3550482,9	112,782	0,943	88,551	2,821
11	positiv	6841388,04	55,674	4,758	56,888	4,758
12	negativ	5,501	15,39	5,858	19,313	1,383
13	negativ	0,197	35,44	0,522	21,715	1,555
14	negativ	8,188	4149,624	7,012	256,413	11,05
15	negativ	0,295	524,371	2,24	87,093	4,133
16	negativ	0,311	111,496	3,606	322,952	0,434
17	negativ	18,402	1116,896	18,591	591,129	18,402
18	negativ	0,317	40,29	16,53	38,954	0,703
19	negativ	4,693	75,944	5,12	67,752	4,693
20	negativ	2,775	149,993	7,006	80,199	2,775
21	negativ	0,069	63,786	0,856	319,928	0,069

Tabelle 12: Statistische Berechnung, die dem Boxplot (Abbildung 11) zugrunde liegt

	TLR2		TLR3		TLR4		TLR9	
	LAT <sup>+</sup>	LAT <sup>-</sup>						
Minimum	1,800	15,390	0,389	0,522	10,956	19,313	1,028	0,069
Q1	49,500	46,164	1,214	2,582	23,119	46,153	4,089	0,873
Median	76,218	93,720	3,421	5,489	45,364	83,646	7,159	2,165
Q3	137,003	430,776	6,644	7,011	82,450	304,049	13,656	4,553
Maximum	1031,700	4149,624	29,381	18,591	371,572	591,129	62,592	18,402



**Abbildung 11: TLR-Expressionsniveau einzelner Neurone.**

Diese Boxplots zeigen die unterschiedliche Expression von TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 zwischen LAT-positiven und LAT-negativen Neuronen. Beide Boxen werden durch ein oberes und ein unteres Quartil begrenzt, die Linie innerhalb der Boxen beschreibt den Median. Die Antennen oder Whiskers beschreiben hier den Minimal- und Maximalwert. Sämtliche Proben wurden in Duplikaten hergestellt und auf das Haushaltsgen GAPDH normiert.

## 4.1.2.3 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mittels SPSS®. Da bei der Messung des Expressionsniveaus der TLRs keine Normalverteilung vorlag, wurde ein nicht-parametrischer Test verwendet. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Bei einem p-Wert kleiner 0,05 liegt eine statistische Signifikanz vor, was die Ablehnung der Nullhypothese nach sich zieht.

Tabelle 13: Auswertung der TLR-Daten unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests

	<b>Nullhypothese <math>N_0</math></b>	<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanz</b>	<b>Entschluss</b>
<b>TLR2</b>	LAT-positive und LAT-negative Ganglien zeigen keinen Unterschied in der TLR2-Expression.	0,065		$N_0$ akzeptiert
	LAT-positive und LAT-negative Neurone zeigen keinen Unterschied in der TLR2-Expression.	0,114		$N_0$ akzeptiert
<b>TLR3</b>	LAT-positive und LAT-negative Ganglien zeigen keinen Unterschied in der TLR3-Expression.	0,441		$N_0$ akzeptiert
	LAT-positive und LAT-negative Neurone zeigen keinen Unterschied in der TLR3-Expression.	1,000		$N_0$ akzeptiert
<b>TLR4</b>	LAT-positive und LAT-negative Ganglien zeigen keinen Unterschied in der TLR4-Expression.	0,471		$N_0$ akzeptiert
	LAT-positive und LAT-negative Neurone zeigen keinen Unterschied in der TLR4-Expression.	0,740		$N_0$ akzeptiert
<b>TLR9</b>	LAT-positive und LAT-negative Ganglien zeigen keinen Unterschied in der TLR9-Expression.	0,953		$N_0$ akzeptiert
	LAT-positive und LAT-negative Neurone zeigen keinen Unterschied in der TLR9-Expression.	0,001	*	$N_0$ abgelehnt

In ganzen Ganglien konnte kein signifikanter Unterschied bei der TLR-Expression festgestellt werden. Die durch den Mann-Whitney-U-Test ermittelten p-Werte waren für TLR2 0,065, für TLR3 0,441, für TLR4 0,471 und für TLR9 0,953.

In einzelnen Neuronen ergab sich hinsichtlich der TLR9-Expression ein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney U-Test p-Wert = 0,001). TLR2, TLR3 und TLR4 zeigten auch in einzelnen Neuronen keine signifikante Änderung des Expressionsniveaus bei unterschiedlichem LAT-Status (p-Werte: TLR2 0,740, TLR3 1,000 und TLR4 0,114).

Weiterhin konnten keine Korrelationen mit dem Alter, Geschlecht oder der Zeitspanne zwischen dem Tod und der Gewebeentnahme ermittelt werden (Rangkorrelationsanalyse nach Spearman).

## 4.2 Vestibularganglien

Um die virale Hypothese der Krankheitsentstehung von akut unilateraler Vestibulopathie zu unterstützen, ist ein Nachweis viraler Transkripte von Nöten. Dafür wurden 40 Vestibularganglien mittels Kryostat geschnitten und eine RNA-Isolierung vorgenommen. Es folgte die reverse Transkription zur Herstellung von cDNA. Diese cDNA diente als Matrize für die RT-qPCR. Die Messungen erfolgten in Duplikaten.

Tabelle 14: Vestibularganglien deren LAT-Status mittels RT-qPCR ermittelt wurden

Proben-Nr.	LAT-Status	Proben-Nr.	LAT-Status
1	negativ	21	negativ
2	negativ	22	<b>positiv</b>
3	negativ	23	negativ
4	negativ	24	<b>positiv</b>
5	negativ	25	negativ
6	negativ	26	negativ
7	negativ	27	<b>positiv</b>
8	negativ	28	<b>positiv</b>
9	negativ	29	negativ
10	negativ	30	negativ
11	negativ	31	negativ
12	negativ	32	negativ
13	negativ	33	negativ
14	<b>positiv</b>	34	negativ
15	negativ	35	negativ
16	negativ	36	<b>positiv</b>
17	negativ	37	negativ
18	negativ	38	negativ
19	<b>positiv</b>	39	negativ
20	negativ	40	negativ

Tabelle 14 sind die 40 untersuchten VGs mit dazugehörigem LAT-Status zu entnehmen. Mittels RT-qPCR konnte bei sieben Ganglien eine HSV-1-Latenz nachgewiesen werden. Dies ergibt einen Anteil von 17,5 %. Da in älteren Publikationen mittels nested PCR über 60 % der Vestibularganglien positiv getestet wurden, wurde für einen Teil der hier verwendeten Vestibularganglien auch eine nested PCR durchgeführt.

Mittels Peqlab-Kit wurde die nested PCR durchgeführt. Das Produkt der ersten PCR diente als Matrize für die zweite Reaktion. Das Primerpaar für diese zweite Reaktion bindet innerhalb des zuerst amplifizierten DNA-Fragments. Die genaue Durchführung sowie die verwendeten Primer können aus der Publikation von Derfuss et. al. 2007 entnommen werden [198].

Das finale Amplifikat wurde auf ein 2 %-Agarose-Gel in TBE-Puffer aufgetragen. Während der Gelelektrophorese wurde das PCR-Produkt nach dessen Größe aufgetrennt. Die DNA-Leiter (pUC Mix Marker, 8, ready-to-use, Fermentas, Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Germany), in der ersten Spur diente zum Ablesen der Größe des Amplifikats. Die Visualisierung erfolgte auf dem UV-Tisch.

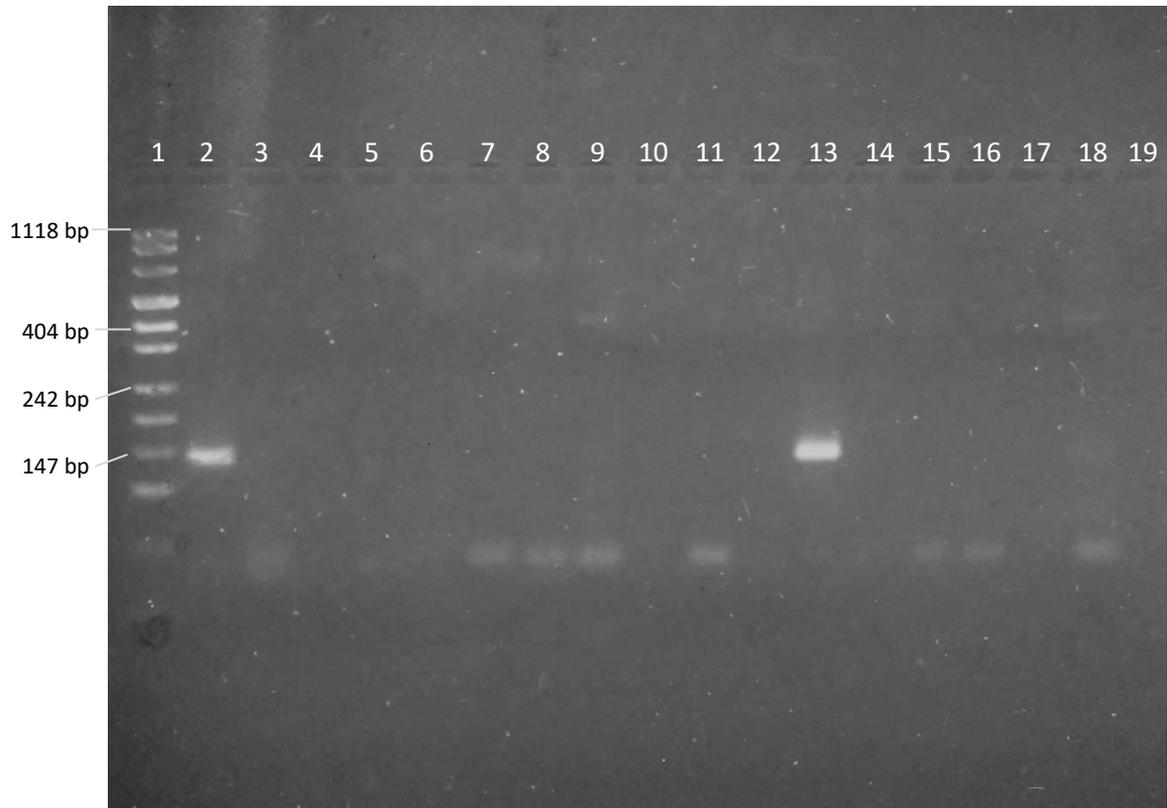
Abbildung 12 zeigt die erfolgte Gelelektrophorese und die Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe. Die Länge des PCR-Produkts kann durch den Vergleich mit der DNA-Leiter, die DNA-Fragmente einer bestimmten Größe enthält und parallel zur Probe im Gel mitläuft, bestimmt werden.

Tabelle 15: Zuteilung der Spuren für das in Abbildung 12 dargestellte Gel

Spur	Probe	Spur	Probe
1	DNA-Leiter	11	13
2	Positivkontrolle	12	9
3	14	13	36
4	37	14	33
5	15	15	11
6	38	16	34
7	16	17	12
8	39	18	35
9	17	19	Negativ-Kontrolle (Wasser)
10	40		

Tabelle 15 ist die Zuteilung der Spuren zu entnehmen. In der ersten Spur wurde die DNA-Leiter (pUC Mix Marker, 8, ready-to-use) mit bekannten Bandengrößen aufgetragen. Die zweite Spur wurde mit einer Positivkontrolle beladen, die das bei HSV-1-spezifische PCR-Produkt von 137 bp enthielt. Da die RT-qPCR deutlich weniger LAT-positive VGs hervorbrachte, als angenommen, diente die nested PCR der Aufdeckung falsch negativer Ergebnisse. Es wurden 15 Proben aufgetragen, bei denen mittels RT-qPCR kein LAT nachgewiesen konnte. Die Spur 13 enthält eine LAT-positive Probe.

In der Abbildung 12 ist das Gel dargestellt. Die Spuren 2 und 13 zeigen auf Höhe der 147 bp-Bande der DNA-Leiter deutlich die zu erwartende Bande. Sämtliche LAT-negativen Proben zeigen auch bei der nested PCR kein PCR-Produkt.



**Abbildung 12: Gelelektrophorese (2 % Agarose in TBE Puffer) mit aufgetragenen PCR-Produkten.**

Die erste Spur enthält die DNA-Leiter (pUC Mix Marker, 8, ready-to-use), die zweite Spur die Positivkontrolle, Spuren 3 bis 18 enthalten die Proben (vergl. Tabelle 15) und die 19. Spur enthält die Negativkontrolle. Bei HSV-1 wird ein spezifisches PCR-Produkt von 137 bp erwartet.

## 5. Diskussion

### 5.1 Trigeminusganglion

Nach Erstinfektion etabliert Herpes Simplex Virus-Typ 1 (HSV-1) eine latente Infektion in den Neuronen der Trigeminusganglien mit sporadischen Reaktivierungsphasen. Latente HSV-1-Infektionen betreffen 70 bis 90 % der Erwachsenen [201]. Während der Latenzzeit wird LAT als einziges virales Gen transkribiert [202]. Es ist essentiell für eine effiziente Reaktivierung der Viren aus der Latenz [92]. Außerdem konnten *in vivo* Studien zeigen, dass LAT eine anti-apoptotische Wirkung besitzt und somit Neurone nicht durch HSV-1 zerstört werden [201]. Selbst nach mehrfacher Reaktivierung von HSV-1 konnten keine sensorischen Defekte festgestellt werden [91]. In dieser Arbeit wurden latent HSV-1-infizierte humane Trigeminusganglien hinsichtlich ihres anti-apoptotischen Effekts und ihrer neuronalen Expression von TLRs untersucht. Es sollten Unterschiede zwischen latent HSV-1-infizierten Ganglien und nicht-befallenen Ganglien aufgedeckt werden. Außerdem sollte diese Untersuchung auf einzelne Neurone ausgeweitet werden.

#### 5.1.1 Apoptos suppression

Als ein integraler Bestandteil der Verteidigung gegen eindringende zelluläre Pathogene dient die Apoptose. Diese reduziert die Replikationszahl der Erreger. Gleichzeitig werden entzündliche Prozesse und das angeborene Immunsystem aktiviert. Bei dem programmierten Zelltod handelt es sich um einen hochregulierten Prozess.

Viren können inhibitorisch wirkende Proteine synthetisieren, welche die Immunantwort der Wirtszelle während der Infektion untergraben sollen. Damit wird die eigene Replikation und Persistenz erleichtert [200].

Die Cysteinyl-Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen) wurden als Schlüsselspieler im zellulären Prozess identifiziert, der als programmierter Zelltod oder Apoptose bezeichnet wird. Während der Apoptose spalten aktivierte apoptotische Caspasen ausgewählte Zielproteine, um den Zelltod auszuführen [203].

In dieser Arbeit wurde mittels RT-qPCR der Nachweis für Caspase-3 erbracht. Caspase-3 wird während der Apoptose aktiviert. Das nachgewiesene Enzym wird in der Literatur mit einem apoptotischen Zelltod gleichgesetzt [204, 205].

Zunächst wurden Dünnschnitte der Ganglien mittels *in-situ*-Hybridisierung hinsichtlich des Latenz assoziierten Transkripts (LAT) untersucht. Der Frage, ob infizierte und nicht-infizierte Neurone bzw. infizierte und nicht-infizierte Ganglien Unterschiede bei apoptotischen Prozessen aufzeigen, wurde in dieser Arbeit über den Caspase-3-Nachweis mittels RT-qPCR nachgegangen. Es wurden elf LAT-positive und acht LAT-negative Ganglien sowie einzelne Neurone aus elf LAT-positiven und zehn LAT-negativen Ganglien hinsichtlich ihrer Caspase-3-Aktivität untersucht. Der LAT-Status wurde parallel zum Caspase-3-Screening während der RT-qPCR bestätigt. Als Positivkontrolle diente der GAPDH-Assay. Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde Wasser als Negativkontrolle verwendet.

Es wurde angenommen, dass es aufgrund der latenten Virusinfektion zu einer Unterdrückung der Apoptose und somit zu einer Reduktion der Caspase-3 kommt. In Abbildung 8 ist das

Ergebnis der ganzen Ganglien mithilfe von Boxplots dargestellt. Zwischen LAT-positiven und LAT-negativen Ganglien konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Signifikanz wurde aufgrund fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U-Tests überprüft. Es ergab sich ein p-Wert von 0,545. In ganzen Ganglien ist demzufolge kein Unterschied des Expressionsniveaus von Caspase-3 festzustellen. Der programmierte Zelltod findet folglich in infizierten und nicht-infizierten Ganglien gleichermaßen statt. Die Annahme liegt jedoch nahe, dass durch die Vielzahl unterschiedlicher Zellen im Ganglion Differenzen im Expressionsniveau von Caspase-3 verdeckt werden. Dies würde den angenommenen Effekt maskieren. Diese Vermutung wird auch durch einen Vergleich von LAT-positiven Ganglien mit einzelnen LAT-positiven Neuronen gestützt. Hier ist entgegen der Erwartung ein signifikanter Unterschied festzustellen (p-Wert < 0,0001). Das zeigt, dass ein Effekt durch die vielen LAT-negativen Neurone innerhalb eines infizierten Ganglions erzielt wurde. LAT-negative Neurone zeigen hingegen keinen signifikanten Unterschied zu LAT-negativen Ganglien (p-Wert 0,360). Vergleicht man Neurone, die aus dem Zellverbund isoliert wurden und unterschiedlichen LAT-Status aufweisen, so ist ein signifikanter Effekt festzustellen (p-Wert 0,005). Die Abbildung 9 zeigt dies mittels Boxplots.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann ein Unterschied der Caspase-3 Expression LAT-positiver und LAT-negativer Neurone bestätigt werden. Latent mit HSV-1-infizierte Neurone zeigen folglich geringere apoptotische Mechanismen als nicht-infizierte Neurone auf. Dies könnte auch die klinische Beobachtung erklären, dass selbst nach rekurrenter HSV-1-Reaktivierung keine sensorischen Defekte auftreten.

Zusätzlich zu ihrer etablierten Funktion im Zelltod werden zunehmend Hinweise darauf geliefert, dass Caspasen auch an mehreren nicht-apoptotischen zellulären Prozessen beteiligt sind [203]. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit konnte eine erhöhte Anzahl an Granzym B-sekretierenden T-Zellen in LAT-positiven Ganglien festgestellt werden [91]. GrB dient der Spaltung und der Aktivierung von Caspase-3, was die Caspasen-Kaskade auslöst und zur Apoptose führt [206]. Diese CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzieren entgegen den Erwartungen keine Apoptose in infizierten Neuronen. Auch konnte immunhistochemisch bei HSV-1-infizierten Ganglien häufiger Caspase-3 nachgewiesen werden. Weiter konnte aktive Caspase-3 in einigen Neuronen gefunden werden, die jedoch keine strukturellen apoptotischen Merkmale aufweisen. Aufgrund dieser Erkenntnisse könnten Caspase-3 Funktionen zugeschrieben werden, die über die apoptotischen Eigenschaften hinausgehen [91].

Nicht-apoptotische Funktionen zeigten sich auch in weiteren funktionellen Studien. Aktivierte Caspasen weisen Funktionen während der T-Zellproliferation und der Zellzyklusregulation auf, sind aber auch an der Differenzierung einer Vielfalt von Zelltypen beteiligt. Die Analyse von bekannten apoptotischen Targets von Caspasen impliziert, dass die Spaltung einer begrenzten Anzahl ausgewählter Substrate eine wichtige Rolle bei nicht-apoptotischen Funktionen von Caspasen spielt. Eine selektive Substratspaltung könnte durch Aktivierung von anti-apoptotischen Faktoren, durch eine kompartimentierte Aktivierung von Caspasen oder durch eine begrenzte Aktivität von Caspasen während Apoptose-unabhängiger Funktionen reguliert werden. Die zunehmende Evidenz für die Caspase-Funktion bei nicht-apoptotischen zellulären Ereignissen legt nahe, dass Caspasen eine vielfältigere Rolle spielen als bisher angenommen [203].

### 5.1.2 Neuronale TLR-Expression

Die Aktivierung der unspezifischen Abwehr erfolgt sofort nach Virusinvasion und bildet die erste Verteidigungslinie. Die angeborene Immunantwort ergibt sich aus der antiviralen Wirkung des Interferonsystems und der Effektorfunktion spezialisierter Abwehrzellen, wie etwa den Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen. Diese Abwehrreaktionen laufen nach einem genetisch vorgegebenen Programm immer in gleicher Weise ab. Die angeborene Immunantwort begrenzt die initiale Virusvermehrung und ermöglicht so dem Immunsystem den Aufbau der spezifischen Immunabwehr. [207]

Die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen durch die Zelle über Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) stellt ein Schlüsselereignis bei der angeborenen Immunabwehr dar [112]. Die Bindung des Rezeptors initiiert eine Signalkaskade, die zur Expression von antimikrobiellen Produkten, inflammatorischen Zytokinen und/oder Chemokinen führt [113, 114].

Auch im zentralen Nervensystem konnte eine konstitutive Expression von TLRs nachgewiesen werden [208, 209]. Dies deutet darauf hin, dass das ZNS selbst über eine unspezifische Immunreaktion eine effiziente antivirale Antwort auslösen kann [158]. Mikrogliazellen und Astrozyten exprimieren ebenfalls mehrere TLR-mRNAs, was für eine Rolle bei der Erkennung von Infektionen und der Auslösung von Entzündungsreaktionen spricht [149, 150]. Dennoch sind auch Neurone in der Lage Chemokine und Zytokine zu produzieren. Es wurde jedoch nicht nachgewiesen, ob menschliche Neuronen im TG TLR exprimieren und selbst eine Infektion wahrnehmen können [158].

In dieser Arbeit wurde mittels RT-qPCR überprüft, ob TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 in Trigeminalganglien exprimiert werden und ob ein Unterschied zwischen LAT-positiven und LAT-negativen Ganglien bzw. einzelnen Neuronen mit unterschiedlichem LAT-Status festzustellen ist. Dafür wurde die RNA aus elf LAT-positiven und acht LAT-negativen ganzen Ganglien isoliert. Die RNA-Isolation einzelner Neurone erfolgte aus elf LAT-positiven und zehn LAT-negativen Ganglien.

In den Tabellen 9 und 11 und den Abbildungen 10 und 11 sind die Ergebnisse dargestellt. In dieser Arbeit konnte der Nachweis von TLR2 und TLR4, der für die Erkennung viraler struktureller und nicht-struktureller Proteine, sowie der Nachweis von TLR3 und TLR9, der für die Erkennung viraler Nukleinsäuren zuständig sind, erbracht werden [120]. Die Expression dieser Rezeptoren deutet auf autonome Abwehrmechanismen der Nervenzellen hin. Bereits in Mäusen konnte gezeigt werden, dass TLRs einen essentiellen Beitrag zur Bekämpfung von Infektionen leisten. Durch die TLRs kam es zur Erkennung und Initiierung der Immunabwehr des Wirts. Fehlte TLR2, so war der klinische Verlauf der Infektion, die Anzahl der Keime, die Inflammation sowie der Schaden der Blut-Hirn-Schranke verstärkt. TLR2 leistet folglich einen Beitrag zur Regulation der bakteriellen Clearance und der Entzündungsreaktion [168, 169].

Es ist nicht verwunderlich, dass ein Rezeptorsystem, welches für die Induktion des Immunsystems wesentlich ist, im Lungengewebe oder in der Milz stark exprimiert wird. Auch im Gehirn konnte mRNA für alle TLRs nachgewiesen werden [144]. Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen unterscheiden sich jedoch deutlich in ihrer TLR-Expression.

Während in Neuronen von Mäusen die mRNA aller TLRs nachgewiesen werden konnte, gelang der Nachweis in humanen Neuronen nur für TLR3 und TLR8 [157, 158, 210]. Es galt die Existenz weiterer TLRs zu belegen. Mittels RT-qPCR konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden,

dass in humanen Trigeminalganglien TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 exprimiert werden. Damit konnte der Beweis erbracht werden, dass Nervenzellen selbst Mustererkennungsrezeptoren aufweisen, die pathogenassoziierte molekulare Strukturen erkennen und daraufhin eine Signalkaskade initiieren, die zur Expression von antimikrobiellen Produkten, inflammatorischen Zytokinen und/oder Chemokinen führen [113, 114].

Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen HSV-1-infizierten und nicht-infizierten Ganglien hinsichtlich des Expressionsniveaus ermittelt werden. Alle ermittelten p-Werte waren über dem Signifikanzniveau von 0,05.

Die Betrachtung der Expression von TLR9 in einzelnen Neuronen zeigte einen signifikanten Unterschied. LAT-positive Neurone wiesen eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu LAT-negativen Neuronen auf. Der mittels Mann-Whitney U-Test berechnete p-Wert ergab 0,001. Latente, mit HSV-1-infizierte Neurone reagieren also mit einer Erhöhung der Expression von TLR9, der in der Lage ist virale CpG-DNA-Motive zu erkennen. TLR2 und TLR4, die in der Lage sind virale strukturelle und nichtstrukturelle Proteine zu detektieren, zeigten in einzelnen Neuronen keine signifikante Änderung des Expressionsniveaus bei unterschiedlichem LAT-Status. Auch TLR3, der dsRNA erkennt, zeigt keinen signifikanten Expressionsunterschied. Ein Zusammenhang der Ergebnisse mit Alter, Geschlecht oder der Zeitspanne zwischen Tod und Gewebeentnahme konnte mittels Korrelationsanalyse ausgeschlossen werden.

Bereits im Trigeminalganglion und im Gehirn von Mäusen konnte die Beteiligung von TLR2 und TLR9 während einer HSV-1-Infektion gezeigt werden. TLR2 und TLR9 stimulieren zusammen die angeborene antivirale Aktivität und schützen somit das ZNS vor einer HSV-1-Infektion [211]. Dabei scheint es sich hauptsächlich um eine lokale Kontrolle zu handeln. In Mäusen war das einzige veränderte Zytokinprofil das von CCL2 [212]. Die Anzahl der Virusreplikationen wird dabei begrenzt, um so eine Enzephalitis, also eine viral bedingte Entzündung des ZNS zu verhindern. Dabei muss die Reaktion gut reguliert sein, da nicht nur das Virus, sondern auch die resultierende Immunantwort selbst gewebeschädigend und eine Enzephalitis verursachend sein kann [213]. Dies deutet darauf hin, dass TLRs neben der Aktivierung der Zytokin- und Chemokinproduktion eine Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielen könnten. Dies wird gestützt durch Hinweise, dass TLRs die Immunantwort von T-Zellen und NK-Zellen unterdrücken, pro-inflammatorische Gene vorübergehend stummschalten, Chemokinrezeptoren modulieren und Leukozytenmigration umleiten können [214].

Für TLR9 konnte gezeigt werden, dass er für frühe Typ-1-IFN-Reaktionen nach einer HSV-Infektion in plasmazytoiden dendritischen Zellen ausschlaggebend ist [215]. Neben der TLR2 und TLR9-Expression ist die Immunantwort bei einer HSV-1-Infektion von Mäusen auch von der IFN- $\gamma$ -Produktion abhängig [216]. Im Trigeminalganglion von infizierten Mäusen sorgt neben IFN- $\gamma$  auch IL-1 $\beta$  für eine effiziente Immunantwort [212]. *In vivo* konnte der Nachweis erbracht werden, dass TLR9-inhibitorische Oligonukleotide die Expression von essentiellen „immediate early“ Herpes-Genprodukten verhindern und die virale Anheftung und den Viruseintritt stören können [217].

## 5.2 Vestibularganglion

Um Latenzmechanismen von HSV-1 oder Reaktionen des Immunsystems auf eine HSV-1-Infektion zu begreifen, ist die Forschung an Trigeminalganglien sinnvoll, da diese den natürlichen Ort des Befalls darstellen. Hier liegt eine viel höhere Dichte an LAT-positiven Neuronen als in Vestibularganglien vor. In Trigeminalganglien sind etwa 10 % der Neurone mit HSV-1 infiziert. Im Gegensatz dazu lässt sich in nur circa einem Prozent der Neurone in Vestibularganglien eine latente Infektion nachweisen. Bei akut unilateraler Vestibulopathie wird von einem Virusbefall der Vestibularganglien ausgegangen. Dafür sprechen histopathologische Untersuchungen des Vestibularnervs. Akut einseitige Vestibulopathie und Herpes Zoster oticus verursachen eine ähnliche Gewebeveränderung des Schläfenbeins [40]. Auch die Infektion der Vestibularkerne nach Animpfen von HSV-1 über die Ohrmuschel von Mäusen, ist ein Argument für die virale Hypothese [36]. Einen weiteren Hinweis darauf geben Studien, die besagen, dass vestibuläre Ganglien ebenso wie andere Hirnnervganglien latent mit HSV-1-infiziert sind [38]. Während der Primärinfektion wird das Trigeminalganglion infiziert. Viren gelangen am Infektionsort von Epithelzellen über direkten Zellkontakt in freie Nervenendigungen und von dort aus über retrograden axonalen Transport ins TG [57]. Von dort aus kann über den N. lingualis das Ganglion geniculi (GG) befallen werden. Über facio-vestibuläre Anastomosen werden dann Neurone im superioren Vestibularganglion infiziert [38]. Bezüglich des Nachweises von LAT in Vestibularganglien gibt es konträre Publikationen. Während Furuta *et al.* im Jahre 1993 bei 16 untersuchten VGs kein LAT nachweisen konnte [218], publizierte Arbusow *et al.* 1999 eine Infektionsfrequenz von 60 % [38].

In der vorliegenden Arbeit, unter Verwendung der hochsensitiven RT-qPCR, konnten beide Studien nicht unterstützt werden. Bei 40 untersuchten Vestibularganglien konnte bei 17,5 % ein positiver Nachweis von LAT erbracht werden.

Als Grund für diese Unterschiede in der HSV-1-Infektionsfrequenz können mehrere Faktoren in Betracht gezogen werden.

Durch die verbesserte Technik der PCRs und der damit einhergehenden erhöhten Sensitivität wurde eine Detektion von sehr schwach transkribierten Nukleinsäuren ermöglicht und verbessert. Furuta *et al.* konnten HSV-1-DNA nachweisen, jedoch kein LAT und kamen doch zu dem Schluss, dass humane Vestibularganglien latent mit HSV-1 infiziert sind, LAT jedoch nur schwach oder gar nicht transkribiert wird [218].

Diskrepanzen könnten während der Präparation der Ganglien entstanden sein. Längere Präparationszeiten oder eine Erwärmung des Gewebes können zu dessen Zerstörung führen. Auch während der Entkalkung oder während des Einfrierens oder Auftauens der Proben könnten Beschädigungen entstanden sein [219, 220].

Eine weitere Möglichkeit, warum diese Arbeit eine deutlich geringere Häufigkeit von HSV-1-LAT in VGs im Vergleich mit Arbusow *et al.* aufweist, sind Unterschiede der Protokolle für die RNA- und DNA-Isolierung. Die Erfahrung zeigte, dass durch langsames Auftauen, strenges Arbeiten auf Eis und Kürzung einiger Schritte, bessere Ergebnisse erzielt werden konnten. Bei der Durchführung von nested PCRs könnten auch benachbarte Proben kontaminiert worden sein. Diese fremde Erbinformation würde ein falsch-positives Ergebnis generieren. Vorstellbar wäre auch eine Dimerbildung [220]. Möglicherweise war auch die Verwendung des Haushaltsgens, das für Beta-Aktin kodiert, ungeeignet und führte so zu falschen Ergebnissen [221].

Die HSV-1-Infektionsfrequenz der Bevölkerung beträgt über 80 %, wobei nach den Ergebnissen dieser Arbeit bei 17,5 % der Infizierten auch das Vestibularganglion befallen ist. Die jährliche Inzidenz von Schwindel liegt bei über 11 %, wobei etwa 8 % der Schwindelpatienten an akut einseitiger Vestibulopathie leiden. Die geringere Infektionsfrequenz passt deutlich besser zu der Anzahl an Schwindelpatienten, die unter akut einseitiger Vestibulopathie leiden. Eine HSV-1-Infektion mit Beteiligung des Vestibularganglions kann eine akut einseitige Vestibulopathie bedingen. Vorstellbar ist, dass durch eine Virusreaktivierung der periphere Vestibularisausfall verursacht wird.

### 5.3 Fazit

Diese Arbeit betrachtet die Auswirkung einer latenten HSV-1-Infektion in sensorischen Neuronen. Dabei wurde die Latenz als Suppression der Apoptose, sowie das Vorhandensein von TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 untersucht und mit nicht-infizierten Neuronen verglichen. Diese Ergebnisse und die Untersuchung der Vestibularganglien wurden im Kontext der akut unilateralen Vestibulopathie diskutiert.

Die wesentlichen Untersuchungsergebnisse stellen sich wie folgt dar:

1. HSV-1-infizierte Neurone weisen eine statistisch signifikant geringere Anzahl an Caspase-3 Transkripten auf als LAT-negative Neurone.
2. Neurone der humanen Trigeminalganglien exprimieren TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9
3. LAT-positive und LAT-negative Neurone des Trigeminalganglions zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied in der TLR9-Expression.
4. Bei 17,5 % der Vestibularganglien kann eine latente HSV-1-Infektion nachgewiesen werden.

Diese können wie folgt eingeordnet werden:

- I. Latent mit HSV-1 infizierte Neurone zeigen geringere apoptotische Mechanismen als nicht-infizierte Neurone. Die Latenz könnte somit als Apoptosesuppression verstanden werden.
- II. Nervenzellen können selbst Mustererkennungsrezeptoren exprimieren, die pathogen-assoziierte molekulare Strukturen erkennen und daraufhin eine Signalkaskade initiieren, die zur Expression von antimikrobiellen Produkten, inflammatorischen Zytokinen und/oder Chemokinen führen.
- III. TLR9, der die Erkennung viraler CpG-DNA-Motive initiiert, wird aufgrund der HSV-1-Infektion stärker exprimiert und scheint eine besondere Rolle zu spielen.
- IV. Die HSV-1-Infektionsfrequenz der Vestibularganglien deckt sich gut mit der Anzahl der Schwindelpatienten, die an akut einseitiger Vestibulopathie leiden. Durch eine Virusreaktivierung kann ein peripherer Vestibularisausfall verursacht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Neuhauser, H.K., *The epidemiology of dizziness and vertigo*. Handb Clin Neurol, 2016. 137: p. 67-82.
2. Corrales, C.E. and N. Bhattacharyya, *Dizziness and death: An imbalance in mortality*. Laryngoscope, 2016. 126(9): p. 2134-6.
3. Neuhauser, H.K., *Epidemiology of vertigo*. Curr Opin Neurol, 2007. 20(1): p. 40-6.
4. Wersinger, E., et al., *Symptomatic treatment of vestibular deficits: therapeutic potential of histamine H4 receptors*. J Vestib Res, 2013. 23(3): p. 153-9.
5. Michael Strupp, T.B., *Leitsymptom Schwindel*. Dtsch Arztebl International, 2008. 10.3238/arztebl.2008.0173.
6. Strupp, M. and T. Brandt, *Diagnose und aktuelle Therapie von Schwindelsyndromen*. Dtsch med Wochenschr, 2016. 141(23): p. 1698-1710.
7. Vignaux, G., et al., *Evaluation of the chemical model of vestibular lesions induced by arsanilate in rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. 258(1): p. 61-71.
8. Angelaki, D.E. and K.E. Cullen, *Vestibular system: the many facets of a multimodal sense*. Annu Rev Neurosci, 2008. 31: p. 125-50.
9. Dieterich, M. and T. Brandt, *Vestibular system: anatomy and functional magnetic resonance imaging*. Neuroimaging Clin N Am, 2001. 11(2): p. 263-73, ix.
10. Drenckhahn, D., *Anatomie - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. Urban & Fischer/Elsevier, 2012.
11. Brillinger, J., *Das neurootologische Profil des alternden Menschen in Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg*. 2008.
12. Leblanc, A., *Atlas of Hearing and Balance Organs - A Practical Guide for Otolaryngologists*. Springer-Verlag Paris. 1999.
13. Maeda, R., et al., *Tip-link protein protocadherin 15 interacts with transmembrane channel-like proteins TMC1 and TMC2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(35): p. 12907-12.
14. PURVES D., A.G.J., FITZPATRICK D, *Neuroscience*. The Otolith Organs: The Utricle and Sacculus. 2001, Sunderland (MA): Sinauer Associates.
15. Ernst, A.B., Dietmar, *Gleichgewichtsstörungen - Diagnostik und Therapie beim Leitsymptom Schwindel*. 2016: Stuttgart, Thieme-Verlag
16. Klinke, R.P., H.C.; Silbernagl, S., *Physiologie*. 2005, Stuttgart: Thieme-Verlag.
17. Trepel, M., *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. 1999, München: Urban & Fischer Verlag
18. Dieterich, M. and T. Brandt, *Functional brain imaging of peripheral and central vestibular disorders*. Brain, 2008. 131(Pt 10): p. 2538-52.
19. Gekle, M., et al., *21.3 Vestibuläre Reflexe*, in *Taschenlehrbuch Physiologie*. 2010, Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
20. Goldberg, J.B.-E., J. A., *The Vestibular System: A Sixth Sense*. 2012: Oxford University Press, USA
21. Meng, H., et al., *Diversity of vestibular nuclei neurons targeted by cerebellar nodulus inhibition*. J Physiol, 2014. 592(1): p. 171-88.
22. Kammermeier, S., J. Kleine, and U. Buttner, *Vestibular-neck interaction in cerebellar patients*. Ann N Y Acad Sci, 2009. 1164: p. 394-9.
23. Zwergal, A., et al., *Parallel ascending vestibular pathways: anatomical localization and functional specialization*. Ann N Y Acad Sci, 2009. 1164: p. 51-9.
24. Brandt, T.D., M.; Strupp, M., *Vertigo - Leitsymptom Schwindel*. 2013, Heidelberg: Springer Berlin
25. Stoll, W., *Vestibuläre Erkrankungen*. 2001, Stuttgart: Thieme.

26. Alviña, K. and K. Khodakhah, *The therapeutic mode of action of 4-aminopyridine in cerebellar ataxia*. J Neurosci, 2010. 30(21): p. 7258-68.
27. Brandt, T. and S. Steddin, *Current view of the mechanism of benign paroxysmal positioning vertigo: cupulolithiasis or canalolithiasis?* J Vestib Res, 1993. 3(4): p. 373-82.
28. Hamann, K.-F., *Grundlagen für die Begutachtung von Schwindelerscheinungen: Pathophysiologie, typische Beschwerden und okulomotorische Symptome*. MedSach, 1999. 06-1999: p. 177.
29. Semont, A., G. Freyss, and E. Vitte, *Curing the BPPV with a liberatory maneuver*. Adv Otorhinolaryngol, 1988. 42: p. 290-3.
30. Brandt, T.D., M.; Strupp, M., *Vertigo: Leitsymptom Schwindel*. Vol. 1. 2004: Steinkopff.
31. Lopez-Escamez, J.A., et al., *Diagnostic criteria for Meniere's disease*. J Vestib Res, 2015. 25(1): p. 1-7.
32. Brandt, T., M. Dieterich, and S. Michael, *Vertigo and Dizziness - Common Complaints*. 2014, London: Springer-Verlag.
33. Gioacchini, F.M., et al., *Prevalence and diagnosis of vestibular disorders in children: A review*. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. 78(5): p. 718-724.
34. Adamec, I., et al., *Incidence, seasonality and comorbidity in vestibular neuritis*. Neurol Sci, 2015. 36(1): p. 91-5.
35. Walker, M.F., *Treatment of vestibular neuritis*. Curr Treat Options Neurol, 2009. 11(1): p. 41-5.
36. Strupp, M. and M. Magnusson, *Acute Unilateral Vestibulopathy*. Neurol Clin, 2015. 33(3): p. 669-85, x.
37. Fetter, M. and J. Dichgans, *Vestibular neuritis spares the inferior division of the vestibular nerve*. Brain, 1996. 119(3): p. 755-763.
38. 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.
39. Arbusow, V., et al., *Detection of herpes simplex virus type 1 in human vestibular nuclei*. Neurology, 2000. 55(6): p. 880-2.
40. Sekitani, T., et al., *Vestibular neuronitis: epidemiological survey by questionnaire in Japan*. Acta Otolaryngol Suppl, 1993. 503: p. 9-12.
41. Theil, D., et al., *Cranial nerve palsies: herpes simplex virus type 1 and varizella-zoster virus latency*. Ann Neurol, 2002. 51(2): p. 273-4.
42. Theil, D., et al., *Prevalence of HSV-1 LAT in human trigeminal, geniculate, and vestibular ganglia and its implication for cranial nerve syndromes*. Brain Pathol, 2001. 11(4): p. 408-13.
43. Strupp, M. and T. Brandt, *Vestibular neuritis*. Semin Neurol, 2009. 29(5): p. 509-19.
44. Bremova, T., et al., *Ocular VEMPs indicate repositioning of otoconia to the utricle after successful liberatory maneuvers in benign paroxysmal positioning vertigo*. Acta Otolaryngol, 2013. 133(12): p. 1297-303.
45. Strupp, M., et al., *Methylprednisolone, valacyclovir, or the combination for vestibular neuritis*. N Engl J Med, 2004. 351(4): p. 354-61.
46. Strupp, M., et al., *Vestibular exercises improve central vestibulospinal compensation after vestibular neuritis*. Neurology, 1998. 51(3): p. 838-44.
47. Davison, A.J., *Evolution of the herpesviruses*. Vet Microbiol, 2002. 86(1-2): p. 69-88.
48. Davison, A.J., *Herpesvirus systematics*. Vet Microbiol, 2010. 143(1): p. 52-69.
49. Ablashi, D.V., et al., *Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8, diseases*. Clin Microbiol Rev, 2002. 15(3): p. 439-64.
50. Roizmann, B., et al., *The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Arch Virol, 1992. 123(3-4): p. 425-49.

51. Roizman, B. and J. Baines, *The diversity and unity of Herpesviridae*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1991. 14(2): p. 63-79.
52. Katlama, C., *Cytomegalovirus infection in acquired immune-deficiency syndrome*. *J Med Virol*, 1993. Suppl 1: p. 128-33.
53. Cathomas, G., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)/human herpesvirus 8 (HHV-8) as a tumour virus*. *Herpes*, 2003. 10(3): p. 72-7.
54. Hellenbrand, W., et al., *Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2005. 24(2): p. 131-5.
55. Whitley, R.J., D.W. Kimberlin, and B. Roizman, *Herpes simplex viruses*. *Clin Infect Dis*, 1998. 26(3): p. 541-53; quiz 554-5.
56. Remeijer, L., A. Osterhaus, and G. Verjans, *Human herpes simplex virus keratitis: the pathogenesis revisited*. *Ocul Immunol Inflamm*, 2004. 12(4): p. 255-85.
57. Vrabec, J.T. and R.L. Alford, *Quantitative analysis of herpes simplex virus in cranial nerve ganglia*. *J Neurovirology*, 2004. 10(4): p. 216-22.
58. Modrow, S., et al., *Molekulare Virologie*. Vol. 3. 2010: Spektrum Akademischer Verlag,, Heidelberg.
59. Deshmane, S.L. and N.W. Fraser, *During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure*. *J Virol*, 1989. 63(2): p. 943-7.
60. Newcomb, W.W. and J.C. Brown, *Structure of the herpes simplex virus capsid: effects of extraction with guanidine hydrochloride and partial reconstitution of extracted capsids*. *J Virol*, 1991. 65(2): p. 613-20.
61. Heine, J.W., P.G. Spear, and B. Roizman, *Proteins specified by herpes simplex virus. VI. Viral proteins in the plasma membrane*. *J Virol*, 1972. 9(3): p. 431-9.
62. Little, S.P., et al., *A virion-associated glycoprotein essential for infectivity of herpes simplex virus type 1*. *Virology*, 1981. 115(1): p. 149-60.
63. Mettenleiter, T.C., *Budding events in herpesvirus morphogenesis*. *Virus Res*, 2004. 106(2): p. 167-80.
64. Jenkins, F.J., M.J. Casadaban, and B. Roizman, *Application of the mini-Mu-phage for target-sequence-specific insertional mutagenesis of the herpes simplex virus genome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(14): p. 4773-7.
65. Paludan, S.R., et al., *Recognition of herpesviruses by the innate immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(2): p. 143-54.
66. Roizman, B., *The structure and isomerization of herpes simplex virus genomes*. *Cell*, 1979. 16(3): p. 481-94.
67. Nii, S., C. Morgan, and H.M. Rose, *Electron Microscopy of Herpes Simplex Virus: II. Sequence of Development*. *J Virol*, 1968. 2(5): p. 517-36.
68. Fuller, A.O. and P.G. Spear, *Anti-glycoprotein D antibodies that permit adsorption but block infection by herpes simplex virus 1 prevent virion-cell fusion at the cell surface*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(15): p. 5454-8.
69. Claesson-Welsh, L. and P.G. Spear, *Oligomerization of herpes simplex virus glycoprotein B*. *J Virol*, 1986. 60(2): p. 803-6.
70. Cai, W.Z., et al., *Linker-insertion nonsense and restriction-site deletion mutations of the gB glycoprotein gene of herpes simplex virus type 1*. *J Virol*, 1987. 61(3): p. 714-21.
71. Draper, K.G., et al., *Molecular basis of the glycoprotein-C-negative phenotype of herpes simplex virus type 1 macroplaque strain*. *J Virol*, 1984. 51(3): p. 578-85.
72. Ojala, P.M., et al., *Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro*. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(13): p. 4922-31.
73. Smiley, J.R., *Herpes simplex virus virion host shutoff protein: immune evasion mediated by a viral RNase?* *J Virol*, 2004. 78(3): p. 1063-8.

74. Honess, R.W. and B. Roizman, *Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins*. J Virol, 1974. 14(1): p. 8-19.
75. Boehmer, P.E. and I.R. Lehman, *Herpes simplex virus DNA replication*. Annu Rev Biochem, 1997. 66: p. 347-84.
76. Stackpole, C.W., *Herpes-Type Virus of the Frog Renal Adenocarcinoma: I. Virus Development in Tumor Transplants Maintained at Low Temperature*. J Virol, 1969. 4(1): p. 75-93.
77. Skepper, J.N., et al., *Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway*. J Virol, 2001. 75(12): p. 5697-702.
78. Lycke, E., et al., *Uptake and transport of herpes simplex virus in neurites of rat dorsal root ganglia cells in culture*. J Gen Virol, 1984. 65 ( Pt 1): p. 55-64.
79. Stevens, J.G., *Human herpesviruses: a consideration of the latent state*. Microbiol Rev, 1989. 53(3): p. 318-32.
80. Grinde, B., *Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response*. J Oral Microbiol, 2013. 5.
81. Efstathiou, S., et al., *Detection of herpes simplex virus-specific DNA sequences in latently infected mice and in humans*. J Virol, 1986. 57(2): p. 446-55.
82. Kramer, M.F. and D.M. Coen, *Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus*. J Virol, 1995. 69(3): p. 1389-99.
83. Zwaagstra, J.C., et al., *Activity of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) promoter in neuron-derived cells: evidence for neuron specificity and for a large LAT transcript*. J Virol, 1990. 64(10): p. 5019-28.
84. Spivack, J.G., G.M. Woods, and N.W. Fraser, *Identification of a novel latency-specific splice donor signal within the herpes simplex virus type 1 2.0-kilobase latency-associated transcript (LAT): translation inhibition of LAT open reading frames by the intron within the 2.0-kilobase LAT*. J Virol, 1991. 65(12): p. 6800-10.
85. Thomas, D.L., et al., *The 2-kilobase intron of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript has a half-life of approximately 24 hours in SY5Y and COS-1 cells*. J Virol, 2002. 76(2): p. 532-40.
86. Theil, D., et al., *Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response*. Am J Pathol, 2003. 163(6): p. 2179-84.
87. Held, K., et al., *Expression of herpes simplex virus 1-encoded microRNAs in human trigeminal ganglia and their relation to local T-cell infiltrates*. J Virol, 2011. 85(19): p. 9680-5.
88. Allen, S.J., et al., *The role of LAT in increased CD8+ T cell exhaustion in trigeminal ganglia of mice latently infected with herpes simplex virus 1*. J Virol, 2011. 85(9): p. 4184-97.
89. Garber, D.A., P.A. Schaffer, and D.M. Knipe, *A LAT-associated function reduces productive-cycle gene expression during acute infection of murine sensory neurons with herpes simplex virus type 1*. J Virol, 1997. 71(8): p. 5885-93.
90. Henderson, G., et al., *Regulation of caspase 8- and caspase 9-induced apoptosis by the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript*. J Neurovirol, 2002. 8 Suppl 2: p. 103-11.
91. Himmelein, S., et al., *Latent herpes simplex virus 1 infection does not induce apoptosis in human trigeminal Ganglia*. J Virol, 2015. 89(10): p. 5747-50.
92. Perng, G.C., et al., *The latency-associated transcript gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is required for efficient in vivo spontaneous reactivation of HSV-1 from latency*. J Virol, 1994. 68(12): p. 8045-55.

93. Wang, Q.Y., et al., *Herpesviral latency-associated transcript gene promotes assembly of heterochromatin on viral lytic-gene promoters in latent infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(44): p. 16055-9.
94. Jurak, I., et al., *Numerous conserved and divergent microRNAs expressed by herpes simplex viruses 1 and 2*. J Virol, 2010. 84(9): p. 4659-72.
95. Umbach, J.L., et al., *MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs*. Nature, 2008. 454(7205): p. 780-3.
96. Flores, O., et al., *Mutational inactivation of herpes simplex virus 1 microRNAs identifies viral mRNA targets and reveals phenotypic effects in culture*. J Virol, 2013. 87(12): p. 6589-603.
97. Du, T., et al., *Disruption of HDAC/CoREST/REST repressor by dnREST reduces genome silencing and increases virulence of herpes simplex virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(36): p. 15904-9.
98. Pan, D., et al., *A neuron-specific host microRNA targets herpes simplex virus-1 ICP0 expression and promotes latency*. Cell Host Microbe, 2014. 15(4): p. 446-56.
99. Spruance, S.L., *Pathogenesis of herpes simplex labialis: experimental induction of lesions with UV light*. J Clin Microbiol, 1985. 22(3): p. 366-8.
100. Underwood, G.E. and S.D. Weed, *Recurrent Cutaneous Herpes Simplex in Hairless Mice*. Infect Immun, 1974. 10(3): p. 471-4.
101. Kubat, N.J., et al., *Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression*. J Virol, 2004. 78(3): p. 1139-49.
102. Neumann, D.M., et al., *In vivo changes in the patterns of chromatin structure associated with the latent herpes simplex virus type 1 genome in mouse trigeminal ganglia can be detected at early times after butyrate treatment*. J Virol, 2007. 81(23): p. 13248-53.
103. Cliffe, A.R., D.A. Garber, and D.M. Knipe, *Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters*. J Virol, 2009. 83(16): p. 8182-90.
104. Chen, Q., et al., *CTCF-dependent chromatin boundary element between the latency-associated transcript and ICP0 promoters in the herpes simplex virus type 1 genome*. J Virol, 2007. 81(10): p. 5192-201.
105. Ertel, M.K., et al., *CTCF Occupation of the Herpes Simplex Virus 1 Genome Is Disrupted at Early Times Postreactivation in a Transcription-Dependent Manner*. J Virol, 2012. 86(23): p. 12741-59.
106. Kim, J.Y., et al., *Transient reversal of episome silencing precedes VP16-dependent transcription during reactivation of latent HSV-1 in neurons*. PLoS Pathog, 2012. 8(2): p. e1002540.
107. Kennedy, P.G.E., et al., *A comparison of herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus latency and reactivation*. J Gen Virol, 2015. 96(Pt 7): p. 1581-602.
108. Davison, A.J., et al., *The Order Herpesvirales*. Arch Virol, 2009. 154(1): p. 171-7.
109. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. 343(1): p. 37-49.
110. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. Curr Opin Immunol, 1997. 9(1): p. 4-9.
111. Ferrandon, D., et al., *The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(11): p. 862-74.
112. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. 54 Pt 1: p. 1-13.
113. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling*. Ann N Y Acad Sci, 2008. 1143: p. 1-20.

114. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. *Immunity*, 2011. 34(5): p. 637-50.
115. Deretic, V., *Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors*. *Curr Opin Immunol*, 2012. 24(1): p. 21-31.
116. Lemaitre, B., et al., *Pillars article: the dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults*. *Cell*. 1996. 86: 973-983. *J Immunol*, 2012. 188(11): p. 5210-20.
117. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(7): p. 499-511.
118. Blasius, A.L. and B. Beutler, *Intracellular toll-like receptors*. *Immunity*, 2010. 32(3): p. 305-15.
119. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. 124(4): p. 783-801.
120. Mogensen, T.H. and S.R. Paludan, *Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors*. *J Mol Med (Berl)*, 2005. 83(3): p. 180-92.
121. Mogensen, T.H. and S.R. Paludan, *Molecular pathways in virus-induced cytokine production*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001. 65(1): p. 131-50.
122. Lester, S.N. and K. Li, *Toll-like receptors in antiviral innate immunity*. *J Mol Biol*, 2014. 426(6): p. 1246-64.
123. Hacker, H., et al., *Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6*. *Nature*, 2006. 439(7073): p. 204-7.
124. Kagan, J.C., et al., *TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta*. *Nat Immunol*, 2008. 9(4): p. 361-8.
125. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. *Int Immunol*, 2005. 17(1): p. 1-14.
126. Cao, Z., et al., *TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1*. *Nature*, 1996. 383(6599): p. 443-6.
127. Deng, L., et al., *Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain*. *Cell*, 2000. 103(2): p. 351-61.
128. Chen, Z.J., *Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway*. *Nat Cell Biol*, 2005. 7(8): p. 758-65.
129. Adhikari, A., M. Xu, and Z.J. Chen, *Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK*. *Oncogene*, 2007. 26(22): p. 3214-26.
130. Shim, J.H., et al., *TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo*. *Genes Dev*, 2005. 19(22): p. 2668-81.
131. Zarubin, T. and J. Han, *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. *Cell Res*, 2005. 15(1): p. 11-8.
132. Sato, S., et al., *Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses*. *Nat Immunol*, 2005. 6(11): p. 1087-95.
133. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. *Nature*, 2001. 410(6832): p. 1099-103.
134. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2002. 3(2): p. 196-200.
135. Carmody, R.J. and Y.H. Chen, *Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling*. *Cell Mol Immunol*, 2007. 4(1): p. 31-41.
136. Honda, K. and T. Taniguchi, *IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors*. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(9): p. 644-58.
137. Takeuchi, O., et al., *Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades*. *Int Immunol*, 2000. 12(1): p. 113-7.

138. Cusson-Hermance, N., et al., *Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation*. J Biol Chem, 2005. 280(44): p. 36560-6.
139. Oganessian, G., et al., *Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response*. Nature, 2006. 439(7073): p. 208-11.
140. Toshchakov, V., et al., *TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages*. Nat Immunol, 2002. 3(4): p. 392-8.
141. Yoneyama, M., et al., *Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300*. Embo j, 1998. 17(4): p. 1087-95.
142. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. 11(1): p. 115-22.
143. Kawai, T., et al., *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes*. J Immunol, 2001. 167(10): p. 5887-94.
144. Nishimura, M. and S. Naito, *Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes*. Biol Pharm Bull, 2005. 28(5): p. 886-92.
145. Kaul, D., et al., *Expression of Toll-like receptors in the developing brain*. PLoS One, 2012. 7(5): p. e37767.
146. Konat, G.W., T. Kielian, and I. Marriott, *The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge*. J Neurochem, 2006. 99(1): p. 1-12.
147. Downes, C.E. and P.J. Crack, *Neural injury following stroke: are Toll-like receptors the link between the immune system and the CNS?* Br J Pharmacol, 2010. 160(8): p. 1872-88.
148. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. 11(5): p. 373-84.
149. Bsibsi, M., et al., *Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. 61(11): p. 1013-21.
150. Farina, C., et al., *Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes*. J Neuroimmunol, 2005. 159(1-2): p. 12-9.
151. Jack, C.S., et al., *TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes*. J Immunol, 2005. 175(7): p. 4320-30.
152. Olson, J.K. and S.D. Miller, *Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs*. J Immunol, 2004. 173(6): p. 3916-24.
153. Redlich, S., et al., *Toll-like receptor stimulation increases phagocytosis of Cryptococcus neoformans by microglial cells*. J Neuroinflammation, 2013. 10: p. 71.
154. Bsibsi, M., et al., *Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators*. Glia, 2006. 53(7): p. 688-95.
155. Esen, N., et al., *Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium Staphylococcus aureus*. J Neurochem, 2004. 88(3): p. 746-58.
156. Bsibsi, M., et al., *Toll-like receptors 2 and 3 agonists differentially affect oligodendrocyte survival, differentiation, and myelin membrane formation*. J Neurosci Res, 2012. 90(2): p. 388-98.
157. Ma, Y., et al., *Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis*. J Cell Biol, 2006. 175(2): p. 209-15.
158. Lafon, M., et al., *The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA*. J Mol Neurosci, 2006. 29(3): p. 185-94.
159. Goethals, S., et al., *Toll-like receptor expression in the peripheral nerve*. Glia, 2010. 58(14): p. 1701-9.

160. Tang, S.C., et al., *Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(34): p. 13798-803.
161. Wadachi, R. and K.M. Hargreaves, *Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection*. J Dent Res, 2006. 85(1): p. 49-53.
162. Lima, G.K., et al., *Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection*. Am J Pathol, 2010. 177(5): p. 2433-45.
163. Ichinohe, T., *Respective roles of TLR, RIG-I and NLRP3 in influenza virus infection and immunity: impact on vaccine design*. Expert Rev Vaccines, 2010. 9(11): p. 1315-24.
164. Szretter, K.J., et al., *The innate immune adaptor molecule MyD88 restricts West Nile virus replication and spread in neurons of the central nervous system*. J Virol, 2010. 84(23): p. 12125-38.
165. Cameron, J.S., et al., *Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals*. J Neurosci, 2007. 27(47): p. 13033-41.
166. Lehmann, S.M., et al., *Extracellularly delivered single-stranded viral RNA causes neurodegeneration dependent on TLR7*. J Immunol, 2012. 189(3): p. 1448-58.
167. Crack, P.J. and P.J. Bray, *Toll-like receptors in the brain and their potential roles in neuropathology*. Immunol Cell Biol, 2007. 85(6): p. 476-80.
168. Echchannaoui, H., et al., *Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to Streptococcus pneumoniae meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation*. J Infect Dis, 2002. 186(6): p. 798-806.
169. Koedel, U., et al., *Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis*. J Immunol, 2003. 170(1): p. 438-44.
170. Hoffmann, O., et al., *TLR2 mediates neuroinflammation and neuronal damage*. J Immunol, 2007. 178(10): p. 6476-81.
171. Deng, G.M., Z.Q. Liu, and A. Tarkowski, *Intracisternally localized bacterial DNA containing CpG motifs induces meningitis*. J Immunol, 2001. 167(8): p. 4616-26.
172. Lehnardt, S., et al., *Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia*. J Neuroimmunol, 2007. 190(1-2): p. 28-33.
173. Ziegler, G., et al., *TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 359(3): p. 574-9.
174. Cao, C.X., et al., *Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 353(2): p. 509-14.
175. Wang, Y.C., S. Lin, and Q.W. Yang, *Toll-like receptors in cerebral ischemic inflammatory injury*. J Neuroinflammation, 2011. 8: p. 134.
176. Hyakkoku, K., et al., *Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knock-out mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia*. Neuroscience, 2010. 171(1): p. 258-67.
177. Yang, Q.W., et al., *HMBG1 mediates ischemia-reperfusion injury by TRIF-adaptor independent Toll-like receptor 4 signaling*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. 31(2): p. 593-605.
178. Zhang, Z., et al., *Immunolocalization of Toll-like receptors 2 and 4 as well as their endogenous ligand, heat shock protein 70, in rat traumatic brain injury*. Neuroimmunomodulation, 2012. 19(1): p. 10-9.
179. Babcock, A.A., et al., *Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury: an innate bridge to neuroinflammation*. J Neurosci, 2006. 26(49): p. 12826-37.
180. Landreth, G.E. and E.G. Reed-Geaghan, *Toll-like receptors in Alzheimer's disease*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. 336: p. 137-53.
181. Yu, X. and S. He, *The interplay between human herpes simplex virus infection and the apoptosis and necroptosis cell death pathways*. Virol J, 2016. 13: p. 77.
182. Krueger, A., et al., *FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis*. Mol Cell Biol, 2001. 21(24): p. 8247-54.

183. Schmitz, I., S. Kirchhoff, and P.H. Krammer, *Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. 32(11-12): p. 1123-36.
184. Rathore, S., et al., *Disruption of cellular homeostasis induces organelle stress and triggers apoptosis like cell-death pathways in malaria parasite*. Cell Death Dis, 2015. 6: p. e1803.
185. Slee, E.A., et al., *Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner*. J Cell Biol, 1999. 144(2): p. 281-92.
186. Peter, M.E. and P.H. Krammer, *The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond*. Cell Death Differ, 2003. 10(1): p. 26-35.
187. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. 281(5381): p. 1305-8.
188. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. 114(2): p. 181-90.
189. Wang, L., F. Du, and X. Wang, *TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways*. Cell, 2008. 133(4): p. 693-703.
190. Schulze-Osthoff, K., et al., *Apoptosis signaling by death receptors*. Eur J Biochem, 1998. 254(3): p. 439-59.
191. Tsuchiya, Y., O. Nakabayashi, and H. Nakano, *FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP*. Int J Mol Sci, 2015. 16(12): p. 30321-41.
192. Saleem, M., et al., *Inhibitors of apoptotic proteins: new targets for anticancer therapy*. Chem Biol Drug Des, 2013. 82(3): p. 243-51.
193. Wang, X., *The expanding role of mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 2001. 15(22): p. 2922-33.
194. Madesh, M. and G. Hajnoczky, *VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release*. J Cell Biol, 2001. 155(6): p. 1003-15.
195. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. 91(4): p. 479-89.
196. Carvour, M., et al., *Chronic low-dose oxidative stress induces caspase-3-dependent PKCdelta proteolytic activation and apoptosis in a cell culture model of dopaminergic neurodegeneration*. Ann N Y Acad Sci, 2008. 1139: p. 197-205.
197. Czabotar, P.E., et al., *Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. 15(1): p. 49-63.
198. 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.
199. Hirsig, R., *Statistische Methoden in den Sozialwissenschaften. Eine Einführung im Hinblick auf computergestützte Datenanalysen mit SPSS für Windows*. Vol. 5. 2007: Seismo.
200. Upton, J.W. and F.K. Chan, *Staying alive: cell death in antiviral immunity*. Mol Cell, 2014. 54(2): p. 273-80.
201. 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.
202. 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.
203. Schwerk, C. and K. Schulze-Osthoff, *Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation*. Biochem Pharmacol, 2003. 66(8): p. 1453-8.
204. Carpenter, D., et al., *The herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcript (LAT) protects cells against cold-shock-induced apoptosis by maintaining phosphorylation of protein kinase B (AKT)*. J Neurovirol, 2015. 21(5): p. 568-75.

205. Wang, F., et al., *A cyclic HSV1-TK reporter for real-time PET imaging of apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. 111(14): p. 5165-70.
206. Chowdhury, D. and J. Lieberman, *Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death*. Annu Rev Immunol, 2008. 26: p. 389-420.
207. Kayser, F.H.B., Erik Christian; Zinkernagel, Rolf M., *Medizinische Mikrobiologie*. Vol. 12. 2010: Thieme.
208. Boivin, G., Z. Coulombe, and S. Rivest, *Intranasal herpes simplex virus type 2 inoculation causes a profound thymidine kinase dependent cerebral inflammatory response in the mouse hindbrain*. Eur J Neurosci, 2002. 16(1): p. 29-43.
209. Bottcher, T., et al., *Differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in experimental murine central nervous system infections*. Neurosci Lett, 2003. 344(1): p. 17-20.
210. Mishra, B.B., P.K. Mishra, and J.M. Teale, *Expression and distribution of Toll like receptors in the brain during murine neurocysticercosis*. J Neuroimmunol, 2006. 181(1-2): p. 46-56.
211. Sorensen, L.N., et al., *TLR2 and TLR9 synergistically control herpes simplex virus infection in the brain*. J Immunol, 2008. 181(12): p. 8604-12.
212. Lima, G.K., et al., *Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR9 Expressed in Trigeminal Ganglia are Critical to Viral Control During Herpes Simplex Virus 1 Infection*. Am J Pathol, 2010. 177(5): p. 2433-45.
213. Lundberg, P., et al., *The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of central nervous system pathology resulting in fatal encephalitis*. J Virol, 2008. 82(14): p. 7078-88.
214. McKimmie, C.S., et al., *A TLR2 ligand suppresses inflammation by modulation of chemokine receptors and redirection of leukocyte migration*. Blood, 2009. 113(18): p. 4224-31.
215. Lund, J., et al., *Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2003. 198(3): p. 513-20.
216. Zolini, G.P., et al., *Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia*. J Neuroinflammation, 2014. 11: p. 20.
217. Sauter, M.M., J.J. Gauger, and C.R. Brandt, *Oligonucleotides designed to inhibit TLR9 block Herpes simplex virus type 1 infection at multiple steps*. Antiviral Res, 2014. 109: p. 83-96.
218. Furuta, Y., et al., *Latent herpes simplex virus type 1 in human vestibular ganglia*. Acta Otolaryngol Suppl, 1993. 503: p. 85-9.
219. Arbusow, V., et al., *HSV-1 not only in human vestibular ganglia but also in the vestibular labyrinth*. Audiol Neurootol, 2001. 6(5): p. 259-62.
220. Himmelein, S., et al., *Differential involvement during latent HSV-1 infection of the superior and inferior divisions of the vestibular ganglia: implications for vestibular neuritis*. J Virol, 2017.
221. 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.

## 7. Danksagung

Ein ganz besonders großer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Susanne Himmelein, die mir während der Arbeit im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand und die diese Arbeit mit viel Sorgfalt und Geduld korrigiert hat. Vielen lieben Dank dafür.

Auch möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Strupp, FANA, FEAN von der Neurologischen Klinik und Deutschen Schwindel- und Gleichgewichtszentrum am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München am Campus Großhadern für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Räume und Arbeitsgeräte bedanken.

PD Dr. med. Katharina Hüfner danke ich ganz herzlich für die Hilfestellungen bei der statistischen Auswertung.

Dank an Frau PD Dr. med. Inga Sinicina für die Bereitstellung der Ganglien.

Dr. Hartmann Harz möchte ich danken, dass er mich auf diesen Weg gebracht hat.

Vielen Dank an meine Familie, besonders meiner Mutter, für die große Unterstützung, die Motivation und den positiven Zuspruch.

Auch meinen Freunden möchte ich für die liebe Unterstützung und die vielen Mut machenden Worte ganz herzlich danken.

Dr. Anja Werner stand mir in all den Jahren während des Studiums und der Promotion als Kollegin und als Freundin zur Seite. Ihr möchte ich für die Unterstützung, das offene Ohr, die vielen Laufrunden und alles andere ganz herzlich danken.

Am Ende gilt mein ganz besonderer Dank meinem Ehemann Frank und meinen Kindern Jonas und David, die mich durch ihre Liebe und ihr Verständnis sehr unterstützt haben, mir die nötige Zeit für diese Arbeit gaben und mir der perfekte Ausgleich waren.

**Danke!**

## 8. Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Innenohrs, übernommen aus [13].....	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Makulaorgans, übernommen aus [14].....	14
Abbildung 3: Darstellung der Verschaltung der Vestibularkerne, übernommen aus [18].....	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung der ipsilateralen und kontralateralen Verbindungen, übernommen aus [19].....	16
Abbildung 5: Aufbau eines Herpes Simplex Virus Typ 1, übernommen aus [62].....	21
Abbildung 6: Visualisierung von LAT-positiven Neuronen, entnommen aus [90].....	24
Abbildung 7: Signalwege der TLRs, entnommen aus [113].....	29
Abbildung 8: Caspase-3-Expression in ganzen Ganglien.....	48
Abbildung 9: Caspase-3-Expression in einzelnen Neuronen.....	50
Abbildung 10: TLR-Expressionsniveau ganzer Ganglien.....	53
Abbildung 11: TLR-Expressionsniveau einzelner Neurone.....	55
Abbildung 12: Gelelektrophorese (2 % Agarose in TBE Puffer) mit aufgetragenen PCR-Produkten .....	59

**8.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany) .....	37
Tabelle 2: LAT TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany) .....	37
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Ganglien mit LAT-Status, Geschlecht und Alter des Verstorbenen, sowie der Zeitspanne zwischen Tod und Gewebeentnahme (PMD) .....	45
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten ganzen Ganglien mit LAT-Status und der Anzahl der Transkripte für LAT und Caspase-3 .....	47
Tabelle 5: Statistische Berechnung, die den Boxplots (Abbildung 8) zugrunde liegt .....	48
Tabelle 6: Einzel-Zell-Analyse - Aufgeführt sind der LAT-Status und die Anzahl der Transkripte für LAT und Caspase-3 .....	49
Tabelle 7: Statistische Berechnung, die den Boxplots (Abbildung 9) zugrunde liegt .....	50
Tabelle 8: Auswertung der Caspase-3 Daten unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests .	51
Tabelle 9: Verwendete Ganglien mit LAT-Status und Anzahl der Transkripte für LAT, TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 .....	52
Tabelle 10: Statistische Berechnung, die den Boxplots (Abbildung 10) zugrunde liegt .....	53
Tabelle 11: Einzel-Zell Analyse - Verwendete Ganglien und die Anzahl der Transkripte für LAT, TLR2, TLR3, TLR4 und TLR9 .....	54
Tabelle 12: Statistische Berechnung, die dem Boxplot (Abbildung 11) zugrunde liegt .....	55
Tabelle 13: Auswertung der TLR-Daten unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests .....	56
Tabelle 14: Vestibularganglien deren LAT-Status mittels RT-qPCR ermittelt wurden .....	57
Tabelle 15: Zuteilung der Spuren für das in Abbildung 12 dargestellte Gel .....	58