

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Virologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stephan Ludwig

Latenz und Reaktivierung von Herpes simplex-Virus in einem Trigeminalganglion-Organmodell

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Westing, Yannick Christian
aus Georgsmarienhütte

2018

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Kühn

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Victor Shahin

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2018

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Virologie

– Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stephan Ludwig

– Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Kühn

– Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Victor Shahin

Zusammenfassung

Latenz und Reaktivierung von Herpes simplex-Virus in einem Trigeminalganglion-

Organmodell

Westing, Yannick Christian

Ziel dieser Arbeit war eine über bisherige Ergebnisse hinausreichende Charakterisierung des Verhaltens von HSV-1 und HSV-2 in dem verwendeten Hühnertrigeminalganglionmodell im Hinblick auf Latenz und Reaktivierung. Dazu wurde methodisch in erster Linie auf Wildtyp-Infektionsversuche mit nachfolgenden Auszählungen zytozentrifugierter, fluoreszenzgefärbter Trigeminalganglienzellen zurückgegriffen.

Zunächst wurde nachvollzogen, dass HSV-1 nach einer axonalen Infektion erfolgreich in eine Latenzphase eintritt und nur wenige Einzelzellen produktive Infektionen zuließen. Im Unterschied dazu konnte für HSV-2 gezeigt werden, dass die Latenzetablierung gestört und bei Vorliegen einer produktiven Infektion die Ausbreitung von HSV-2 im Trigeminalgewebe ungleich aggressiver war.

Kern der Arbeit war es, fünf verschiedene Agenzien, für die eine infektionsfördernde bzw. reaktionstriggernde Wirkung in verschiedenen Wirt-Modellen vorbeschrieben war, hinsichtlich ihrer Wirksamkeit im *vorliegenden* Hühnertrigeminalganglionmodell zu testen. Die Substanzen Valproat und Rapamycin zeigten keine Wirkung auf HSV-1; ein vermutlich leicht positiver Effekt von DMSO auf HSV-2 war nicht signifikant.

HMBA entfaltete sowohl für HSV-1 als auch HSV-2 eine ausgeprägte und signifikante Enhancer-Wirkung, konnte aber keine HSV-1-Reaktivierung im engeren Sinne hervorrufen. Überraschend war, dass der Wirkstoff Forskolin eine floride HSV-1-Wildtyp-Infektion statistisch signifikant und relevant hemmte. Eine ähnliche Beobachtung in anderen Modellen ist nach Kenntnis des Autors bisher nicht beschrieben worden.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2018

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Latenz und Reaktivierung von Herpes simplex-Virus in einem Trigeminalganglion-Organmodell

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Institut für Medizinische Mikrobiologie - Klinische Virologie (UKM)

unter der Anleitung von:

Prof. Dr. med. Joachim Kühn

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

20.11.2018

Ort, Datum

Yannick Westing

Name/ Unterschrift

Abkürzungsverzeichnis

ABAM	<i>antibiotic-antimycotic</i>
Abb.	Abbildung
ACV	Aciclovir
AP	Alkalische Phosphatase
bw	<i>backward</i>
bzw.	beispielsweise
CMC	Carboxymethylcellulose-Natriumsalz
CMV	Cytomegalie-Virus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
<i>CRE(B)</i>	<i>cAMP response element(-binding protein)</i>
d.p.i.	<i>days post infection</i>
DABCO	Triethylendiamin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIG	Digoxigenin
Disk.	Diskussion
DK	Doppelkammer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	<i>early</i>
EB	<i>elution buffer</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
f.	folgende
FCS	Fetales Kalb-Serum
Fig.	<i>Figure</i> (Abbildung)
fw	<i>forward</i>
gD	Glykoprotein-D
h.p.i.	<i>hours post infection</i>
H ₂ O	Wasser
HCF	<i>host cell factor</i>
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylasen

HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLCR	HDAC1/LSD-1/CoREST/REST <i>repressor complex</i>
HMBA	Hexamethylen-Bisacetamid
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HSV	Herpes simplex-Virus
IC	Innenkammer (<i>inner chamber</i>)
ICP-0, ICP-1	<i>infected cell protein 0 bzw. 1</i>
IE	<i>immediate early</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFI-16	<i>interferon-γ inducible protein 16</i>
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthio- β -galactosid
IR _L	<i>intermediate long repeat</i> (HSV-Untereinheit)
IR _S	<i>intermediate short repeat</i> (HSV-Untereinheit)
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
JAK/STAT	Janus-Kinase/ <i>signal transducers and activators of transcription</i>
Kap.	Kapitel
L	<i>late</i>
l.	links
LAT	<i>latency associated transcript</i>
LBBB	LB-Broth-Base
LSD-1	Lysine-spezifische Demethylase-1
M.O.I.	<i>multiplicity of infection</i>
MEM	<i>Modified Eagle Medium</i>
MM	Master-Mix
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NGF	<i>neurotropic growth factor</i>
OC	Außenkammer (<i>outer chamber</i>)
OT	Objekträger
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PcG	<i>Polycomb Group-Protein</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PFU	<i>part forming unit</i>
PRC	PcG-Repressor-Komplex
r.	rechts
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Real Time
rt	<i>reverse transkriptase</i>
SA-Cy3	Cyber-3-gekoppeltes Streptavidin
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TG	Trigeminalganglion
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TR _L	<i>terminal long repeat</i> (HSV-Untereinheit)
TR _S	<i>terminal short repeat</i> (HSV-Untereinheit)
u.a.	unter anderem
v/v	Volumen pro Volumen
vergl.	vergleiche
VIC	VP-16-induzierter Komplex
VP-16, VP-22a	<i>virion phosphoprotein16 bzw. 22a</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1.	Klassifikation und Aufbau von Herpes simplex-Viren (HSV)	1
1.2.	Infektionen durch Herpes simplex-Viren: Epidemiologische und klinische Aspekte	1
1.2.1.	Infektionszyklus: Überblick	1
1.2.2.	Durchseuchung	2
1.2.3.	Gingivostomatitis und Herpes labialis	2
1.2.4.	Herpes genitalis	2
1.2.5.	Keratitis herpetica	3
1.2.6.	Herpes neonatorum	3
1.2.7.	Infektionen des (zentralen) Nervensystems	3
1.2.8.	Weitere Herpes-Infektionen	4
1.2.9.	Diagnostik und virostatistische Therapie	4
1.3.	Molekularbiologische Grundlagen	5
1.3.1.	Replikationszyklus	5
1.3.2.	Intrazellulärer Transport von Herpes simplex in Neuronen	6
1.3.3.	Latenz und Reaktivierung von Herpes simplex-Viren	7
1.3.3.1.	Zwei-Phasen-Modell: Merkmale von lytischer Akutinfektion und Reaktivierung	7
1.3.3.2.	Zellinterne Mechanismen zur Kontrolle der Virus-DNA-Transkription während Latenz und Reaktivierung	7
1.3.3.3.	<i>Latency Associated Transcript (LAT)</i> : Struktur und Transkripte	9
1.3.3.4.	Die Rolle von LAT im Gefüge von Latenz und Reaktivierung	10
1.3.3.5.	Beteiligung zellulärer Signalwege an der Balance zwischen Latenz und Reaktivierung	11
1.3.3.6.	Bedeutung des Immunsystems für Latenz und Reaktivierung	12
1.3.3.7.	Substanzen mit Reaktivierungspotential	13
1.4.	Zielsetzung	13
2.	<u>Material und Methoden</u>	14
2.1.	Material	14

2.1.1.	Virenstämme, Zelllinien, Hühnerembryonen	14
2.1.2.	Zell-und Organkulturmedien, Additiva	14
2.1.3.	Bakterienstämme, Kulturmedien und Additiva für Bakterien	14
2.1.4.	Monoklonale Antikörper, Antiseren, Konjugate, Fluorochrome	15
2.1.5.	Nukleinsäuren	15
2.1.6.	Enzyme und Enzympuffer	16
2.1.7.	Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.8.	Puffer und Lösungsmittel	18
2.1.9.	Reagenziensysteme	19
2.1.10.	Puffer- und Reagenzien-Ansätze für <i>in-situ</i> -Hybridisierung	19
2.1.11.	Laborbedarf	21
2.1.12.	Geräte	22
2.2.	Methoden	24
2.2.1.	Das Organmodell	24
2.2.1.1.	Allgemeiner Aufbau der Doppelkammer (DK)	24
2.2.1.2.	Herstellung und Vorbereitung der Doppelkammern	24
2.2.1.3.	Explantation der Trigeminalganglien	24
2.2.2.	Infektion der Trigeminalganglien	25
2.2.2.1.	Ansetzen des CMC-Mediums für die Infektion von Trigeminalganglien	25
2.2.2.2.	Infektion der Innenkammer	25
2.2.2.3.	Infektion der Außenkammer	26
2.2.3.	Ernte der Trigeminalganglien	26
2.2.3.1.	Entnahme und Trypsin-Kollagenase-Verdau der Trigeminalganglien	26
2.2.3.2.	Zytozentrifugation der Trigeminalganglien-Resuspension	26
2.2.4.	Immunfluoreszenzmikroskopie	27
2.2.4.1.	Immunfärbung	27
2.2.4.2.	Auszählung von Zellen	28
2.2.4.3.	Statistische Aufarbeitung der Ergebnisse	28
2.2.5.	Zellkultur	28
2.2.5.1.	Infektion von Verozellen	29
2.2.5.2.	Plaque-Assay und Kristallviolett-färbung	29
2.2.6.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.2.6.1.	GC-rich-PCR	29

2.2.6.2.	Real Time PCR (RT-PCR) und Reverse Transkriptase-PCR (rt-PCR)	30
2.2.6.2.1.	Aufreinigung der Nukleinsäuren	30
2.2.6.2.2.	Transkription von RNA in cDNA mittels Reverse Transkriptase (rt-PCR)	31
2.2.6.2.3.	Durchführung der RT-PCR	31
2.2.7.	Klonierung	32
2.2.7.1.	Topo-Klonierung: Herstellung des Plasmids pCR-Topo 2.1 –LAT_1113-2573	32
2.2.7.2.	Klonierung: Herstellung des Plasmids pCMV-TNT-LAT 1113-2573	32
2.2.7.3.	Plasmidpräparation	33
2.2.7.4.	Restriktionsverdau	33
2.2.7.5.	Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion	34
2.2.8.	<i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH)	34
2.2.8.1.	Prinzip	34
2.2.8.2.	<i>in vitro</i> -Transkription zur Herstellung einer Sonde	35
2.2.8.3.	RNA-Fällung	35
2.2.8.4.	Etablierung eines <i>in situ</i> -Hybridisierungsprotokolls für HSV-1-LAT	36
2.2.8.4.1.	Vorbehandlung des Probenmaterials	36
2.2.8.4.2.	Hybridisierung von Sonde und Zielsequenz	36
2.2.8.4.3.	Bindung eines AP-konjugierten Anti-DIG-Antikörpers an die Sonde	37
2.2.8.4.4.	Detektion des gebundenen AP-konjugierten Anti-DIG-Antikörpers	37
3.	<u>Ergebnisse</u>	38
3.1.	Infektionsversuche mit HSV-1	38
3.1.1.	Charakterisierung des Verhaltens von HSV-1 im Trigeminal-Modell mittels Immunfluoreszenzmikroskopie: Infektionsverläufe ohne chemische Agenzien	38
3.1.1.1.	Infektion der Innenkammer mit HSV-1	38
3.1.1.2.	Infektion der Außenkammer mit HSV-1	43
3.1.1.3.	Empfänglichkeit des Trigeminal-Modells für eine produktive HSV-1- Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten nach Explantation	46
3.1.1.4.	Kinetik Antigen-positiver Doppelkammern nach retrograder Infektion mit HSV-1	47

3.1.2.	Infektionsversuche mit HSV-1 unter Einfluss potentieller Stimulanzen	49
3.1.2.1.	Effekt von HMBA auf den Verlauf der HSV-1-Infektion Trigeminalganglien-Explantaten	49
3.1.2.1.1.	Effekt von HMBA auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment des Trigeminal-Modells	49
3.1.2.1.2.	Effekt von HMBA auf den Verlauf der HSV-1-Infektion nach Infektion des axonalen Kompartiments	51
3.1.2.1.2a.	Effekt von HMBA auf den Verlauf einer axonalen HSV-1-Infektion bei einer Infektionsdosis von $2,6 \times 10^7$ PFU	51
3.1.2.1.2b.	Effekt von HMBA auf den Verlauf einer axonalen HSV-1-Infektion bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU	54
3.1.2.1.2c.	Zusammenfassung: Effekt von HMBA auf eine axonale HSV-1-Infektion	56
3.1.2.1.3.	Versuch zur Reaktivierbarkeit von HSV-1 durch HMBA	59
3.1.2.2.	Effekt von Valproat auf den Verlauf der HSV-1-Infektion in Trigeminalganglien-Explantaten	61
3.1.2.2.1.	Effekt von Valproat auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment des Trigeminal-Modells	61
3.1.2.2.2.	Effekt von Valproat auf den Verlauf der HSV-1-Infektion nach Infektion des axonalen Kompartiments	61
3.1.2.2.3.	Versuch zur Reaktivierbarkeit von HSV-1 durch Valproat	62
3.1.2.2.4.	Zusammenfassung der HSV-1-Infektionsversuche unter Zusatz von Valproat	62
3.1.2.3.	Effekt von Rapamycin auf den Verlauf der HSV-1-Infektion in Trigeminalganglien-Explantaten	63
3.1.2.3.1.	Effekt von Rapamycin auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment des Trigeminal-Modells	63
3.1.2.3.2.	Effekt von Rapamycin auf den Verlauf der HSV-1-Infektion nach Infektion des axonalen Kompartiments	64
3.1.2.3.3.	Versuch zur Reaktivierbarkeit von HSV-1 durch Rapamycin	64
3.1.2.3.4.	Zusammenfassung der HSV-1-Infektionsversuche unter Zusatz von Rapamycin	65

3.1.2.4.	Effekt von Forskolin und DMSO auf den Verlauf der HSV-1-Infektion in Trigeminalganglien-Explantaten	66
3.1.2.4.1.	Effekt von Forskolin und DMSO auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment des Trigeminal-Modells	66
3.1.2.4.2.	Effekt von Forskolin und DMSO auf den Verlauf der HSV-1-Infektion nach Infektion des axonalen Kompartiments	71
3.1.2.4.3.	Versuch zur Reaktivierbarkeit von HSV-1 durch Forskolin und DMSO	71
3.1.2.4.4.	Zusammenfassung der HSV-1-Infektionsversuche unter Zusatz von Forskolin und DMSO	72
3.2.	Infektionsversuche mit HSV-2	72
3.2.1.	Charakterisierung des Verhaltens von HSV-2 im Trigeminal-Modell mittels Immunfluoreszenzmikroskopie: Infektionsverläufe ohne chemische Stimulanzen	72
3.2.1.1.	Infektion der Innenkammer mit HSV-2	72
3.2.1.2.	Infektion der Außenkammer mit HSV-2	75
3.2.2.	Effekte der potentiellen Enhancer HMBA, Forskolin und DMSO auf eine axonale Infektion mit HSV-2	76
3.2.3.	Versuch zur Reaktivierbarkeit von HSV-2 durch Entzug von Aciclovir	80
3.3.	Latenztablierung von HSV-1 und HSV-2 im Trigeminalmodell	82
3.3.1.	Etablierung eines <i>in situ</i> -Hybridisierungs-Protokolls zum Nachweis von HSV-1-LAT-Zielsequenzen im Trigeminal-Modell	82
3.3.1.1.	<i>in situ</i> -Hybridisierung in Vero-Zellen mit der Sonde HSV-1 LAT_5DIG	82
3.3.1.2.	Herstellung der ISH-Sonde 888bp-LAT-RNA-DIG für <i>in situ</i> -Hybridisierung	82
3.3.1.3.	<i>in situ</i> -Hybridisierung in HSV-1-infizierten Vero-Zellen mit der Sonde 888bp-LAT-RNA-DIG	84
3.3.1.4.	<i>in situ</i> -Hybridisierungs-Versuch zur Detektion von LAT-Zielsequenzen in retrograd HSV-1-infizierten Trigeminalganglien	85
3.3.1.5.	Detektion von LAT-Zielsequenzen nach HSV-1-Infektion der Innenkammer mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung	86
3.3.1.6.	Zusammenfassung der <i>in situ</i> -Hybridisierungs-Versuche in Vero-Zellen und im Trigeminal-Modell	86

3.3.2.	Unterschiede in der Latenzetablierung von HSV-1 und HSV-2 nach axonaler Infektion von Trigeminalganglien-Explantaten	89
3.3.2.1.	Nachweis von LAT mittels RT-PCR nach axonaler Infektion mit HSV-1 und HSV-2	89
3.3.2.2	Veränderung der Neuritenmorphologie nach retrograder Infektion mit HSV-1 und HSV-2	91
4.	<u>Diskussion</u>	94
4.1.	Latenz und Reaktivierung: Modelle	94
4.2.	Latenzetablierung von HSV-1 im Trigeminal-Modell	96
4.2.1.	<i>in situ</i> -Hybridisierung im Trigeminal-Modell	96
4.2.2.	Nachweis der Latenzetablierung von HSV-1 im Trigeminal-Modell mittels RT-PCR	98
4.3.	Charakterisierung des Verhaltens von HSV-1 im Trigeminal-Modell mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie	99
4.4.	Charakterisierung des Verhaltens von HSV-2 <i>strain</i> 333 im Trigeminal-Modell mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und RT-PCR	101
4.5.	Infektionsversuche in Trigeminalganglien-Explantaten unter Einfluss von HMBA	105
4.6.	Infektionsversuche in Trigeminalganglien-Explantaten unter Einfluss von Rapamycin	107
4.7.	Infektionsversuche in Trigeminalganglien-Explantaten unter Einfluss von Valproat	108
4.8.	Infektionsversuche in Trigeminalganglien-Explantaten unter Einfluss von Forskolin und DMSO	110
4.9.	Fazit und Ausblick	112
5.	<u>Literaturverzeichnis</u>	114
6.	<u>Curriculum vitae</u>	138
7.	<u>Danksagung</u>	139

8.

Appendix

A: Abbildungen

B: Tabellen

C: Anhang auf angefügtem Datenträger

Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Boxplots

– im Haupttext –

Abbildung H1	Prinzip und Arbeitsschritte der <i>in situ</i> -Hybridisierung	35
Abbildung H2	Typisches Ergebnis der IF-Färbung	41
Abbildung H3	Typische Darstellung einer HSV-1-Infektion der IC mit $5,5 \times 10^5$ PFU zum Zeitpunkt 24 h.p.i. in der IFT-Auswertung	42
Abbildung H4	Darstellung eines typischen Ergebnisses einer retrograden HSV-1-Infektion mit $2,6 \times 10^7$ PFU zum Zeitpunkt 46 h.p.i. in der IFT-Auswertung	45
Abbildung H5	Herstellung einer Antisense-RNA-Sonde für LAT	83f.
Abbildung H6	ISH in HSV-1-infizierten Vero-Zellen	85
Abbildung H7	Detektion von LAT-Nukleinsäuren mittels ISH nach HSV-1-Infektion der IC (1)	87f.
Abbildung H8	Detektion von LAT-Nukleinsäuren mittels ISH nach HSV-1-Infektion der IC (2)	88f.
Tabelle H1	Betrachtung verschiedener Zeitpunkte nach axonaler Infektion hinsichtlich der Anzahl an DK mit Nachweis HSV-1-Antigen-positiver Neuronen bzw. Begleitzellen	48
Tabelle H2	Axonale HSV-1-Infektion an Tag 8	92
Tabelle H3	Axonale HSV-2-Infektion an Tag 8	92
Boxplot 1	Verlauf einer Infektion der IC mit HSV-1 (1)	40
Boxplot 2	Verlauf einer Infektion der IC mit HSV-1 (2)	40
Boxplot 3	Verlauf einer HSV-1-Infektion der OC	44
Boxplot 4	Effekt von HMBA auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment (1)	50
Boxplot 5	Effekt von HMBA auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment (2)	50
Boxplot 6	Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von $2,6 \times 10^7$ PFU (1)	53
Boxplot 7	Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von $2,6 \times 10^7$ PFU (2)	54
Boxplot 8	Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU (1)	57

Boxplot 9	Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU (2)	57
Boxplot 10	Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU (3)	58
Boxplot 11	Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU (4)	58
Boxplot 12	Reproduzierbare Verminderung des Anteils HSV-1-Antigenpositiver Neurone durch Forskolin	69
Boxplot 13	Reproduzierbare Verminderung der Anzahl HSV-1-Antigenpositiver Neurone durch Forskolin	69
Boxplot 14	Reproduzierbare Verminderung der Menge HSV-1-Antigenpositiver Begleitzellen durch Forskolin	70
Boxplot 15	Verlauf einer Infektion der IC mit HSV-2 (1)	74
Boxplot 16	Verlauf einer Infektion der IC mit HSV-2 (2)	74
Boxplot 17	Effekt von HMBA, Forskolin und DMSO auf eine HSV-2-Infektion im axonalen Kompartiment (1)	79
Boxplot 18	Effekt von HMBA, Forskolin und DMSO auf eine HSV-2-Infektion im axonalen Kompartiment (2)	79

– im Anhang –

Abbildung 1	Gegenüberstellung typischer Ergebnisse in der IF-Mikroskopie nach Infektion der IC mit 5×10^4 PFU HSV-1 in den Gruppen „HMBA“ (C – D) und „Kontrolle“ (A – B)	I
Abbildung 2	Darstellung eines typischen Ergebnisses nach axonaler Infektion in der IF-Mikroskopie mit (B) und ohne (A) Zugabe von 2,5 mM HMBA bei einer Infektionsdosis von $2,6 \times 10^7$ PFU HSV-1	II
Abbildung 3	Darstellung eines typischen Ergebnisses in der IF-Mikroskopie nach axonaler Infektion mit (B) und ohne (A) Zugabe von 2,5 mM HMBA bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU HSV-1	III
Abbildung 4	Gegenüberstellung typischer Ergebnisse in der IF-Mikroskopie 48 Stunden nach Infektion der IC mit 5×10^4 PFU unter Zusatz von 100 μ M Forskolin in 1% DMSO (A – B), 1 % DMSO (C – D) sowie ohne Zusatz von Agenzien (E – F: Native Kontrolle)	IV

Abbildung 5	Darstellung des Verlaufs einer HSV-2-Infektion in der IC	V
Abbildung 6	Darstellung des Verlaufs einer produktiven HSV-2-Infektion in der OC	VI
Abbildung 7	Typische Ergebnisse in der IF-Mikroskopie nach Infektion der OC mit 5×10^6 PFU HSV-2 mit anschließender Exposition gegenüber HMBA (B), DMSO (C) und Forskolin (D) bzw. in der nativen Kontrolle (A)	VII
Abbildung 8	PCR-Produkt LAT_1113-2573	VII
Abbildung 9	Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau des Vektors pCMV-TNT-LAT_1113-2573 mit Sal 1 und Eco R1	VII
Abbildung 10	Lichtmikroskopische Aufnahmen der OC an Tag 8 nach retrograder HSV-Infektion	VIII
Abbildung C1	Repräsentative Darstellung morphologisch intakter Axone unmittelbar vor retrograder Infektion	XXI
Abbildung C2	Mock-Infektion mit Zugabe von 50 μ g/ml ACV	XXII
Abbildung C3	Axonale HSV-2-Infektion unter Zusatz von 50 μ g/ml ACV	XXII
Abbildung C4	ISH in HSV-1-infizierten Vero-Zellen	XXIII
Tabelle 1	HSV-1-Infektion der IC ohne Zusatz von Stimulantien 12 h.p.i.	IX
Tabelle 2	HSV-1-Infektion der IC ohne Zusatz von Stimulantien 24 h.p.i.	IX
Tabelle 3	HSV-1- Infektion der IC ohne Zusatz von Stimulantien 48 h.p.i.	X
Tabelle 4	HSV-1-Infektion der IC unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 48 h.p.i.	X
Tabelle 5	Kontrollgruppe: HSV-1-Infektion der IC ohne HMBA 48 h.p.i.	X
Tabelle 6	Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 24 h.p.i.	XI
Tabelle 7	Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 24 h.p.i.	XI
Tabelle 8	Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 47 h.p.i.	XI
Tabelle 9	Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 47 h.p.i.	XII
Tabelle 10	Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 4 d.p.i.	XII
Tabelle 11	Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 4 d.p.i.	XII
Tabelle 12	Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 8 d.p.i.	XIII
Tabelle 13	Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 8 d.p.i.	XIII
Tabelle 14	HSV-1-Infektion der IC unter Zugabe von 100 μ M Forskolin (in 1%-DMSO-Lösung) zum Zeitpunkt 48 h.p.i.	XIII
Tabelle 15	Kontrolle: HSV-1-Infektion der IC unter Zugabe von 1% DMSO	XIV

Tabelle 16	Native Kontrolle: HSV-1-Infektion der IC ohne Zusatz von DMSO oder Forskolin	XIV
Tabelle 17	Reproduzierbarkeit der Verminderung HSV-1-Antigen-positiver Neurone und Begleitzellen durch Forskolin (in 1%-DMSO-Lösung)	XIV
Tabelle 18	HSV-2-Infektion der IC ohne Stimulans zum Zeitpunkt 12 h.p.i.	XV
Tabelle 19	HSV-2-Infektion der IC ohne Stimulans zum Zeitpunkt 24 h.p.i.	XV
Tabelle 20	HSV-2-Infektion der IC ohne Stimulans zum Zeitpunkt 45 h.p.i.	XV
Tabelle 21	Infektion der OC mit HSV-2 zum Zeitpunkt 24 h.p.i.	XVI
Tabelle 22	Infektion der OC mit HSV-2 zum Zeitpunkt 45 h.p.i.	XVI
Tabelle 23	Infektion der OC mit HSV-2 zum Zeitpunkt 4 d.p.i.	XVII
Tabelle 24	Infektion der OC mit HSV-2 zum Zeitpunkt 8 d.p.i.	XVII
Tabelle 25	Axonale Infektion mit HSV-2 zum Zeitpunkt 48 h.p.i. unter Zugabe von 2,5 mM HMBA	XVIII
Tabelle 26	Axonale Infektion mit HSV-2 zum Zeitpunkt 48 h.p.i. unter Zugabe von 100 μ M Forskolin in 1% DMSO	XVIII
Tabelle 27	Kontrollgruppe: Axonale Infektion mit HSV-2 zum Zeitpunkt 48 h.p.i. unter Zugabe von 1% DMSO	XIX
Tabelle 28	Native Kontrolle: Axonale Infektion mit HSV-2 zum Zeitpunkt 48 h.p.i. ohne Zugabe von HMBA, Forskolin oder DMSO	XIX
Tabelle C1	Infektion der OC mit HSV-1 ohne Zusatz von Stimulantien 22 h.p.i.	XXIV
Tabelle C2	Infektion der OC mit HSV-1 ohne Zusatz von Stimulantien 46 h.p.i.	XXIV
Tabelle C3	HSV-1-Infektion der IC mit einer Dosis von 5×10^5 PFU an Tag 12/13 nach der Präparation	XXV
Tabelle C4	HSV-1-Infektion der IC mit einer Dosis von 5×10^5 PFU an Tag 19/20 nach der Präparation	XXV
Tabelle C5	Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 24 h.p.i. bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU	XXV
Tabelle C6	Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 24 h.p.i. bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU	XXVI
Tabelle C7	Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 48 h.p.i. bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU	XXVI
Tabelle C8	Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 48 h.p.i. bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU	XXVI

Tabelle C9	24 Stunden nach Zugabe von HMBA an Tag 8 nach axonaler HSV-1-Infektion	XXVII
Tabelle C10	Kontrollgruppe: 24 Stunden nach Mediumwechsel an Tag 8 nach axonaler HSV-1-Infektion ohne HMBA-Zugabe 4 Tage nach Zugabe von HMBA an Tag 8 nach axonaler HSV-1-Infektion	XXVII
Tabelle C11	4 Tage nach Zugabe von HMBA an Tag 8 nach axonaler HSV-1-Infektion	XXVII
Tabelle C12	Kontrollgruppe: 4 Tage nach Mediumwechsel an Tag 8 nach axonaler HSV-1-Infektion ohne HMBA-Zugabe	XXVIII
Tabelle C13	Infektion der IC mit HSV-1 unter Zusatz von 2,0 mM Valproat	XXVIII
Tabelle C14	Kontrollgruppe: Infektion der IC mit HSV-1 ohne Valproat	XXVIII
Tabelle C15	HSV-1-Infektion der IC unter Zugabe von 100nM Rapamycin über eine Dauer von 20 Stunden	XXIX
Tabelle C16	Kontrollgruppe: HSV-1-Infektion der IC unter Zugabe von 0,01% DMSO über eine Dauer von 20 Stunden	XXIX
Tabelle C17	Kontrollgruppe: HSV-1-Infektion der IC ohne 0,01% DMSO oder Rapamycin 48.h.p.i.	XXIX

1. Einleitung

1.1. Klassifikation und Aufbau von Herpes simplex-Viren (HSV)

HSV-1 und HSV-2 bilden zusammen mit dem Varizella-Zoster-Virus die Subfamilie humanpathogener α -Herpesviren, deren Vertreter latente Infektionen in Ganglien des peripheren Nervensystems etablieren. α -Herpesviren sind ebenso wie die zwei übrigen Subfamilien (β - und γ -Herpesviren) Teil der Familie Herpesviridae.

HSV-1 und HSV-2 überschneiden sich auf DNA-Ebene in circa 50% ihrer Sequenzen. Ihre DNA besitzt eine Größe von 152 kb bzw. 155 kb [48; 200; 203]. Mit 84 in der DNA enthaltenen Genen handelt es sich bei HSV um ein verhältnismäßig großes Virus [197].

Im Aufbau reifer HSV-Partikel lassen sich morphologisch vier Strukturen voneinander unterscheiden: Äußerlich besitzt das Virus eine mit Glykoproteinen versehene Lipidhülle zellulären Ursprungs. Darunter liegen äußere und innere Tegumentproteine, die das Kapsid bedecken. Das Kapsid ist eine ikosaedrische Struktur, die circa 100 – 110 nm misst und die Erbinformationen des Virus beherbergt [165; 166; 203]. Diese liegt – das latente Virus außer Acht gelassen – in Form von linearer doppelsträngiger DNA vor und teilt sich in vier Abschnitte: Die Regionen U_L und U_S (*long* und *short unique region*) werden jeweils von repetitiven Sequenzen – TR_L und IR_L (*terminal* und *internal long repeats* bzw. TR_S und IR_S (*terminal* und *internal short repeats*) – flankiert (vergl. Abb. H5, Kap. 3.3.1.2.). Da U_L und U_S ihre Ausrichtung zueinander verändern können, liegen vier mögliche Isomere der DNA vor [201].

1.2. Infektionen durch Herpes simplex-Viren: Epidemiologische und klinische Aspekte

1.2.1. Infektionszyklus: Überblick

Im Replikationszyklus neurotroper Herpesviren existieren zwei mögliche Infektionszustände: latente und lytische Infektion. In vivo verschafft sich das Virus über die Infektion von Epithelien Zugang zum Organismus. Vom Epithel ausgehend wird es durch retrograden axonalen Transport in neuronale Somata getragen, wo es zur Etablierung einer latenten Infektion kommt, die das virale Reservoir für Reaktivierungen darstellt. Bei der Reaktivierung werden Viruspartikel durch anterograden axonalen Transport wieder zu dem von dem betroffenen Neuron innervierten Epithel befördert. Die hier einsetzende lytische Infektion dient der Virusverbreitung.

1.2.2. Durchseuchung

Herpes simplex-Viren sind weltweit verbreitet. Die Durchseuchung mit HSV-1 beginnt im Kindesalter und nimmt – abhängig von Entwicklungsstandard und Schichtzugehörigkeit – bis ins höhere Alter auf bspw. 90% in den USA und nahezu 100% in einigen afrikanischen Ländern zu. HSV-2 wird meist sexuell übertragen, sodass der Erstkontakt oft im Jugendalter stattfindet. Ausmaß und Anstieg der Seroprävalenz sind je nach Land unterschiedlich und im Allgemeinen bei Frauen bzw. Angehörigen niedriger sozialer Schichten höher. In den USA stieg die Prävalenz in den letzten Jahrzehnten bis auf 35 - 60% bei 60-Jährigen an; in Europa ist die Seroprävalenz insgesamt niedriger, in Deutschland sind mehr als 20% der Über-60-Jährigen seropositiv [218].

1.2.3. Gingivostomatitis und Herpes labialis

Die rezurrente Infektion – bevorzugt im Bereich der Lippe (Herpes labialis) – ist die häufigste und mildeste Manifestationsform der HSV-1-Infektion. Sie äußert sich in der Entstehung schmerzhafter, virusgefüllter Bläschen, die nach einigen Tagen platzen und dann krustig abheilen. Bei Kindern (Primärinfektion) und Immunsupprimierten kann es auch zu ausgedehnten Gingivostomatiden kommen, die durch perorale oder intravenöse Applikation von Aciclovir (ACV) behandelt werden können [248]. Die banale Herpes labialis-Rekurrenz wird mit topischem ACV behandelt [255].

HSV-1-Seropositivität vermindert das Risiko, eine genitale HSV-2-Infektion zu erwerben [163].

1.2.4. Herpes genitalis

„Traditionell“ ist HSV-2 das auslösende infektiöse Agens des Genitalherpes. Es wurde jedoch ein Anstieg an durch HSV-1 verursachten Erkrankungen verzeichnet; in einigen Regionen Großbritanniens bspw. wird als Ursache des Herpes genitalis bei Frauen mittlerweile häufiger HSV-1 beobachtet [147]. In diesen Fällen sind Ausmaß und Häufigkeit der Rekurrenz geringer [145; 248]. Die Therapie besteht in der Regel in der oralen Verabreichung von ACV [180]; bei häufiger Rekurrenz besteht die Möglichkeit einer oralen ACV-Prophylaxe [248]. Mögliche Impfstoffe gegen HSV-2 werden zur Zeit in verschiedenen klinischen Phasen getestet [34; 109]. Besondere Bedeutung kommt der genitalen HSV-2-Infektion insofern zu, als sie die Wahrscheinlichkeit für die Infektion mit HIV um das Zwei- bis Vierfache erhöht [39].

1.2.5. Keratitis herpetica

Die Herpes-Keratitis kann perinatal (v.a. HSV-2) oder im Lauf des Lebens erworben werden. Bei Kindern werden im Allgemeinen schwerere Verläufe beobachtet [28; 204]. Die Primärinfektion befällt in der Regel das Epithel; Reaktivierungsepisoden führen vermehrt zu stromaler Keratitis oder Uveitis. Neben der schädigenden Wirkung des Virus selbst wird die CD4+-T-Zell-Immunantwort für die Cornea-Destruktion verantwortlich gemacht. Nachfolgende Vernarbung und Neovaskularisierung können zur Erblindung der Patienten führen [114]. Es wird vermutet, dass jährlich circa 40.000 Menschen schwere Sehbehinderungen erleiden bzw. erblinden [69]. Therapiert wird die Keratitis herpetica topisch oder systemisch mit ACV oder topisch mit dem Antimetaboliten Trifluridin. Diese Behandlung kann um eine lokale Glukokortikoid-Therapie ergänzt werden. Zur Prophylaxe bei häufigen Krankheitsepisoden kann die tägliche orale Einnahme von ACV sinnvoll sein [221; 252; 253].

1.2.6. Herpes neonatorum

Die perinatale Infektion mit HSV (v.a. HSV-2) ist ein potentiell lebensbedrohliches Krankheitsbild. Bei Primärinfektion der Mutter ist die Transmissionsrate mit circa 30% zehnmal höher als bei rekurrenter Infektion. Die Neugeboreneninfektion tritt in verschiedenen Befallsmustern auf und kann Haut, Augen und das Hirn betreffen oder sich als generalisierte Infektion mit Virämie manifestieren. Der ZNS-Befall und die Generalisation haben eine schlechte Prognose. Die Therapie besteht in gewichtsadaptierter intravenöser ACV-Gabe über drei Wochen. Bei ZNS-Beteiligung profitieren Neugeborene hinsichtlich ihres kognitiven Status von einer anschließenden sechsmonatigen oralen ACV-Behandlung [120; 142; 248].

1.2.7. Infektionen des (zentralen) Nervensystems

Die Herpes-Encephalitis jenseits des Neugeborenenalters ist unbehandelt mit einer Letalität von 70%, behandelt circa 20% bis 30%, verbunden. Nur eine Minderheit der intravenös mit ACV behandelten Patienten leidet nicht unter Folgeschäden wie bspw. einer sekundären Epilepsie. Die nekrotisierende HSV-1-Infektion befällt besonders den Temporallappen und äußert sich in Symptomen wie Fieber, fokalen epileptischen Anfällen, hemiparetischen Ausfällen, Dysphasie oder Ataxie. Die Erkrankung ist mit circa zwei Fällen pro 1 Million Personen pro Jahr selten [94]. Daneben kann HSV-1 auch Ursache für eine Radikulitis, Myelitis und Neuritis sein. Ob die Bell'sche Faszialisparese eine Folge der Demyelinisierung durch eine Herpesneuritis darstellt, ist immer noch kontrovers [115; 243].

HSV-2 kann aseptische Meningitiden verursachen, die aber überwiegend mild verlaufen [142; 248]. Die HSV-2-Meningitis ist die häufigste der neurologischen Manifestationsformen [10].

1.2.8. Weitere Herpes-Infektionen

Herpes simplex kann durch Superinfektion des atopischen Ekzems das Ekzema herpeticum verursachen, eine Hautläsion mit schwerem Krankheitsgefühl und Fieber [152].

Herpes-Ösophagitiden kommen bei Immunsupprimierten, z.B. bei AIDS-Patienten, vor [158]. Therapeutische Immunsuppression birgt zudem immer auch das Risiko für potentiell tödliche Generalisierungen einer Herpesinfektion [153].

Die Herpes-Retinitis mit der Möglichkeit einer akuten Retina-Nekrose tritt dagegen auch bei immunkompetenten Patienten auf und kann den (partiellen) Verlust des Augenlichts bedeuten. Zu den Behandlungsmöglichkeiten gehört zusätzlich zur intravenösen ACV-Basistherapie die intravitreale Applikation oder eine Interferon-Therapie [235].

1.2.9. Diagnostik und virostatistische Therapie

Die Diagnose herpetischer ZNS-Infektionen wird durch den direkten Erregernachweis durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit cerebrospinalen Liquor des Patienten gesichert. Bei Mukosa- und Epithelinfektionen kann nach einem Abstrich eine PCR, ein Antigennachweis durch Immunfluoreszenz-(IF)-Mikroskopie oder die Virusisolation aus Zellkultur erfolgen. Letztere Methode erlaubt die Typisierung des Virus durch gG-1 beziehungsweise gG-2-Antikörper [10; 142; 156; 248].

Serologische Verfahren sind v.a. von epidemiologischen Nutzen. In der Diagnostik weist nur die Serokonversion von IgM zu IgG auf eine Primärinfektion hin, da neben dem Durchseuchungsmarker IgG gegen HSV gerichtete IgM-Antikörper auch bei Rekurrenz nachgewiesen werden können. Bei stattgehabten ZNS-Manifestationen, deren Symptomatik bereits über zehn Tage andauert, kann der Antikörpernachweis (Liquor-Serum-Relation) hilfreich sein. Er erlaubt bei definitiver Diagnose zudem eine Einschätzung des Immunstatus [142; 156].

Therapeutikum der ersten Wahl ist ACV. Dabei handelt es sich um ein synthetisches Purin, das nach seiner Aktivierung durch die virale Thymidinkinase als Nukleotid in die virale DNA eingebaut wird. Dies ruft den Kettenabbruch hervor [132; 244]. Die ACV-Therapie ist gut verträglich. Zu den Nebenwirkungen bei hoher Dosierung oder zu schneller intravenöser

Applikation gehören Nephropathien und zentralneurologische Symptome wie Somnolenz [84; 97]. Resistenzen kommen meist durch Thymidinkinase- oder DNA-Polymerase-Mutationen zustande. Die Resistenzbestimmung kann phänotypisch im Plaque-Assay oder genotypisch durch den Nachweis der verantwortlichen Mutation erfolgen [42; 102; 209]. Ausweichtherapeutika bei nachgewiesener ACV-Resistenz sind bspw. Foscarnet oder Ganciclovir [49; 221].

1.3. Molekularbiologische Grundlagen

1.3.1. Replikationszyklus

Der Replikationszyklus beginnt mit dem Eindringen von HSV in die (epitheliale) Wirtszelle. Wie viele andere Viren – z.B. HPV oder HIV [77; 237] – heftet sich HSV initial an Heparansulfatketten der Glykokalix an [234]. Der Kontakt und die anschließende Fusion mit der Membran der Wirtszelle wird durch virale Glykoproteine vermittelt [8]. Im Zytosol wird HSV als Kapsid aktiv zum Nukleus transportiert. Dort wird die virale DNA in einem Uncoating genannten Prozess durch nukläre Poren in den Zellkern transloziert, wo die Replikation der Virus-DNA erfolgt [144]. Das anschließende Assembly der Virionen verläuft mehrstufig und lässt sich in die Schritte Nukleokapsid-Bildung, primäres Envelopment und nukleärer Egress, Tegumentation, sekundäres Envelopment und schließlich die Ausschleusung reifer Virionen aus der Wirtszelle unterteilen:

Die intranukleäre Formierung des Kapsids ist ein autokatalytischer Prozess, in dessen Verlauf sich Kapsidproteine um ein Gerüst aus Scaffold-Protein (VP22a) arrangieren. Initiiert wird die Kapsidbildung durch den sogenannten Portal-Komplex. Durch ihn erfolgt im Prozess der Kapsidreifung auch das Befüllen des Kapsids mit konkatemerer DNA (*encapsidation*) [7; 167].

Aktinfilamente, deren Synthese durch die Infektion angeregt wird, dienen dem Nukleokapsid zum Transport zur Kernmembran [70]. Der Übertritt in das Zytosol beginnt mit dem sogenannten *Budding* (engl. „das Knospen“) des Viruspartikels an der inneren Membran: Ein Ansatz, das *luminal pathway*-Modell, geht von einer sekretorischen Ausschleusung aus dem perinukleären Spalt aus [141]. Im *envelopment-deenvelopment*-Modell dagegen tritt das unreife Virion durch primäres Envelopment an der inneren Kernmembran in den perinukleären Spalt ein und verliert seine Hülle beim Durchtritt durch die äußere Kernmembran wieder [167]. (Daneben wird auch noch eine dritte Möglichkeit, der Austritt über ein *leaking* an nukleären Poren, beschrieben [250].)

Der nachfolgender Schritt – die Tegumentation – ist wenig verstanden. Zahlreiche Proteine sind beteiligt, sodass das Vorhandensein funktionell redundanter Elemente angenommen wird [165 - 167]. Exemplarisch hervorgehoben werden kann das Protein pUL36, das eine entscheidende Aufgabe übernimmt, indem es als Teil der inneren Tegumenthülle vermutlich für die Rekrutierung weiterer Tegumentproteine sowie für die Verbindung zwischen äußerem und innerem Tegument verantwortlich ist [167].

Auf die Tegument-Bildung folgt das sekundäre Envelopment, bei dem das Virus seine definitive Lipidhülle erhält. Diese Hülle stammt wahrscheinlich aus den Vesikeln des Trans-Golgi-Netzwerkes [229]. Während des Envelopments werden weitere funktionell bedeutsame Glykoproteine in die Lipidhülle integriert. Durch die Fusion von Vesikel- und Zellmembran wird das behüllte Viruspartikel schließlich aus der Zelle ausgeschleust. [167]. In Neuronen spielt darüber hinaus der axonale Transport eine besondere Rolle.

1.3.2. Intrazellulärer Transport von Herpes simplex in Neuronen

Der komplexe Replikationszyklus der α -Herpesvirinae-Subfamilie wird erst durch Strategien zur Nutzung der zelleigenen Transportsysteme ermöglicht. Zellulärer und insbesondere axonaler Transport von Herpesviren bzw. viralen Bestandteilen erfolgen durch Anheftung an die Motoproteine der Mikrotubuli [183]:

Nach der Fusion von HSV mit der Axonmembran verliert das Virus den Großteils seiner Tegumentproteine [1]. Durch Interaktion mit dem Motoprotein Dynein und dessen Kofaktor Dynaktin wird das Virus retrograd in Richtung Nukleus transportiert [59]. Im Falle des anterograden Transports bindet das Virus wahrscheinlich an das Motoprotein Kinesin [184]. Es ist allerdings bisher noch nicht abschließend geklärt, an welchem Ort das sekundäre Envelopment von Herpesviren in neuronalen Zellen stattfindet: Dem *married*-Modell zufolge erhält das Virus seine Lipidhülle bereits im Zytoplasma, sodass es als reifes Viruspartikel in Transportvesikeln durch das Axon transportiert wird [52]. Im *subassembly*-Modell hingegen werden tegumentumhülltes Nukleokapsid und Envelope getrennt voneinander transportiert und die Viruszusammensetzung wird in der Peripherie in Varikositäten und *growth cones*, axonalen Ausstülpungen, abgeschlossen [206].

Der Transport von Herpesviren zum Soma bzw. in die Peripherie ist bidirektional. Beim Transport des Virus zum Soma überwiegt die Effizienz des retrograden Systems, während beim Transport in die Peripherie die anterograde Lokomotion (bei gleichbleibender retrograder

Geschwindigkeit) gesteigert ist [216; 217]. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür sieht vor, dass abhängig von der Tegumentzusammensetzung verschiedene Kinesine besetzt werden: Unstrittig ist, dass die inneren Tegumentproteine pUL36 und pUL37 mit effizienterem retrograden Axontransport assoziiert sind. Welche Strukturen den anterograden Transport genau steuern – in Frage kommen bspw. pUL47, pUL48 und pUL49 aus dem äußeren Tegumentbesatz – ist Gegenstand der aktuellen Diskussion [58; 125].

1.3.3. Latenz und Reaktivierung von Herpes simplex-Viren

1.3.3.1. Zwei-Phasen-Modell: Merkmale von lytischer Akutinfektion und Reaktivierung

Das Genom von HSV wird anhand der Transkriptionsdynamik während der lytischen Infektion (in nicht-neuronalen Zellen) in verschiedene Klassen eingeteilt: Man unterscheidet *immediate-early*-Gene (IE), deren Transkription per definitionem auch in Anwesenheit von Inhibitoren der Proteinbiosynthese erfolgt, das heißt nicht auf die vorhergehende Synthese viraler Proteine angewiesen ist, von *early*- (E) und *late*-Genen (L), deren Transkription vom Vorhandensein der jeweils vorangehenden Proteinklassen abhängig ist. L-Gene lassen sich weiterhin durch die Abhängigkeit ihres Ansprechens auf virale DNA-Synthese-Inhibitoren in *leaky-late* und *true-late* einteilen [95; 96].

Die Dynamik des Reaktivierungsprozesses unterscheidet sich deutlich von der klassischen Einteilung. Die Reaktivierung ist insgesamt prolongiert und lässt sich in zwei Phasen einteilen: In Phase 1 treten alle Proteinklassen gleichzeitig und zudem unabhängig von Virus-DNA-Synthese auf. Infektiöse Partikel sind nicht nachweisbar. Nach 25 Stunden kommt es zu einer einschneidenden Verringerung der Transkriptmengen. Darauf folgt Phase 2, die in ihrer Beschaffenheit der lytischen Infektion ähnelt: Die Produktion von *true-late*-Genen ist abhängig von der Virus-DNA-Synthese und es treten infektiöse Viren auf. Darüber hinaus setzt in Phase 2 die Transaktivierungsfunktion von VP-16 die IE-Transkriptionskaskade in Gang [32; 86; 118] (vergl. Kap. 1.3.3.2.).

1.3.3.2. Zellinterne Mechanismen zur Kontrolle der Virus-DNA-Transkription während Latenz und Reaktivierung

Die Transkription der HSV-DNA wird auf (mindestens) zwei ineinandergreifenden Ebenen kontrolliert. Einerseits werden die IE-Promotoren durch das Fehlen viraler und zellulärer Transkriptionsregulatoren im Kern inaktiviert, andererseits spielen epigenetische Faktoren und

das Verpacken der Virus-DNA eine wichtige Rolle. Aus der großen Menge an Mechanismen werden hier nur einige Aspekte herausgegriffen:

Nach dem Transport des Kapsids an die Kernporen und der Einschleusung der viralen DNA in den Zellkern liegt diese DNA in zirkularisierter Form außerhalb der Chromosome episomal vor [162]. Die latenten HSV-Episome werden in Form von Nukleosomen organisiert [54]; im lytischen Infektionsmodus werden die Nukleosomen restrukturiert [116]. Die funktionelle Bedeutung der DNA-Organisation in Nukleosomen lässt sich exemplarisch daran ablesen, dass H3-Histone unter Regulation des multifunktionalen IE-Proteins ICP-0 (während der lytischen Infektion) gezielt mit Acetylgruppen angereichert und von HSV-Promotoren entfernt werden [31; 138]. Typische Euchromatin-Marker, die während der lytischen Infektion gefunden werden sind z.B. H3K9-/H3K14-Acetylierung oder H3K4-Methylierung [116; 99]. Nukleosomal organisierte HSV-Genome hingegen, die im Zellkern eine latente Infektion unterhalten, weisen ein geringeres Acetylierungsmuster auf und sind in Regionen einiger lytischer Gene mit Heterochromatin-Markern wie H3K9- oder H3K27-Methylierungen versehen [30; 128; 254]. Die Methylierung von H3K27 bspw. ist ein Hinweis auf die Beteiligung sogenannter *Polycomb-group*-Proteine (PcG). PcG sind epigenetische Repressoren, die zusammen mit weiteren Proteinen PcG-Repressor-Komplexe (PRC) bilden und auch in inaktivem HSV-Chromatin gefunden werden [134]. Die Rekrutierung von PRC-1 unter Beteiligung der von PRC-2 gesetzten H3K27me-Markierung führt letztlich zur Kompaktierung des umliegenden Chromatin und letztlich zu der Blockierung der von HSV genutzten RNA-Polymerase II [209; 133; 135; 254].

Die Frage, warum es gerade in Neuronen zur Etablierung einer latenten Infektion kommt, wird wenigstens partiell durch die Beobachtung beantwortet, dass HSV nach dem Eintritt in das Axon und dem nachfolgenden Disassembly eines großen Teils des Tegumentmantels die Transaktivierungsfunktion des Tegumentproteins VP-16 fehlt. VP-16 ist also ein Faktor, der die Entscheidung für oder gegen die lytische Infektion (mit-)bestimmt. [86; 87; 118; 233].

Während Phase 1 der Reaktivierung befindet sich VP-16 ausschließlich im Zytoplasma. Mit dem Beginn der zweiten Phase wird VP-16 in den Kern transportiert [119], wo es als *VP-16 induced complex* (VIC) zusammen mit den zellulären Faktoren Oct-1 und HCF-1 über die TAATGARAT-Sequenz an IE-Promotoren bindet. HCF (*host cell factor*), normalerweise an der Regulation der Zellproliferation beteiligt, wird nicht nur für den Transport von VP-16 in den Kern benötigt, sondern auch für die folgende Transaktivierung der IE-Gene [257]. Die Beobachtungen, dass HCF in Neuronen im Gegensatz zu proliferierenden Zelltypen normalerweise v.a. extranukleär

vorkommt [127] und es zudem zwei HCF-Inhibitoren (Luman und Zhangfei) gibt [150; 151], stützen die Hypothese, dass die Konzentration von nukleärem HCF einen regulierenden Faktor im Regelkreis von Latenz und Reaktivierung repräsentiert. Der Transkriptionsfaktor Oct-1 vermittelt die Bindung von VP-16 an die Promotor-Sequenz [257]. Die Bindung des VIC an den Promotor setzt eine Kaskade in Gang [263]: Lytische HSV-Gene aller Klassen sind im latenten Infektionsmodus durch HLCR besetzt, einen Komplex u.a. aus HDAC (Histon-Deacetylase), LSD-1 (Lysin-spezifische Demethylase) sowie dem CoREST/REST-Repressor-Komplex. Histon-Deacetylierungen durch HDAC haben eine hemmende Wirkung auf die Transkription [116; 131]; auf diese Weise ist der CoREST/REST-Komplex in nicht-neuronalen Zellen normalerweise für das Silencing neuronaler Gene zuständig [79]. Die Wirkung von Histon-Demethylierungen ist prinzipiell kontextabhängig, häufig aber Merkmal von Heterochromatin [14; 88]. Abhängig davon, welche Domäne aktiviert ist, kann LSD-1 entweder durch H3K4-Demethylierung reprimierend oder aber durch H3K9-Demethylierung aktivierend wirken. Die Aktivierung von LSD-1 durch den VIC führt hier über die Umstrukturierung des umgebenden Chromatins zum Ablesen der IE-Gene, unter denen sich auch ICP-0 befindet [202]. Obwohl der HLCR-Komplex also einerseits die Unterhaltung der Latenzphase unterstützt, ist andererseits die Expression von IE-Proteinen ohne dessen Aktivator-Funktion beschränkt [263; 143]. Auf E- und L-Genen interagiert ICP-0 im weiteren Verlauf mit CoREST, was dort zum Verlust von HDAC und der Destabilisierung des HLCR-Komplex führt. Daraufhin kann dieser seine Repressorfunktion nicht mehr ausführen und E- und L-Gene können transkribiert werden [82; 202].

Da einerseits die IE-Genexpression in der ersten Phase der Reaktivierung VP-16-unabhängig abläuft und bestimmte VP-16-Mutanten andererseits in der Lage sind nach Latenzetablierung effektiv zu reaktivieren, wird angenommen, dass es weitere Mechanismen gibt, die die Produktion lytischer Proteine einleiten (können) [61; 226]. Ein Teil der Antwort liefert eventuell die Beobachtung, dass HCF-1 und Oct-1 auch einer VP-16-unabhängigen Steuerung unterliegen und ihre Funktionalität ohne VP-16 nicht vollständig verlieren. Das Steuerelement Oct-1 bindet TAATGARAT-Sequenzen in geringem Umfang bspw. auch in Abwesenheit von VP-16. Die Oct-1-Konzentration wiederum steigt z.B. in Reaktion auf den Stressreiz UV-Licht [257].

1.3.3.3. Latency Associated Transcript (LAT): Struktur und Transkripte

Das *Latency Associated Transcript*-Gen ist im Genom von HSV zweifach vertreten. Die Kopien befinden sich im TR_L- und IR_L-Segment. Es gibt drei bekannte Transkripte: Beim Spleißen der RNA entsteht aus dem primären 8.3 kb-LAT das zirkularisierte 2.0 kb-LAT-Intron, aus dem das

ebenfalls zirkuläre 1.5 kb-LAT-Intron hervorgeht [55; 223; 256]. Während das 8.3 kb-LAT nur in geringem Umfang nachweisbar ist, kommen die Introns in großer Menge vor. Ungewöhnlich ist, dass die Introns äußerst stabil sind und Halbwertszeiten im Bereich von Stunden besitzen [18; 231]. Die Introns werden daher auch als *major* LATs bezeichnet. Das LAT-Exon ist hingegen instabil und verbleibt größtenteils im Kern [110]. Obwohl LAT allgemein als nicht-codierende RNA betrachtet wird, ist die Existenz von *open reading frames (ORFs)* und die Assoziation von LAT zu Ribosomen nachgewiesen worden [6; 169; 254]. Neben den großen Transkripten entsteht auch ein Ensemble kleiner RNAs. Bisher wurden mehr als sechs miRNAs und zwei sRNA-Transkripte identifiziert [189]. Die sRNA liegen innerhalb des 1.5 kb-LAT-Bereichs [186], die miRNA befinden sich außerhalb des 2.0 kb-Introns [238]. Zwei von ihnen werden im Bereich des LAT-Promotors gefunden [189].

1.3.3.4. Die Rolle von LAT im Gefüge von Latenz und Reaktivierung

LAT ist das einzige während der Latenz in großem Umfang abgelesene Transkript [227]. Im Gegensatz zu anderen Genen ist das LAT-Gen in dieser Phase mit Euchromatin assoziiert [128]. Die meisten Studien kommen zu dem Schluss, dass LAT zwar eine unterstützende Rolle bei Latenzetablierung und -erhalt zukommt, sein Vorhandensein dafür aber keine notwendige Bedingung ist [126; 176; 189]:

Im Maus-Infektions-Modell führt eine LAT-minus-Mutation initial zur Verminderung der Anzahl latent infizierter Neurone im murinen Trigeminalganglion, ohne dass sich die durchschnittlichen Genomspiegel pro Zelle im Vergleich zur Wildtyp-Infektion verändern. Demgegenüber steht die Beobachtung, dass der Verlust infizierter Neurone in der Phase der Latenzerhaltung ohne die Produktion von LAT (bei gleichen Reaktivierungsraten wie beim Wildtyp) erhöht ist. Nicoll et al. vertreten daher die Hypothese, dass LAT den Wirt während der anfänglichen lytischen Infektion (durch die Begrenzung der infizierten Neuronanzahl) vor den potentiell schädlichen Konsequenzen eines zu großen Virusreservoirs schützt und anschließend als latenzhaltender Faktor fungiert [176 - 178, Diskussion]. Eine Möglichkeit dafür, wie LAT zur Latenzunterhaltung beitragen kann, wird durch die Inhibitor-Funktion verschiedener miRNAs repräsentiert: miR-H6 und miR-H2 bspw. reduzieren die Menge an ICP-4 respektive ICP-0 [106; 239] und dadurch möglicherweise auch Zellstress, der in der Latenzphase durch Spuren lytischer Transkripte entstehen kann [124]. Obwohl über die Funktion der kleinen RNAs insgesamt noch wenig bekannt ist, unterstützen einzelne miRNAs offenbar auch die Zellproliferation [262].

Eine zentrale Funktion von LAT besteht darin, die Apoptose-Mechanismen der Wirtszelle auszuhebeln: LAT unterdrückt vermutlich über die innerhalb des 1.5kb-LAT gelegenen sRNA-Transkripte [213] die Funktionen von Kaspase-8, -9 und -3 [62; 90; 108]. Da die Apoptose der Host-Zelle zu den Reaktivierungstriggern zählt, kann man argumentieren, dass auch dies indirekt zur Latenzerhaltung beiträgt. Die sRNA können außerdem das Ausmaß der lytischen Infektion begrenzen [213].

Die Vielschichtigkeit der Rolle von LAT spiegelt sich auch darin wider, dass das 1.5kb-LAT-Transkript einen für den Reaktivierungsprozess bedeutsamen Faktor darstellt [187]. Zwar kann Reaktivierung prinzipiell auch ohne LAT stattfinden [177], jedoch ist der Reaktivierungsprozess bestimmter Mutanten im Kaninchen-Modell gestört [108; 188]. Die mögliche Bedeutung von LAT als kritischem Faktor während Latenzetablierung und Reaktivierung wird insgesamt aber dadurch etwas relativiert, dass nicht alle latent infizierten Neurone LAT transkribieren [161]. Hinzu kommt, dass die Anzahl LAT-exprimierender Neurone dynamisch ist und innerhalb von Wochen um das Achtfache ansteigen kann [220] (vergl. Kap. 4.2.2.; Kap. 4.4.)

1.3.3.5. Beteiligung zellulärer Signalwege an der Balance zwischen Latenz und Reaktivierung

Die Reaktivierung von HSV kann durch eine Vielzahl externer Einflüsse ausgelöst werden. Wie der Reaktivierungsprozess im Detail an diese Stimuli gekoppelt ist, ist weniger gut bekannt. Am besten belegt ist die herausragende Bedeutung der NGF-Signalkaskade, die hier grob vereinfacht dargestellt wird:

Der Wachstumsfaktor NGF (*Neurotropic Growth Factor*) ist in vielen Neuron-Subtypen notwendig für den Latenzerhalt von HSV im Ganglion in vivo und in vitro [21; 91; 259]. Die Bindung von NGF an den Tyrosin-Kinase-Rezeptor TrkA führt über die dauerhafte Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) zur Produktion des Second Messengers PIP₃, der wiederum die Proteinkinase-B (Akt) stimuliert. Akt kann dann das kleine G-Protein Rheb, einen Aktivator der Serin-Threonin-Kinase mTOR, enthemmen. Blockiert wird Rheb durch TSC-1 und -2, deren Aktivität abhängig von der Balance zwischen Adenosin-Triphosphat (ATP) und Adenosin-Monophosphat (AMP), also dem Energiestatus der Zelle, reguliert wird. Der Faktor mTOR integriert so Informationen aus anabolen und katabolen Signalwegen und verknüpft sie mit der Steuerung essentieller Zellfunktionen wie der Proteinbiosynthese und der Kontrolle von Zellcyclus und -überleben. So setzt der Raptor-mTOR-Komplex (mTORC1) z.B. den Translationsfaktor eIF-4E frei und enthemmt das Translationsprotein Protein-S6 [47]. Die Unterbrechung dieser Signalkaskade begünstigt die Überwindung der Latenzphase. Neben

dem Entzug von NGF stellen auch PI3-K-Inhibitoren und mTORC1-Inhibitoren wie Rapamycin Reaktivierungsstimuli dar; gleiches gilt für Translationshemmer und Hypoxie [21; 122].

Konsequenterweise wird auch die Apoptose der Wirtszelle als maximaler Ausdruck von Zell-Stress mit einer Virus-Reaktivierung beantwortet [60]. Die Induktion apoptotischer Signale wie z.B. der Aktivierung von MAP-Kinasen oder der mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom-c in der Peripherie bietet eine Möglichkeit zur Erklärung bekannter Reaktivierungsstimuli wie UV-Licht und Axotomie [130; 194; 208].

1.3.3.6. Bedeutung des Immunsystems für Latenz und Reaktivierung

Die Interaktionen von Virus und Immunsystem sind sehr komplex, sodass hier nur zwei zentrale Gesichtspunkte herausgegriffen werden:

Das Eindringen von HSV wird von Ziel- bzw. Immunzellen anhand von PAMPs (Pathogen-assoziierte molekulare Muster) erkannt. Glykoprotein gD wird auf Lymphozyten z.B. von Toll-Like-Rezeptor-2 gebunden [119]; im Zytoplasma sind Faktoren wie bspw. IFI-16 (*interferon- γ inducible protein 16*) an der PAMP-Identifikation beteiligt [37]. PAMP-Erkennungsprozesse stimulieren den NF κ B-Weg sowie Interferon- und Zytokin-Produktion. Die vielfältigen antiviralen Effekte von Interferonen werden einerseits durch den PI3-K-Signalweg [193] andererseits durch JAK/STAT-Signalwege vermittelt [175; 185]. Zu den Interferon-vermittelten Effekten gehören bspw. die Zerstörung viraler RNA durch RNase-L [22; 175]. Interferone stimulieren auch die Bildung von MHC-(*major histocompatibility complex*)-Molekülen und fördern so die Antigenpräsentation [72]. Gleichzeitig werden – u.a. IFI-16-vermittelt – die virale Genexpression herabreguliert [181], der Zellcyclus arretiert [258] und die Differenzierung lymphatischer Zellen gefördert [260]. Unter experimentellen Bedingungen sind Interferon- α und - γ in der Lage, das Gleichgewicht in HSV-infizierten Trigemininalganglien in Richtung Latenz zu verschieben [22; 50].

T-Zellen kommunizieren in infizierten Ganglien über chemische Synapsen mit Nervenzellen [228; 254]. Während sich die Virusabwehr durch aktivierte CD8⁺-T-Zellen in der Peripherie auf Apoptose-Induktion durch die Sekretion von Perforinen, Granzymen und TNF α sowie mittels CD95-Rezeptor verlässt [65; 164; 171], zeichnet sie sich im Ganglion gerade durch den Verzicht darauf aus. Stattdessen zwingt die Präsenz von T-Zellen im Ganglion HSV dazu, im latenten Infektionsmodus zu verweilen [121]: So unterhalten T-Zellen z.B. Interferon- γ -abhängige Signalwege, die die Reaktivierung beeinträchtigen, was u.a. durch die Suppression der ICP-0-

Expression erreicht wird [51; 117]. Daher macht ein Modell für psychisch oder hormonell ausgelöste Reaktivierungsprozesse die durch Kortisol bzw. Progesteron bedingte Verminderung von T-Zellen und Interferon-Signalling verantwortlich für die Latenzüberwindung [41; 62; 92].

1.3.3.7. Substanzen mit Reaktivierungspotential

Einigen pharmakologischen Substanzen wohnt die Eigenschaft inne, die Reaktivierung latenter HSV-Infektionen in Zellkultur und zum Teil im Tiermodell zu provozieren. Neben den oben genannten PI-3-Kinase-Inhibitoren gehören darüber hinaus bspw. auch Glukokortikoide wie Dexamethason oder Katecholamine wie Epinephrin [157], HDAC-Hemmer wie Natriumbutyrat [174] und Trichostatin A [129] sowie das Neuropeptid PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) [44] zu den reaktivierungsfördernden Substanzen. Die Wirkprofile der in dieser Arbeit verwendeten Agenzien Hexamethylen-Bisacetamid (HMBA), Rapamycin, Valproat, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Forskolin werden in der Diskussion aufgegriffen.

1.4. Zielsetzung

Es existiert eine große Modellvielfalt zur Untersuchung von Herpesviren. Anhand verschiedener Modelle können Fragestellungen auf unterschiedlichen Auflösungsebenen beziehungsweise zu verschiedenen Phasen des Infektionszyklus adressiert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, ein etabliertes aber in bisherigen Publikationen seltener verwendetes Infektionsmodell eingehender zu beschreiben:

Es sollte 1.) herausgefunden werden, ob die *Humanen Herpes simplex*-Typen 1 und 2 gleichermaßen zur Latenzetablierung in explantierten Hühnertrigeminalganglien der Lage sind.

2.) sollte überprüft werden, wie das Virus in verschiedenen Infektionsmodi auf die Exposition gegenüber bekannten chemischen Stimulanzen reagiert. Dabei war insbesondere von Interesse, ob latente HSV-1-Viren gezielt aus dem Latenzzustand reaktiviert werden können. Dazu wurden Versuche mit fünf verschiedenen Wirkstoffen durchgeführt, die direkt oder indirekt über verwandte Stoffe auch Relevanz im klinischen Alltag besitzen; dies waren Hexamethylen Bisacetamid (HMBA), das Immunsuppressivum Rapamycin (Sirolimus), das Antikonvulsivum Valproat, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Forskolin.

Im Rahmen dieser Fragestellung sollte darüber hinaus ein Protokoll zur *in situ*-Hybridisierung (ISH) von *Herpes-simplex*-LAT-Zielsequenzen entwickelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Virusstämme, Zelllinien, Hühnerembryonen

HSV-1 *strain* 17syn⁺

HSV-2 *strain* 333

Verozellen (Affennierenzellen)

Befruchtete Hühnereier

Brinkschulte Geflügelzucht, Senden

2.1.2. Zell- und Organkulturmedien, Additiva

MEM

Biochrom, Berlin

MEM w D-Valine

Biochrom, Berlin

MEM 2x (+ L-Glutamine)

Thermo Scientific, Braunschweig

L-Glutamin 200 mM

Sigma-Aldrich, München

Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, 100x)

Merck, Darmstadt

D-(+)-Glukose-Lsg. (10%)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Penicillin G (10.000 U/ml)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Streptomycin (10.000 µg/ml)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Antibiotic-Antimycotic (ABAM, 100x)

Thermo Scientific, Braunschweig

NGF 7S

Invitrogen, Karlsruhe

Carboxymethylcellulose-Natriumsalz (CMC)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Humanserum

Harlan Sera-lab, Leicestershire (UK)

Fetales Kalb-Serum (FCS)

Biochrom, Berlin

N,N'-Hexamethylen-Bisacetamid (HMBA)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Forskolin

Sigma-Aldrich, Steinheim

Valproinsäure-Natriumsalz (Valproat)

Cayman Chemical, Ann Arbor (USA)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Merck, Darmstadt

Rapamycin

Sigma-Aldrich, Seelze

Aciclovir (ACV)

Ratiopharm, Ulm

Milchpulver

Carl Roth, Karlsruhe

2.1.3. Bakterienstämme, Kulturmedien und Additiva für Bakterien

One Shot Top 10 Chemically Competent *E.coli*

Invitrogen, Karlsruhe

(Teil des TA Cloning Kits)

Subcloning Efficiency DH5 α Competent Cells (<i>E.coli</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Broth-Base (LBBB)	Invitrogen, Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropylthio- β -galactosid (IPTG)	Boehringer, Ingelheim
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe

LB-Agarplatten mit Ampicillin (und IPTG / X-Gal) enthielten 3,2% LB-Agar, 50 μ g/ml Ampicillin, (sowie gegebenenfalls 0,5% 1M IPTG-Lösung und 0,01% X-Gal). LB-Medium enthielt 2% LBBB.

2.1.4. Monoklonale Antikörper, Antiseren, Konjugate, Fluorochrome

Monoklonaler Maus-Anti-Neurofilament-Antikörper (200 kD)	Merck, Darmstadt
Kaninchen-Anti-HSV-1-Serum (DAKO-1-Serum)	DakoCytomation Denmark, Glostrup (Dänemark)
Kaninchen-Anti-HSV-2-Serum (DAKO-2-Serum)	DakoCytomation Denmark, Glostrup (Dänemark)
Monoklonales Ziege-Anti-Maus-IgG (Biotin-gekoppelt)	Dianova, Hamburg
Monoklonales Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (Fluoreszin-gekoppelt)	Dianova, Hamburg
Cyber-3-gekoppeltes Streptavidin (SA-Cy3)	Dianova, Hamburg
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche, Mannheim

2.1.5. Nukleinsäuren

17syn ⁺ <i>infectious</i> DNA:	Aus laboreigener Herstellung mittels Phenol-Chloroform-Fällung
<i>Vektorsysteme:</i>	
pCMV-TNT-Vektor	Promega Corporation, Madison (USA)

pCR-Topo 2.1-Vektor

Invitrogen, Karlsruhe

(Bestandteil des TOPO TA Cloning Kits)

Primer und TaqMan-Sonden:

Primer und TaqMan-Sonden (*Probes*) stammten von der Firma biomers.net (Ulm). Die Primer wurden in dem in Klammern angegeben Volumen DEPC-H₂O gelöst, um eine Stockkonzentration von 100 pmol/μl (100 μM) zu erhalten. Vor dem Einsatz wurden die Primer dann 1:10 verdünnt.

chicken-β-Actin fw: 5'-tgc tgt gtt ccc atc tat cg-3' (511 μl) [190]

chicken-β-Actin rev: 5'-ttg gtg aca ata ccg tgt tca-3' (246 μl)

HSV-1_LAT_2,0kb-fw: 5'-ccc acg tac tcc aag aag gc-3' (330 μl) [35]

HSV-1_LAT_2,0kb-rev: 5'-aga ccc aag cat aga gag cca g-3' (324 μl)

HSV-1_LAT_2,0kb-Probe: 5'-ccc acc ccg cct gtg ttt ttg tg-3'

HSV-2_LAT-fw: 5'-gtc aac acg gac aca ctc ttt tt-3' (237 μl)

HSV-2_LAT-bw: 5'-cga ggc ctg ttg gtc ttt atc -3' (280 μl)

HSV-2_LAT-Probe: 5'-cac cca cca aga cag gga gcc a-3'

HSV-1_LAT-1113-2573-fw: 5'-gcg cga att ctg tct gtg ttg gat gta tcg-3' (1188 μl)

HSV-1_LAT-1113-2573-bw: 5'-gcg cgt cga cct atg ctt ggg tct tac tgc-3' (290 μl)

Oligonukleotid-Sonde für in situ-Hybridisierung (HSV-1 LAT_5DIG-Sonde):

DIG-5'-cat aga gag cca ggc aca aaa aca c-3' Eurofins MWG Operon, Ebersberg

Standardverdünnungsreihe für die RT-PCR: Aus laboreigener Herstellung mittels Phenol-Chloroform-Fällung

2.1.6. Enzyme und Enzympuffer

Sal 1 (EC 3.1.21.4) Roche, Mannheim

Eco R1 (EC 3.1.21.4) Roche, Mannheim

Puffer H Roche, Mannheim

Anti-DIG-Antikörper-AP-Konjugat (EC 3.1.3.1):	Teil des DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche)
FastStart Taq-DNA-Polymerase (EC 2.7.7.7):	Teil des Kits LightCycler TaqMan Master (Roche)
SP6-RNA-Polymerase (EC 2.7.7.6):	Teil des DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche)
DNase I (EC 3.1.4.5):	Teil des DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche)
Reverse Transkriptase (EC 2.7.7.49):	Teil des Kits Superscript III First-Strand Synthesis-System für RT-PCR (Invitrogen)
RNase H (EC 3.1.26.4):	Teil des Kits Superscript III First-Strand Synthesis-System für RT-PCR (Invitrogen)
T4-DNA-Ligase(EC 6.5.1.1) mit Pufferlösung	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Trypsin (1:250) in PBS (EC 3.4.21.4)	Biochrom AG, Berlin
Kollagenase Typ 2,2% (EC 3.4.24.7)	Biochrom AG, Berlin
Pepsin A (250 U/mg) aus porciner Magenmukosa (EC 3.4.23.1)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.7. Chemikalien und Reagenzien

Seakem GTG Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ethidiumbromid (1%)	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe
Aceton	Honeywell Specialty Chemicals, Seelze
<i>Chemikalien für in situ-Hybridisierung:</i>	
Lachssperma-DNA-Natriumsalz, sonifiziert	Appllichem, Darmstadt
Dextransulfat-Natriumsalz	Appllichem, Darmstadt
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure 1N	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd-Lösung (37%)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

Deioniertes Formamid	Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
Natronlauge 5 N	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
DEPC-Wasser	Applichem, Darmstadt
Essigsäure 100%	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Applichem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (pH 7,4)	Merck, Darmstadt
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylene	Sigma-Aldrich, Steinheim
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe

Reagenzien-Ansätze für Infektionsversuche im Trigeminal-Modell:

HMBA (M = 200,28 g/mol):	200-fache Stocklösung (500 mM): 0,5 g/5ml 0,9%-NaCl-Lösung
Forskolin (M = 410,50 g/mol):	100-fache Stocklösung (10 mM): 10 mg/ 2436 µl DMSO
Valproat (M = 166,19 g/mol):	50-fache Stocklösung (100 mM): 166,2 mg/10 ml PBS
Rapamycin (M = 914,17 g/mol):	10.000-fache Stocklösung (1 mM): 10 mg/ 10.938 ml DMSO
ACV:	200-fache Stocklösung: 10 mg/ml Aqua ad injectabilia

Die Reagenzien-Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt bzw. sterilfiltriert.

2.1.8. Puffer und Lösungsmittel

Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
PBS Dulbeco	Biochrom AG, Berlin
Herstellung von bidestilliertem H ₂ O: Mili-Q	Millipore, Billerica (USA)
Thimerosal	Sigma-Aldrich, Steinheim
TBE-Puffer (10x)	Thermo Scientific, Braunschweig
SB-Puffer enthielt 40% (w/v) Saccharose (Merck, Darmstadt) und 0,25% (w/v) Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim) in bidestilliertem Wasser.	

2.1.9. Reagenziensysteme

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
AllPrep DNA/RNA Micro Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
GC-rich PCR-System	Roche, Mannheim
LightCycler TaqMan Master	Roche, Mannheim
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
DIG Nukleic Acid Detection Kit	Roche, Mannheim
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche, Mannheim
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Superscript III First-Strand Synthesis-System für RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.10. Puffer- und Reagenzien-Ansätze für *in-situ*-Hybridisierung

Fixierlösung:

Formaldehyd	4% (v/v)
Essigsäure	5% (v/v)
NaCl	0,9% (w/v)

Permeabilisierungslösung:

Pepsin A	0,1% (w/v)
HCl	0,1 M

Postfixierlösung:

Formaldehyd	1% in bidestilliertem H ₂ O
-------------	--

Hybridisierungslösung:

Deionisiertes Formamid	60% (v/v)
NaCl	300 mM
Natriumcitrat	30 mM
EDTA	10 mM
Natriumdihydrogenphosphat (pH 7,4)	25 mM

Dextransulfat	5% (w/v)
Sonifiziertes Lachssperma	250 ng/ μ l

Aliquotieren der Sonden:

Die gesamte Menge (87 μ g) der Sonde HSV-1 LAT_5DIG wurde in 174 μ l TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH = 8) aufgenommen (500 ng/ μ l) und bei -20°C gelagert.

Die Sonde 888bp-LAT-RNA-DIG wurde durch *in vitro*-Transkription mithilfe des DIG RNA Labeling Kits (SP6/T7) (Roche) hergestellt. 50 μ l Resuspension gelabelter RNA wurden nach der RNA-Fällung in Aliquots á 5 μ l aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt (vergl. Kap. 2.2.8.3).

Hybridisierungsmix:

Pro 1 ml Hybridisierungslösung wurde entsprechend einer Zielkonzentration von 5 ng/ μ l ein 10 μ l-Aliquot der Sonde HSV-1 LAT_5DIG zugefügt. Pro 1 ml Hybridisierungslösung wurde ein 5 μ l-Aliquot der Sonde 888bp-LAT-RNA-DIG zugegeben. Die Sonde wurde jeweils unmittelbar vor Gebrauch zugegeben.

Posthybridisierungswaschlösung:

Formamid	60% (v/v)
NaCl	300 mM
Natriumcitrat	30 mM

Blocking Solution:

TRIS-HCl (pH = 7,5)	100 mM
NaCl	150 mM
Blocking Reagenz	0,5% (w/v)

Um das Blocking Reagenz (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche) in Lösung zu bringen, wurde es aufgekocht, einige Minuten geschüttelt und bis zum Gebrauch bei 37°C gelagert.

Antikörper-Mix:

Der AP-konjugierte Anti-DIG-Antikörper (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche) wurde vor Gebrauch fünf Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Blocking Solution im Verhältnis 1:250 frisch zugesetzt.

Waschlösung vor und nach Antikörper-Mix (Wash-post-Antibody):

TRIS-HCl (pH = 7,5)	100 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,3% (v/v)

Detektionspuffer:

TRIS-HCl	0,1 M
NaCl	0,1 M

Der Detektionspuffer wurde mit 5 N Natronlauge auf pH 9,5 eingestellt.

Detektionsansatz:

Die Substrate für die Farbreaktion (NBT/BCIP) (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche) wurden in Dunkelheit auf 37°C erwärmt und dem Detektionspuffer im Verhältnis 1:50 frisch zugesetzt.

Zusatz des RNase-Inhibitors DEPC im RNA-Protokoll:

Allen Lösungen und Flüssigkeiten wurden 0,1% DEPC (v/v) zugesetzt und ausgiebig verrührt.

2.1.11. Laborbedarf

Sterile Einwegmaterialien wurden von den Firmen Biozym (Hessisch Oldendorf), Greiner bio-one (Frickenhausen), Eppendorf AG (Hamburg) und Corning, Inc. (Corning, USA) bezogen.

Amersham 1 kb-DNA-Leiter	GE Healthcare, Buckinghamshire (UK)
Objekträger	Waldemar Knittel Glasverarbeitung GmbH, Braunschweig
Polylysinbeschichtete Objekträger	Thermo Scientific, Braunschweig
DABCO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Histofluid-Kleber	Engelbrecht-Medizin- & Labor-technik GmbH, Edermünde
Deckgläser	Bresser GmbH, Rhede
Zytokammern Nr. 1662	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Einfüllhilfe für Zytokammern Nr. 1663	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Filter für Zytokammern	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
RNAse OUT -Lösung	Teil des Kits Superscript III First-Strand Synthesis-System für RT-PCR (Invitrogen)

Sterile Pinzetten	idea-Technik AG, Rothenburg (Schweiz)
Dako Pen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Millex-Filter für Sterilfiltration (0,22 µm)	Merck, Darmstadt
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Sechsllochplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
75cm ² -Zellkulturflasche	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
QIAshredder-Säulen	Qiagen, Hilden
RNAse-away	Molecular Bioproducts, San Diego (USA)

Materialien zur Herstellung des Doppelkammer-Modells:

Maus-Laminin (1 mg in 2 ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gelatine (10 mg/ml)	Biochrom, Berlin
HBSS-Medium	Thermo Scientific, Braunschweig
Zellkulturschale, 35 mm	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix (Frankreich)
Glaszylinder	Omnilab, Bremen
Kratzer für Führungsritzen	Tyler Research, Edmonton, Kanada
Silikon	Bayer, Leverkusen

2.1.12. Geräte

Rotationsinkubator für Hühnereier	Grumbach Brutgeräte, Asslar
CO ₂ -Inkubator	Ewald Innovationstechnik GmbH (Sanyo), Bad Nenndorf
Zentrifuge Biofuge fresco	Haereus instruments, Düsseldorf
Zytozentrifuge Rotofix 32	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Zentrifuge Biofuge 28RS	Haereus instruments, Düsseldorf
Vortexmischer Reax Top	Heidolph Instruments, Schwabach
Sterile Werkbank Herasafe	Haereus instruments, Düsseldorf

Pipettierhilfen	Eppendorf AG, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Göttingen
Kamera Axioacam MRm	Carl Zeiss, Göttingen
Zellzähler	ENM England, Chicago (USA)
Waage EW600-2M	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Heizblock Unitek HB-130/E	SEL Laboratory Products, Pullman (USA)
Wasserbad	GFL, Burgwedel
UV-Lichtquelle GEL iX20 Imager	Intas, Göttingen
Gelkammern für Elektrophorese	Biozym, Hessisch Oldendorf
Phero-Stab 0312	Biotech-Fischer, Reiskirchen
(Spannungsquelle für Elektrophorese)	
Light Cyclor 2.0	Roche, Mannheim

2.2. Methoden

2.2.1. Das Organmodell

Das Modell wurde freundlicherweise von Dr. Wali Hafezi (Medizinische Mikrobiologie, Klinische Virologie) zur Verfügung gestellt.

2.2.1.1. Allgemeiner Aufbau der Doppelkammer (DK)

Das Organmodell war bereits etabliert (Hafezi et al., 2002 und 2012 [85; 86]). Es bestand aus zwei voneinander separierten Kompartimenten, die im Folgenden Innenkammer (IC; engl.: *inner chamber*) und Außenkammer (OC; engl.: *outer chamber*) genannt wurden. Die Grundlage bildete eine Zellkulturschale (35 mm). Die IC wurde durch einen Glaszylinder (8 mm Innendurchmesser, 8 mm Höhenabmessung, 1 mm Wandstärke) repräsentiert, der in die Petrischale eingesetzt wurde. Trigeminalganglien (TG) von Hühnerembryonen wurden nach der Explantation in die IC verpflanzt. Aussprossende Neuriten wuchsen unter dem Glaszylinder, der eine Diffusionsbarriere bildete, in die OC hinein. Parallele Führungsrillen in der Lamininbeschichtung lenkten dabei das Wachstum der Neuriten (vergl. Abb. C1 – C3 sowie Abb. 10).

2.2.1.2. Herstellung und Vorbereitung der Doppelkammern

Die Haftung der TG auf der Oberfläche wurde durch eine Gelatine-Lamininbeschichtung in der Zellkulturschale gewährleistet: Zunächst wurde die Petrischale mit 350 µl Gelatine (10 mg/ml) benetzt und 45 Minuten bei 37°C gelagert. Der Gelatine-Überstand wurde verworfen und mit einer Mischung aus 20 µl Laminin-Lösung (entsprechend 2 µg) und 330 µl HBSS-Medium überschichtet und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Oberfläche mit sterilem Wasser gewaschen. Vor der Präparation der TG wurden Führungsrillen für das Neuritenwachstum in die Lamininschicht eingekratzt. Der Glaszylinder, der IC und OC voneinander abgrenzte, wurden an zwei Punkten mit Silicon beschichtet und im Zentrum der Zellkulturschale plziert bzw. fixiert.

2.2.1.3. Explantation der Trigeminalganglien

Befruchtete Hühnereier wurden unter Standardbedingungen (37,8°C, 50-60% Luftfeuchtigkeit) im Rotationsinkubator bebrütet. Am Tag 15 wurden die Eier aufgebrochen. Die Hühnerembryonen wurden dekapitiert, die TG (Durchmesser circa 2 mm) präpariert und in TG-Medium (s.u.) bis zur Fixierung aufbewahrt. Die TG wurden durch circa einminütige

Lufttrocknung auf dem lamininbeschichteten Untergrund in der IC fixiert. Anschließend wurden 500 µl TG-Medium in die IC und 2,5 mL TG-Medium in die OC gegeben. Das TG-Medium bestand aus dem Medium MEM (D-Valin-modifiziert), 5 g/l Glukose, 2 mM L-Glutamin, 100 mg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin G, 0,25 mg/ml Amphotericin B (ABAM) und 50 ng/ml NGF 7S.

Es folgte eine vier- bis fünftägige Inkubation der TG bei 37°C im CO₂-Inkubator (5% CO₂; 100% Luftfeuchtigkeit), während der die Neuriten in die OC hineinwuchsen. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.2. Infektion der Trigeminalganglien

Die Infektion der TG fand standardisiert an Tag 4 bzw. 5 nach der Explantation statt. Vor den Versuchen wurde das Neuritenwachstum lichtmikroskopisch kontrolliert. Danach wurden die DK blind randomisiert. Es gab zwei verschiedenen Infektionsmodi: Die TG konnten direkt in der IC infiziert werden; bei der Infektion in der OC wurden die Neurone der TG retrograd über die Axone infiziert (vergl. Hafezi et al. 2012 [86]). Die Infektion sowie alle vorbereitenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Der hydrostatische Druck in der IC wurde während und nach der Infektion über dem Niveau in der OC gehalten, um einen Einstrom aus der OC zu vermeiden. Bis zur Ernte wurden die DK bei 37°C im Inkubator aufbewahrt. Die Infektion der IC erfolgte dabei mit einem Gesamtvolumen von 300 µl, die Infektion der OC mit 2 ml Infektionsansatz.

2.2.2.1. Ansetzen des CMC-Mediums für die Infektion von Trigeminalganglien

Der Ansatz für ein Gesamtvolumen von 80,7 ml CMC-Medium setzte sich zusammen aus 35 ml MEM (2x), 800 µl Humanserum, 800 µl ABAM, 4 ml 10%ige Glukose-Lösung, 100µl NGF-Stocklösung (1 ng/µl; Endkonzentration im TG-Medium 50 ng/ml) und 40 ml 1%-CMC-Lösung in bidestilliertem Wasser. Die im Humanserum enthaltenen Anti-HSV-Antikörper und das Verdickungsmittel CMC sollten eine Sekundärinfektion verhindern. Alle Agenzien, mit denen die TG behandelt wurden, wurden in gleicher Konzentration in IC und OC eingebracht. Das Volumen hinzugefügter weiterer Agenzien wurde vom Volumen der CMC-Lösung abgezogen.

2.2.2.2. Infektion der Innenkammer

Das TG-Medium wurde aus der IC entfernt. Die TG wurden mit 300 µl Infektionsansatz überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde das TG-Medium

aus der OC abpipettiert und dann der Infektionsansatz mit einer sterilen Pipettenspitze aus der IC entfernt. Die IC wurde mit 350 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden IC und OC mit 300 µl respektive 2,5 ml CMC-Medium bedeckt, um die Kompartimente funktionell voneinander zu isolieren.

2.2.2.3. Infektion der Außenkammer

Bei der OC-Infektion bestand der erste Schritt im sogenannten Abdichten der IC: Dazu wurde das TG-Medium in der IC durch 300 µl CMC-Medium ersetzt. Die DK wurden dann für 30 - 45 Minuten bei 37°C gehalten. Das CMC-Medium drang in dieser Zeit in den Raum zwischen Glaszylinder und Kammerboden ein. Dies sollte die IC undurchlässig für Viruspartikel machen. Im nächsten Schritt wurde das TG-Medium aus der OC abgezogen und durch 2 ml Infektionsansatz ersetzt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei 37°C. Danach wurde der Infektionsansatz entfernt. Es folgte ein Waschschrift der OC mit 2,5 ml PBS. Zuletzt wurden 2,5 ml CMC-Medium in die OC gegeben.

2.2.3. Ernte der Trigeminalganglien

2.2.3.1. Entnahme und Trypsin-Kollagenase-Verdau der Trigeminalganglien

Vor der Entnahme der TG wurde zunächst das CMC-Medium aus der OC entfernt und in der IC durch 300 µl PBS ersetzt. Das TG-Paar aus je einer DK wurde dann mittels einer sterilen Pinzette abgelöst, in ein Enzymgemisch aus 100 µl Trypsinlösung (1:250) und 2 µl Kollagenase (2%) überführt und 35 Minuten bei 37°C im Heizblock verdaut. Der Verdau wurde durch Abpipettieren der Enzymlösung und Zugabe von 200 µl PBS mit 10% FCS beendet. Nach 30-sekündiger Zentrifugation bis auf circa 4.000 rpm wurde die FCS-PBS-Lösung erneuert. Die TG wurden anschließend durch häufiges Auf- und Abpipettieren mechanisch aufgetrennt, bis eine gleichmäßige Zellsuspension entstand.

2.2.3.2. Zytozentrifugation der Trigeminalganglien-Resuspension

Objektträger (OT) ohne Polylysinbeschichtung wurden vor Gebrauch in 100%igem Ethanol gewaschen. Der OT wurde zur anschließenden Zentrifugation in eine Zytokammer eingesetzt und mit einem Filterpapier und Einfüllhilfe für die TG-Resuspension versehen. Das Gesamtvolumen TG-Resuspension einer DK wurde auf zwei spätere Mikroskopierfelder (je 100 µl) aufgeteilt. Die Zytokammern wurden fünf Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt. Einfüllhilfe und Filterpapier wurden entfernt. Die

OT wurden fünf Minuten lang bei 12.000 rpm getrocknet. Es folgte eine zehnmütige Fixierung der Zellen mit -20°C kaltem Aceton (bei IF-Versuchen). Die Zellfelder wurden mit einem lipophilen Film umrandet. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die OT in Dunkelheit bei 4°C aufbewahrt.

Um TG-Zellen derselben DK parallel verschiedenen Methoden zuzuführen, wurde das Protokoll angepasst, indem TG-Paare in 300 µl FCS-PBS-Lösung resuspendiert wurden. Davon wurden je 100 µl fluoreszenzgefärbt, die übrigen zwei Drittel der Suspension standen für andere Assays zur Verfügung (vergl. Kap. 3.3.2.1.; Kap. 3.2.3.)

2.2.4. Immunfluoreszenzmikroskopie

2.2.4.1. Immunfärbung

Die Antikörper für die Immunfärbung wurden in einer sterilfiltrierten Lösung aus PBS mit 4% FCS, 1% Milchpulver und 0,05% Thimerosal angesetzt. Pro Zellfeld wurden circa 80 µl Volumen benötigt. Die TG-Zellen wurden sequenziell mit drei Antikörper-Ansätzen behandelt:

Ansatz für Erst-Antikörper: 2 µg/ml Maus-Anti-Neurofilament-Antikörper und 2 µl/ml DAKO-1-Serum (HSV-1) bzw. 3 µl/ml DAKO-2-Serum (HSV-2).

Ansatz für Zweit-Antikörper: 3 µg/ml Fluoreszin-gekoppeltes Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (für HSV-1 und -2) und 2,6 µg/ml Biotin-gekoppeltes Ziege-Anti-Maus-IgG (für Neurofilament).

Ansatz 3: 3 µg/ml Fluoreszin-gekoppeltes Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, 3,6 µg/ml SA-Cy3 und 1 µl/ml DAPI. (Das Fluorochrom DAPI interkaliert mit DNA, das Konjugat SA-Cy3 bindet an Biotin.) Um Artefakten durch kristalline Ausfällungen vorzubeugen, wurde SA-Cy3 vor Gebrauch in einem Volumen von 500 µl über 30 Minuten bei 28.000 rpm zentrifugiert. Die oberen 400 µl wurden abpipettiert und die übrigen Antikörper dem verbleibenden Volumen zugesetzt.

Vor Zugabe des ersten Antikörper-Ansatzes wurde jeder Zellbereich für 30 Minuten mit 100 µl FCS überschichtet, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu besetzen. Danach wurde das FCS verworfen und die OT mit PBS gewaschen. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten für die Erst-Antikörper und je 45 Minuten für die nachfolgenden Ansätze. Zwischen jedem Schritt wurden die OT 30 Sekunden in PBS gewaschen, der letzte Waschschrift wurde zudem mit bidestilliertem Wasser durchgeführt. Zuletzt wurden die getrockneten OT mit dem Konservierungsmittel DABCO eingedeckt und bis zur Auswertung in Dunkelheit bei 4°C aufbewahrt.

2.2.4.2. Auszählung von Zellen

Um die Gesamtzahl der Neuronen eines Zellbereiches sinnvoll und vergleichbar zu ermitteln, wurde zuerst die Größe des Zellbereiches abgeschätzt; als Einheit diente hierbei der Gesichtsfelddurchmesser. Unter der Annahme, dass die OT-Bereiche annähernd eine Kreisform beschrieben, wurde aus der Quersumme von Längs- und Querdurchmesser mit der Genauigkeit eines halben Gesichtsfeldes (GF) der Radius bestimmt, der dann in die Kreisflächenformel $A = r^2 \times \pi$ eingesetzt wurde: $A [in GF] = ((d_{\text{Quer}} + d_{\text{Längs}}) \times 0,25)^2 \times \pi$.

Dann wurde die Anzahl der Neuronen in 12 GF pro Zellbereich gezählt und der Mittelwert mit der errechneten Anzahl an GF multipliziert. Die Anzahl HSV-Antigen-positiver Zellen – Neuronen und Begleitzellen – wurde nur dann auf diese Weise ermittelt, wenn sie so hoch lag (Schwelle jeweils circa 250 Zellen), dass eine genaue Auszählung in angemessener Zeit nicht möglich war. In diesem Fall wurden die Zellanzahl und Summen der infizierten Neurone bzw. Begleitzellen in denselben GF bestimmt. (Für Begleitzellen wurden nur 6 GF ausgezählt). In DK, in denen weniger Zellen infiziert waren, wurde das komplette Zellfeld mikroskopiert und ausgezählt. Die Rohdaten für jedes TG-Paar wurden nach der Auswertung addiert, sodass sich alle genannten Zahlen ohne weiteren Hinweis auf die TG einer DK beziehen.

2.2.4.3. Statistische Aufarbeitung der Ergebnisse

Für die statistische Analyse wurden die Programme GraphPad InStat 3.0b (Graph Pad, La Jolla, CA, USA) und IBM SPSS Statistics Version 23 genutzt. Parametrische Tests wurden nur unter der Bedingung angewandt, dass die Datenreihe normalverteilt war und die Standardabweichungen (SD) sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Als parametrische Tests dienten t-Test (zwei Vergleichsgruppen) bzw. ANOVA (mehr als zwei Gruppen). Als Post-hoc-Test wurde der Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test durchgeführt. Waren die genannten Bedingungen nicht erfüllt, wurden als non-parametrische Tests der Mann-Whitney Test (zwei Gruppen) bzw. der Kruskal-Wallis Test (mehr als zwei Gruppen) angewandt. Als Post-hoc-Test diente dann Dunn's Multiple Comparisons Test. Gab es signifikante Unterschiede im Post-hoc-Test, wurde auf die Nennung des vorhergehenden Tests verzichtet. Für nominal verteilte Variablen wurde Fisher's Exact Test genutzt.

2.2.5. Zellkultur

Verzellen wurden nach einem Standardprotokoll kultiviert und zweimal in der Woche passagiert. Das Zellkulturmedium MEM enthielt 10% FCS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml

Penicillin G und 1% NEAA. Die Anzucht erfolgte im CO₂-Inkubator (37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit).

2.2.5.1. Infektion von Verozellen

Das Volumen an Virus-Stock-Suspension orientierte sich an der M.O.I.: $\text{Volumen} = (\text{M.O.I.} \times \text{Zellzahl}) / \text{Virustiter}$. Die angenommene Zellzahl war 1×10^7 in einer 75-cm²-Zellkulturflasche und $1,28 \times 10^6$ in Sechslachplatten-Wells. Das Zellkulturmedium wurde verworfen und ein Infektionsansatz aus Virussuspension und MEM (2% FCS) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurde der Infektionsansatz verworfen. Die Verozellen wurden mit PBS gewaschen, mit MEM (2% FCS) bedeckt und bei 37°C im Inkubator kultiviert. (Mit Ausnahme von FCS wurden die Konzentrationen aller oben genannten Zusätze zum MEM im Infektionsansatz konstant gehalten.)

2.2.5.2. Plaque-Assay und Kristallviolett-färbung

Aus zwei Dritteln der TG-Resuspension wurde nach der Ernte eine Verdünnungsreihe hergestellt: 200 µl TG-Resuspension wurden mit 900 µl MEM (2% FCS) vermischt. Aus dieser per Definition unverdünnten TG-Suspension wurden durch Zugabe von MEM (2% FCS) die Verdünnungsstufen 1:4 und 1:16 hergestellt; in den Kontrollen darüber hinaus 1:64, 1:256 und 1:1024. Die Inkubation erfolgte über vier Stunden bei 37°C. Dann wurden die TG-Resuspensionen entfernt und die Zellrasen mit 2 ml 1%-CMC-Medium überschichtet (1:1-Mix aus 2%-CMC-Lösung und MEM (2x) mit 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin G und 1% FCS). Die Wells wurden nach drei Tagen bei 37°C mit Kristallviolett gefärbt: Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, zehn Minuten in 3,7% Formalin fixiert, fünf Minuten mit 0,1% Kristallviolett-Lösung überschichtet und mit Wasser gewaschen. Nach der Lufttrocknung wurden die Plaques ausgezählt.

2.2.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.6.1. GC-rich-PCR

Für die Amplifikation des LAT-DNA-Fragments LAT_1113-2573 wurde das GC-rich PCR-System nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) genutzt. Als Target diente 17syn⁺ *infectious* DNA. Als Primer wurden HSV-1_LAT-1113-2573-fw und -bw verwendet. Diese enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Eco R1 und Sal 1 (vergl. Kap. 3.3.1.2., vergl. Abb. 8 und 9; Abb. H5. Der Ansatz für Master Mix (MM)-1 bestand aus 10 µl GC-rich resolution

solution, 1 µl Target-DNA, 1 µl dNTPs, je 2,5 µl Primer und 18 µl H₂O. MM-2 setzte sich aus 10 µl GC-rich PCR reaction buffer, 1 µl GC-rich PCR System enzyme-Mix und 4 µl H₂O zusammen. Für einen PCR-Ansatz wurden 35 µl MM-1 mit 15 µl MM-2 gemischt. Die initiale Denaturierung fand bei 95°C über 3 Minuten statt. Die nachfolgenden Zyklusbedingungen waren: 95°C (30 Sekunden), Annealing bei 62,3°C (45 Sekunden), Elongation bei 72°C (2 Minuten). Es wurden 40 Zyklen durchgeführt. Der letzte Elongationsschritt dauerte 7 Minuten, die anschließende Aufbewahrung erfolgte bei 4°C. Zum Nachweis wurden 3 µl des PCR-Produkts eine Agarosegelelektrophorese (1% Seakem) durchgeführt. Das Amplifikat wurde mithilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in 30 µl EB eluiert.

2.2.6.2. Real Time PCR (RT-PCR) und Reverse Transkriptase-PCR (rt-PCR)

Die RT-PCR dient dem mengenmäßigen Nachweis eines bekannten DNA-Fragments. Die Quantifizierung des während der PCR vervielfältigten Fragments erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR durch Vergleich mit einer definierten Standardverdünnungsreihe, indem die Intensität der Fluoreszenz von Probe und Standard gemessen werden. Die RT-PCR kann mit der rt-PCR kombiniert werden. Bei der rt-PCR nutzt man die Eigenschaft des Enzyms Reverse Transkriptase, RNA-Transkripte in cDNA zu übersetzen. Durch Quantifizierung der cDNA mittels RT-PCR kann auf die ursprüngliche Transkriptmenge geschlossen werden [19; 251].

2.2.6.2.1. Aufreinigung der Nukleinsäuren

Die Ernte der TG wurde unter Zusatz von 0,1% DEPC zu verwendeten Reagenzien und soweit möglich unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Zur Auftrennung und Homogenisierung des Probenmaterials wurden zwei Drittel der TG-Resuspension in 350 µl RLtplus-Puffer (Allprep DNA/RNA Micro Kit, Qiagen) mit 1% Beta-Mercaptoethanol resuspendiert. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder-Säule gegeben und zwei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der homogenisierte Durchfluss wurde in eine AllPrep DNA spin-Säule gegeben und 45 Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die im Durchfluss enthaltene RNA und die in der Allprep-DNA-spin-Säule gebundene DNA wurden anschließend nach Angaben des Herstellers mithilfe des Allprep DNA/RNA Micro Kit (Quiagen) aufgereinigt. Die aufgereinigte RNA wurde in 14 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die aufgereinigte DNA wurde in 50 µl EB-Puffer eluiert.

2.2.6.2.2. Transkription von RNA in cDNA mittels Reverse Transkriptase (rt-PCR)

Zum Umschreiben von RNA in cDNA wurde das Kit Superscript III First-Strand Synthesis-System für RT-PCR (Invitrogen) eingesetzt. Für jede Probe wurde je ein Ansatz mit und ohne Reverse Transkriptase (Negativkontrolle) vorbereitet. Ein Primer-Ansatz bestand aus 2 µl RNA-Probe, 6 µl H₂O, 1 µl *random*-Hexamer-Primer (50 ng) und 1 µl dNTP (10 mM). Die Ansätze wurden fünf Minuten bei 65°C auf einem Heizblock inkubiert und eine Minute auf Eis gelagert. Jedem Ansatz wurden dann 2 µl 10-fach-RT-Puffer, 4 µl MgCl₂ (Magnesium-Chlorid), 2 µl DTT (Dithiothreitol; 0,1 mM), 1 µl Rnase OUT (40 U) und 1 µl Reverse Transkriptase (200 U Superscript III) bzw. 1 µl H₂O in den Negativkontrollen hinzugefügt. Die Ansätze wurden zehn Minuten lang bei Raumtemperatur gelagert und dann 50 Minuten lang bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 85°C beendet. Es folgte eine einminütige Lagerung auf Eis. In den Proben mit Reverser Transkriptase wurde die Matrizen-RNA durch eine 20-minütige Behandlung mit 1 µl Rnase H (2 U) bei 37°C entfernt.

2.2.6.2.3. Durchführung der RT-PCR

Für die PCR-Zielstrukturen HSV-1-LAT und HSV-2-LAT wurde das LightCycler TaqMan Master Kit (Roche) benutzt. Die Ansätze für die Quantifizierung von HSV-LAT-gDNA bestanden aus je 1,6 µl Primer fw und bw, 0,2 µl TaqMan-Probe, 7,6 µl H₂O, 4 µl TaqMan-Polymerase-MM und 5 µl aufgereinigte DNA aus TG. Gleiche Mengenverhältnisse wurden für die geeichte Standardverdünnungsreihe verwendet. Die Ansätze zur Quantifizierung von cDNA enthielten abweichend 2 µl aufgereinigte cDNA aus TG und 10,6 µl H₂O.

Für HSV-1-LAT wurden die Primer HSV-1_LAT_2,0kb-fw und -rev verwendet. Für HSV-2-LAT waren die Primer HSV-2_LAT-fw und -bw. Die Zyklusbedingungen für HSV-1-LAT waren: Zehn Minuten bei 95°C. Es folgten 45 Zyklen: 10 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 20 Sekunden Annealing bei 53°C, eine Sekunde Amplifikation bei 72°C. Kühlung bei 40°C über 30 Sekunden.

Für HSV-2-LAT galten folgende Bedingungen: Präinkubation bei 50°C über zwei Minuten und 95°C über zehn Minuten. Es folgten 45 Zyklen: 20 Sekunden bei 95°C, 60 Sekunden bei 60°C. Kühlung bei 40°C für 30 Sekunden.

Für die Quantifizierung von *chicken*-β-Actin-Nukleinsäuren wurde das Kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green (Roche) verwendet. Die PCR-Ansätze für *chicken*-β-Actin-gDNA und -cDNA enthielten je 0,4 µl Primer fw und bw, 4 µl 5-fach-MM LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, 2 µl aufgereinigte gDNA bzw. cDNA aus TG-Explantaten und 13,2 µl H₂O.

Für *chicken*-β-Actin wurden das Primerpaar *chicken*-β-Actin-fw und -rev genutzt.

Die Zyklusbedingungen waren: Präinkubation bei 95°C für zehn Minuten. Es folgten 45 Zyklen mit zehnständiger Denaturierung bei 95°C, vier Sekunden Annealing bei 58°C und 20 Sekunden Elongation bei 72°C. Die Kühlung erfolgte bei 40°C über 30 Sekunden.

Die Eichung der Transkript-Mengen mittels Kalkulation relativer Transkriptlevel wie in Kap. 3.3.2.1. (vergl. auch Tab. H2 und H3) erfolgte in Anlehnung an Bode et al., 2007 [15] und Hafezi et al., 2012 [86].

2.2.7. Klonierung

2.2.7.1. Topo-Klonierung: Herstellung des Plasmids pCR-Topo 2.1-LAT 1113-2573

Ligation:

Für die Ligation des Vektors pCR-Topo2.1-LAT_1113-2573 wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) benutzt. Der Ligationsansatz bestand aus 2,5 µl PCR-Fragment LAT_1113-2573, 1 µl pCR-Topo 2.1-Vektor, 1 µl Salzlösung und wurde mit H₂O auf 6 µl aufgefüllt. Die Inkubationszeit betrug fünf Minuten bei 20°C .

Transformation kompetenter E. coli (Top 10):

2 µl des Ligationsansatzes wurden in einem Eppendorf-Tube mit One Shot Top 10-E.coli (Topo TA Cloning Kit, Invitrogen) vermischt. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, über 30 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und sofort wieder auf Eis gelagert. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Ansätze eine Stunde bei 37°C geschüttelt. 50 µl, 100 µl und das übrige Volumen wurden dann auf Ampicillin-haltigen Agarplatten mit IPTG und X-Gal ausgestrichen. Die Bakterien wurden 24 Stunden lang bei 37°C kultiviert. Mittels Blau-Weiß-Selektion wurden weiße Kolonien in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin übertragen und über 24 Stunden bei 37°C geschüttelt. 1 ml der Kultur wurde in Glycerin konserviert, die übrigen 4 ml wurden zehn Minuten bei 4.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgte die Plasmidpräparation aus den Bakterienpellets (vergl. Kap. 2.2.7.3.)

2.2.7.2. Klonierung: Herstellung des Plasmids pCMV-TNT-LAT 1113-2573

Das DNA-Fragment LAT_1113-2573 wurde in den pCMV-TNT-Vektor umklontiert: Dazu wurden die Vektoren pCR-Topo 2.1-LAT_1113-2573 c1 und pCMV-TNT c1.2 einem Restriktionsverdau mit Sal 1 und Eco R1 unterzogen (vergl. Kap. 2.2.7.4.). Es folgte eine Gelextraktion von Insert und pCMV-TNT c1.2 (vergl. Kap. 2.2.7.5., vergl. auch Abb. H5).

Ligation von LAT 1113-2573 c1 und dem Vektor pCMV-TNT c1.2:

Der Ligationsansatz bestand aus 2 µl pCMV-TNT c1.2, 10 µl Insert, 2 µl Ligationspuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) und 5 µl H₂O. Für die Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert und Ligase vorbereitet; die Positivkontrolle enthielt kein Insert. Beide Kontrollen wurden mit H₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Die Ligationsansätze wurden für 24 Stunden bei 16°C inkubiert.

Transformation kompetenter E.coli (DH5α-Zellen):

Vom Ligations- bzw. den Kontrollansätzen für pCMV-TNT-LAT_1113-2573 wurden je 5 µl in ein 50 µl-Tube auf Eis aufgetauter DH5α-Zellen gegeben und mit den Zellen vermischt. Auf eine Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Nach weiteren zwei Minuten auf Eis wurden die Ansätze in 950 µl SOC-Medium gegeben und bei 37°C für eine Stunde geschüttelt. 50 µl und 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausgestrichen. Von den Kontrollansätzen wurden je 100 µl ausgestrichen. Die weiteren Schritte bis zur Plasmidpräparation erfolgten wie in Kap. 2.2.7.1. dargestellt (keine Blau-Weiß-Selektion).

2.2.7.3. Plasmidpräparation

Bakterienpellets wurden in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers weiterbehandelt. Die Plasmid-DNA pCR-Topo 2.1-LAT_1113-2573 wurde in 32 µl EB aufgenommen. Das Konstrukt pCMV-TNT-LAT_1113-2573 c8 wurde in 50 µl EB eluiert. Zur Kontrolle folgten ein Restriktionsverdau mit Sal 1 und Eco R1 mit anschließender Gelelektrophorese.

2.2.7.4. Restriktionsverdau

Der Plasmidpräparation von pCR-Topo 2.1-LAT_1113-2573 sowie pCMV-TNT-LAT_1113-2573 c8 folgte ein sequentieller Restriktionsverdau mit den Enzymen Sal 1 und Eco R1 (vergl. Abb. 9). Der MM für Sal 1 bestand aus 4 µl Sal 1, 20 µl Puffer H und 116 µl H₂O. Der MM für Eco R1 bestand aus 4 µl Eco R1, 23 µl Puffer H und 3 µl H₂O. Zu je 3 µl des Vektors pCR-Topo 2.1-LAT_1113-2573 respektive pCMV-TNT-LAT_1113-2573 c8 wurde ein Volumen von 17 µl Sal 1-MM zugegeben. 2 µl pCMV-TNT wurden 18 µl Sal 1-MM zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden den Ansätzen 3 µl des Eco R1-MM hinzugefügt. Die Reinkubation erfolgte unter gleichen Bedingungen.

2.2.7.5. Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion

Es wurden Gele mit 1% Seakem benutzt. TBE-Laufpuffer (10x) wurde 1:10 mit destilliertem H₂O verdünnt und zusammen mit 50 µl Ethidiumbromid in die Elektrophoreskammer gegeben. Zusammen mit 2 µl SB-Puffer wurden 3 - 5 µl DNA bzw. 3 µl 1kB-Marker in die Geltaschen pipettiert. Die Dauer der Elektrophorese betrug circa 35 Minuten bei 200 V. DNA-Fragmente wurden durch UV-Licht der Wellenlänge 312 nm sichtbar gemacht.

Für das DNA-Fragment LAT_1113-2573 c1 und den Vektor pCMV-TNT c1.2 wurde eine Agarosegelextraktion durchgeführt. Je 3 µl der restriktionsverdauten Ansätze wurden zur Detektion mittels Ethidiumbromidmarkierung abgezweigt und mit 2 µl SB-Puffer gemischt. Der restliche Ansatz wurde auf zwei Gelkammern aufgeteilt und mit je 5 µl SB-Puffer versetzt. Die Gelelektrophorese mit einem nicht-ethidiumbromidhaltigen Gel dauerte zwei Stunden bei 80 V. Mittels UV-Detektion der ethidiumbromidbehandelten Vergleichsbande wurden Insert und Vektor ausgeschnitten und mithilfe des Qiaquick Gel Extraction Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers geextrahiert. Die DNA wurde in je 30 µl EB eluiert.

2.2.8. *in situ*-Hybridisierung

2.2.8.1. Prinzip

Die *in situ*-Hybridisierung (ISH) stellt ein molekularbiologisches Verfahren zur Detektion von Nukleinsäuren in ihrer biologischen Umgebung (*in situ*) dar. Sie erlaubt die Lokalisation von DNA und RNA innerhalb einzelner Zellen, Gewebe oder ganzer Organismen. Das Funktionsprinzip der ISH besteht in der spezifischen Bindung einer markierten Nukleinsäuresequenz (Sonde) an ihre komplementäre Zielsequenz und der anschließenden Detektion der Sonde (vergl. Abb. H1). Mithilfe der ISH ist es einerseits möglich, das Vorhandensein bestimmter Gene oder Mutationen ausfindig zu machen, andererseits kann durch den Nachweis von RNA die transkriptionelle Aktivität eines Gens bestimmt werden.

Zur direkten Markierung der Sonde eignen sich prinzipiell Radioisotope oder Fluorochrome. Bei der indirekten Markierung werden die Nukleinsäuren an ein Hapten wie Biotin oder Digoxigenin (DIG) gekoppelt, das mittels Fluoreszenz-Antikörper (FISH) oder durch Enzym-basierte Immunhistochemie detektiert wird. Als Enzyme kommen Meeretich-Peroxidase oder Alkalische Phosphatase (AP) in Frage.

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten, eine ISH-Sonde zu markieren. Hier wurde auf die Methode der *in vitro*-Transkription zurückgegriffen, mittels derer einzelsträngige RNA-Sonden synthetisiert werden können. Bei diesem Verfahren wird die gewählte Sondensequenz über

einen Vektor oder ein PCR-Fragment in RNA transkribiert, die sich aus bereits vormarkierten Nukleotiden speist [16; 23; 24; 64; 107; 161; 195].

Fixieren des Probenmaterials

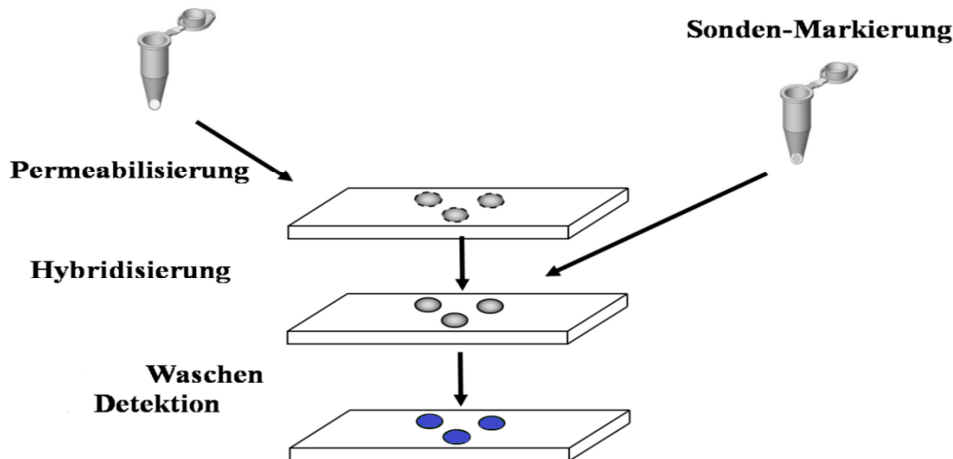


Abb. H1: Prinzip und Arbeitsschritte der *in situ*-Hybridisierung. Graphik entnommen aus: Schultz, 2009 [210, Abb. 1.4].

2.2.8.2. *in vitro*-Transkription zur Herstellung einer Sonde

Die ISH-Sonde 888bp-LAT-RNA-DIG wurde durch *in vitro*-Transkription mithilfe des DIG RNA Labeling Kits (SP6/T7) (Roche) hergestellt. Als Matrize diente das aufgereinigte Plasmid pCMV-TNT-LAT_1113-2573 c8 (vergl. Kap. 2.2.7.). 5 μ l Plasmid-DNA wurden mit 8 μ l DEPC-H₂O in einem RNase-freien Eppendorf-Tube vermischt und auf Eis gelagert. Es wurden weitere Reagenzien hinzugefügt: 2 μ l NTP *labeling mixture*, 2 μ l Transkriptionspuffer, 1 μ l Protector RNase Inhibitor und 2 μ l SP6-RNA-Polymerase. Der Ansatz wurde gemischt, 30 Sekunden bei 2.000 rpm zentrifugiert und zwei Stunden lang bei 37°C inkubiert. Die DNA-Matrize wurde durch Zugabe von 2 μ l DNase I und 15-minütiger Inkubation bei 37°C aus dem Ansatz entfernt. Um die Reaktion zu beenden, wurden 2 μ l 200 mM EDTA (pH = 8,0) zugegeben.

2.2.8.3. RNA-Fällung

Zur Herstellung einer RNA-Sonde für die ISH wurden im Anschluss an die *in vitro*-Transkription 24 μ l des Ansatzes mit 2,4 μ l 3 M Natriumacetat (pH = 5,2) und 60 μ l -20°C kaltem Ethanol gemischt und über eine Stunde bei -20°C inkubiert. Der Ansatz wurde danach 30 Minuten bei 14.800 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 70% Ethanol

resuspendiert bzw. gewaschen. Das Tube wurde nochmals 15 Minuten bei 14.800 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Resuspension der gefällten RNA erfolgte in 50 µl DEPC-H₂O.

2.2.8.4. Etablierung eines *in situ*-Hybridisierungsprotokolls für HSV-1-LAT

Das Grundgerüst für die Versuche zur ISH-Etablierung orientierte sich an einem Protokoll aus dem DIG Application Manual *for nonradioactive in situ*-Hybridization (Roche, 4. Edition, S. 116ff.), das sich auf Veröffentlichungen von Boom et al. 1986 [16] und Raap et al., 1991 [195] stützte. Bei der Detektion der Sonde dienten die Angaben des Herstellers als Grundlage (DIG Nucleic Acid Detection-Kit, Roche). Im Folgenden wird ein ISH-Protokoll zur Detektion von HSV-1-LAT-Nukleinsäuren in zytozentrifugierten Hühner-TG-Zellen beschrieben. Per Definition wurde zwischen einem DNA- und einem RNA-Protokoll unterschieden: Im DNA-Protokoll gab es einen zusätzlichen Denaturierungsschritt (s.u.). Im RNA-Protokoll wurden alle Flüssigkeiten und OT mit 0,1% DEPC behandelt. In beiden Protokollansätzen wurden Oberflächen mit RNase-away dekontaminiert.

2.2.8.4.1. Vorbehandlung des Probenmaterials

Nach der Zytozentrifugation wurden die TG-Zellen 30 Minuten mit der Fixierlösung behandelt und anschließend fünf Minuten in PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 70%, 90% und 100% über je fünf Minuten dehydriert. Nach der Entfernung von Lipidpartikeln mittels einer dreißigsekündigen Behandlung in Xylene erfolgte die Rehydrierung in derselben Ethanolreihe über je fünf Minuten sowie ein fünfminütiger Waschschrift in PBS. Nach Reinigung der OT mittels Filterpapier wurde ein lipophiler Film um die Zellbereiche aufgetragen. Die Zellmembranen wurden durch Behandlung mit circa 70 µl 37°C warmer Pepsin-HCl-Lösung permeabilisiert. Experimentell wurde eine Dauer von fünf Minuten als geeignet ermittelt. Die OT wurden mit PBS gewaschen, zehn Minuten mit Postfixierlösung behandelt und nochmals mit PBS gewaschen.

2.2.8.4.2. Hybridisierung von Sonde und Zielsequenz

Nach dem Trocknen mittels Filterpapier wurden auf jedes Zellfeld circa 60 µl frisch angesetzter Hybridisierungsmix gegeben. Im DNA-Protokoll folgte nun ein Denaturierungsschritt auf einem 100°C warmen Heizblock. Empirisch erwies sich eine Dauer von 12 Minuten als geeignet. Zur Verminderung der Renaturierungsrate wurden die Zellen für zwei Minuten einer Temperatur

von -20°C ausgesetzt. Die Hybridisierung fand anschließend über 20 Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer statt.

2.2.8.4.3. Bindung eines AP-konjugierten Anti-DIG-Antikörpers an die Sonde

Um die Hybridisierung zu beenden, wurden die OT über je fünf Minuten mit Posthybridisierungs-Waschlösung und PBS gewaschen. Es schloss sich ein 30-minütiges Blocken mit circa 70 µl *Blocking Solution* bei 37°C in der feuchten Kammer an, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu besetzen. Vor der Zugabe von 70 µl Antikörper-Mix wurden die Zellen fünf Minuten mit der *Wash-post-Antibody*-Lösung gewaschen. Die Inkubationszeit des Antikörper-Mix' wurde auf drei Stunden bei 37°C festgelegt. Anschließend wurden die OT zweimal zehn Minuten mit *Wash-post-Antibody*-Lösung gewaschen.

2.2.8.4.4. Detektion des gebundenen AP-konjugierten Anti-DIG-Antikörpers

Die Zellfelder wurden fünf Minuten lang mit dem Detektionspuffer auf pH 9,5 eingestellt. Der Puffer wurde dann restlos entfernt. Zur Detektion wurden jedem Zellbereich circa 70 µl Detektionsansatz mit den Substraten NBT/BCIP zugegeben. Die Lagerung zur Entwicklung der Farbreaktion fand in Dunkelheit statt. Die vom Kit-Hersteller angegebene Dauer von maximal 24 Stunden bis zur vollständigen Farbenwicklung wurde abgewartet. In einigen Fällen schloss sich eine Fluoreszenzfärbung der Zellkerne an. Dazu wurden die OT zweimal 30 Sekunden mit PBS gewaschen und wie in Kap. 2.2.4.1. beschrieben über 45 Minuten an mit DAPI (1:1000) inkubiert.

3. Ergebnisse

3.1. Infektionsversuche mit HSV-1

3.1.1. Charakterisierung des Verhaltens von HSV-1 im Trigeminal-Modell mittels Immunfluoreszenzmikroskopie: Infektionsverläufe ohne chemische Agenzien

Zunächst wurde das biologische Verhalten von HSV-1 im Organmodell mittels IF charakterisiert. Dabei wurden nacheinander die Infektion in der IC und in der OC betrachtet (vergl. Kap. 2.2.2.). Soweit nicht anders beschrieben erfolgten IF-Färbung und Auswertung wie in Kap. 2.2.4. geschildert (vergl. auch Kap. 3.1.1.1).

3.1.1.1. Infektion der Innenkammer mit HSV-1

24 DK wurden mit einer Dosis von $5,5 \times 10^5$ PFU in der IC infiziert. Betrachtet wurde die Entwicklung der Häufigkeit Antigen-positiver Zellen aus jeweils acht DK nach 12 h.p.i., 24 h.p.i. und 48 h.p.i. Als mock-infizierte Kontrolle diente eine DK (Ernte nach 24 Stunden).

Die Darstellung HSV-1-Antigen-positiver Zellen erfolgte mittels IF wie in Kap. 2.2.4. beschrieben. Neuronen wurden in der IF über ihre Reaktivität mit einem Neurofilament-spezifischen monoklonalen Antikörper identifiziert (vergl. Kap. 2.2.1.4.). Im Einzelfall, z.B. bei fehlender Eindeutigkeit der Neurofilament-Färbung oder bei starker Hintergrundfärbung, wurde darüber hinaus die spezifische Struktur neuronaler Nuklei in der DAPI-Färbung berücksichtigt. Wie in Abb. H2 gezeigt stellten sich neuronale Zellkerne i.d.R. fleckig aufgelockert dar und waren dunkler und größer als die Kerne nicht-neuronaler Zellen.

Zellen, die den genannten Kriterien nicht entsprachen, wurden nur durch das Vorhandensein eines DAPI-gefärbten Zellkern charakterisiert und ohne weitere Differenzierung als Begleitzellen bzw. nicht-neuronale Zellen klassifiziert. Dabei galten Zellen als produktiv infiziert bzw. Antigen-positiv, wenn DAKO-Färbung und DAPI-Färbung kolokalisiert auftraten (vergl. Abb. H2 und H3).

In der IF-mikroskopischen Auswertung fanden die Anzahl Antigen-positiver Neurone und die Anzahl Antigen-positiver Begleitzellen der TG einer DK Berücksichtigung. Um die Menge positiver Neuronen (und gegebenenfalls Begleitzellen) in Beziehung zur TG-Paar-Größe setzen zu können, wurde zudem die Gesamtanzahl an Neuronen einer DK bestimmt (vergl. Kap. 2.2.4.2.). Darüber hinaus wurden starke Abweichungen der Gesamt-Neuronen-Zahl nach unten als Indiz für eine mögliche Schädigung der TG gewertet (vergl. Kap. 3.2.3.; , vergl. Kap. 4.4.).

Zwölf Stunden nach der Infektion betrug die mittlere Anzahl an Neuronen pro DK 616, wovon durchschnittlich 15 Neuronen HSV-1-Antigen-positiv waren. Das entsprach einem Anteil von 2,3% (Median = 2,1%). Es waren durchschnittlich 92 Begleitzellen infiziert; der Median wich mit einem Wert von 66,5 deutlich vom Mittelwert ab (vergl. Tab. 1).

In der 24-Stunden-Gruppe waren im Mittel 53 von 855 Neuronen Antigen-positiv, was einer Infektionsrate von 6,8% entsprach (Median = 6,5%). Es fanden sich durchschnittlich 666 infizierte Begleitzellen (vergl. Tab. 2).

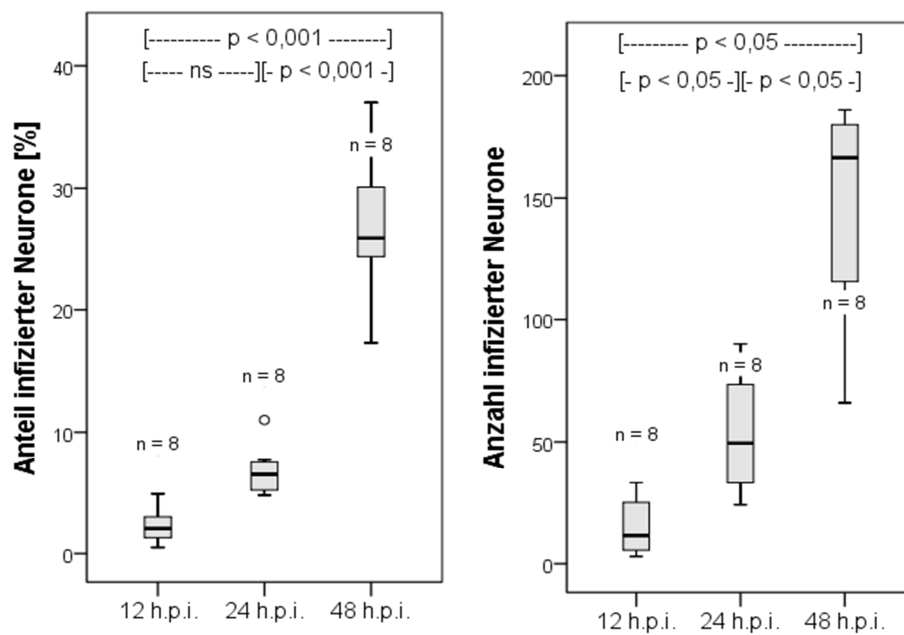
Nach 48 Stunden waren 26,9% der Neuronen HSV-1-Antigen-positiv; dies entsprach durchschnittlich 147 produktiv infizierten Neuronen pro DK. Der Median betrug 25,9%. Pro Kammer waren durchschnittlich mehr als 1500 Begleitzellen infiziert. Die mittlere Neuronenanzahl lag bei 544 je DK (vergl. Tab. 3).

In der mock-infizierten Kammer fanden sich keine markierten Zellen. Mit 421 Neuronen lag die Kontrolle im unteren Bereich der Verteilung der entsprechenden Versuchsgruppe.

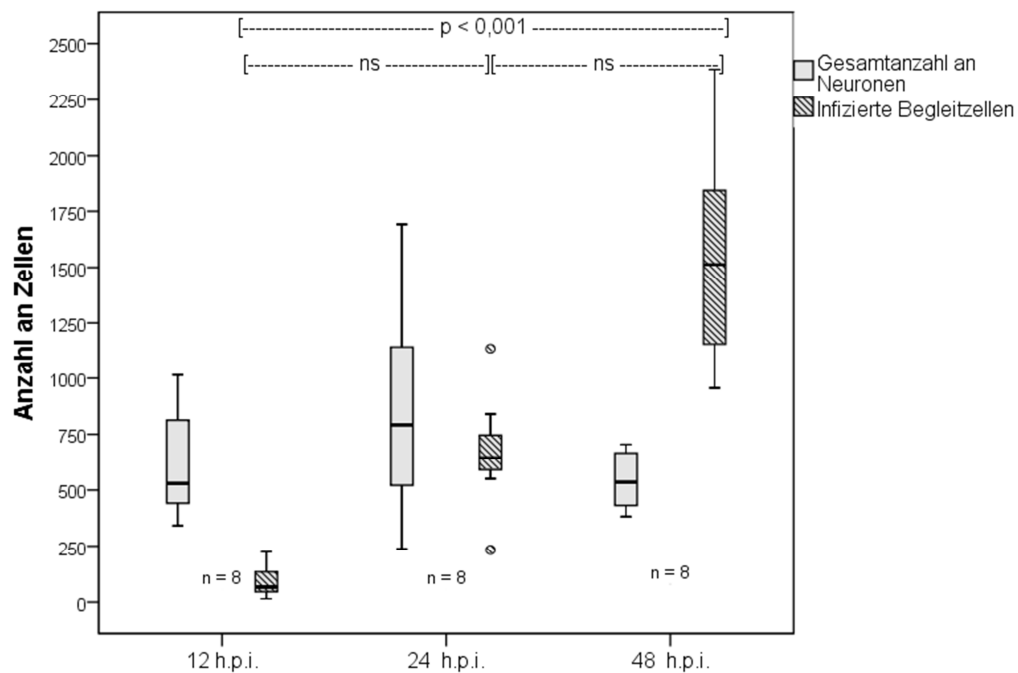
Ein Vergleich der Anteile infizierter Neurone in der 12- bzw. 24-Stundengruppe gegenüber dem Zustand nach 48 Stunden zeigte eine signifikante Steigerung (jeweils $p < 0,001$, Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test). (Der Unterschied zwischen den Gruppen 12 h.p.i. und 24 h.p.i. war statistisch nicht signifikant.) Hinsichtlich der absoluten Anzahl infizierter Neurone unterschieden sich die Ergebnisse der drei Versuchsgruppen jeweils signifikant voneinander ($p < 0,05$; Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test; vergl. Boxplot 1).

Die absoluten Anzahlen infizierter Begleitzellen waren nur 24 h.p.i. und 48 h.p.i. normalverteilt; Die Gruppen 12 h.p.i. und 48 h.p.i. unterschieden sich signifikant voneinander ($p < 0,001$, Dunn's Multiple Comparisons Test; vergl. Boxplot 2).

Das mediane Verhältnis der Anzahlen infizierter Begleitzellen zur Gesamtanzahl an Neuronen der gleichen DK stieg von zunächst rund 0,1, auf 0,8 und zuletzt 2,7 Begleitzellen pro Neuron. Dabei waren die Unterschiede zwischen der 12- und 24-Stundengruppe gegenüber der Gruppe 48 h.p.i. jeweils statistisch signifikant (Dunn's Multiple Comparisons Test).



Boxplot 1: Verlauf einer Infektion der IC mit HSV-1 (1): Relative (l.) und absolute (r.) Häufigkeiten infizierter Neurone zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit einer Infektionsdosis von $5,5 \times 10^5$ PFU ohne Zusatz potentieller Stimulanzen. Die Häufigkeiten infizierter Neurone unterlagen in allen Gruppen der Gauß'schen Verteilung. **Links:** Die Zunahme der Infektionsrate 48 h.p.i. gegenüber den vorherigen Zeitpunkten war signifikant. **Rechts:** Die mittleren Anzahlen infizierter Neurone aller Versuchsgruppen unterschieden sich jeweils signifikant voneinander. Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test.



Boxplot 2: Verlauf einer Infektion der IC mit HSV-1 (2): Darstellung der Gesamtneuronenanzahl (grau unterlegt) gegenüber der Anzahl infizierter Begleitzellen (schraffiert) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit einer

Infektionsdosis von $5,5 \times 10^5$ PFU. Kein Zusatz potentieller Stimulanzen. Die Gesamtanzahlen an Neuronen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (ANOVA). In allen Gruppen waren die Neuronquantitäten normalverteilt. Die Anzahl infizierter Begleitzellen war nur zu den Zeitpunkten 24 h.p.i. und 48 h.p.i. normalverteilt. Die Mediane der 12- und 48-Stundengruppe unterschieden sich signifikant voneinander (Dunn's Multiple Comparisons Test).

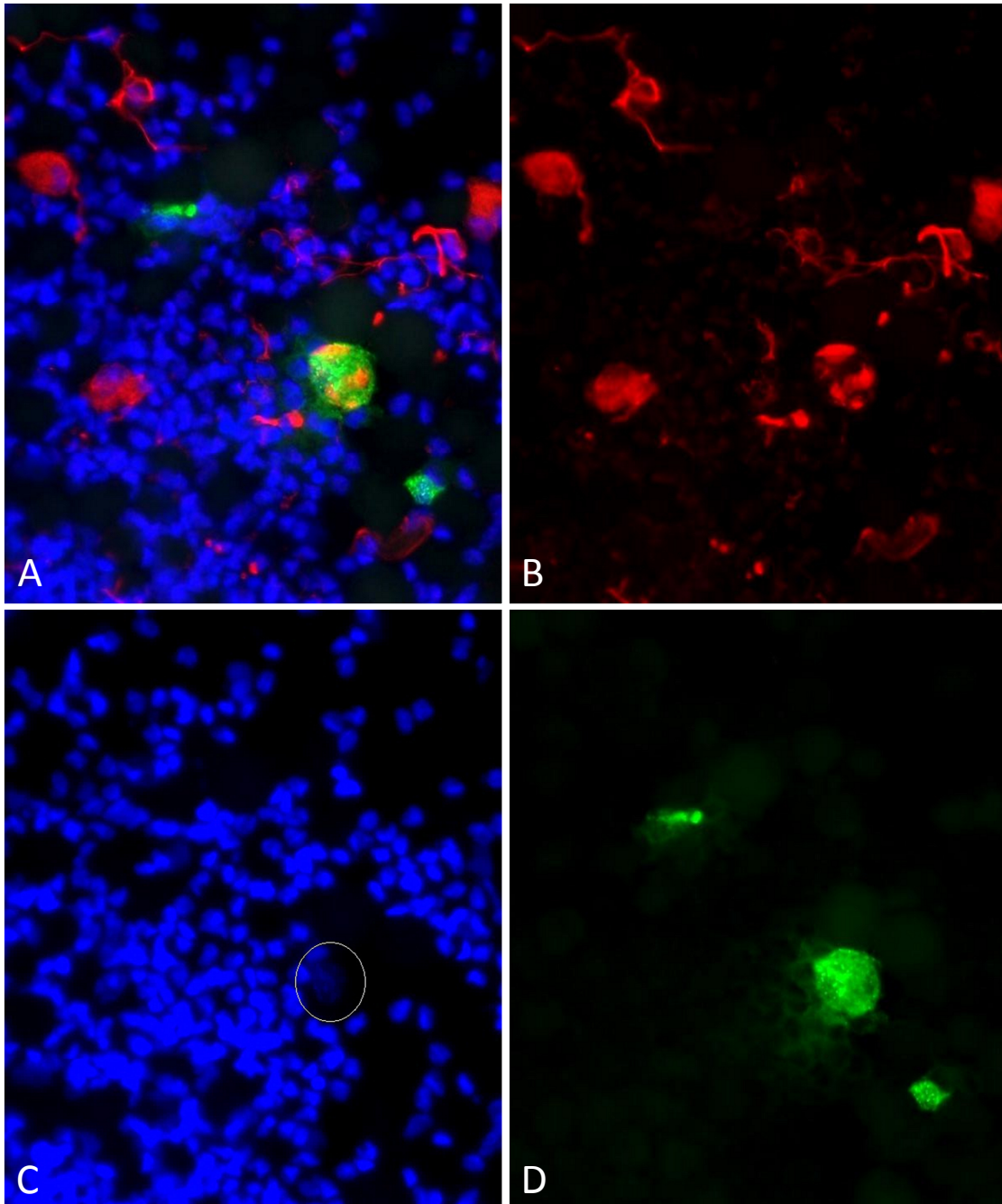


Abb. H2: Typisches Ergebnis der IF-Färbung. 12 h.p.i. **A:** Overlay der Felder B – D. Rechts unterhalb des Bildzentrums befindet sich ein Antigen-positives Neuron. Sechs Antigen-negative Neurone sind in den oberen zwei Dritteln des Bildes halbkreisförmig angeordnet. **B:** In der Neurofilament-Färbung stellen sich Neurone rötlich dar. **C:**

DAPI-gefärbte Zellkerne. Die Abbildung illustriert beispielhaft die typisch dunkel-fleckige Erscheinungsform neuronaler Zellkerne. **D:** Die DAKO-Färbung (grün) markiert HSV-Antigene. Es sind zwei produktiv infizierte Begleitzellen abgebildet. Vergrößerung 400-fach.

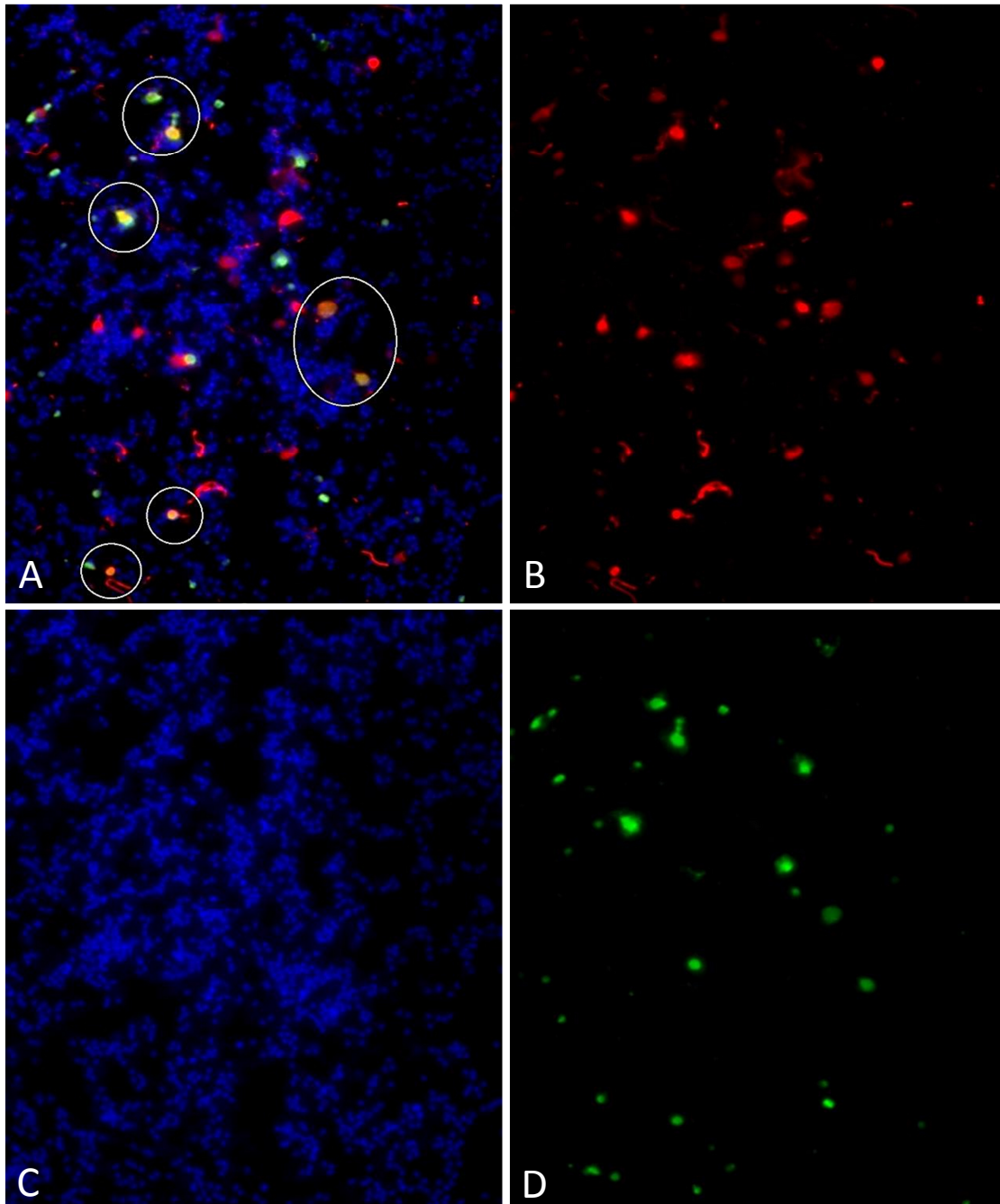


Abb. H3: Typische Darstellung einer HSV-1-Infektion der IC mit $5,5 \times 10^5$ PFU zum Zeitpunkt 24 h.p.i. in der IFT-Auswertung. **A:** Overlay der Panels B – D. Als Antigen-positiv angesehene Neurone sind weiß umrandet. Auf die Häufigkeit produktiv infizierter Begleitzellen wurde durch die Kolo-kalisation von DAKO- und DAPI-Färbung geschlossen. **B:** In der Neurofilament-Färbung stellen sich Neurone rötlich dar. **C:** DAPI-gefärbte Zellkerne (blau). **D:** Die DAKO-Färbung (grün) zeigt das Vorhandensein von HSV-Antigenen an. Vergrößerung 160-fach.

3.1.1.2. Infektion der Außenkammer mit HSV-1

Der Versuch sollte zeigen, wie sich eine axonale Infektion mit HSV-1 im TG-Modell auswirkt. Zur Auswertung wurde die Methode der IF-Mikroskopie genutzt (vergl. Kap. 2.2.4.). 21 DK aus zwei verschiedenen Präparationsgruppen wurden mit einem Inokulum von $2,6 \times 10^7$ PFU in der OC infiziert. Elf DK wurden 22 Stunden, zehn DK 46 Stunden nach Versuchsbeginn geerntet. Zwei DK wurden mock-infiziert (Ernte 22 h.p.i.). Es wurden keine potentiell infektionsfördernden Substanzen verwendet.

Nach 22 Stunden fanden sich in elf DK bei einem Mittelwert von 625 Neuronen pro DK insgesamt zwei HSV-1-Antigen-positive Neurone. Die Neuronanzahlen waren nicht normalverteilt (Median = 662). Es wurden in vier DK insgesamt sechs infizierte Begleitzellen gesehen (vergl. Tab. C1).

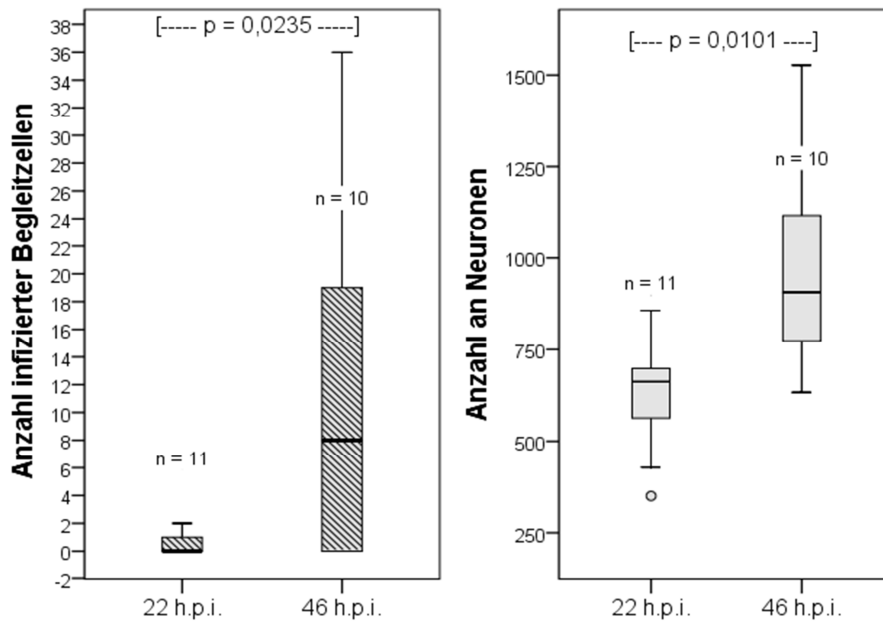
Im 46-Stunden-Versuch erhöhte sich die Anzahl der DK mit Antigen-positiven Zellen. Die Zahl infizierter Neuronen stieg auf insgesamt 13, in sechs von zehn Kammern war kein Neuron Antigen-positiv. Die mittlere Anzahl infizierter Begleitzellen erhöhte sich auf rund 16, wobei nur in drei Kammern gar keine Zellen – Neurone eingeschlossen – infiziert waren (Median = 8 Begleitzellen) (vergl. Abb. H4). Der Durchschnittswert für die Neuronenanzahl lag bei 964; eine Normalverteilung der Werte lag vor (vergl. Tab. C2).

In den mock-infizierten TG-Paaren wurden keine IF-markierten Zellen nachgewiesen. Die Zählung ergab 884 bzw. 766 Neurone; beide Werte lagen im oberen Bereich der Verteilung der 22-Stunden-Versuchsgruppe.

Beim Vergleich der Ergebnisse zu den betrachteten Messpunkten fiel auf, dass sich nach 46 Stunden *innerhalb* der Kammern, die generell HSV-1-Antigen-*positive* Neuronen enthielten, die Anzahl dieser infizierter Neurone tendenziell erhöhte. Betrachtete man nur diese Neuron-positiven Kammern, lag die Infektionsrate an Tag 2 bei rund 0,4%. Deutlicher trat diese Beobachtung bei nicht-neuronalen Zellen hervor: Die Mediane der Kammern, die sich durch das Auftreten Antigen-positiver Begleitzellen auszeichneten, unterschieden sich mit $p = 0,0061$ signifikant (1,5 Zellen 22 h.p.i. vs. 22,6 Zellen 46 h.p.i.) (vergl. Boxplot 3).

Allerdings gab es zum Zeitpunkt 46 h.p.i. auch insgesamt mehr Neurone auf den OT: Die Gesamtneuronanzahl unterschied sich gegenüber dem Zeitpunkt 22 h.p.i. signifikant ($p = 0,0101$, Mann-Whitney Test) (vergl. Boxplot 3). Trotzdem waren die Anzahlen infizierter Begleitzellen innerhalb der DK, in denen Begleitzellen Antigen-positiv waren, im Verhältnis zur

jeweiligen Neuronenzahl mit $p = 0,0061$ signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-Test). (Die Summen infizierter Begleitzellen wurden in Relation zur jeweiligen Gesamtneuronenzahl gesetzt, um der Annahme Rechnung zu tragen, dass mit der Anzahl an Neuronen einer DK auch die Menge an Begleitzellen steigt.)



Boxplot 3: Verlauf einer HSV-1-Infektion der OC: Absolute Anzahl infizierter Begleitzellen (l.) und Gesamtanzahl an Neuronen (r.) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion der OC mit einer Dosis von $2,6 \times 10^7$ PFU.

Links: Die Mediane infizierter Begleitzellen aller DK unterschieden sich signifikant voneinander; auch die Mediane der DK, die Antigen-positiven Begleitzellen enthielten, unterschieden sich mit signifikant ($p = 0,0061$). Mann-Whitney-Test. (Der Übersicht halber nicht mitabgebildet ist ein Ausreißer zum Zeitpunkt 46 h.p.i. mit einem Wert von 63.)

Rechts: Die Neuronenzahlen der Betrachtungszeitpunkte unterschieden sich signifikant ($p = 0,0101$). Zeitpunkt 22h.p.i.: Keine Normalverteilung. Zeitpunkt 46 h.p.i.: Normalverteilung lag vor. Trotzdem waren die Anzahlen infizierter Begleitzellen (innerhalb der DK mit Antigen-positiven Begleitzellen) im Verhältnis zur Neuronenzahl mit $p = 0,0061$ signifikant unterschiedlich. Mann-Whitney-Test. (Es handelte sich um zwei zu verschiedenen Zeitpunkten explantierte TG-Gruppen.)

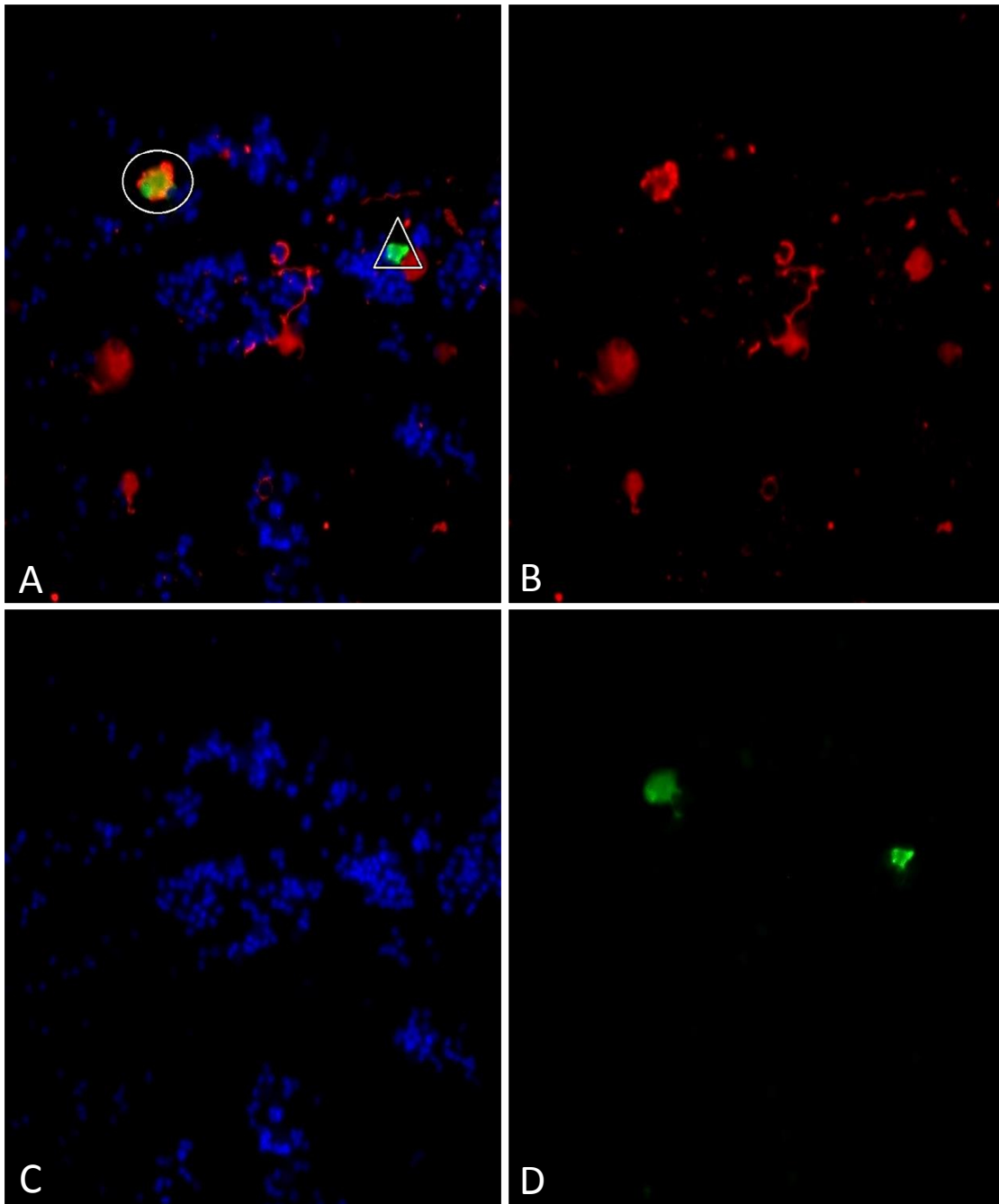


Abb. H4: Darstellung eines typischen Ergebnisses einer retrograden HSV-1-Infektion mit $2,6 \times 10^7$ PFU zum Zeitpunkt 46 h.p.i. in der IFT-Auswertung (DK 2, vergl. Tab. C2). **A:** Overlay der Panels B – D. Ein einzelnes infiziertes Neuron (Oval) und eine infizierte Begleit-zelle (Dreieck) sind markiert. **B:** Neurone in der Neurofilament-Färbung. **C:** DAPI-gefärbte Zellkerne. **D:** HSV-1-Antigene in der DAKO-Färbung. Vergrößerung 200-fach.

3.1.1.3. Empfänglichkeit des Trigeminal-Modells für eine produktive HSV-1-Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten nach Explantation

Ziel des Versuchs war es zu ermitteln, ob das TG-Modell nach 12/13 Tagen bzw. 19/20 Tagen *post explantationem* prinzipiell noch für HSV-1-Infektionen suszeptibel war. Der Zeitpunkt 12/13 Tage nach Explantation entsprach dabei formal dem Zeitpunkt 8 d.p.i. in den nachfolgenden Versuchen zur Reaktivierbarkeit von HSV-1 mittels verschiedener Substanzen (vergl. Kap. 3.1.2.1.2.; Kap. 3.1.2.4.2.; Kap. 3.1.2.3.2.; Kap. 3.1.2.2.2.).

Zu den genannten Zeitpunkten wurden je fünf DK im äußeren respektive inneren Kompartiment infiziert, je fünf DK wurden mock-infiziert. Für die OC-Infektion lag die Infektionsdosis bei 5×10^6 PFU, für die IC-Infektion bei 5×10^5 PFU. Alle Teilversuche wurden 48 h.p.i. beendet. Die TG-Zellen wurden fluoreszenzgefärbt (vergl. Kap. 2.2.4.1.).

Infektion an Tag 12/13:

Bei Infektion der IC 12/13 Tage nach Explantation waren 48 h.p.i. im Mittel 51 Neurone Antigen-positiv. Dies entsprach 14,8% (Median = 17,8%). Alle DK waren Antigen-positiv. Die mittlere Neuronenzahl pro DK betrug 360. Durchschnittlich wurde eine Anzahl von 288 infizierten Begleitzellen ermittelt (vergl. Tab. C3). Die genannten Infektionsparameter waren normalverteilt.

Im axonalen Infektionsmodus wurden in keiner der fünf DK Antigen-positive Neurone nachgewiesen; in zwei der Kammern fanden sich je vier infizierte Begleitzellen. Die mittlere Neuronenzahl erreichte einen Betrag von 431 (Median = 458,0; SD = 58,1).

In der Mock-Infektionsgruppe gab es keine Antigen-positiven Zellen. Die durchschnittliche Anzahl an Neuronen betrug hier 435 (Median = 399,0; SD = 151,5).

In allen drei Versuchsgruppen waren die Neuronenzahlen normalverteilt und nicht signifikant unterschiedlich voneinander (ANOVA).

Infektion an Tag 19/20:

Die IC-Infektion erbrachte einen Mittelwert von 16,5% infizierten Neuronen (Median = 20,1%). Dies entsprach 83 Zellen. Alle DK waren Antigen-positiv. Aus jeder DK wurden im Mittel 560 Neurone auf den OT übertragen. Die mittlere Anzahl infizierter Begleitzellen lag bei 582 (vergl. Tab. C4). Die Werte der genannten Parameter folgten der Normalverteilung.

In den OC-infizierten DK wurden weder infizierte Neurone noch Begleitzellen gesehen. Durchschnittlich befanden sich 176 Neurone pro DK auf den OT (Median = 115,0; SD = 137,3).

Alle mock-infizierten DK waren Antigen-negativ, die mittlere Neuronenzahl betrug 185 (Median = 186,0; SD = 107,4).

Für alle drei Gruppen ergab sich eine Gauß'sche Verteilung bezüglich der Neuronenquantitäten. Die Neuronenzahlen von IC- vs. OC-Infektion bzw. Mock-Infektion differierten mit $p < 0,01$ statistisch signifikant (Tukey-Kramer-Test) (vergl. auch Kap. 4.4.).

Die Mittelwerte infizierter Begleitzellen in den IC-Infektionen unterschieden sich zu den verschiedenen Zeitpunkten signifikant ($p = 0,0115$, t-Test). In der an Tag 19/20 infizierten Gruppe waren circa doppelt so viele Begleitzellen infiziert wie in der Vergleichsgruppe. Bezogen auf die Anzahl der Begleitzellen einer DK in Relation zur jeweiligen Gesamtneuronenzahl ergab sich bei Mittelwerten von 0,8 infizierten Begleitzellen pro Neuron (12/13-Tage) vs. 1,1 (19/20-Tage) aber kein signifikanter Unterschied ($p = 0,1894$, t-Test).

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass die Neurone der TG noch 20 Tage nach Explantation vital waren und eine produktive HSV-1-Infektion unterstützten. Nach axonaler Infektion wurde zu den betrachteten Zeitpunkten aber keine Antigen-positiven Neurone detektiert. Die Messgenauigkeit der OC-Infektion der 19/20-Tage-Gruppe wurde durch Schwankungen in der auf den OT gezählten Neuronanzahlen eingeschränkt.

3.1.1.4. Kinetik Antigen-positiver Doppelkammern nach retrograder Infektion mit HSV-1

Anhand der Versuchskontrollen der OC-Infektionen aus Kap. 3.1.2.1., Kap. 3.1.2.2., Kap. 3.1.2.3., Kap. 3.1.2.4. und Kap. 3.3.2.1. konnte eine Verlaufsbeobachtung der Anzahl Antigen-positiver TG-Paare nach retrograder HSV-1-Infektion vorgenommen werden (vergl. auch Kap. 4.3.).

Zu beachten ist, dass in allen Kontrollen jenseits von Tag 8 nach Infektion zum Zeitpunkt 8 d.p.i. ein Mediumwechsel erfolgte. Bei Kontrollen für Infektionen mit Rapamycin und Valproat wurden ebenfalls zusätzliche Mediumwechsel durchgeführt. Die Infektionsdosis betrug in allen Gruppen 5×10^6 PFU.

Die meisten Daten lagen für die Zeitpunkte 4 d.p.i., 8 d.p.i und 12 d.p.i. vor: Das Maximum an DK mit Antigen-positiven Neuronen war 4 d.p.i. zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt waren innerhalb Antigen-positiver Kammern auch mehr Neurone infiziert als zu anderen Zeitpunkten. Spätestens ab Tag zehn nach retrograder Infektion war eine abnehmende Tendenz in der Häufigkeit Antigen-positiver DK zu erkennen. Die Beobachtung war statistisch aber nicht

signifikant (Fisher's Exact Test). Gleiches galt für die Anzahl Antigen-positiver Neurone innerhalb dieser DK. Eine Auflistung der Daten kann Tab. H1 entnommen werden (Haupttext).

Eine Assoziation zwischen dem Vorkommen infizierter Neuronen und Begleitzellen war zwar offensichtlich, es gab aber auch Ausnahmen: In 88 Kontroll-DK (verschiedener Zeitpunkte) wurde in zwei Fällen bei Detektion eines infizierte Neurons keine infizierten Begleitzellen gefunden. In vier Fällen waren umgekehrt keine infizierten Neuronen detektierbar. (In 17 der genannten 88 DK waren Neurone und / oder Begleitzellen infiziert.)

Ein Vergleich der Zellanzahlen über den Zeitraum von 24 Stunden bis 12 Tage nach axonaler Infektion legte eine insgesamt abnehmende Tendenz hinsichtlich der Neuronquantitäten auf den OT offen:

Insbesondere die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten 24 h.p.i., 48 h.p.i. und 4 d.p.i vs. 10 d.p.i. und 12 d.p.i. waren mit p-Werten kleiner 0,05 signifikant (Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test). Zum Zeitpunkt 4 d.p.i. lag der Mittelwert z.B. bei 502 Neuronen pro DK, während 12 d.p.i. im Mittel nur eine Anzahl von 327 Neuronen pro DK bestimmt wurde. Der Zeitpunkt 9 d.p.i. (mit nur fünf DK) stellte eine Ausnahme dar (Mittelwert = 528). Die Neuronanzahlen aller Gruppen unterlagen der Gauß'schen Verteilung.

Kontrollreihe von Zeitpunkt [...] nach OC-Infektion	Verhältnis Antigen-positiver DK (bzgl. Neuronen) zur Anzahl betrachteter DK	Anzahl betrachteter Präparationsserien	Anzahl Antigen-positiver Neurone in Antigen-positiven DK	Anzahl Antigen-positiver Begleitzellen in Antigen-positiven DK
1 d.p.i.	1 von 5	1	1	0
2 d.p.i.	1 von 11	2	1	2
4 d.p.i.	5 von 17	3	1; 2; 6; 8; 17	1; 14; 60; 69; 110
8 d.p.i.*	2 von 15	2	1; 1	12; 16
9 d.p.i.	2 von 5	1	2; 3	13; 22; 39
10 d.p.i.	0 von 9	1	0	0
12 d.p.i.	2 von 26	4	1; 1	2; 3; 4; 14

Tab. H1: Betrachtung verschiedener Zeitpunkte nach axonaler Infektion hinsichtlich der Anzahl an DK mit Nachweis HSV-1-Antigen-positiver Neuronen bzw. Begleitzellen. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU. Ab Tag 10 nach retrograder Infektion war eine abnehmende Tendenz Antigen-positiver Neurone zu erkennen.

* Nur ein Drittel der TG-Suspension wurde per IF-Mikroskopie ausgewertet (vergl. Kap. 3.3.2.1.).

3.1.2. Infektionsversuche mit HSV-1 unter Einfluss potentieller Stimulanzen

Im Folgenden wurde die Wirkung verschiedener potentieller chemischer Reaktivierungsstimuli auf den Infektionsverlauf von HSV-1 in verschiedenen Infektionsmodi betrachtet. Es kamen die Substanzen HMBA, Valproat, Rapamycin, DMSO und Forskolin zum Einsatz (vergl. Kap. 4.5. – 4.8.); die Exposition fand stets in beiden Kompartimenten der DK statt. Zur Auswertung diente die bereits in Kap. 3.1.1. angewandte und beschriebene Methode der IF-Mikroskopie (vergl. Kap. 2.2.4.).

3.1.2.1. Effekt von HMBA auf den Verlauf der HSV-1-Infektion in Trigeminalganglien-Explantaten

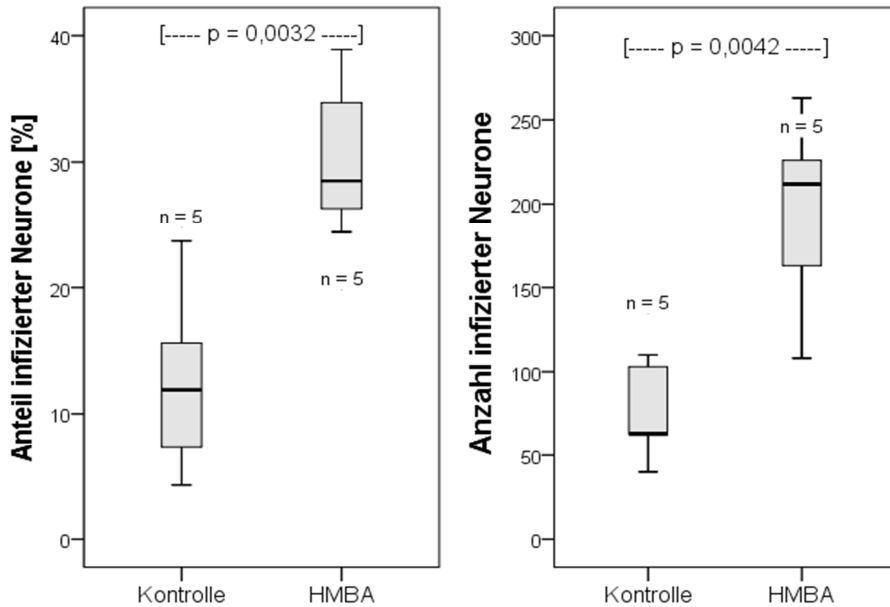
3.1.2.1.1. Effekt von HMBA auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment des Trigeminal-Modells

Es wurde die Wirkung von HMBA auf eine Infektion des Ganglion-Kompartiments der DK untersucht. Versuchs- und Kontrollgruppe umfassten je 5 DK. Nach Infektion mit 5×10^4 PFU HSV-1 wurde den DK der Versuchsgruppe 2,5 mM HMBA zugegeben. 48 h.p.i. wurde der Versuch beendet.

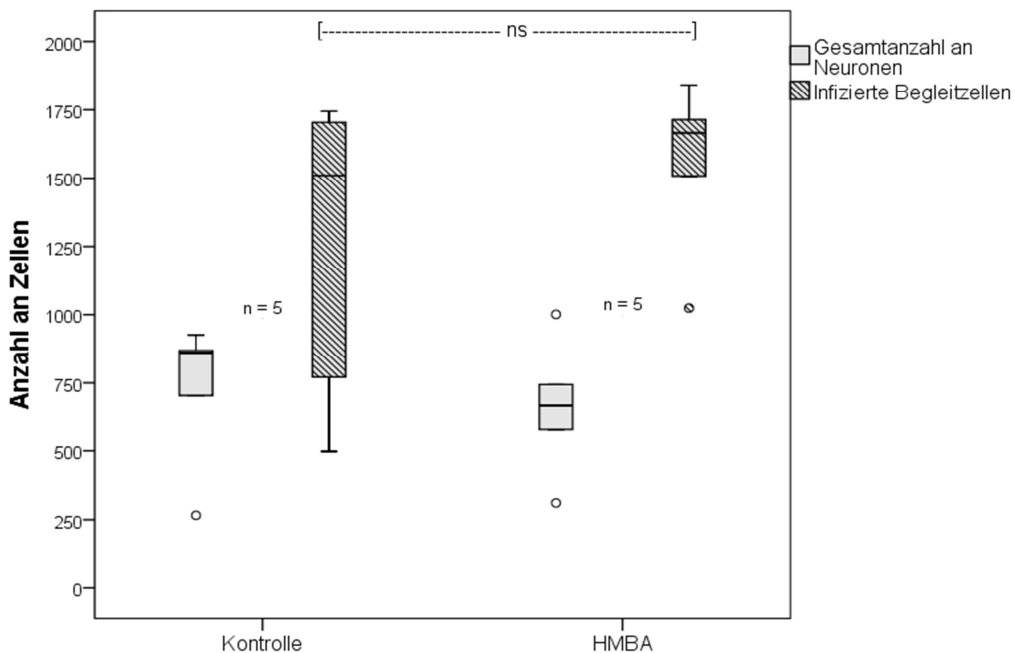
In der Versuchsgruppe mit HMBA betrug die mittlere Infektionsrate der Neurone 30,6% (Median = 28,5%), während in der Kontrollgruppe 12,6 % der Neurone Antigen-positiv waren (Median = 11,9%). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p = 0,0032$, t-Test) und wird exemplarisch in Abb. 1 illustriert. Versuchs- und Kontrollgruppe unterschieden sich mit durchschnittlich 194 gegenüber 76 Antigen-positiven Neuronen pro DK auch bei Betrachtung absoluter Anzahlen signifikant ($p = 0,0042$, t-test) (vergl. Tab. 4 und 5; vergl. Boxplot 4).

Die Kammern der Versuchsgruppe enthielten im Durchschnitt 661 Neurone (Median = 668), die der Kontrollgruppe 725 Neurone (Median = 860) (vergl. Boxplot 5).

Die durchschnittlichen Mengen infizierter Begleitzellen wurden wie Kap. 2.2.4.2. beschrieben durch Auszählen von sechs Gesichtsfeldern auf circa 1600 unter HMBA (1551) bzw. circa 1200 in den Kontroll-DK (1246) hochgerechnet; sie unterschieden sich nicht statistisch signifikant (t-Test) (vergl. Tab. 4 und 5, vergl. Boxplot 5). Die Verhältnisse infizierter Begleitzellen zur Gesamtneuronenzahl der entsprechenden DK zeigten ebenfalls keinen statistischen Unterschied auf (t-Test). Die Mittelwerte betragen unter HMBA 2,5 und in der Kontrollgruppe 1,9 infizierte Begleitzellen pro Neuron.



Boxplot 4: Effekt von HMBA auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment (1). Dargestellt sind die relativen (l.) und absoluten (r.) Häufigkeiten infizierter Neurone unter Zugabe von 2,5 mM HMBA gegenüber der Kontrollgruppe ohne HMBA. Zeitpunkt der Ernte war 48 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU. Die Zunahme der Häufigkeit infizierter Neurone unter HMBA war jeweils statistisch signifikant (t-Test). Alle Daten unterlagen der Normalverteilung.



Boxplot 5: Effekt von HMBA auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment (2). Darstellung der Gesamtneuronenanzahl (grau unterlegt) neben der Anzahl infizierter nicht-neuronaler Zellen (schraffiert) 48 Stunden nach Infektion der IC mit HSV-1 unter Zugabe von 2,5 mM HMBA gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU. Neuronquantität und Anzahl infizierter Begleitzellen der HMBA-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe (t-Test). Alle Daten unterlagen der Normalverteilung.

3.1.2.1.2. Effekt von HMBA auf den Verlauf der HSV-1-Infektion nach Infektion des axonalen Kompartiments

Nachdem gezeigt wurde, dass HMBA bei Infektion der IC infektionsbegünstigend wirkt, wurde der Effekt von HMBA auf eine axonale Infektion überprüft. Es wurden zwei verschiedene Infektionsdosen verglichen – $2,6 \times 10^7$ PFU und 5×10^6 PFU. In beiden Fällen wurden Daten für die Zeitpunkte 1 d.p.i. und 2 d.p.i., für die niedrigere Dosis darüber hinaus für die Zeitpunkte 4 d.p.i. und 8 d.p.i. gewonnen. Die HMBA-Konzentration betrug 2,5 mM.

3.1.2.1.2a. Effekt von HMBA auf den Verlauf einer axonalen HSV-1-Infektion bei einer Infektionsdosis von $2,6 \times 10^7$ PFU

Die Präparationseinheit umfasste 22 DK; für beide Messpunkte wurde je sechs Kammern in IC und OC HMBA zugesetzt, fünf Kammern dienten jeweils als Kontrolle ohne HMBA.

Im 24-Stunden-Versuch ergab sich ein Mittelwert von 491 Neuronen pro Kammer. Insgesamt waren 13 von circa 2950 Neuronen Antigen-positiv, wobei in zwei DK kein HSV-1-Antigen nachgewiesen wurde. Im Mittel entsprach dies 0,5% infizierten Neuronen pro DK; der Median lag bei 0,4%. Begleitzellen waren in allen Kammern infiziert (Mittelwert = 8,2 Zellen). 24 d.p.i. waren alle Infektionsparameter normalverteilt (vergl. Tab. 6).

In der Kontrollgruppe waren 24 h.p.i. zwei von insgesamt circa 3500 Neuronen Antigen-positiv. Die Neuronen entstammten einer DK. In derselben und einer weiteren Kammer fanden sich fünf bzw. zehn infizierte nicht-neuronale Zellen. Im Durchschnitt wurden 693 Neurone pro DK gezählt (vergl. Tab. 7).

Die mittleren Neuronanzahlen von Versuchs- und Kontrollreihe waren normalverteilt und unterschieden sich 24 h.p.i. nicht signifikant (t-Test).

Nach 47 Stunden erhöhte sich der Anteil produktiv infizierter Neurone unter Einfluss von HMBA auf 3,3% (Median = 2,7%). Von 646 Neuronen pro DK waren im Durchschnitt rund 18 Zellen infiziert. Nur in einer Kammer waren weder Neurone noch Begleitzellen Antigen-positiv. In allen übrigen Ganglionpaaren lag die Summe infizierter Begleitzellen bei mehr als 50 Zellen (vergl. Tab. 8).

In der Kontrollgruppe ergab sich entsprechend einem Mittelwert von 1,2 infizierten Neuronen bei durchschnittlich 731 Neuronen pro DK eine Infektionsrate von rund 0,2% (Median = 0,1%). In zwei Fällen war kein Neuron produktiv infiziert. Infizierte Begleitzellen waren in allen DK

nachweisbar; ihre Anzahl überschritt in keiner DK die Marke von 18 Zellen (Mittelwert = 12,8) (vergl. Tab. 9).

Obwohl die Infektionsraten von Versuchs- und Kontrollreihe stark differierten, war der Unterschied (mit $p = 0,0777$) nicht signifikant (t-Test, Welch-Korrektur). Hinsichtlich der absoluten Häufigkeit infizierter Neurone war hingegen festzustellen, dass der beobachtete Unterschied mit $p = 0,0399$ nicht hinreichend durch zufällige Schwankungen erklärt wurde. (t-Test, Welch-korrigiert) (vergl. Boxplot 6; vergl. Abb. 2).

Die Anzahl infizierter Begleitzellen streute 47 h.p.i. um Mittelwerte von 117 (HMBA) und 13 Zellen (Kontrolle). Das Ergebnis war mit $p = 0,0549$ gerade nicht statistisch signifikant (t-Test, Welch-Korrektur).

Das Verhältnis infizierter Begleitzellen zu den korrespondierenden Neuronquantitäten lag in der HMBA-Gruppe zwar um mehr als das 11-fache über dem der Kontrollgruppe; mit $p = 0,0876$ war dieser Unterschied ebenfalls nicht signifikant (t-Test, Welch-Korrektur) (vergl. Boxplot 7).

Vergleich der Zeitpunkte 24 h.p.i. vs. 47 h.p.i. in axonal infizierten Trigeminalganglien mit HMBA-Exposition:

Bezüglich der Neuronzellanzahlen unterschieden sich die gewählten Zeitpunkte unter Einfluss von 2,5 mM HMBA nicht (t-Test).

Der mittlere Anstieg der neuronalen Infektionsraten zwischen den Zeitpunkten 24 h.p.i. und 47 h.p.i. um den Faktor acht war (mit $p = 0,1045$) nicht statistisch signifikant (t-Test, Welch-Korrektur).

Bei der Quantifizierung der absolut infizierten Neurone ergab sich mit $p = 0,0490$ ein statistischer Unterschied zwischen den betrachteten Zeitpunkten (t-Test, Welch-Korrektur).

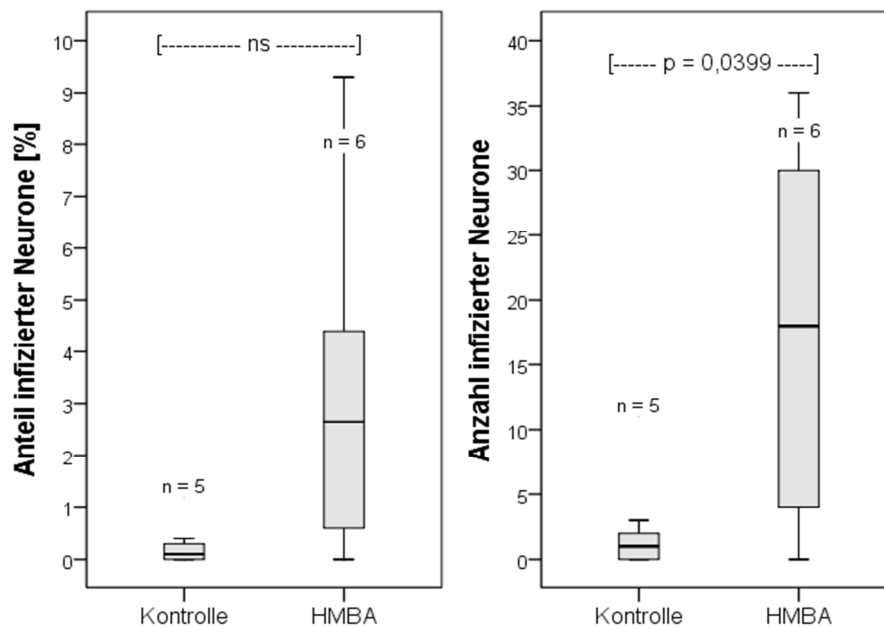
Die durchschnittliche Erhöhung der Anzahl infizierter Begleitzellen um mehr als das 14-fache war signifikant ($p = 0,0479$, t-Test, Welch-Korrektur).

Vergleich der Zeitpunkte 24 h.p.i. vs. 47 h.p.i. in axonal infizierten Trigeminalganglien ohne HMBA-Exposition:

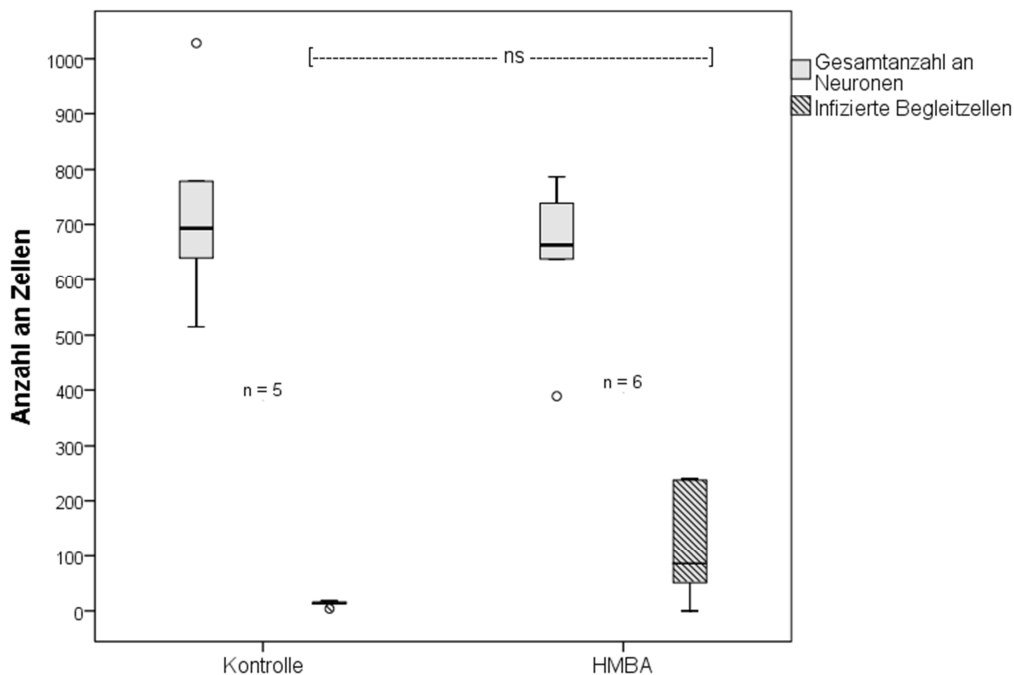
Während die Anzahl infizierter Neurone pro DK auf gleichem Niveau blieb, waren sowohl die Zunahme infizierter Begleitzellen als auch die Zunahme der Verhältnisse aus infizierten Begleitzellen und zugehöriger Neuronenanzahl signifikant ($p = 0,0317$ bzw. $p = 0,0159$, Mann-Whitney-Test).

Zudem zeichnete sich hinsichtlich der Anzahl der DK mit infizierten Begleitzellen eine Dynamik ab: Während nach 24 Stunden in zwei von fünf Kammern HSV-1-Antigene in Begleitzellen entdeckt wurden, waren nach 47 Stunden alle DK positiv.

Die mittleren Anzahlen an Neuronen unterschieden sich in den Kontrollgruppen zu den gewählten Zeitpunkten nicht signifikant (t-Test).



Boxplot 6: Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von $2,6 \times 10^7$ PFU (1). Darstellung der relativen (l.) und absoluten (r.) Häufigkeit infizierter Neurone zum Zeitpunkt 47 h.p.i. unter Zugabe von 2,5 mM HMBA gegenüber der Kontrollgruppe ohne HMBA. **Links:** Die Zunahme des Anteils infizierter Neurone war (mit $p = 0,0777$) nicht statistisch signifikant. **Rechts:** Die Erhöhung der absoluten Anzahl infizierter Neurone unter HMBA erreichte dagegen das 5%-Signifikanzniveau. t-Test, Welch-korrigiert. Alle Daten unterlagen der Normalverteilung.



Boxplot 7: Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von $2,6 \times 10^7$ PFU (2). Darstellung der Gesamtneuronenanzahl (hellgrau unterlegt) neben der Anzahl infizierter Begleitzellen (schraffiert) zum Zeitpunkt 47 h.p.i. unter dem Einfluss von 2,5 mM HMBA gegenüber der Kontrollgruppe ohne HMBA. Die Neuronanzahlen in Versuch und Kontrolle waren normalverteilt und unterschieden sich nicht signifikant (t-Test). Die Anzahl infizierter Begleitzellen waren normalverteilt und unterschieden sich mit $p = 0,0549$ (t-Test, Welch-Korrektur) gerade nicht signifikant voneinander.

3.1.2.1.2b. Effekt von HMBA auf den Verlauf einer axonalen HSV-1-Infektion bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU

Die Infektionsdosis wurde variiert und auf 5×10^6 PFU reduziert. Nach Betrachtung der Zeitpunkte 1 d.p.i. und 2 d.p.i. wurde der Versuch auf die Zeitpunkte 4 d.p.i. und 8 d.p.i. ausgedehnt.

Zeitpunkte 24 h.p.i. und 48 h.p.i.:

Nach 24 Stunden wurden unter HMBA-Zusatz in fünf von sechs Kammern HSV-1-Antigene in Neuronen und Begleitzellen detektiert. Es waren maximal zwei Neurone respektive 15 Begleitzellen infiziert. Eine DK war vollständig Antigen-negativ (vergl. Tab. C5).

In der 24-Stunden-Kontrolle war von über 3000 Neuronen in fünf DK nur eines produktiv infiziert, Begleitzellen waren nicht infiziert (vergl. Tab. C6).

Die Durchschnittswerte der Neuronanzahlen lagen bei in beiden Gruppen bei 621 Neuronen pro DK. Die Daten waren normalverteilt und unterschieden sich nicht signifikant (t-test).

Nach 48 Stunden war in der Versuchsgruppe in sechs DK nur eines von fast 2500 Neuronen infiziert. In dieser und einer weiteren Kammer fanden sich auch infizierte Begleitzellen (maximal 22 Zellen) (vergl. Tab. C7).

In der 48-Stunden-Kontrollgruppe war von fünf DK eine Kammer Antigen-positiv. Dort wurden ein infiziertes Neuron und zwei infizierte Begleitzellen gezählt (vergl. Tab. C8).

Die Durchschnittswerte der Neuronanzahlen lagen bei bei 414 (HMBA) respektive 578 (Kontrolle). Die Werte waren normalverteilt; es gab keinen signifikanten Unterschied.

Zeitpunkte 4 d.p.i. und 8 d.p.i.:

Zum Zeitpunkt 4 d.p.i. betrug die mittlere neuronale Infektionsrate unter Einfluss von HMBA 11,2% (Median = 8,7%). Dies entsprach durchschnittlich 53 infizierten Neuronen pro DK. Auf den OT fanden sich in der Gruppe mit HMBA im Mittel 544 Neurone pro Kammer; es waren durchschnittlich 642 nicht-neuronale Zellen infiziert, der Median lag bei 595. Es gab keine Antigen-negativen DK (vergl. Tab. 10; vergl. Abb. 3).

Im Kontrollversuch fiel die durchschnittliche Rate infizierter Neurone 4 d.p.i. mit 1,0% circa elfmal geringer aus als unter HMBA (Median = 0,0). In zwei von fünf Kontroll-DK waren Neurone Antigen-positiv (acht respektive 17 infizierte Neurone). Aus jeder DK wurden im Mittel 457 Neurone auf die OT übertragen (vergl. Tab. 11; vergl. Abb. 3).

Der Unterschied zwischen den Infektionsraten in Versuchs- und Kontrollgruppe war signifikant ($p = 0,0397$, t-Test, Welch-Korrektur bzw. $p = 0,0173$, Mann-Whitney-Test) (vergl. Boxplot 8).

Auch in der statistischen Betrachtung absolut infizierter Neurone zeigte sich mit $p = 0,0173$ ein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-Test) (vergl. Boxplot 9). (In der HMBA-Gruppe lag hier keine Normalverteilung vor, daher ausschließlich nicht-parametrisches Testverfahren.)

In der Kontrollgruppe wurden nur in zwei von fünf DK Antigen-positive Begleitzellen detektiert (Mittelwert = 25,8; Median = 0,0). Der Unterschied zwischen Versuch und Kontrolle war signifikant ($p = 0,0173$, Mann-Whitney-Test; vergl. Boxplot 10). Auch bei Bildung von Quotienten aus den Anzahlen infizierter Begleitzellen und der jeweiligen Gesamtneuronanzahl blieben die Unterschiede signifikant ($p = 0,0135$, Mann-Whitney-Test).

Zum Zeitpunkt 8 d.p.i. wurden durchschnittlich 393 (HMBA) respektive 351 (Kontrolle) Neuronen pro Kammer untersucht.

Unter HMBA-Exposition waren viel mehr Neurone produktiv infiziert als ohne Zusatz des Agens: Im Kontrollversuch war in zwei verschiedenen DK jeweils nur ein Neuron infiziert. In der HMBA-Gruppe dagegen streuten die Ergebnisse um Mittelwerte von 44 bzw. 12,7% infizierten Neuronen (Median = 11,1%) (vergl. Tab. 12 und 13). Der Unterschied zwischen den Gruppen war unter Betrachtung absoluter sowie relativer Häufigkeiten signifikant (jeweils $p = 0,0435$, Mann-Whitney-Test) (vergl. Boxplot 8 und 9).

Während in der HMBA-Gruppe fünf von sechs Kammern Antigen-positiv waren, fanden sich unter den Kontrollen nur zwei positive DK (von insgesamt fünf). In den Antigen-negativen DK beider Gruppen wurden auch keine infizierten Begleitzellen gesehen (vergl. Tab. 13).

Die Anzahl infizierter Begleitzellen betrug in der Gruppe mit Zusatz von HMBA im Mittel 356. In der Kontrollgruppe ohne HMBA wurde ein Maximum von 12 infizierten Begleitzellen erreicht, der Median lag bei 0. Die beiden Gruppen unterschieden sich signifikant ($p = 0,0435$, Mann-Whitney-Test) (vergl. Boxplot 11).

Auch bei Bildung von Quotienten aus den Anzahlen infizierter Begleitzellen und der jeweiligen Gesamtneuronenzahl blieben die Unterschiede signifikant ($p = 0,0435$, Mann-Whitney-Test).

Vergleich der Zeitpunkte 4 d.p.i. vs. 8 d.p.i.:

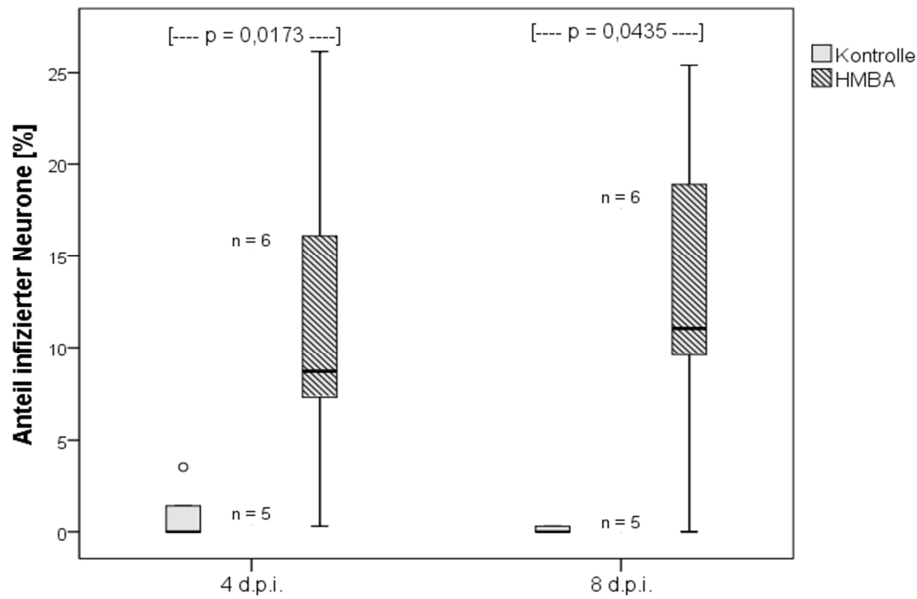
Es gab innerhalb der HMBA- respektive der Kontrollgruppen jeweils keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten 4 d.p.i. und 8 d.p.i. hinsichtlich der mittleren Neuronanzahl, der neuronalen Infektionsraten und der Anzahl infizierter Begleitzellen.

3.1.2.1.2c. Zusammenfassung: Effekt von HMBA auf eine axonale HSV-1-Infektion

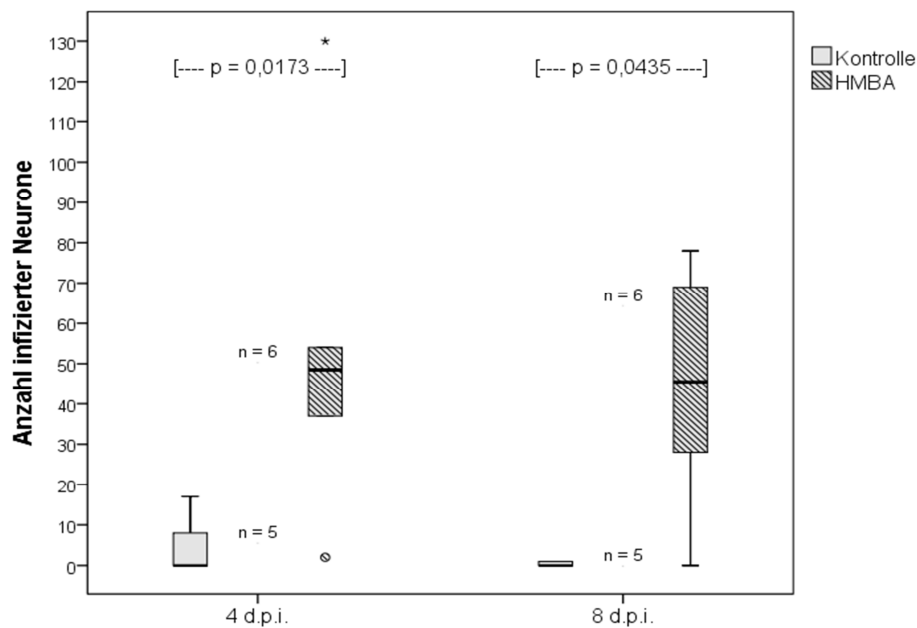
Es konnte gezeigt werden, dass HMBA die Entwicklung einer produktiven Infektion in TG von Hühnerembryonen bei retrogradem Infektionsmodus begünstigte.

Diese Beobachtung war sowohl für Zellen neuronalen Ursprungs als auch für Begleitzellen gültig.

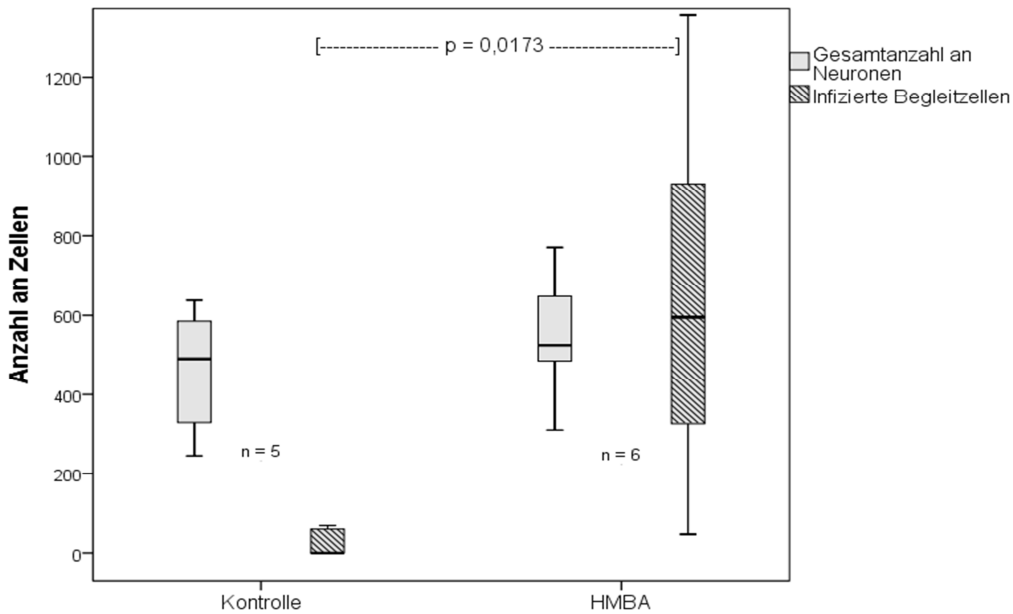
Die Kinetik des Infektionsverlaufes beschleunigte sich durch Erhöhung der Infektionsdosis von 5×10^6 PFU auf $2,6 \times 10^7$ PFU.



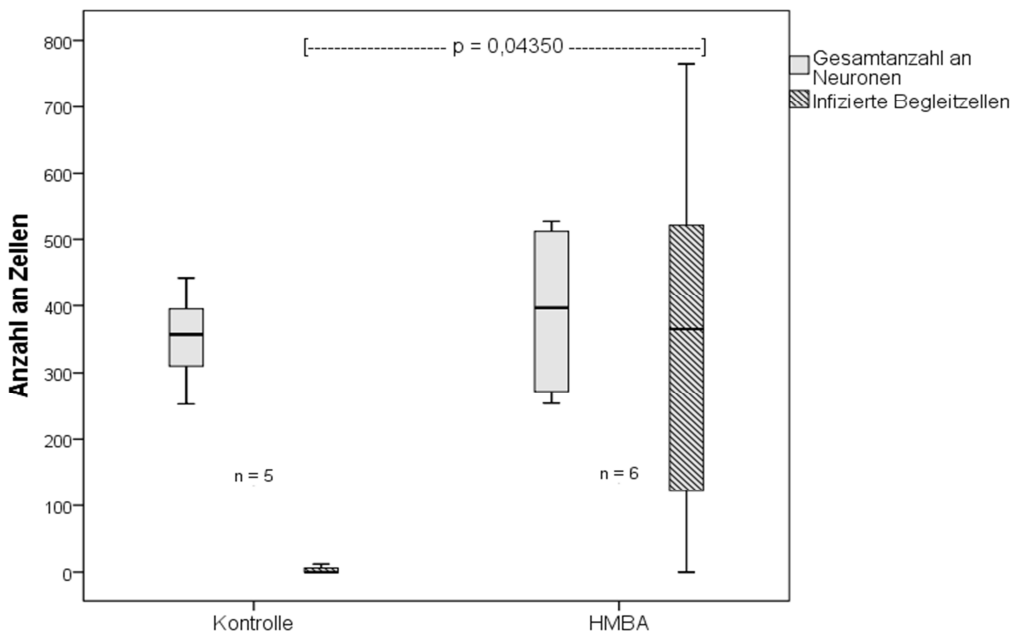
Boxplot 8: Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU (1). Darstellung des Anteils infizierter Neurone unter Einfluss von 2,5 mM HMBA gegenüber der Kontrollgruppe ohne HMBA. Zeitpunkte 4 d.p.i. und 8 d.p.i. Die Zunahme der Häufigkeit infizierter Neurone unter Zugabe von HMBA gegenüber der Kontrollgruppe war jeweils statistisch signifikant. Mann-Whitney-Test. Zum Zeitpunkt 8 d.p.i. waren die Werte der Kontrollgruppe nicht normalverteilt.



Boxplot 9: Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU (2). Darstellung der absoluten Anzahl infizierter Neurone unter Einfluss von 2,5 mM HMBA gegenüber der Kontrollgruppe ohne HMBA. Zeitpunkte 4 d.p.i. und 8 d.p.i. Die Zunahme der Häufigkeit infizierter Neurone unter Zugabe von HMBA gegenüber der Kontrollgruppe war jeweils statistisch signifikant. Mann-Whitney-Test. Zum Zeitpunkt 4 d.p.i. waren die Werte in der HMBA-Gruppe nicht normalverteilt; 8 d.p.i. waren die Werte der Kontrollgruppe nicht normalverteilt.



Boxplot 10: Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU (3). Darstellung der Gesamtneuronenanzahl und der Anzahl infizierter Begleitzellen mit und ohne Zugabe von HMBA zum Zeitpunkt 4 d.p.i. Die Neuronquantitäten in HMBA- und Kontrollgruppe waren normalverteilt und unterschieden sich nicht signifikant voneinander (t-Test). Die Anzahl infizierter Begleitzellen war nur in der HMBA-Gruppe normalverteilt. Die Unterschiede zwischen HMBA- und Kontrollgruppe in Hinblick auf die Anzahl infizierter Begleitzellen waren signifikant (Mann-Whitney-Test).



Boxplot 11: Effekt von HMBA auf den Verlauf einer HSV-1-Infektion im Axon-Kompartiment bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU (4). Darstellung der Gesamtneuronenanzahl neben der Anzahl infizierter Begleitzellen mit und ohne Zugabe von HMBA zum Zeitpunkt 8 d.p.i. Die Neuronquantitäten in HMBA- und Kontrollgruppe waren normalverteilt

und unterschieden sich 8 d.p.i. nicht signifikant voneinander (t-Test). Die Anzahl infizierter Begleitzellen war nur in der HMBA-Gruppe normalverteilt. Die Unterschiede zwischen HMBA- und Kontrollgruppe in Hinblick auf die Anzahl infizierter Begleitzellen waren signifikant (Mann-Whitney-Test).

3.1.2.1.3. Versuch zur Reaktivierbarkeit von HSV-1 durch HMBA

Es wurde getestet, ob HMBA in retrograd mit HSV-1 infizierten Trigeminalganglien eine Reaktivierung des Virus hervorrufen konnte.

23 Kammern wurden mit einer HSV-1-Dosis von 5×10^6 PFU axonal infiziert. Zum Zeitpunkt 8 d.p.i. wurde das Medium gewechselt. Bei 12 zufällig ausgewählten DK wurde das Medium mit 2,5 mM HMBA versetzt, die übrigen DK dienten als Kontrollen. Ergebnisse wurden ein bzw. vier Tage nach dem Mediumwechsel erhoben.

Tag 1 nach HMBA-Exposition:

24 Stunden nach dem Mediumwechsel wurden in der HMBA-Gruppe in zwei von sechs DK jeweils nur ein infiziertes Neuron gefunden. In zwei Kammern wurden infizierte Begleitzellen gesehen (insgesamt 7 Zellen). Im Mittel befanden sich auf einem OT 481 Neuronen; diese Daten unterlagen der Gauß'schen Verteilung (vergl. Tab. C9).

In der zugehörigen Kontrollreihe waren insgesamt fünf Neurone in zwei von fünf DK Antigen-positiv. Es waren mehr nicht-neuronale Zellen infiziert als in der HMBA-Gruppe; der Mittelwert betrug 15, der Median lag bei 13 infizierten Begleitzellen pro DK (vergl. Tab. C10).

Durchschnittlich lag die Anzahl an Neuronen pro DK bei 528; die Werte waren normalverteilt. Versuchs- und Kontrollgruppe unterschieden sich hinsichtlich der Neuronenanzahlen nicht signifikant (t-Test).

Tag 4 nach HMBA-Exposition:

Vier Tage nach dem Mediumwechsel fanden sich in der HMBA-Gruppe in vier von sechs Kammern einzelne infizierte Neurone. Es gab jedoch ein abweichendes Ergebnis: In einer Kammer waren 38 Neurone infiziert, was einer Infektionsrate von 10,1% entsprach. Dieser Ausreißer spiegelte sich in einem Gesamtmittelwert von 2,2% wider (Median = 0,6%).

In den Kammern, in denen infizierte Neurone nachgewiesen wurden, fanden sich auch infizierte Begleitzellen (Mittelwert = 57, Median = 32). Die Quantitäten infizierter Begleitzellen waren normalverteilt. Zwei DK waren vollständig Antigen-negativ (vergl. Tab. C11).

Die Kontrollgruppe umfasste sechs DK. Von insgesamt mehr als 2000 Neuronen war nur eines produktiv infiziert; in derselben DK waren auch 14 Begleitzellen infiziert. Darüber hinaus wurden infizierte Begleitzellen in geringem Maße in zwei weiteren Kammern (Mittelwert = 3, Median = 1,0) detektiert (vergl. Tab. C12).

Die absoluten Mengen infizierter Begleitzellen in Versuchs- und Kontrollgruppe waren normalverteilt und unterschieden sich zwar deutlich hinsichtlich ihrer Maxima, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (t-Test, Welch-Korrektur). Gleiches galt für die Quotienten aus infizierten Begleitzellen und korrespondierenden Neuronenzahlen ($p = 0,0779$, t-Test, Welch-Korrektur).

Die Anzahlen an Neuronen waren in Versuchs- und Kontrollgruppe normalverteilt und unterschieden sich nach viertägiger HMBA-Exposition nicht signifikant (t-Test). In der Versuchsgruppe lag der Mittelwert bei 346, in der Kontrollgruppe bei 334.

Das Ergebnis des Versuchs war nicht eindeutig. Zwar hatte HMBA einen Tag nach der Exposition keinen sichtbaren oder eher einen hemmenden Effekt auf eine mögliche Reaktivierung von HSV-1. An Tag 4 nach dem Mediumwechsel unterschied sich jedoch eine DK bezüglich der neuronalen Infektionsrate stark von den übrigen DK bzw. den DK der Kontrollgruppe; es waren in einigen Kammern zudem mehr Begleitzellen infiziert als in den Kontrollen. Um das Ergebnis des Reaktivierungsversuchs besser interpretieren zu können, wurde ein Teil des Versuchs wiederholt. Dazu wurden 15 DK wie beschrieben infiziert, acht von ihnen 8 d.p.i. mit HMBA behandelt und vier Tage später untersucht.

Die erhobenen Daten wichen von denen des oben beschriebenen Versuchs ab: In der Gruppe mit HMBA war in acht DK keines von über 3600 Neuronen produktiv infiziert. Auch Begleitzellen waren nicht infiziert. In der Kontrollgruppe waren in sieben DK ein Neuron und drei Begleitzellen infiziert; die übrigen Kammern waren vollständig Antigen-negativ.

Die mittleren Neuronanzahlen in Versuch und Kontrolle waren normalverteilt und unterschieden sich nicht signifikant (t-Test). Die Mittelwerte lagen in der HMBA-Gruppe bei 458 respektive 384 in der Kontrollgruppe.

Reaktivierbarkeit von HSV-1 durch HMBA-Behandlung – Zusammenfassung:

Die Ergebnisse der Versuchsdurchgänge wiesen in unterschiedliche Richtungen und erbrachten keinen Beweis dafür, dass HMBA in explantierten embryonalen Hühner-TG unter den gewählten Bedingungen eine Reaktivierung von HSV-1 aus dem latenten Zustand begünstigte.

3.1.2.2. Effekt von Valproat auf den Verlauf der HSV-1-Infektion in Trigeminalganglien-Explantaten

Es sollte getestet werden, ob die Substanz Valproat in explantierten TG in verschiedenen Infektionsmodi einen Effekt auf die Infektionsaktivität von HSV-1 besitzt. Methodisch wurden IF-Versuche durchgeführt wie in Kap. 2.2.4. respektive Kap. 3.1.1.1. beschrieben.

3.1.2.2.1. Effekt von Valproat auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment des Trigeminal-Modells

Zehn DK wurden mit einer Menge von 5×10^4 PFU HSV-1 in der IC infiziert. Fünf dieser DK waren vor der Infektion über eine Dauer von 22 Stunden mit 2,0 mM Valproat in beiden Kompartimenten vorbehandelt worden. In den fünf DK der Kontrollgruppe wurde zur gleichen Zeit lediglich ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach der Infektion wurde dem Medium der Versuchsgruppe Valproat in gleicher Konzentration zugesetzt. 46 h.p.i. wurde der Versuch beendet und die Zellen der TG wurden wie in Kap. 2.2.4.1. beschrieben fluoreszenzgefärbt.

Die Infektionsrate unter den Neuronen der Valproat-Gruppe betrug 13,3% (Median = 11,3%). In den Kontrollkammern lag der entsprechende Mittelwert mit 12,7% auf dem gleichen Niveau (Median = 14,1%). In absoluten Häufigkeiten ausgedrückt wurden im Mittel 74 Antigen-positive Neuronen in der Valproat-Gruppe und 87 in den Kontrollen gezählt.

Die mittlere Anzahl infizierter Begleitzellen pro DK betrug in beiden Gruppen über 1200 (1271 in der Valproat-Gruppe vs. 1367 in der Kontrollreihe). Im Mittel wurden auf den OT der beiden Gruppen 564 (Valproat) respektive 696 Neuronen (Kontrolle) gezählt.

Die Werte aller hier beschriebenen Daten waren normalverteilt; unter keinem der betrachteten Aspekte unterschieden sich Valproat- und Kontrollgruppe statistisch signifikant. Einen Überblick über die Ergebnisse geben Tab. C13 und Tab. C14.

3.1.2.2.2. Effekt von Valproat auf den Verlauf der HSV-1-Infektion nach Infektion des axonalen Kompartiments

Ziel war es, den möglichen Effekt von 2,0 mM Valproat auf eine axonale HSV-1-Infektion fluoreszenzmikroskopisch zu quantifizieren. Die explantierten TG wurden 22 Stunden lang mit Valproat vorbehandelt; vor der Infektion mit 5×10^6 PFU HSV-1 wurden die Neuriten aller Kammern lichtmikroskopisch auf morphologische Unversehrtheit geprüft (vergl. Abb. C1). Nach Infektion mit 5×10^6 PFU HSV-1 wurde Valproat dem Medium ebenfalls wieder

hinzugefügt. Die Gruppenstärke von Versuch und Kontrolle betrug jeweils sieben DK. Die Ernte erfolgte 4 d.p.i.

In der Valproat-Gruppe wurden keine Antigen-positiven Zellen detektiert. In der Kontrollgruppe waren in sechs von sieben DK keine infizierten Neuronen und nur eine infizierte nicht-neuronale Zelle zu sehen. Eine Kontroll-DK wich im Ergebnis von den übrigen Kammern ab: Hier waren sechs Neuronen (und 110 Begleitzellen) infiziert, was einer neuronalen Infektionsrate von 2,1% entsprach.

Die durchschnittlichen Neuronquantitäten von Valproat- und Kontrollreihe lagen bei 310 (Median = 350,0; SD = 149,1) respektive 457 (Median = 530,0; SD = 223,2) Zellen und unterschieden sich nicht signifikant voneinander (t-Test). Die Zahlen unterlagen der Gauß'schen Verteilung.

3.1.2.2.3. Versuch zur Reaktivierbarkeit von HSV-1 durch Valproat

Es sollte geprüft werden, ob Valproat die Reaktivierungstendenz latenter HSV-1-Partikel im Organmodell erhöht. 14 DK wurden mit einem Inokulum von 5×10^6 PFU axonal infiziert. Am Tag 8 nach der Infektion wurde das Medium gewechselt und in sieben DK mit 2,0 mM Valproat angereichert. Vier Tage nach Beginn der Valproat-Exposition wurde der Versuch beendet und die TG-Zellen fluoreszenzgefärbt.

Weder in der Versuchs- noch in der Kontrollreihe wurden produktiv infizierte Neurone oder Begleitzellen gesehen.

Die mittleren Neuronanzahlen von 335 (Median = 308; SD = 126,1) in der Valproat-Gruppe und 385 (Median = 352; SD = 84,2) in der Kontrollgruppe waren normalverteilt und wiesen mit $p = 0,4013$ keinen statistischen Unterschied auf (t-Test).

3.1.2.2.4. Zusammenfassung der HSV-1-Infektionsversuche unter Zusatz von Valproat

Eine mögliche Beeinflussung der Aktivität von HSV-1 im TG-System durch Valproat konnte unter den gewählten Bedingungen in drei verschiedenen Infektionsmodi fluoreszenzmikroskopisch nicht nachgewiesen werden.

3.1.2.3. Effekt von Rapamycin auf den Verlauf der HSV-1-Infektion in Trigeminalganglien-

Explantaten

Ziel der Versuche war zu ermitteln, ob Rapamycin in explantierten Hühner-TG in verschiedenen Infektionsmodi einen Effekt auf die Infektionsaktivität von HSV-1 besitzt. Zur Auswertung dienten IF-Versuche wie in Kap. 2.2.4. respektive Kap. 3.1.1.1. beschrieben.

Für die Substanz Rapamycin diente DMSO als Lösungsmittel. Neben der nativen Kontrolle ohne Substanzzusatz wurde bei den Versuchen daher auch jeweils eine im Folgenden DMSO-Kontrolle genannte Versuchsreihe mitgetestet. In allen Rapamycin-Versuchen wurde die Substanzen aus IC- und OC-Kompartiment 20 Stunden nach der Zugabe wieder durch einen Mediumwechsel entfernt (vergl. Kap. 4.6.).

3.1.2.3.1. Effekt von Rapamycin auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment des Trigeminal-Modells

Die Wirkung von 100nM Rapamycin auf eine HSV-1-Infektion der IC wurde zum Zeitpunkt 48 h.p.i. untersucht. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU. Eine Übersicht über die Ergebnisse geben die Tabellen C15 – C17. Die Untersuchungsgruppen umfassten je fünf DK.

Die durchschnittlichen Anzahlen an Neuronen waren in den drei Versuchsgruppen normalverteilt und unterschieden sich nicht signifikant voneinander (ANOVA). Die entsprechenden Mittelwerte betragen 579 in der Rapamycin-Gruppe, 574 in der DMSO-Kontrolle und 577 in der Kontrollgruppe.

In der Rapamycin- und der Kontrollgruppe lagen die mittleren Infektionsraten mit 15,2% und 12,9% dicht beieinander, wohingegen in der DMSO-Kontrollgruppe im Mittel nur 8,2% der Neurone infiziert waren. Die zugehörigen Mediane betragen 13,7% (Rapamycin), 13,1% (Kontrolle) und 7,2% (DMSO-Kontrolle). Bei Betrachtung der relativen Häufigkeiten fiel zudem auf, dass nur die Werte der Kontrollreihen normalverteilt waren. Die Variation der Werte übertraf mit $p = 0,0840$ nicht das Maß der Zufälligkeit (Kruskal-Wallis-Test).

Die absoluten Mengen infizierter Neurone waren in allen Gruppen normalverteilt und unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant (ANOVA). Die Mittelwerte betragen 83 infizierte Neurone in der Rapamycin-Gruppe, 49 in der DMSO-Kontrollgruppe und 68 in der Kontrollgruppe ohne Substanzzusatz.

Es gab mit $p = 0,6838$ keinen statistischen Hinweis auf quantitative Unterschiede hinsichtlich der Infektion von Begleitzellen (ANOVA): Die Mittelwerte wurden wie in Kap. 2.2.4.2.

beschrieben auf circa 1070 (Rapamycin), 830 (DMSO-Kontrolle) und 800 Zellen (native Kontrolle) geschätzt. Die Daten waren normalverteilt.

3.1.2.3.2. Effekt von Rapamycin auf den Verlauf der HSV-1-Infektion nach Infektion des axonalen Kompartiments

Das Ziel des Assays bestand darin, den Effekt von 100nM Rapamycin bei Zugabe zum Zeitpunkt der axonalen Infektion fluoreszenzmikroskopisch zu überprüfen. 20 Stunden nach dem Zusatz von 100nM Rapamycin bzw. 0,01% DMSO wurden die Substanzen aus allen Kammern durch einen Mediumwechsel entfernt. Die Ernte der TG erfolgte zum Zeitpunkt 4 d.p.i.

Insgesamt wurden 19 DK mit einem Inokulum von 5×10^6 PFU mit HSV-1 infiziert. Davon wurden je sieben DK mit Rapamycin respektive DMSO versetzt, fünf DK dienten als native Kontrolle ohne Substanzzugabe.

Vier Tage nach der Infektion wurden in der Rapamycin-Gruppe in zwei von sieben DK insgesamt zwei infizierte Neuronen gesehen. In zwei anderen Kammern wurden in geringem Umfang infizierte Begleitzellen gefunden (maximal vier Zellen). In keiner der sieben DMSO-Kontrollen waren Neuronen oder Begleitzellen infiziert. In den fünf Kontrollen ohne Substanzzusatz waren in einer DK ein Neuron und in weiteren DK zwei Neurone und 14 Begleitzellen produktiv infiziert.

Die mittleren Neuronquantitäten der Einzelgruppen unterlagen jeweils der Gauß'schen Verteilung und betragen 218 (Rapamycin), 215 (DMSO-Kontrolle) und 609 (Kontrolle). (Die korrespondierenden Mediane betragen 201, 193 und 537 Neurone; die SD lagen bei 91,6 sowie 91,8 und 190,4.) Damit war die durchschnittliche Anzahl an Neuronen auf den OT der Kontrollen ohne Substanzzugabe um circa den Faktor 2,8 höher als in der Rapamycin-respektive der DMSO-Gruppe. Dieser Unterschied war jeweils signifikant ($p \leq 0,0001$, Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test).

Der Versuch konnte unter den beschriebenen Bedingungen keinen sichtbaren Effekt einer zeitgleich zur HSV-1-Infektion erfolgenden Behandlung der Trigeminalganglien mit 100nM Rapamycin nachweisen.

3.1.2.3.3. Versuch zur Reaktivierbarkeit von HSV-1 durch Rapamycin

Ziel des Versuchs war es, die Wirkung von Rapamycin auf latent HSV-1 infizierte TG zu beurteilen. Dazu wurden 19 DK axonal mit einer Menge von 5×10^6 PFU infiziert. 8 d.p.i.

wurden sieben DK 100 nM Rapamycin in 0,01% DMSO und sechs DK 0,01% DMSO zugegeben und 20 Stunden nach Expositionsbeginn durch einen Mediumwechsel wieder entfernt. In den sechs Kammern der nativen Kontrollgruppe wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Ernte der TG erfolgte zum Zeitpunkt 12 d.p.i. Danach wurden die Proben IF-gefärbt.

In der Versuchsgruppe war keines von insgesamt 2862 Neuronen produktiv infiziert; es wurde eine Antigen-positive Begleitzone detektiert. In der DMSO-Kontrolle war eines von knapp 2100 Neuronen Antigen-positiv. In zwei weiteren DK wurden wenige infizierte Begleitzone gesehen (1 bzw. 3 Zellen). Die Kontrollgruppe ohne Substanzzusatz enthielt keine infizierten Neurone oder Begleitzone.

Die Variation der mittleren Neuronanzahlen der Einzelgruppen war wie bei dem Versuch zur axonalen Infektion (Kap. 3.1.2.3.2.) größer als bei einer zufälligen Verteilung zu erwarten war ($p = 0,0226$, ANOVA). Im vorliegenden Versuch waren die höchsten Mittelwerte allerdings in der Rapamycin-Gruppe, die niedrigsten in der Kontrollgruppe zu finden. Daher wurde nicht angenommen, dass eine potentiell toxische Wirkung von Rapamycin für die Beobachtung verantwortlich war.

In der Rapamycin-Gruppe wurden durchschnittlich 409 Neurone gezählt (Median = 391; SD = 174,8), in der DMSO-Kontrolle waren es 345 (Median = 321; SD = 130,5), in der Kontrollgruppe nur 184 (Median = 164; SD = 49,4). Signifikant unterschiedlich waren die Mittelwerte von Rapamycin- vs. Kontrollgruppe ($p < 0,05$, Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test). Die Neuronquantitäten unterlagen der Normalverteilung.

Trotz der Unterschiede hinsichtlich der Neuronanzahlen wurde deutlich, dass ein Effekt von 100nM Rapamycin auf latente HSV-1-Partikel unter den gewählten Bedingungen fluoreszenzmikroskopisch nicht nachgewiesen werden konnte.

3.1.2.3.4. Zusammenfassung der HSV-1-Infektionsversuche unter Zusatz von Rapamycin

Fluoreszenzmikroskopisch konnte in keinem der getesteten Infektionsmodi unter 20-stündiger Anwesenheit von 100nM Rapamycin ein quantitativer Effekt im Virus-TG-System nachgewiesen werden.

Die Messgenauigkeit der Ergebnisse wurde durch Schwankungen in den Neuronanzahlen auf den OT eingeschränkt.

3.1.2.4. Effekt von Forskolin und DMSO auf den Verlauf der HSV-1-Infektion in Trigeminalganglien-Explantaten

Die Wirkung der Substanz Forskolin sollte in verschiedenen Infektionsmodi charakterisiert werden. Es wurde eine Konzentration von 100 μ M Forskolin gewählt. Forskolin wurde in DMSO gelöst, sodass eine potentielle Wirkung von DMSO (als 1%-DMSO-Kontrolle) ebenfalls überprüft wurde. Die zugrundeliegende Methodik wurde bereits in Kap. 2.2.4. respektive Kap. 3.1.1.1. beschrieben.

3.1.2.4.1. Effekt von Forskolin und DMSO auf den Verlauf der HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment des Trigeminal-Modells

Für den Infektionsversuch im Ganglion-Kompartiment wurden zunächst 15 DK mit einer Infektionsdosis von 5×10^4 PFU HSV-1 infiziert. Je fünf DK wurden mit 100 μ M Forskolin in 1% DMSO bzw. 1% DMSO behandelt; fünf DK dienten als native Kontrollen ohne Zusatz von Agenzien. Der Versuch wurde 48 h.p.i. beendet. Die Zellen der TG wurden fluoreszenzgefärbt. Ein Teil des Versuchs wurde in einem zweiten Versuchsdurchgang wiederholt.

In der Gruppe mit Forskolin-Exposition waren durchschnittlich 13 Neuronen infiziert. Unter Einwirkung von 1% DMSO waren 95 Neuronen und in der Kontrollreihe 69 Neuronen HSV-1-Antigen-positiv (vergl. Tab. 14 – 16; vergl. Abb. 4).

Die mittlere neuronale Infektionsrate von 8,5% (Median = 8,1%) in der nativen Kontrollgruppe war um circa vier Prozentpunkte niedriger als in den Kontrollen vergleichbarer Versuche (vergl. Kap. 3.1.2.1.1., Kap. 3.1.2.2.1. und Kap. 3.1.2.3.1.). Darüber hinaus entsprach die Streuung der Werte nicht einer Normalverteilung. Der Minimalwert lag mit 7,5% infizierten Neuronen allerdings immer noch deutlich über dem geringsten ermittelten Wert bisheriger Kontrollen (vergl. z.B. Tab. 5, DK 4). In der 1%-DMSO-Gruppe waren im Mittel 14,2% der Neuronen infiziert (Median = 14,6%). Der durchschnittliche Anteil infizierter Neuronen in der Forskolin-Gruppe lag mit 2,3% um das 3,7-fache niedriger als in der nativen Kontrollgruppe und um mehr als das 6-fache unter den Infektionsraten der 1%-DMSO-Gruppe. Der Median lag mit 1,6% infizierten Neuronen noch unterhalb des Mittelwerts.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich absoluter und relativer Häufigkeiten infizierter Neuronen erklärten sich statistisch nicht durch zufällige Variation ($p = 0,0060$ absolut bzw. $p = 0,0027$ relativ, Kruskal-Wallis Test): Die Gruppen „Forskolin“ vs. „1%-DMSO“

unterschieden sich signifikant voneinander (jeweils $p < 0,01$, Dunn's Multiple Comparisons Test) (vergl. Boxplot 12 und 13).

Hinsichtlich der Quantität infizierter Begleitzellen waren die Daten der Kontrollgruppe nicht normalverteilt: Während in der DMSO- und der Kontrollgruppe pro Kammer im Mittel 693 bzw. 813 (Median hier deutlich abweichend mit einem Betrag von 448) Begleitzellen Antigen-positiv waren, waren unter Forskolin-Exposition durchschnittlich 31 Begleitzellen infiziert. Damit lag die Menge infizierter Begleitzellen in der Forskolin-Gruppe um ein Vielfaches unter den Mengen in den Kontrollgruppen.

Die Variation dieser Ergebnisse war mit $p = 0,0013$ nicht zufällig (Kruskal-Wallis-Test). Die Forskolin-Gruppe unterschied sich hinsichtlich der Quantität infizierter Begleitzellen jeweils signifikant von den Kontrollgruppen ($p < 0,05$, Dunn's Multiple Comparisons Test; vergl. Boxplot 14). Die gleiche Aussage ergab sich bei Betrachtung der Quotienten aus infizierten Begleitzellen und Neuronanzahl ($p < 0,05$, Dunn's Multiple Comparisons Test; Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0090$).

In der Forskolin-Gruppe lagen die mittleren Anzahlen an Neuronen auf den OT bei 643 Zellen, in der 1%-DMSO-Gruppe bei 677 und in den nativen Kontrollen bei 786. Einen Überblick über die Ergebnisse bieten Tab. 14 – 16.

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse:

In einem Nebenversuch wurden aufgrund der unerwarteten Ergebnisse weitere vier Kammern in der IC mit HSV-1 infiziert und mit 100 μM Forskolin behandelt. Die Versuchsdurchführung erfolgte gemeinsam mit den in Kap. 3.1.2.3.1. und Kap. 3.1.2.1.1. beschriebenen Versuchen und wurde innerhalb dieses Versuches kontrolliert. (Es wurden keine weiteren Kammern mit 1% DMSO getestet.) Die DK wurden 48 h.p.i. geerntet und fluoreszenzgefärbt.

Die Infektionsrate in den DK, die mit Forskolin behandelt wurden, lag mit 3,4% (Median = 3,5%) nur wenig über derjenigen von 2,3% aus dem ersten Versuchsdurchgang. Die Anzahl infizierter Neuronen pro OT betrug durchschnittlich 14 Zellen (vergl. Tab. 17).

Wie in Tab. 5 ersichtlich lag die Infektionsrate in der direkten nativen Kontrollgruppe (ohne weiteren Mediumwechsel) bei 12,6%. In absoluten Zahlen waren 76 Neurone infiziert.

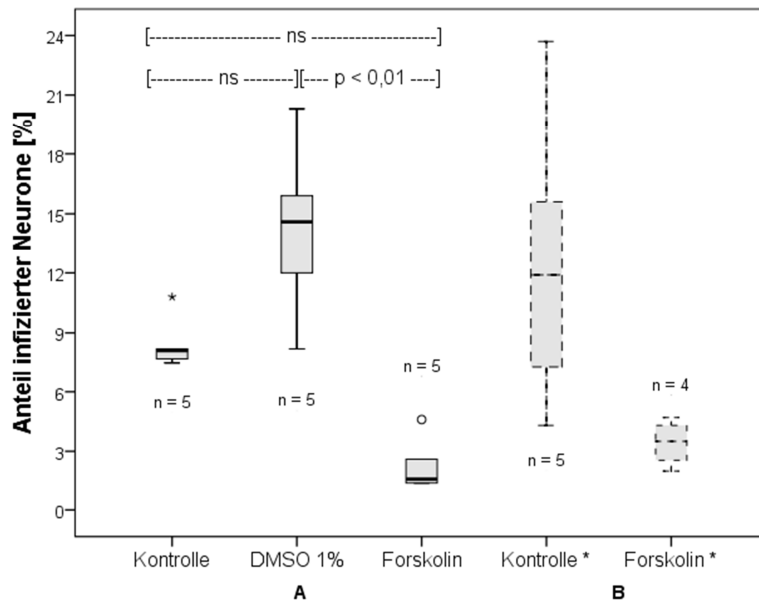
Damit war die Infektionsrate in der Forskolin-Gruppe des zweiten Versuchsdurchgangs um den Faktor 3,7 geringer als in der direkten nativen Kontrollgruppe (vergl. auch Tab. C16, C17).

Die Anzahlen infizierter Begleitzellen in der Forskolin-Gruppe streuten um einen Mittelwert von 54 und unterboten das Niveau der Kontrollen deutlich: Wie in Kap. 3.1.2.1.1. beschrieben waren in der direkten nativen Kontrollgruppe im Durchschnitt über 1200 Begleitzellen infiziert (vergl. Tab. 5), sodass sich ein quantitativer Unterschied gegenüber der Forskolin-Gruppe in der Größenordnung um den Faktor 23 einstellte. (In den übrigen Kontrollgruppen der Versuchsserie waren ebenfalls Hunderte Begleitzellen infiziert (vergl. Tab. C16 und C17)).

Die Variation der Neuronanzahlen war innerhalb der gesamten Versuchsgruppe ($n = 29$, vergl. Kap. 3.1.2.1.1. und Kap. 3.1.2.3.1.) nicht größer als stochastisch zu erwarten. Im Mittel fanden sich in den vier DK der Forskolin-Gruppe 435 Neuronen auf jedem OT, der Median betrug 407.

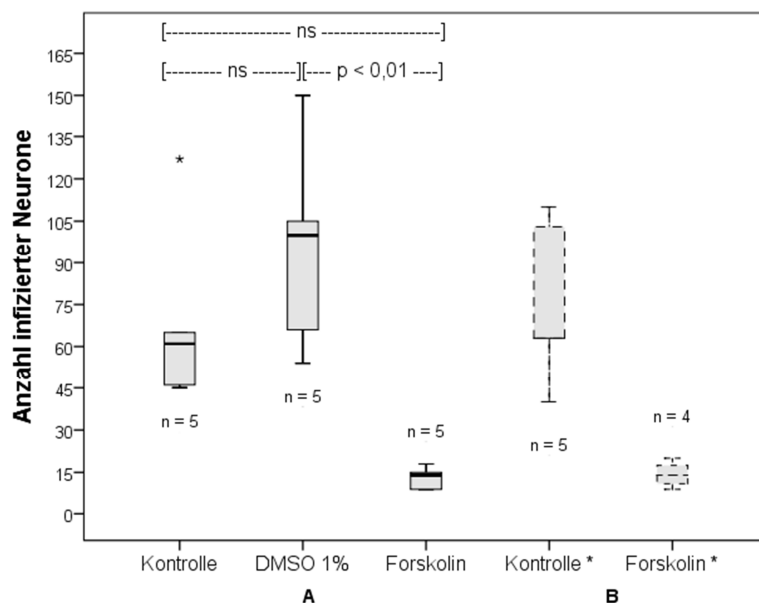
Bei gemeinsamer Betrachtung beider Versuchsdurchgänge ergab sich, dass die Forskolin-Gruppen ($n = 9$) sich gegenüber der 1%-DMSO-Gruppe ($n = 5$) und den DK ohne Zusatz von Agenzien ($n = 10$) hinsichtlich der Anzahl infizierter Neurone jeweils signifikant unterschieden ($p < 0,01$, Dunn's Multiple Comparisons Test bzw. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0002$; vergl. Boxplot 13). Gleiches galt für die Infektionsraten (Forskolin vs. native Kontrolle: $p < 0,01$; Forskolin vs. 1%-DMSO: $p < 0,001$. Dunn's Multiple Comparisons Test; Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0002$; vergl. Boxplot 12).

Zusammenfassend zeigte sich, dass Forskolin reproduzierbar einen hemmenden Effekt auf die HSV-1-Infektion in der IC ausübte. DMSO hingegen schien die Ausbreitung der HSV-1-Infektion zu fördern; allerdings war diese Beobachtung nicht statistisch signifikant.



Boxplot 12: Reproduzierbare Verminderung des Anteils HSV-1-Antigen-positiver Neurone durch Forskolin. Darstellung der Ergebnisse zwei verschiedener Versuchsdurchführungen
A: Erster Versuchsdurchgang. Durchgezogene Boxen; **B:** Reproduktion der Ergebnisse. Gestrichelte Boxen. Gezeigt wird jeweils die relative Häufigkeit infizierter Neurone nach Infektion der IC mit HSV-1 unter Zugabe von 100 μ M Forskolin in 1%

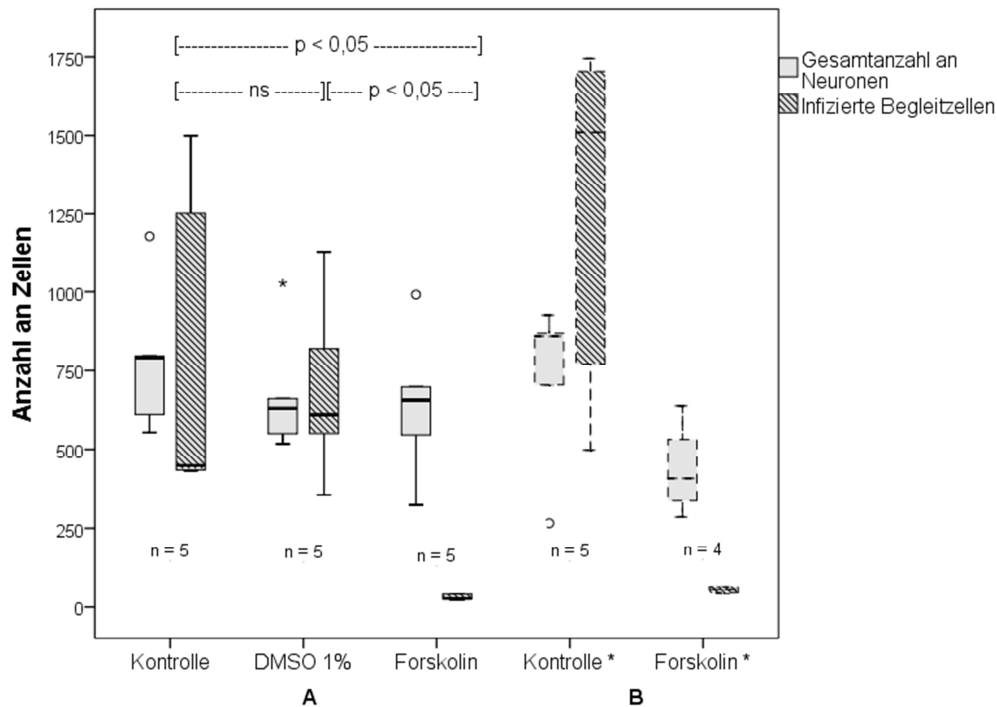
DMSO gegenüber verschiedenen Kontrollgruppen zum Zeitpunkt 48 h.p.i. Die Infektionsdosis lag bei 5×10^4 PFU. **A:** Die Gruppen „Forskolin“ und „1% DMSO“ unterschieden sich signifikant; der Unterschied zwischen den Gruppen „1%-DMSO“ und „Kontrolle“ war nicht signifikant (Dunn’s Multiple Comparisons Test). In der Forskolin- und der DMSO-Gruppe waren die erhobenen Werte im Unterschied zur nativen Kontrolle normalverteilt. **B:** Qualitative Reproduktion der Ergebnisse in einem Nebenversuch. Die Gruppe Kontrolle* ist identisch mit den Kontrollen aus Kap. 3.1.2.1.1. (Tab. 5). Der gemeinsame Vergleich aller gegenüber Forskolin exponierten DK ($n = 9$) mit den abgebildeten nativen Kontrollgruppen ($n = 10$) wies auf einen signifikanten Unterschied hin ($p < 0,01$) hin; der Unterschied gegenüber der 1%-DMSO-Gruppe blieb signifikant ($p < 0,001$) (Dunn’s Multiple Comparisons Test).



Boxplot 13: Reproduzierbare Verminderung der Anzahl HSV-1-Antigen-positiver Neurone durch Forskolin. Darstellung der Ergebnisse zwei verschiedener Versuchsdurchführungen.
A: Erster Versuchsdurchgang. Durchgezogene Boxen; **B:** Reproduktion der Ergebnisse. Gestrichelte Boxen. Gezeigt wird jeweils die absolute Anzahl infizierter Neurone nach Infektion der IC mit HSV-1 unter Zugabe von 100 μ M Forskolin in 1% DMSO

gegenüber verschiedenen Kontrollgruppen zum Zeitpunkt 48 h.p.i. Die Infektionsdosis lag bei 5×10^4 PFU. **A:** Die Gruppen „Forskolin“ und „1% DMSO“ unterschieden sich mit $p < 0,01$ signifikant voneinander; der Unterschied

zwischen den Gruppen „1%-DMSO und „Kontrolle“ war nicht signifikant (Dunn’s Multiple Comparisons Test). Die Werte aller drei Gruppen waren normalverteilt. **B**: Qualitative Reproduktion der Ergebnisse in einem Nebenversuch. Die Gruppe Kontrolle* ist identisch mit den Kontrollen aus Kap. 3.1.2.1.1. (Tab. 5). Die Gesamtheit der mit Forskolin behandelten DK (n = 9) unterschied sich gegenüber der 1%-DMSO-Gruppe (n = 5) und den dargestellten nativen Kontrollen (n = 10) mit $p < 0,01$ jeweils signifikant (Dunn’s Multiple Comparisons Test).



Boxplot 14: Reproduzierbare Verminderung der Menge HSV-1-Antigen-positiver Begleitzellen durch Forskolin. Darstellung der Ergebnisse zwei verschiedener Versuchsdurchführungen. **A**: Erster Versuchsdurchgang. Durchgezogene Boxen; **B**: Reproduktion der Ergebnisse. Gestrichelte Boxen. Gezeigt werden jeweils die Gesamtneuronenzahl neben der Anzahl infizierter Begleitzellen 48 h.p.i. Die Infektion der IC unter Einfluss von 100 μ M Forskolin in 1% DMSO wird verschiedenen Kontrollgruppen gegenübergestellt. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU. **A**: Die Gruppe „Forskolin“ unterschied sich hinsichtlich der Quantität infizierter Begleitzellen jeweils signifikant von den Kontrollgruppen „1%-DMSO“ und „Kontrolle“ und (Dunn’s Multiple Comparisons Test). Hinsichtlich infizierter Begleitzellen waren die Ergebnisse der Gruppe „Kontrolle“ nicht normalverteilt. Die Gesamtanzahlen an Neuronen waren normalverteilt und statistisch nicht signifikant unterschiedlich (ANOVA). **B**: Qualitative Reproduktion der Ergebnisse in einem Nebenversuch. Die Gruppe „Kontrolle*“ war identisch mit der Kontrolle für die Gruppe „HMBA“ aus Kap. 3.1.2.1.1. (Tab. 5).

3.1.2.4.2. Effekt von Forskolin und DMSO auf den Verlauf der HSV-1-Infektion nach Infektion des axonalen Kompartiments

20 DK wurden axonal mit 5×10^6 PFU infiziert, je sieben davon wurden nach der Infektion mit 100 μ M Forskolin (in 1%-DMSO-Lösung) respektive 1% DMSO versetzt. Sechs DK dienten als native Kontrolle. Der Versuch wurde zum Zeitpunkt 48 h.p.i. beendet. Die TG-Zellen wurden fluoreszenzgefärbt.

In der Forskolin-Gruppe war in sieben DK von insgesamt über 4000 Neuronen ein Neuron Antigen-positiv. Es waren keine Begleitzellen infiziert. Weder in der DMSO- noch in der Kontrollgruppe waren Neuronen oder Begleitzellen Antigen-positiv.

Die Mittelwerte der Neuronquantitäten auf den OT lagen bei 599 für die Forskolin-Reihe (Median = 548; SD = 159,8), 698 für die 1%-DMSO-Reihe (Median = 752; SD = 123,1) und 560 für die native Kontrollgruppe (Median = 528; SD = 166,6). Die Daten waren normalverteilt und unterschieden sich nicht signifikant (ANOVA).

3.1.2.4.3. Versuch zur Reaktivierbarkeit von HSV-1 durch Forskolin und DMSO

32 DK wurden mit einem Inokulum von 5×10^6 PFU axonal infiziert. Je neun DK wurde zum Zeitpunkt 8 d.p.i. 100 μ M Forskolin (in 1%-DMSO-Lösung) bzw. 1 % DMSO zugesetzt; in neun DK fand lediglich ein Mediumwechsel statt. Fünf Kammern wurde Forskolin an Tag 15 nach Infektion zugegeben. Der Versuch wurde 48 Stunden nach Substanzzugabe bzw. Mediumwechsel beendet. Nach der Ernte wurden die TG-Zellen fluoreszenzgefärbt.

In der Gruppe, in der Forskolin 8 d.p.i. zugegeben wurde, waren von insgesamt über 2800 Neuronen zwei Neurone derselben DK Antigen-positiv. In der gleichen Kammer waren zwei nicht-neuronale Zellen infiziert. In der Gruppe, in der Forskolin erst 15 d.p.i. zugegeben wurde, war keine Zelle infiziert. In der 1%-DMSO-Gruppe waren insgesamt zwei Begleitzellen in derselben DK infiziert; in der nativen Kontrollgruppe waren keine Neuronen oder Begleitzellen Antigen-positiv.

Die mittlere Anzahl an Neuronen auf den OT lag in der Forskolin-Gruppe 12 d.p.i. bei 320 (Median = 264; SD = 166,1), 19 d.p.i. bei 176 (Median = 76; SD = 154,0). In der 1%-DMSO-Gruppe lag der Wert bei 428 Zellen (Median = 443; SD = 224,5), bei den nativen Kontrollen waren es 272 Zellen (Median = 281; SD = 143,3). Dies entsprach einer stochastischen Verteilung der Werte (ANOVA); es fiel jedoch auf, dass in der Forskolin-19-d.p.i.-Gruppe die

drei niedrigsten Neuronenquantitäten des gesamten Versuchs zu finden waren. Die Daten waren normalverteilt.

3.1.2.4.4. Zusammenfassung der HSV-1-Infektionsversuche unter Zusatz von Forskolin und DMSO

Unter den gewählten Bedingungen eigneten sich weder Forskolin noch DMSO, um im TG-Modell eine Reaktivierung von HSV-1 hervorzurufen. Ebenso konnte kein Effekt auf eine akute Infektion im axonalen Kompartiment gezeigt werden. Das Ausmaß einer floriden HSV-1-Infektion im Ganglion-Kompartiment wurde durch Forskolin entgegen der Erwartung deutlich begrenzt. Ein möglicher Enhancer-Effekt von DMSO konnte nur vermutet, aber nicht eindeutig bestätigt werden.

3.2. Infektionsversuche mit HSV-2

3.2.1. Charakterisierung des Verhaltens von HSV-2 im Trigeminal-Modell mittels Immunfluoreszenzmikroskopie: Infektionsverläufe ohne chemische Stimulanzen

Das Interesse richtete sich zunächst darauf, das Verhalten von HSV-2 im Organmodell bei Infektion von IC respektive OC mittels IF-Mikroskopie zu charakterisieren und einen Vergleich zwischen HSV-1 und HSV-2 anzustellen (vergl. Kap. 2.2.4. respektive Kap. 3.1.1.1.).

3.2.1.1. Infektion der Innenkammer mit HSV-2

Es wurden 15 DK mit einer Menge von 5×10^5 PFU in der IC infiziert. Jeweils fünf TG-Paare wurden zu den Zeitpunkten 12 h.p.i., 24 h.p.i. und 45 h.p.i. geerntet und fluoreszenzgefärbt. (Nachfolgende Vergleiche von HSV-2 mit HSV-1 beziehen sich auf den Versuch aus Kap. 3.1.1.1., vergl. Tab. 1 – 3).

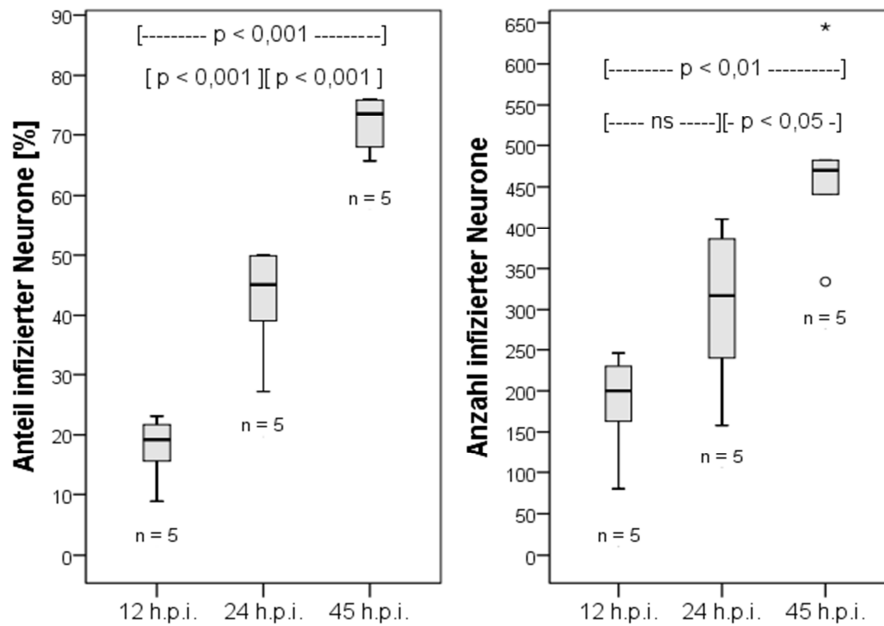
Die Ausbreitung der produktiven HSV-2-Infektion in den TG verlief ungleich aggressiver als bei HSV-1. Innerhalb von zwei Tagen war ein Großteil der Neurone und Begleitzellen Antigen-positiv (vergl. Boxplot 15 und 16; vergl. Abb. 5).

12 h.p.i. waren im Mittel bereits 17,7% der Neurone infiziert (Median = 19,2%) (vergl. Tab. 18). Die Infektionsrate von HSV-2 lag damit um mehr als 750% über der Infektionsrate von HSV-1 zum gleichen Zeitpunkt.

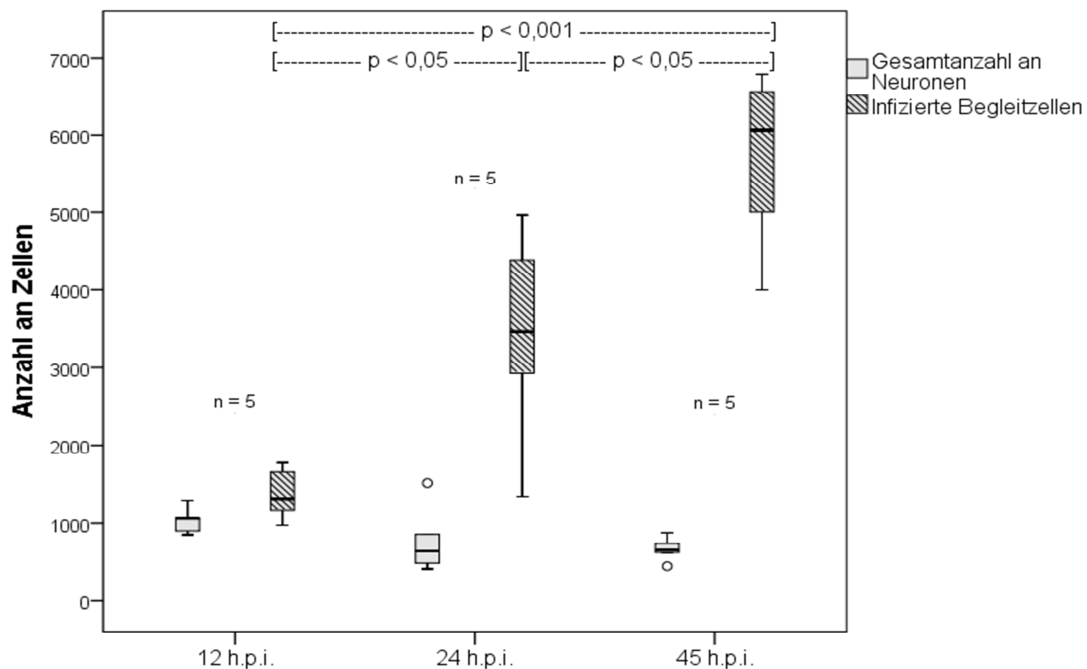
Die absolute Anzahl HSV-2-infizierter Neurone überstieg die Anzahl HSV-1-infizierter Neurone zum gleichen Zeitpunkt mit einem Wert von 184 um mehr als das 12-fache. Allerdings war die Gesamtanzahl an Neuronen mit durchschnittlich 1032 ebenfalls höher als im HSV-1-Versuch. Auch die Anzahl infizierter Begleitzellen überbot mit über 1300 Zellen die für HSV-1 bestimmte Menge um fast das 15-fache. (Der Anteil infizierter Begleitzellen in Bezug zur Anzahl vorhandener Neuronen übertraf die Ergebnisse des HSV-1-Versuchs mit 1,3 infizierten Begleitzellen pro Neuron um das 6,5-fache.)

Zum Zeitpunkt 24 h.p.i. hatte sich der Anteil infizierter Neuronen gegenüber 12 h.p.i. mehr als verdoppelt und übertraf mit 42,3% die HSV-1-Ergebnisse um mehr als das 6-fache (Median = 45,1%). Es waren im Durchschnitt 302 Neuronen infiziert (vergl. Tab. 19); das entsprach mehr als dem 5-fachen dessen, was in absoluten Zahlen bei der Infektion mit HSV-1 gezählt wurde. Die Anzahl HSV-2-infizierter Begleitzellen wurde 24 h.p.i. auf über 3400 (3416) hochgerechnet – fünfmal mehr als bei HSV-1. Das Verhältnis infizierter Begleitzellen pro Neuron lag bei 4,8 im HSV-2-Versuch und bei nur 1,1 Begleitzellen pro Neuron im HSV-1-Versuch. Die Anzahl an Neuronen pro DK lag mit 777 auf ähnlichem Niveau wie im HSV-1-Versuch.

An Tag 2 nach der Infektion war der Großteil aller Neuronen HSV-2-infiziert (71,9%) (gegenüber 26,9% im HSV-1-Versuch). Der Median lag bei 73,6%. In absoluten Werten waren im Mittel 474 von 663 Neuronen HSV-2-Antigen-positiv (vergl. Tab. 20). Die Anzahl infizierter Begleitzellen wurde auf durchschnittlich mehr als 5000 (5680) Zellen pro DK hochgerechnet (vergl. Kap. 2.2.4.2.). Auf jedes Neuron kamen damit im Mittel fast 9 infizierte nicht-neuronale Zellen; unter beiden Aspekten waren im HSV-2-Versuch mehr als dreimal soviel Begleitzellen infiziert wie bei der HSV-1-Infektion.



Boxplot 15: Verlauf einer Infektion der IC mit HSV-2 (1). Relative (l.) und absolute (r) Anzahl infizierter Neurone zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit einer Infektionsdosis von $5,0 \times 10^5$ PFU. Kein Zusatz potentieller Stimulanzien. **Links:** Die Zunahme der Infektionsraten gegenüber dem jeweils vorangegangene Messpunkt war signifikant. **Rechts:** Die absolute Anzahl infizierter Neuronen der Gruppe „45 h.p.i.“ unterschied sich signifikant von den beiden übrigen Gruppen. Jeweils Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. Alle Werte waren normalverteilt.



Boxplot 16: Verlauf einer Infektion der IC mit HSV-2 (2). Darstellung der Gesamtneuronenzahl (hellgrau) neben der Anzahl infizierter Begleitzellen (schraffiert) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit einer HSV-2-Dosis von $5,0 \times 10^5$ PFU. Kein Zusatz potentieller Stimulanzien. Die Gesamtanzahlen an Neuronen zu den betrachteten Zeitpunkten unterschieden sich nicht signifikant voneinander (ANOVA). In allen Gruppen waren Neuronquantitäten

und die Menge infizierter Begleitzellen normalverteilt. Das Vorkommen infizierter Begleitzellen differierte unter den Gruppen signifikant (siehe Boxplot). Gleiches galt für die Quotienten aus infizierten Begleitzellen und zugehöriger Gesamtneuronenzahl ($p < 0,01$ (12 h.p.i. vs. 24 h.p.i. und 24 h.p.i. vs. 45 h.p.i.); $p < 0,001$ (12 h.p.i. vs. 45 h.p.i.)). Jeweils Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test.

3.2.1.2. Infektion der Außenkammer mit HSV-2

Um den Verlauf einer HSV-2-Infektion in der OC zu beschreiben, wurden für die Zeitpunkte 24 h.p.i. und 45 h.p.i. je sieben DK axonal infiziert; jeweils neun DK für die Betrachtungspunkte 4 d.p.i. und 8 d.p.i. stammten aus zwei weiteren Präparationsgruppen. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU. Nachfolgende Vergleiche mit HSV-1 nehmen Bezug auf die Kontrollen der angegebenen Versuche.

Zum Zeitpunkt 24 h.p.i. deckten sich die Ergebnisse der HSV-2-Infektion grob mit denen äquivalenter HSV-1-Versuche (vergl. Kap. 3.1.2.1.2b.). In einer von sieben Kammern waren ein Neuron und fünf Begleitzellen infiziert (vergl. Tab. 21 und Tab. C6).

An Tag 2 nach der Infektion waren in zwei von sieben DK deutlich mehr Zellen infiziert als unter gleichen Bedingungen in den HSV-1-Versuchen: Mit 17 und 25 infizierten Neuronen entsprach deren Anteil an der Gesamtheit der Neuronen auf den betreffenden OT 3,8% bzw. 2,6%. In denselben DK waren 79 und 243 Begleitzellen Antigen-positiv (vergl. Tab. 22).

Bei der HSV-1-Infektion waren bei gleichem Inokulum in einer von 11 DK ein Neuron und zwei Begleitzellen infiziert (vergl. auch Kap. 3.1.2.1.2b., Tab. C8 sowie Kap. 3.1.2.4.2.).

Zum Zeitpunkt 4 d.p.i. waren zwei von neun DK HSV-2-Antigen-positiv: In einer dieser DK waren insgesamt nur zwei Begleitzellen aber keine Neurone infiziert. In der anderen DK wurden 71 infizierte Neuronen (entsprechend einem Anteil von 12,1% in dieser DK) und circa 1000 infizierten Begleitzellen (1039) gesehen (vergl. Tab. 23). Dieses Ergebnis übertraf das unter gleichen Bedingungen für HSV-1 beobachtete Maximum von 17 Antigen-positiven Neuronen bzw. 110 Antigen-positiven Begleitzellen um ein Vielfaches. (Maxima aus unterschiedlichen DK, $n = 17$ insgesamt, davon waren fünf DK in Hinsicht auf Neuronen HSV-1-Antigen-positiv; vergl. Kap. 3.1.2.1.2b., Tab. 11; Kap. 3.1.2.2.2; Kap. 3.1.2.3.2.)

An Tag 8 nach der Infektion wurden in vier von neun Kammern infizierte Neuronen beobachtet. Die einzelnen Infektionsraten bewegten sich im Bereich zwischen 1,2% und 31,3% (4 respektive 129 Zellen). Die assoziierten Anzahlen infizierter Begleitzellen wurden auf Werte zwischen rund 760 und 5200 Zellen hochgerechnet (vergl. Tab. 24, vergl. Kap. 2.2.4.2.). In vergleichbaren HSV-1-Versuchen wurde 8 d.p.i. in zwei von insgesamt 15 DK nur jeweils ein Antigen-positives Neuron detektiert (vergl. Tab. 13 und Tab. H2); gleichzeitig waren maximal 12 nicht-neuronale Zellen infiziert.

Insgesamt stiegen die Anteile produktiv infizierter Neurone innerhalb der Antigen-positiven DK im Zeitraum 1 d.p.i. bis 8 d.p.i. kontinuierlich an (vergl. Tab. 21 – Tab. 24; vergl. Abb. 6).

Die Mengen der Neuronen in den einzelnen Gruppen waren normalverteilt und lagen bei 599 zum Zeitpunkt 1 d.p.i., 645 2 d.p.i., 543 zum Messpunkt 4 d.p.i. und 404 8 d.p.i. Die Streuung dieser Werte entsprach einer zufälligen Verteilung.

3.2.2. Effekte der potentiellen Enhancer HMBA, Forskolin und DMSO auf eine axonale Infektion mit HSV-2

Der Versuch sollte zeigen, ob sich die Beobachtungen aus den HSV-1-Versuchen hinsichtlich der Wirkungen von HMBA, Forskolin (und DMSO) auf HSV-2 übertragen ließen (vergl. Kap. 3.1.2.1.1.; Kap. 3.1.2.4.1.). Dazu wurden 29 DK retrograd infiziert und in die vier Gruppen „HMBA“, „Forskolin“, „1%-DMSO-Kontrolle“ und „native Kontrolle“ aufgeteilt. Messzeitpunkt, Infektionsdosis und Konzentrationen wurden in Bezug auf die genannten HSV-1-Versuche konstant gehalten (5×10^6 PFU; 2,5 mM HMBA; 100 μ M Forskolin in 1% DMSO; 1% DMSO; Ernte 48 h.p.i.). Bei der Auswertung wurden auch die Ergebnisse der retrograden HSV-2-Infektion zum Zeitpunkt 45 h.p.i. aus Kap. 3.2.1.2. (vergl. Tab. 22) berücksichtigt.

In der Forskolin-Gruppe waren in drei von sieben DK Neurone Antigen-positiv. Die Anteile infizierter Neurone in diesen DK betragen 1,3%, 2,9% und 8,2% (6, 13 und 58 Neurone). Gleichzeitig war in diesen DK zwischen 28 und fast 500 Begleitzellen infiziert (474). Es gab darüber hinaus zwei Kammern mit jeweils zwei Antigen-positiven Begleitzellen (vergl. Tab. 26). Die Ergebnisse deuteten nicht auf einen fassbaren Unterschied zur Kontrollgruppe mit 1% DMSO hin. Auch hier waren in drei von sieben DK Neuronen Antigen-positiv (mindestens acht,

maximal 47 infizierte Neuronen; dies entsprach einer Spanne von 0,8% bis 4,1%. In denselben DK waren circa 120 bis 580 Begleitzellen infiziert (124; 577) (vergl. Tab. 27).

Die native Kontrollgruppe ohne Substanzzusatz wich im Ergebnis leicht von der Forskolin- und der DMSO-Gruppe ab. Es wurden in einer von sieben DK insgesamt nur vier infizierte Neuronen (und 29 infizierte Begleitzellen) gezählt, was einem Anteil von 0,8% in dieser Kammer entsprach. Bei Einbeziehung der in Kap. 3.2.1.2. beschriebenen Ergebnisse ergab sich, dass in drei von 14 DK Infektionsraten von 0,8% bis 3,8% (1 bis 22 Neurone) bestimmt wurden und die maximale Anzahl positiver Begleitzellen bei über 240 Zellen lag (vergl. Tab. 22 und 28).

Die Versuchsgruppe unter HMBA-Exposition unterschied sich im Ergebnis deutlich von allen anderen Gruppen (vergl. Tab. 25; vergl. Abb. 7): Fünf von acht Kammern waren bezüglich Neuronen Antigen-positiv. Die niedrigste neuronale Infektionsrate lag mit 44 Zellen bei 6,0%, der höchste Anteil bei 35,5%. Im Durchschnitt waren 80 Neuronen infiziert (Median = 65 Zellen), was einer Rate von 10,1% entsprach (Median = 7,6%). Infizierte Begleitzellen fanden sich in sechs DK. Unter den Antigen-positiven DK lag die niedrigste Anzahl infizierter Begleitzellen bei einem Betrag von zwei; die Hochrechnung für die übrigen DK variierten von rund 860 bis 3100 Zellen (vergl. Kap. 2.2.4.2.). Der Mittelwert über alle Kammern betrug mehr als 1100.

Bei Berücksichtigung aller DK des Versuchs unterschieden sich die vier Versuchsgruppen hinsichtlich absoluter und relativer Häufigkeit infizierter Neurone nicht signifikant voneinander (jeweils Kruskal-Wallis Test). Bei isolierter Betrachtung der *Antigen-positiven DK* wurde offensichtlich, dass die absoluten und relativen Häufigkeiten infizierter Neurone insgesamt keiner zufälligen Verteilung entsprachen ($p = 0,0275$ absolut respektive $p = 0,0441$ relativ, Kruskal-Wallis-Test; vergl. Boxplot 17). Es gab aber im direkten Vergleich der einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Post-hoc-Test (Dunn's Multiple Comparisons Test). Dies änderte sich auch bei Berücksichtigung der zusätzlichen Daten aus Tab. 22 nicht ($p = 0,0200$ (absolut); $p = 0,0343$ (relativ), Kruskal-Wallis Test, Post-hoc-Test: Dunn's Multiple Comparisons Test).

Die Mediane der Anzahlen Antigen-positiver Begleitzellen unterschieden sich zwar statistisch signifikant ($p = 0,0458$ bzw. $p = 0,0265$ bei Berücksichtigung der Daten aus Tab. 22, Kruskal-Wallis Test); es gab aber auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen

Gruppen. (Die Unterschiede der Anzahlen infizierter Begleitzellen innerhalb der *Antigen-positiven* DK war hingegen gerade nicht signifikant ($p = 0,0932$ bzw. $p = 0,0653$ unter Hinzunahme der Daten aus Tab. 22 Kruskal-Wallis Test).)

Die Verhältnisse aus Antigen-positiven Begleitzellen und Neuronen (innerhalb der DK, die Antigen-positiv waren,) waren in der HMBA-Gruppe mit knapp zwei Begleitzellen pro Neuron um circa das Zehnfache höher als in den Kontroll-DK (respektive der Forskolin-Gruppe). In der DMSO-Gruppe lag das Verhältnis bei 0,5 Zellen pro Neuron. Die Unterschiede waren nicht signifikant ($p = 0,0856$, Kruskal-Wallis Test).

Ob die beobachtete erhöhte Anzahl *Antigen-positiver Kammern* unter dem Einfluss von HMBA zufällig war, konnte statistisch nicht eindeutig widerlegt werden: Verglichen mit den nativen Kontroll-DK unter Einbeziehung der Resultate des Versuchs aus Kap. 3.2.1.2. (Tab. 22) unterschied sich die Anzahl an DK mit positivem Antigennachweis in Neuronen statistisch nicht signifikant ($p = 0,0815$, Fisher's Exact Test). Berücksichtigte man auch DK mit Nachweis von HSV-Antigen in Begleitzellen, so ergab sich mit $p = 0,0260$ ein Hinweis darauf, dass in der HMBA-Gruppe signifikant mehr DK Antigen-positiv waren (Fisher's Exact Test; vergl. Boxplot 18).

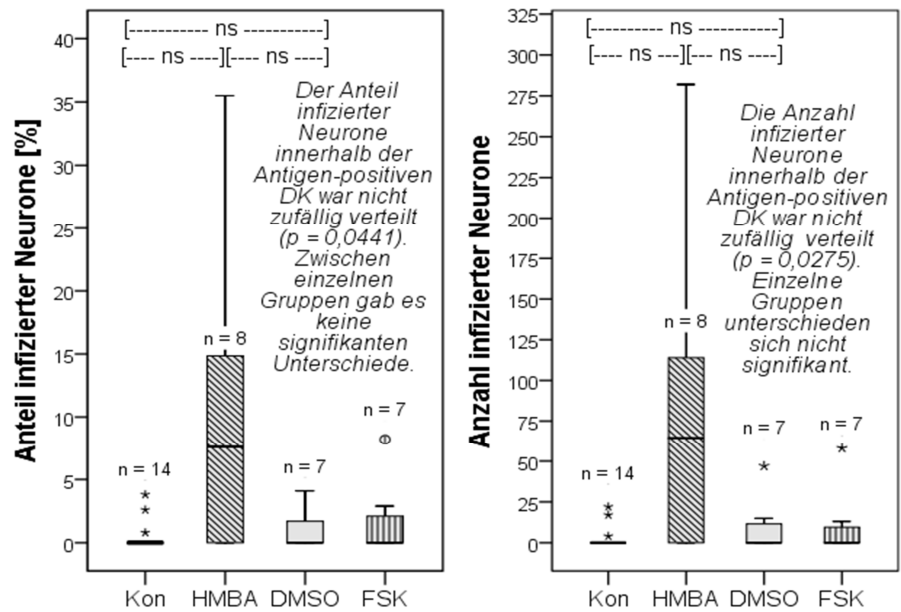
Die Summen der auf den OT bestimmten Neurone lagen im Mittel bei 775 (HMBA), 588 (Forskolin), 803 (1 % DMSO) und 707 bzw. 676 (native Kontrolle, $n = 7$ bzw. $n = 14$).

Zusammenfassung:

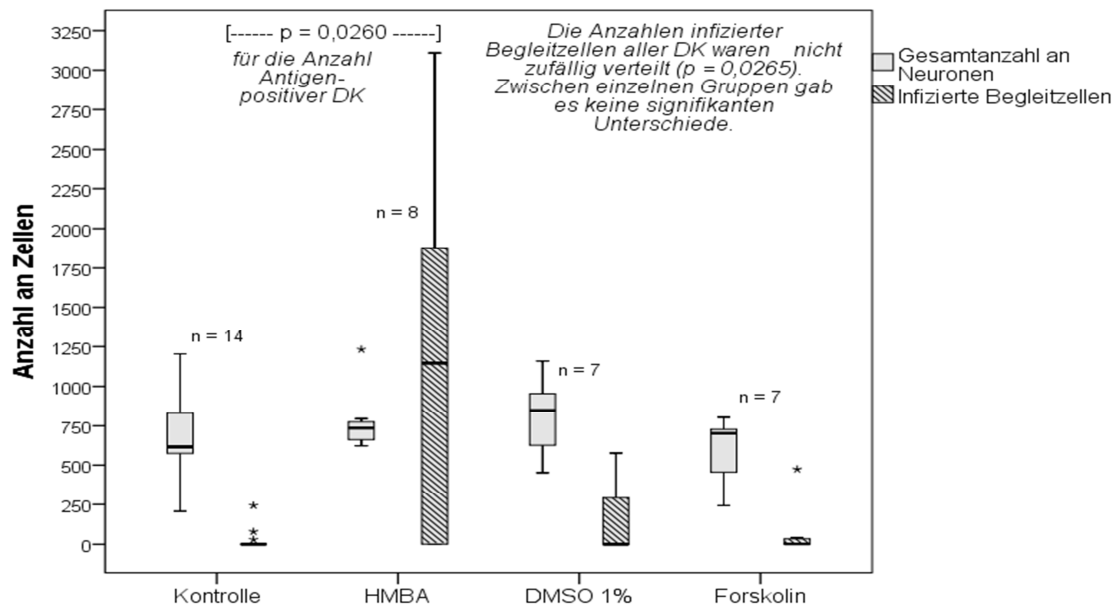
Die Substanz Forskolin zeigte bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ nicht den im HSV-1-Versuch beobachteten hemmenden Effekt auf die Höhe des Anteil infizierter Zellen. Ebenso wenig war ein stimulierender Effekt gegenüber der 1%-DMSO-Kontrolle zu beobachten.

Die vorliegenden Ergebnisse deuteten zwar darauf hin, dass DMSO eine leichte Enhancer-Wirkung auf die HSV-2-Infektion besaß. Insbesondere unter Einbeziehung vorheriger Ergebnisse für die native Kontrolle (Tab. 22) konnte aber kein sicher messbarer Effekt festgehalten werden.

Die in den HSV-1-Versuchen beschriebene stimulierende Wirkung von HMBA auf eine floride HSV-1-Infektion im Ganglion wurde qualitativ auch bei der retrograden Infektion mit HSV-2 deutlich beobachtet. Für eine sichere statistische Aussage war die Gruppengröße zu gering. Ob die Behandlung mit HMBA auch zu einer Erhöhung der Anzahl Antigen-positiver Kammern führte, wurde durch den Versuch nicht zweifelsfrei beantwortet.



Boxplot 17: Effekt von HMBA, Forskolin und DMSO auf eine HSV-2-Infektion im axonalen Kompartiment (1). Darstellung der relativen (l.) und absoluten (r.) Häufigkeiten infizierter Neurone unter Zugabe von 2,5 mM HMBA, 100 μ M Forskolin und 1%-DMSO bzw. in den nativen Kontroll-DK zum Zeitpunkt 48 h.p.i. In der Abbildung wurden die Ergebnisse des Versuchs aus Kap. 3.2.1.2. der Kontrollgruppe hinzugefügt. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU. Die Häufigkeiten infizierter Neurone waren innerhalb der Antigen-positiven DK nicht zufällig verteilt (Kruskal-Wallis-Test). Obwohl die HMBA-Gruppe sich deutlich von den übrigen Gruppen abhob, war der beobachtete Unterschied nicht signifikant. Gleiches galt für die übrigen Gruppen (jeweils Dunn's Multiple Comparisons Test). Die HMBA-Gruppe war die einzige, in der die Häufigkeiten infizierter Neurone normalverteilt waren. FSK: Forskolin.



Boxplot 18: Effekt von HMBA, Forskolin und DMSO auf eine HSV-2-Infektion im axonalen Kompartiment (2). Darstellung der Gesamtneuronenzahl (grau unterlegt) neben der Anzahl infizierter Begleitzellen (schraffiert) zum Zeitpunkt 2 d.p.i. nach Infektion der OC mit einer HSV-2-Dosis von 5×10^6 PFU unter Zugabe verschiedener

Agenzien. In der Abbildung wurden die Ergebnisse der Kontrollgruppe des vorliegenden Versuchs um Werte aus Kap. 3.2.1.2. ergänzt. Die Mediane der Anzahlen Antigen-positiver Begleitzellen unterschieden sich statistisch signifikant ($p = 0,0458$ bzw. $p = 0,0265$ bei Berücksichtigung der Daten aus Tab. 22 (Kruskal-Wallis Test). Die HMBA-Gruppe stach zwar hervor, es gab aber keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen im Post-hoc-Test. Nur in der HMBA-Gruppe waren die Antigen-positiven Begleitzellquantitäten normalverteilt. Die Verhältnisse aus infizierten Begleitzellen und Neuronen unterschieden sich nicht signifikant. Die Anzahl an DK mit Antigen-Nachweis in Begleitzellen in der HMBA-Gruppe (6 von 8 DK) war gegenüber der abgebildeten Kontrollgruppe (3 von 14 DK) signifikant erhöht (Fisher's Exact Test). Die Mediane der Neuronquantitäten unterschieden sich nicht signifikant (Kruskal-Wallis Test). Die Gesamtanzahl an Neuronen war in der HMBA-Gruppe im Gegensatz zu den anderen Gruppen nicht normalverteilt.

3.2.3. Versuch zur Reaktivierbarkeit von HSV-2 durch Entzug von Aciclovir

In Kap. 3.2.1.2. wurde gezeigt, dass es nach Inokulation der OC mit HSV-2 in einigen DK zu einer ausgeprägten produktiven Infektion kam. Der vorliegende Versuch sollte daher die Frage beantworten, ob HSV-2 nach einer axonalen Infektion unter Zugabe des Virostatikums ACV reaktiviert werden kann, indem die hemmende ACV-Wirkung wieder aufgehoben wird.

28 DK wurden in vier Gruppen gleicher Größe aufgeteilt. 21 DK wurden mit einem Inokulum von 5×10^6 PFU retrograd infiziert, sieben DK wurden mock-infiziert. Allen DK wurde ACV in einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ zugesetzt. In sieben DK wurde ACV zum Zeitpunkt 8 d.p.i. durch einen Mediumwechsel entfernt, in einer weiteren Gruppe 15 d.p.i. In der mock-infizierten und einer weiteren Gruppe blieb ACV bis zum Versuchsende 21 d.p.i. im Medium. Die Entnahme der Ganglien erfolgte nach modifiziertem Protokoll (vergl. Kap. 2.2.3.2.), das heißt, ein Drittel der TG-Resuspension wurde der IF-Mikroskopie zugeführt, mit den übrigen zwei Dritteln wurde ein Plaque-Assay erstellt. Fünf weitere DK dienten als Positivkontrollen für den Plaque-Assay: Zwei der DK wurden in der IC mit einer Infektionsdosis von 5×10^5 PFU infiziert und 2 d.p.i. geerntet, drei DK wurden mit 5×10^6 PFU in der OC infiziert und 3 d.p.i. nach modifiziertem Protokoll geerntet. (Zwei der fünf Kontrollen wurden an Tag 19 (anstatt nach standardisiertem Protokoll an Tag 4/5) nach Präparation infiziert.) Als weitere Positivkontrolle diente eine Virustitration in Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-6} , der Titer des Stocks lag bei 1×10^7 PFU/ml. Die TG wurden einen Tag vor der Entnahme lichtmikroskopisch untersucht. Es gab keinen Hinweis auf Schädigung der Zellen durch ACV anhand der Axonmorphologie (vergl. Abb. C2 und C3).

Fluoreszenzmikroskopisch fanden sich in keiner Versuchsgruppe produktiv infizierte Neuronen oder Begleitzellen auf den OT. Die Mittelwerte der Neuronenzahlen waren (unter Berücksichtigung der modifizierten Erntemethode sehr gering und lagen bei 15 (ACV bis 8 d.p.i.), 32 (ACV bis 15 d.p.i.), 50 (ACV bis 21 d.p.i.) und 26 (mock-infizierte DK mit ACV). Die zugehörigen Mediane betragen 12, 31, 44 und 27 in gleicher Reihenfolge. Die SD betragen 8,3; 18,8; 18,2; 10,7. Antigen-negative Begleitzellen waren auf allen OT in großer Anzahl vorhanden.

Im Kokultivierungsversuch waren nach drei Tagen in keiner der Versuchseinheiten cytopathische Plaques auszumachen.

In den IC-infizierten Positivkontrollen fanden sich auf den OT 99 bzw. 20 Antigen-positive Neurone sowie geschätzt mehrere Hundert infizierte Begleitzellen in der IF-Mikroskopie. Die Kokultivierung ergab 44 bzw. 65 Plaques bei einem Verdünnungsfaktor von 1:64.

Von den drei OC-infizierten Kontrollen waren zwei sowohl in der IF-Mikroskopie als auch nach dreitägiger Kokultivierung negativ. In einer OC-infizierten DK waren sieben von 51 Neuronen produktiv infiziert (13,7%). Darüber hinaus waren 41 Begleitzellen infiziert. Im Verozellrasen wurden in der niedrigsten Verdünnungsstufe („unverdünnt“) 32 Plaques gezählt, was hochgerechnet 48 PFU pro DK entsprach. Das Design des Plaque-Assays war also im Prinzip geeignet, um auch auf produktiv infizierte Zellen aus axonal infizierten TG zurückzuschließen.

In den an Tag 19 nach Explantation infizierten Kontrollen lagen die absoluten Anzahlen an Neuronen mit 51 und 46 deutlich unterhalb der nach standardisierten Zeiten behandelten Kontroll-DK (92; 219; 156 Zellen).

In der Virustitration wurden bei einer Verdünnung von 10^{-6} 13 Plaques gezählt.

Zusammenfassend konnte eine Entzug von ACV aus dem DK-System keine messbare Reaktivierung von HSV-2 hervorrufen.

3.3. Latenzetablierung von HSV-1 und HSV-2 im Trigeminalmodell

3.3.1. Etablierung eines *in situ*-Hybridisierungs-Protokolls zum Nachweis von HSV-1-LAT-Zielsequenzen im Trigeminal-Modell

Da in der Arbeitsgruppe kein etabliertes Protokoll für *in situ*-Hybridisierung (ISH) in zytozentrifugierten Hühner-TG-Zellen existierte, wurde ein ISH-Protokoll für den Nachweis von HSV-1-LAT-Zielsequenzen entwickelt. Neben produktiv infizierten sollten auch latent infizierte Neuronen nachgewiesen und quantifiziert werden, um so Aussagen über die Latenz von HSV-1 zu treffen.

3.3.1.1. *in situ*-Hybridisierung in Vero-Zellen mit der Sonde HSV-1 LAT_5DIG

Zunächst wurde ein Protokoll für HSV-LAT-Zielsequenzen in Vero-Zellen entwickelt (sogenanntes DNA-Protokoll; vergl. Kap. 2.2.8.4.). Als Sonde diente HSV-1 LAT_5DIG (vergl. Kap. 2.1.5.; Kap. 2.1.10.). Eine 75cm²-Zellkulturflasche mit konfluentem Vero-Zellrasen wurde mit einer M.O.I. von 10 infiziert; dabei wurde eine Zellzahl von 1×10^7 angenommen. 24 h.p.i. wiesen nahezu alle Zellen einen ausgeprägten cytopathischen Effekt auf. Um den Versuch zu kontrollieren, wurde eine Verdünnungsreihe aus infizierten und uninfizierten Zellen erstellt (ausschließlich infizierte bzw. uninfizierte Vero-Zellen sowie 1:10, 1:5 und 1:1). Die Zellen wurden auf Polylysin-beschichtete OT aufzentrifugiert und nach dem ISH-DNA-Protokoll behandelt (vergl. 2.2.8.4.).

Nach circa 90 Minuten war eine deutliche Farbreaktion zu sehen. Die Häufigkeitsverteilung markierter Vero-Zellen entsprach in der Tendenz der Verdünnungsreihe. In der reinen Positivreihe war ein großer Anteil der Zellen bläulich angefärbt. In den Negativkontrollen wurden keine angefärbten Zellen gesehen (vergl. Abb. C4). Das Protokoll besaß insgesamt das Potential, auf Einzelzellebene redundante Mengen an LAT-Zielsequenzen nachzuweisen. Zwischen LAT-DNA und -RNA wurde nicht unterschieden. Weitere ISH-Versuche mit der Oligonukleotid-Sonde HSV-1 LAT_5DIG in DNA- und RNA-Modus (vergl. Kap. 2.2.8.4.) warfen die Frage auf, wie die Sensitivität der ISH in Vero- sowie in TG-Zellen erhöht werden konnte.

3.3.1.2. Herstellung der Sonde 888bp-LAT-RNA-DIG für *in situ*-Hybridisierung

Mit dem Ziel, Sensitivität und Spezifität der LAT-ISH zu erhöhen, wurde eine 888bp große RNA-Antisense-Sonde (888bp-LAT-RNA-DIG) synthetisiert (siehe dazu Kap. 2.2.7.; Kap. 2.2.8.; Kap. 2.1.10.): Die Herstellung der Sonde begann mit der Amplifikation des 888bp großen LAT-DNA-Fragments LAT_1113-2573 (benannt nach dem 1.5kb-LAT-Intron) mittels *GC-rich*-PCR (Kap.

2.2.6.1.). Die hierfür verwendeten Primer waren HSV-1_LAT-1113-2573-fw und -bw (vergl. Kap. 2.1.5.). Amplifiziert wurde die LAT-Sequenz von Position 1371 bis 2258 (vergl. Abb. 8). Das Fragment wurde zunächst in den Vektor pCR-Topo2.1 zwischenkloniert. Das entstandene Plasmid pCR-Topo2.1-LAT_1113-2573 wurde mit Sal 1 und Eco R1 verdaut und das Insert in das Plasmid pCMV-TNT einkloniert (vergl. Abb. 9). Der Klon pCMV-TNT-LAT_1113-2573 c8 wurde in das DIG-Labeling-Protokoll (vergl. Kap. 2.2.8.2.) übernommen.

Die RNA-Sonde war komplementär zum 1,5kb-LAT-RNA-Transkript. Das Genom von HSV enthält zwei gegensätzlich zueinander ausgerichtete Kopien des LAT-Gens. Als Matrize zur Synthese einer LAT-Antisense-Sonde diente die Kopie im TR_L. Ein innerhalb des 1.5kb-LAT-Intron gelegener Abschnitt wurde mithilfe der Primer HSV-1_LAT-1113-2573-fw und -bw mittels PCR amplifiziert. Der fw-Primer enthielt eine EcoR1-Sequenz, der bw-Primer eine Sal 1-Sequenz, sodass die LAT-Sequenz in Antisense-Orientierung (LAT') in den Polylinker des Vektors pCMV-TNT eingesetzt wurde. Vom SP6-Promotor ausgehend erfolgt die Synthese von Antisense-Transkripten über *in vitro*-Transkription mittels SP6-RNA-Polymerase (Abb. H5).

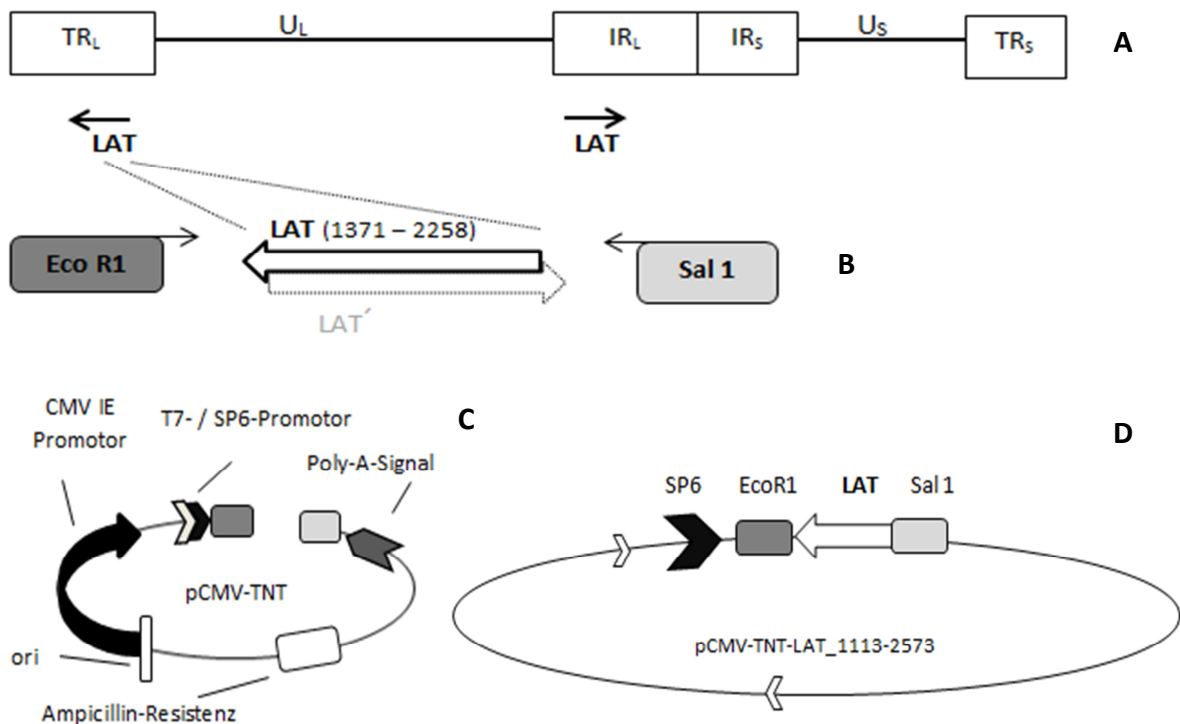


Abb. H5: Herstellung einer Antisense-RNA-Sonde für LAT. Fortsetzung siehe S. 84

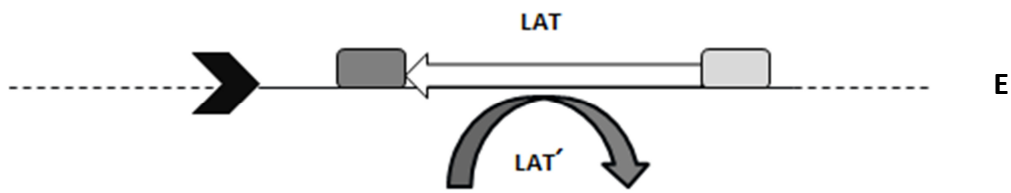


Abb. H5 (Fortsetzung): Herstellung einer Antisense-RNA-Sonde für LAT: Das Genom von HSV enthält zwei Kopien des LAT-Gens, die in entgegengesetzter Orientierung zueinander liegen. Als Matrize zur Synthese einer LAT-Antisense-Sonde diente die Kopie im TR_L-Abschnitt (A). Der innerhalb des 1.5kb-LAT-Intron (1113 - 2573) gelegene Gen-Abschnitt 1371 - 2258 wurde mithilfe der Primer HSV-1_LAT-1113-2573-fw und -bw mittels PCR amplifiziert. Der fw-Primer enthielt eine EcoR1-Sequenz, der bw-Primer eine Sal 1-Sequenz (B), sodass die LAT-Sequenz in Antisense-Orientierung (LAT') in den Polylinker des Vektors pCMV-TNT (fragmentarisch abgebildet) eingesetzt wird (C, D). Vom SP6-Promotor ausgehend erfolgte die Synthese von Antisense-Transkripten über *in vitro*-Transkription mittels SP6-RNA-Polymerase (D).

3.3.1.3. *in situ*-Hybridisierung in HSV-1-infizierten Vero-Zellen mit der Sonde 888bp-LAT-RNA-DIG

Konfluente Vero-Zellrasen einer 6-Lochplatte wurde mit einer M.O.I. von 10 infiziert, 24 h.p.i. geerntet und auf OT aufzentrifugiert. Die angenommene Zellzahl war $1,28 \times 10^6$. Als Kontrollgruppe dienten nicht-infizierte Vero-Zellen. Die ISH wurde nach dem DNA-Protokoll (vergl. Kap. 2.2.8.4.) durchgeführt. Dabei wurde als Sonde 888bp-LAT-RNA-DIG eingesetzt (vergl. Kap. 3.3.1.2.).

Nach zwanzig Minuten war ein großer Anteil der infizierten Vero-Zellen bläulich angefärbt (vergl. Abb. H6). Ein Teil der Zellen war infolge der lytischen Infektion beschädigt. In Zellen, die dem Aspekt nach intakt waren, war die Färbung in den meisten Fällen auf eine meist zentral gelegene rundliche Struktur begrenzt, die als Zellkern interpretiert wurde. In den Negativkontrollen wurden keine markierten Vero-Zellen beobachtet. Hier waren nur wenige Zellen beschädigt. Es zeigte sich eine dezente Hintergrundfärbung der Zellen. Das mit dem DNA-Protokoll erzielte Ergebnis aus Kap. 3.3.1.1. konnte unter Anwendung der Sonde 888bp-LAT-RNA-DIG reproduziert werden; die Lokalisierung der LAT-Nukleinsäuren war schärfer als in vorherigen Versuchen; darüber hinaus wurden insgesamt weniger Färbungsartefakte beobachtet.

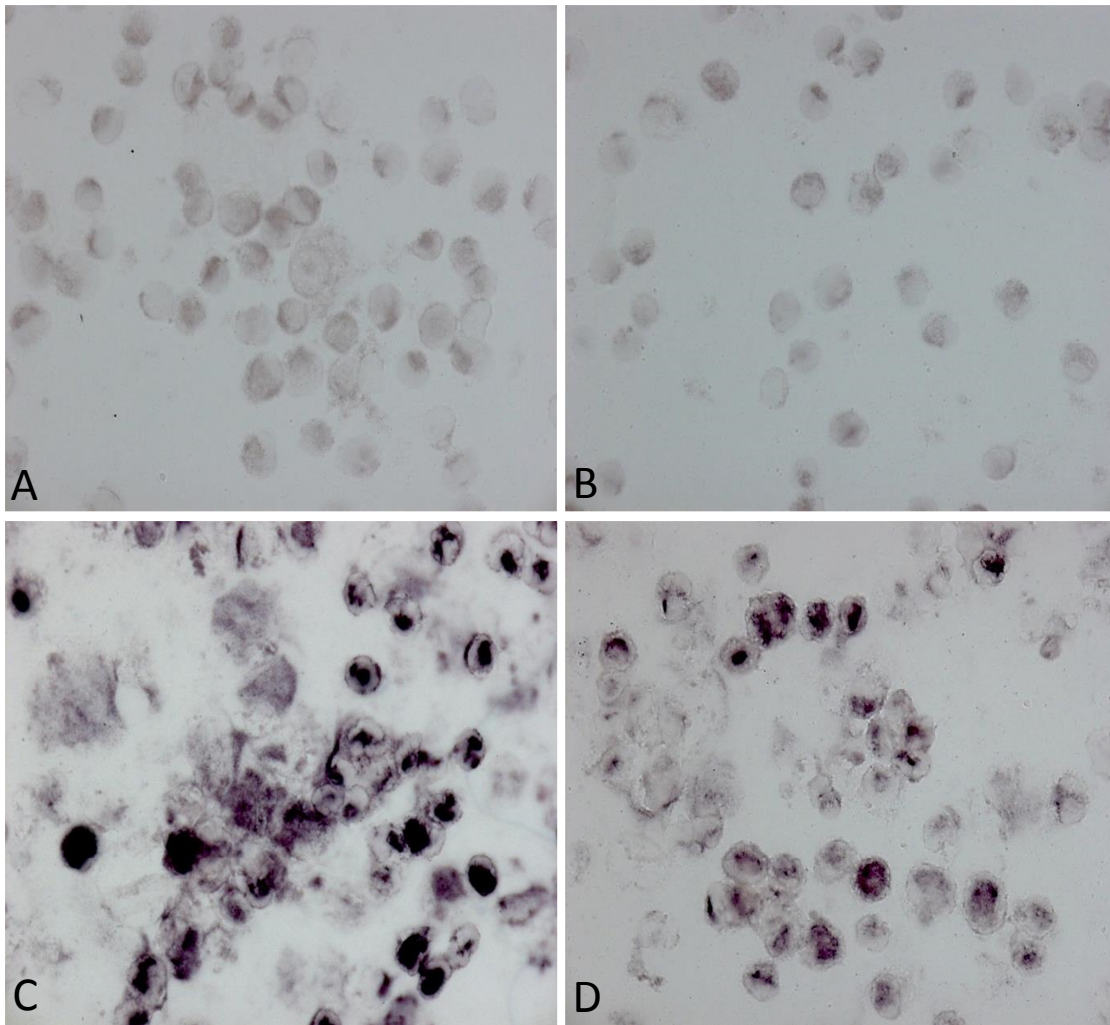


Abb. H6: ISH in HSV-1-infizierten Vero-Zellen. **A – B:** Uninfiziert. **C – D:** M.O.I. = 10. Es wurde das in Kap. 2.2.8.4. beschriebene DNA-Protokoll angewandt. Als Sonde diente 888bp-LAT-RNA-DIG. Ein Großteil dem Aspekt nach intakter Vero-Zellen war markiert. Dabei konzentrierte sich die Färbung in der Regel auf eine zentrale Struktur, die als Zellkern interpretiert wurde. Vergrößerung: 400-fach.

3.3.1.4. *in situ*-Hybridisierungs-Versuch zur Detektion von LAT-Zielsequenzen in retrograd HSV-1-infizierten Trigemininalganglien

Sieben DK wurden mit einer Dosis von 5×10^6 PFU retrograd infiziert. Zwei DK wurden mock-infiziert. Die Ernte erfolgte 8 d.p.i. Es folgte eine Behandlung nach dem in Kap. 2.2.8.4. beschriebenen RNA-Protokoll. Als Sonde diente diente 888bp-LAT-RNA-DIG. Das Target war LAT-RNA. In der Auswertung wurde in den infizierten DK in einzelnen TG-Zellen bläuliche Färbungen beobachtet. Trotzdem war die optische Unterscheidung von Versuchs- und Kontrollgruppe in der Lichtmikroskopie 24 Stunden nach Detektionsbeginn insgesamt schwierig.

3.3.1.5. Detektion von LAT-Zielsequenzen nach HSV-1-Infektion der Innenkammer mittels *in situ*-Hybridisierung

Es sollte beurteilt werden, ob das DNA-Protokoll von der Anwendung in Kulturzellen auf das Organmodell übertragen werden konnte (vergl. Kap. (vergl. Kap. 2.2.8.4.; Kap. 3.3.1.3.)). Das Target waren LAT-Nukleinsäuren. Als Sonde diente 888bp-LAT-RNA-DIG. Der Versuch umfasste sechs DK, von denen je zwei in der IC mit einem Inokulum von 5×10^6 PFU bzw. 5×10^5 PFU HSV-1 infiziert wurden. Zwei DK wurden mock-infiziert. Die Ernte fand 2 d.p.i. statt. Nach der ISH wurden die Zellen mit DAPI gefärbt.

In den infizierten TG-Zellen wurden LAT-Zielsequenzen detektiert. Versuchs- und Kontrollgruppe unterschieden sich 30 Minuten nach Detektionsbeginn deutlich. Dem morphologischen Aspekt nach waren sowohl Neuronen als auch Begleitzellen markiert. In fast allen Fällen war die Färbung mit dem Zellkern kolokalisiert, der bei Neuronen in der DAPI-Färbung häufig gefleckt und etwas blasser in Erscheinung trat (vergl. Abb. H7; vergl. Abb. H2). Die Häufigkeit markierter Zellen war in der Gruppe mit niedrigerer Infektionsmenge geringer als in der Vergleichsgruppe höherer Dosis. In den Negativ-Kontrollen traten keine gefärbten Zellen auf (vergl. Abb. H8). Es gab insgesamt kaum Artefakte. Der Versuch zeigte, dass das DNA-Protokoll im TG-Modell angewandt werden kann, um hohe Mengen an LAT-Nukleinsäuren zu detektieren.

3.3.1.6. Zusammenfassung der *in situ*-Hybridisierungs-Versuche in Vero-Zellen und im Trigeminal-Modell

Mit dem ISH-DNA-Protokoll konnten redundante Mengen an LAT-Zielsequenzen sowohl in Vero-Zellen als auch in TG-Zellen nachgewiesen werden. Die Differenzierung der LAT-Nukleinsäuren mithilfe des in Kap. 2.2.8.4. beschriebenen RNA-Protokolls gelang nicht (vergl. Kap. 4.2.1.). Die Methode konnte im gegenwärtigen Stadium keinen sicheren Nachweis über die Latenzetablierung von HSV im TG-Modell erbringen, sodass hierfür auf die bereits etablierte rt-PCR-Methode zurückgegriffen wurde (vergl. Hafezi et al., 2012 [86]; vergl. Kap. 3.3.2.1.).

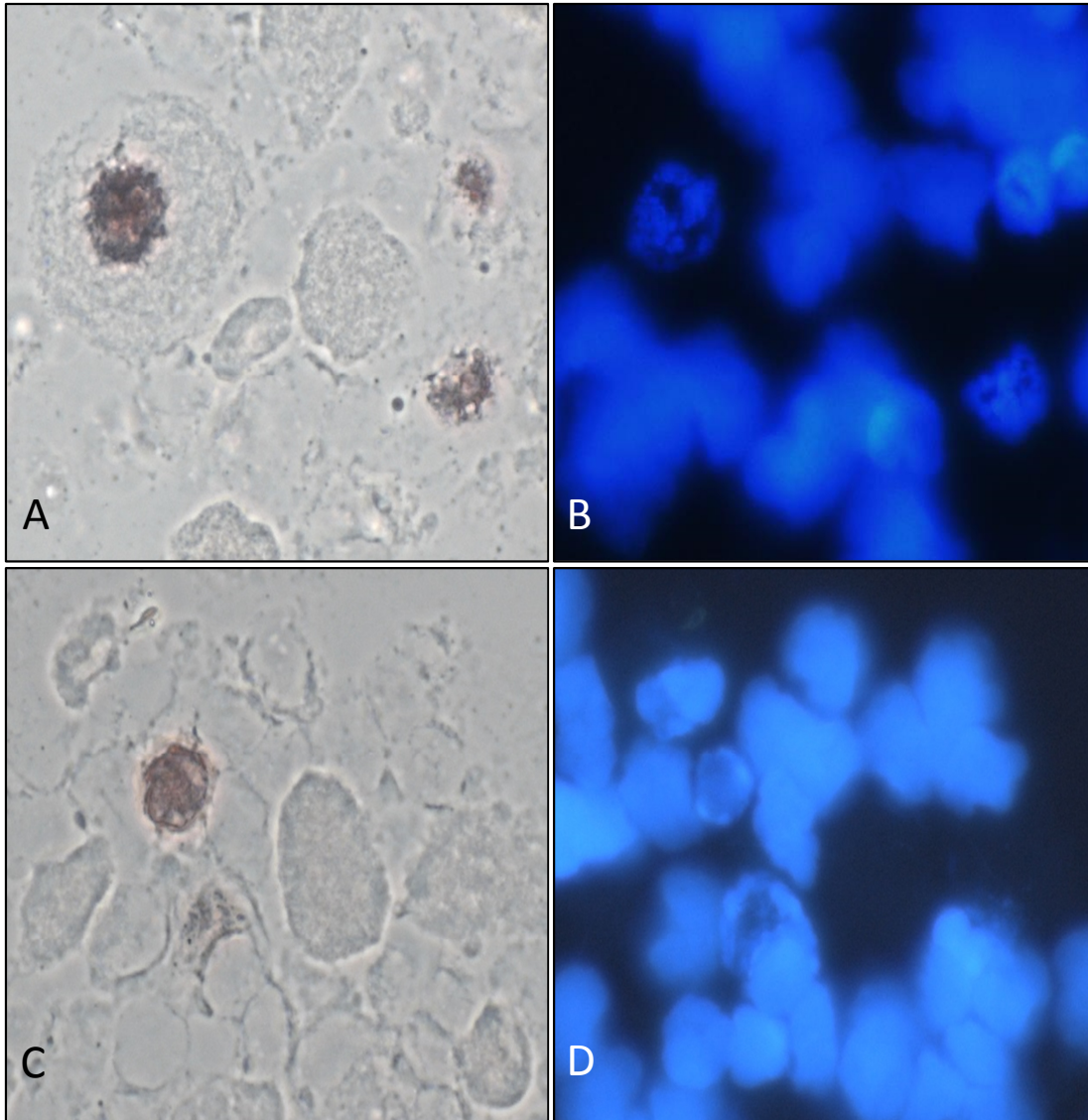


Abb. H7: Detektion von LAT-Nukleinsäuren mittels ISH nach HSV-1-Infektion der IC (1). DNA-Protokoll unter Verwendung der Sonde 888bp-LAT-RNA-DIG (vergl. Kap. 2.2.8.4.) Die Panel zeigen exemplarisch lichtmikroskopische (l.) und fluoreszenzmikroskopische (r.) Aufnahmen des jeweils gleichen Bildausschnitts nach ISH und DAPI-Färbung. **A – D:** IC-infizierte DK. **E – F** (siehe folgende Seite): Negativ-Kontrolle. Die Felder A / B zeigen dem morphologischen Aspekt nach ein Neuron mit dunkel-fleckigem Zellkern (links im Bild, vergl. Abb. H2) und zwei weitere markierte nicht-neuronale Zellen. Die Markierung mittels ISH beschränkte sich auf den Zellkern. Auch die ISH-Färbung der in den Feldern C / D abgebildete (Begleit-)Zelle war mit dem Kern kolokalisiert. In den Negativ-Kontrollen wurden keine markierten Zellen beobachtet. Vergrößerung 630-fach.

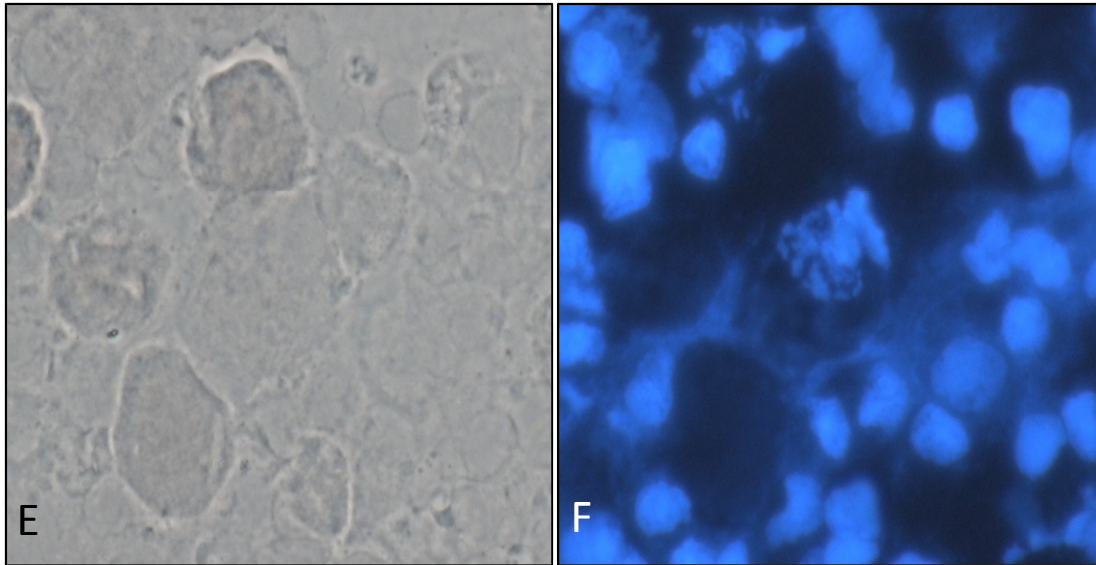


Abb. H7 (Fortsetzung): Negativ-Kontrolle.

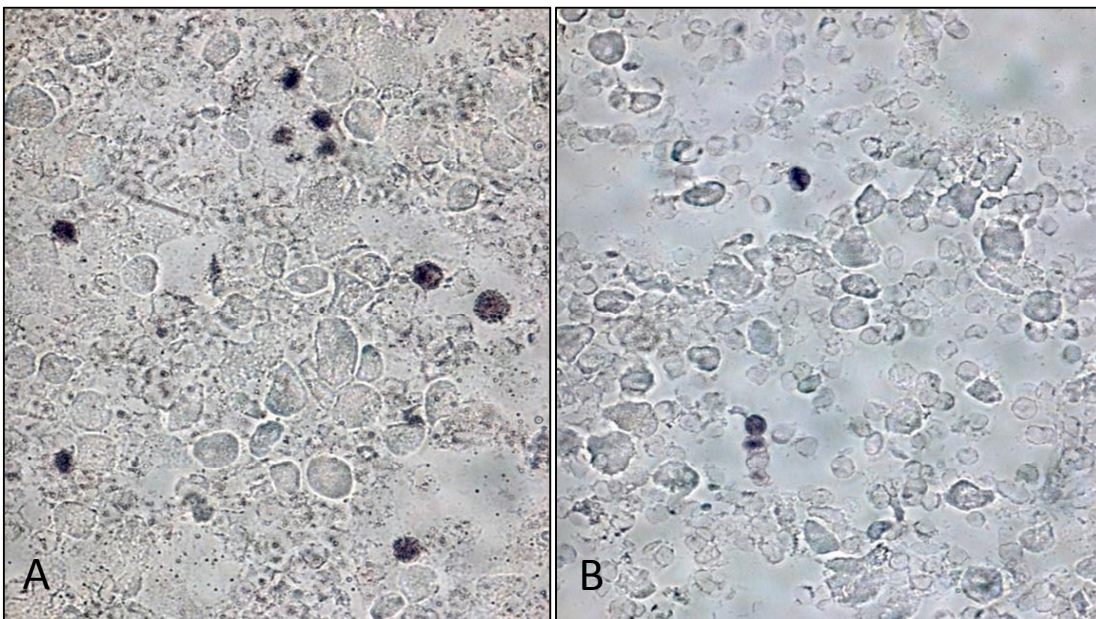


Abb. H8: Detektion von LAT-Nukleinsäuren mittels ISH nach HSV-1-Infektion der IC (2). **A:** 5×10^6 PFU. **B:** 5×10^5 PFU. **C – D** (siehe folgende Seite): Mock-infizierte TG. Die TG wurden nach dem in Kap. 2.2.8.4. beschriebenen DNA-Protokoll behandelt. Es wurde die Sonde 888bp-LAT-RNA-DIG verwendet. Die Anzahl markierter Zellen war in den DK mit einer Infektionsdosis von 5×10^6 deutlich größer als bei zehnfach niedrigerer PFU-Menge. In den Negativ-Kontrollen wurden keine markierten Zellen beobachtet. Vergrößerung A – C: 200-fach; D:160-fach.

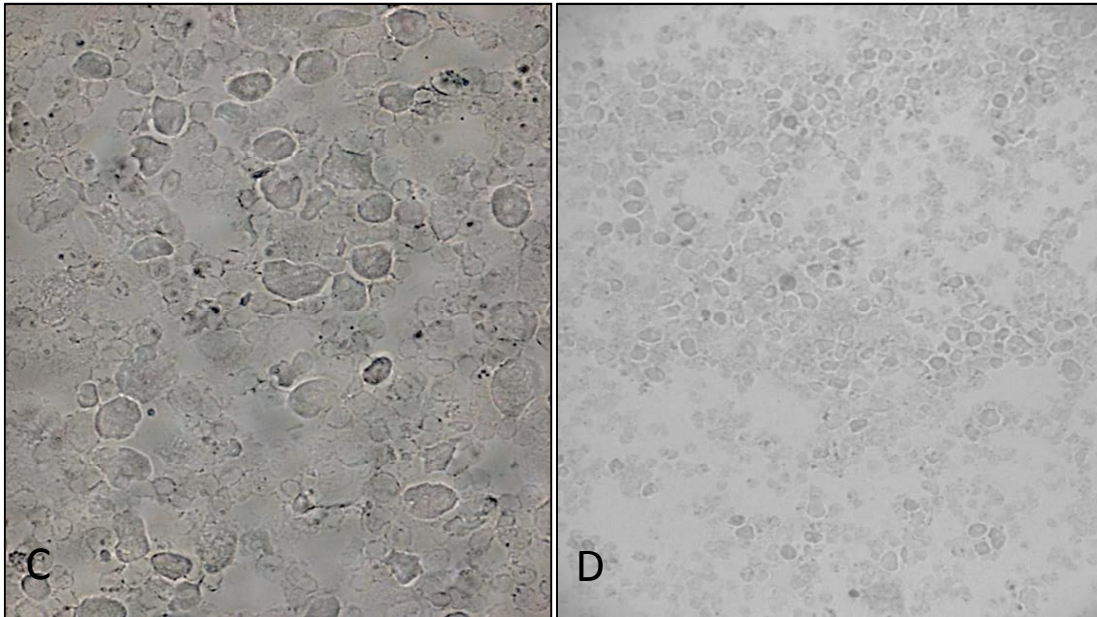


Abb. H8 (Fortsetzung): Negativ-Kontrolle.

3.3.2. Unterschiede in der Latenzetablierung von HSV-1 und HSV-2 nach axonaler Infektion von Trigeminalganglien-Explantaten

3.3.2.1. Nachweis von LAT mittels RT-PCR nach axonaler Infektion mit HSV-1 und HSV-2

Der Versuch sollte mögliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen HSV-1 und HSV-2 hinsichtlich der Latenzetablierung und -unterhaltung im Trigeminal-Modell veranschaulichen. Dazu wurden aus jeweils derselben Kammer LAT-gDNA- und LAT-cDNA-Level mittels RT-PCR bestimmt (vergl. Kap. 2.2.6.2.) und vergleichend eine mögliche Virus-Antigen-Produktion via IF-Mikroskopie nachgewiesen und quantifiziert.

Jeweils zehn DK wurden axonal mit 5×10^6 PFU HSV-1 bzw. HSV-2 infiziert. Vier DK wurden mock-infiziert. Die TG wurden 8 d.p.i. geerntet. Die Ganglion-Resuspension wurde nach der Ernte aufgeteilt (modifiziertes Protokoll, vergl. Kap. 2.2.3.2.). Zwei Drittel der Suspension wurden der RT-PCR, ein Drittel der Untersuchung mittels IFT zugeführt.

Um die PCR-Ergebnisse für LAT-Transkripte zu standardisieren, wurden relative Transkriptlevel bestimmt. Dazu wurden die Cp-Schwellenwerte von LAT-cDNA in Beziehung zu den Cp-Schwellenwerten des *housekeeping*-Gens *chicken*- β -Actin gesetzt $[2^{-(Cp \text{ LAT-cDNA} - Cp \beta\text{-Actin})}]$ (vergl. Kap. 2.2.6.2.3., vergl. Tab. H2 und H3).

Im HSV-1-Versuch wurden in der IF-Mikroskopie keine Antigen-positiven Neuronen oder Begleitzellen detektiert. Die mittlere Anzahl an Neuronen pro OT lag bei 167 (Median = 129,0; SD = 90,8). In einer DK war die LAT-gDNA-Menge in der RT-PCR nicht quantifizierbar; diese DK wurde von weiteren Betrachtungen ausgeschlossen. In den übrigen neun DK streuten die HSV-1-LAT-gDNA-Level um einen Mittelwert von rund $1,14 \times 10^5$ Kopien. Der Median wich mit einem Wert von $3,23 \times 10^4$ Kopien deutlich vom Mittelwert ab.

In zwei DK wurde kein HSV-1-LAT-Transkript (LAT-cDNA) nachgewiesen. In den sieben übrigen DK betrug das durchschnittliche Transkript-Level $3,98 \times 10^4$ Kopien; der Median lag bei $3,46 \times 10^4$ Kopien. Die Anzahl an LAT-Transkripten war im Mittel circa um den Faktor 10^3 geringer als die die Transkriptmengen von β -Actin (vergl. Tab. H2, im Haupttext), Relative Transkriptlevel; vergl. Kap. 4.2.2.).

Im HSV-2-Versuch wurden in der IF im Mittel 151 Neurone pro OT bestimmt (Median = 152,0; SD = 42,0). Drei von zehn DK waren Antigen-positiv (vergl. Tab. H3, im Haupttext): In diesen Kammern waren zwischen 15 (13,2 %) und 55 (29,6 %) Neuronen sowie jeweils circa 1000 Begleitzellen produktiv infiziert.

In einer DK konnte in der RT-PCR keine HSV-2-LAT-gDNA nachgewiesen werden; diese DK wurden von weiteren Betrachtungen ausgenommen. In den Antigen-positiven Kammern wurden hohe LAT-gDNA-Spiegel gemessen; sie lagen im Bereich von circa 1×10^8 und mehr Kopien. Die HSV-2-LAT-cDNA-Spiegel in diesen DK bewegten sich in einer Größenordnung von mehr als 2×10^6 bis 2×10^7 Kopien. Dies entsprach einem relativen Transkriptlevel von circa 2% bis 7% gegenüber den β -Actin-Transkriptmengen.

In den HSV-2-Antigen-negativen DK waren die gDNA-LAT-Spiegel im Mittel circa 20 mal geringer als in der HSV-1-Versuchsreihe: Es wurden nur wenige Tausend HSV-2-LAT-DNA-Kopien in den TG gemessen (Mittelwert = 5670; Median = 3490; SD = 6990). LAT-cDNA wurde in den Antigen-negativen DK im Unterschied zum HSV-1-Versuchsteil nicht detektiert.

In den vier mock-infizierten Kontrollen betrug die durchschnittliche Neuronanzahl pro OT 204 (Median = 183,5; SD = 49,1). Es wurden keine Antigen-positiven Zellen gesehen. In der PCR wurden weder LAT-gDNA noch LAT-cDNA von HSV-1 und HSV-2 detektiert.

3.3.2.2. Veränderung der Neuritenmorphologie nach retrograder Infektion mit HSV-1 und HSV-2

Folgende Beobachtungen basieren im Wesentlichen auf dem Versuch Kap. 3.3.2.1. In den mock-infizierten DK waren nach acht Tagen lichtmikroskopisch sowohl inner- als auch außerhalb der IC dichte Neuritengeflechte zu erkennen, die sich in der OC über die gesamte Länge der Führungsrinnen erstreckten. In der IC war keine Unterscheidung zwischen den Neuriten der beiden gegenüberliegenden Ganglien mehr möglich. Die Neuriten verjüngten sich in der Peripherie der OC, sodass sie in Ganglionnähe häufig noch strangartig, in der OC-Mitte hingegen filigran wirkten. In der OC fanden sich unmittelbar um die Glasringe herum (Begleit-)zellartig anmutende Strukturen. Zwischen den Beobachtungszeitpunkten 4/5 und 12/13 Tage nach Explantation war ein deutliches Neuritenwachstum in Bezug auf Länge und Grad der Verflechtung zu erkennen .

Acht Tage nach der retrograden HSV-2-Infektion ähnelte das Erscheinungsbild insgesamt dem der Mock-Kontrollen (vergl. Abb. 10): Die Verflechtung feiner Neuriten war bis zum Ende der Führungsrillen erhalten. Segmentierte Neuriten waren nur vereinzelt zu sehen; die meisten Neuriten schienen intakt. In unmittelbarer Nähe zum Begrenzungsring war in der OC gegenüber den uninfizierten DK kein Unterschied erkennbar. Gleiches galt für den IC-Bereich. Ähnliche Beobachtungen wurden auch im Versuch Kap. 3.2.3. gemacht (vergl. Abb. C2 und C3). Acht Tage nach der axonalen HSV-1-Infektion hingegen war die Integrität der Neuriten im Bereich der OC stark beschädigt (vergl. Abb. 10): Einige Neuriten erreichten zwar die Enden der Führungsrillen, allerdings waren die Ausläufer schmaler und weniger zahlreich als in den Kontrollen und den HSV-2-infizierten DK. In der OC brachen viele Neuriten bereits in direkter Nähe zum Begrenzungsring ab. Der Großteil der Neuriten war segmentiert. Zellartige Strukturen um den Glasring herum waren wie in den Negativ-Kontrollen vorhanden. Die IC-Bereiche unterschieden sich dem Aspekt nach nicht von den Kontrollen.

Benennung der DK	Neurone gesamt	HSV-1-Antigen-positive Neurone	HSV-1-Antigen-positive Begleitzellen	LAT-gDNA: Anzahl an Kopien [x 10 ⁴]	LAT-cDNA: Anzahl an Kopien [x 10 ⁴]	LAT-cDNA: Relatives Transkript-level [x 10 ⁻⁴]
5	108	0	0	12,5	3,24	4,49
6	72	0	0	2,84	0,46	6,53
7	138	0	0	3,07	3,46	7,15
8	121	0	0	2,55	n	/
9	334	0	0	2,93	0,86	5,97
10	129	0	0	3,23	3,77	10,61
(11)	(146)	0	0	n	/	/
12	232	0	0	49,7	n	/
13	94	0	0	3,33	5,66	13,43
14	275	0	0	22,0	10,4	27,05
Mittelwert	167,0	/	/	11,35	3,98	10,75
Median	129,0	0	0	3,23	3,46	7,15
SD	90,8	/	/	15,8	3,34	7,81

Tab. H2: Axonale HSV-1-Infektion an Tag 8. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU. Der linke Teil der Tabelle zeigt die Ergebnisse der IF-Mikroskopie, der rechte Teil zeigt die Ergebnisse der RT-PCR. Ein Drittel der Ganglion-Resuspension wurde nach der Ernte fluoreszenzgefärbt; die übrigen zwei Drittel wurden der RT-PCR zugeführt. Die PCR-Daten beziehen sich auf die gesamten zwei Drittel der TG-Resuspension. DK 11 fand keinen Eingang in die Berechnung der angegebenen statistischen Größen. n: nicht quantifizierbar.

Benennung der DK	Neurone gesamt	HSV-2-Antigen-positive Neurone	Anteil Antigen-positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen-positive Begleitzellen	LAT-gDNA*: Anzahl an Kopien [x 10 ³]	LAT-cDNA: Anzahl an Kopien [x 10 ⁶]	LAT-cDNA: Relatives Transkript-level [x 10 ⁻²]
15	121	0	0	0	2,83	n	/
16	162	33	20,4	941	$9,67 \times 10^4$	2,16	1,77
(17)	(144)	0	0	0	/	/	/
18	81	0	0	0	5,04	n	/
19	175	0	0	0	1,07	n	/
20	114	15	13,2	1027	$3,56 \times 10^5$	21,14	4,04
21	152	0	0	0	1,31	n	/
22	186	55	29,6	1208	$2,47 \times 10^5$	11,69	7,38
23	222	0	0	0	19,6	n	/
24	149	0	0	0	4,15	n	/
Mittelwert	151,3	/	/	/	5,67 (*n = 6)	11,66	4,40
Median	152,0	0	0	0	3,49 (*n = 6)	11,69	4,04
SD	42,0	/	/	/	6,99 (*n = 6)	9,49	2,82

Tab. H3: Axonale HSV-2-Infektion an Tag 8. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU. Der linke Teil der Tabelle zeigt die Ergebnisse der IF-Mikroskopie, der rechte Teil zeigt die Ergebnisse der RT-PCR. Ein Drittel der Ganglion-

Resuspension wurde nach der Ernte fluoreszenzgefärbt; die übrigen zwei Drittel wurden der RT-PCR zugeführt. Die PCR-Daten beziehen sich auf die gesamten zwei Drittel der TG-Resuspension. DK 17 fand keinen Eingang in die Berechnung der angegebenen statistischen Größen. n: nicht quantifizierbar. * Die statistischen Maßeinheiten in der Spalte „LAT-gDNA“ beziehen sich ausschließlich auf Antigen-negative DK; produktiv infizierte DK wurden hier ausgenommen.

4. Diskussion

4.1. Latenz und Reaktivierung: Modelle

Der Erfolg der Strategie von neuronaler Latenzetablierung und rekurrerender Reaktivierung wird durch die hohe Seroprävalenz von HSV-1 und HSV-2 belegt [218]. Die beteiligten Mechanismen, Signalwege und Mitspieler sind extrem vielfältig und trotz jahrzehntelanger Bemühungen zum Teil nur in Ansätzen verstanden.

Aus naheliegenden Gründen können Latenz und Reaktivierung nur selten (molekularbiologisch) anhand menschlichen Probenmaterials untersucht werden [53]. Die meisten Autoren verlassen sich bei der Erforschung von Latenz und Reaktivierung daher auf Zellkultur- oder Tiermodelle. Am häufigsten wird zwar das Mausmodell genutzt, aber auch Spezies wie Kaninchen und Meerschweinchen sind regelmäßig Basis für Tierversuche [204; 246]. Ein oft benanntes Problem ist, dass Beobachtungen aus Experimenten mit verschiedenen Spezies teilweise deutlich voneinander abweichen. Die Häufigkeit der Reaktivierungsepisoden ist bei Mäusen z.B. viel geringer als bei Kaninchen. Zudem kann die Reaktivierung bei Kaninchen *in vivo* experimentell vergleichsweise leicht provoziert werden. Die Beobachtung, dass auch die Verwendung verschiedener HSV-Stämme zu Abweichungen in der Häufigkeit von spontaner oder induzierter Reaktivierung führen kann, erschwert die Vergleichbarkeit von Ergebnissen zusätzlich [246; 254]. Speziesunterschiede werden auch hinsichtlich der Funktion von LAT beobachtet: Die Infektion mit LAT-negativen HSV-Mutanten führt bei Mäusen während der Latenzphase zur einer Vervielfachung der Menge lytischer Transkripte, wohingegen bei Kaninchen eine Verminderung lytischer Transkripte verzeichnet wird [14; 76]. Aufgrund solcher Widersprüche stimmen die meisten Autoren darüber ein, dass LAT mehrere funktionelle Facetten besitzt und (je nach Versuchsbedingungen) sowohl Latenzetablierung als auch die Reaktivierung vereinfachen kann (vergl. Kap. 1.3.3.4.).

Neben Tiermodellen findet eine Fülle verschiedener Zellkultur-Modelle Verwendung für HSV-Latenz- bzw. Reaktivierungsversuche, z.B. neuronal differenzierte PC12-Zellen [43] oder humane Fibroblasten [249]. Zwischen Tier- und Zellkulturmodellen stehen *in vitro*-Modelle, in denen periphere Ganglien als vollständige Explantate (Organmodell) oder in Form aufbereiteter Ganglionzellen kultiviert werden. *in vitro*-Modelle mit zwei funktionell getrennten Kompartimenten (DK-Modelle) nehmen innerhalb dieser Gruppe eine gesonderte Stellung ein und werden bisher vergleichsweise selten genutzt [50; 122].

Ein Vorteil von DK-Modellen gegenüber den meisten anderen *in vitro*-Modellen ist die Möglichkeit, eine latente HSV-Infektion ohne die Verwendung von ACV etablieren zu können [86; 50]. Du et al. (2012, Diskussion) weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass die ACV-Behandlung zu einer HSV-Suppression führt, die in ihren Eigenschaften vom Latenzzustand im engeren Sinne abweichen kann, da ACV erst dann mit dem Virus interagiert, wenn es bereits in den Replikations- bzw. Transkriptionsprozess eingetreten ist [60] (vergl. Kap. 1.2.9).

Neben dem Aspekt, dass Versuche mit *in vitro*-Modellen nicht auf die Infektion von Labortieren angewiesen sind und deshalb weniger Leid verursachen, bieten sie den Vorteil, den Verlauf von HSV-Infektionen über große Zeitspannen hinweg (z.B. fluoreszenzmikroskopisch) in Echtzeit nachverfolgen zu können [86].

Ein wichtiger Gesichtspunkt bei Reaktivierungsversuchen ist der massive Einfluss der Axotomie auf die die Homöostase der in den Explantaten enthaltenen Neuronen. Im Mausmodell bspw. wird die Reaktivierung oft kalkuliert durch die Explantation selbst hervorgerufen [254]. Sawtell und Thompson (2004) kritisieren, dass Beobachtungen hinsichtlich des Reaktivierungsprozesses in zuvor *via naturalis* infizierten Explantaten schon nach einigen Stunden der Kultivierung nicht mehr mit unmittelbar nach der Explantation untersuchtem Proben vergleichbar seien [208]. Im Unterschied dazu werden DK-Modelle erst nach Aussprossen der Neuriten, also zu einem Zeitpunkt, zu dem sich die Neuronen von der Axotomie erholt haben, infiziert. Das hier verwendete Organmodell lässt darüber hinaus die Integrität des Ganglions unangetastet, sodass die Interaktion zwischen Neuronen, Glia- und anderen (stationären) nicht-neuronalen Zellen ungestört bleibt, bildet also Prozesse auf einer Ebene ab, die unter Einfluss der *innate immunity* (vergl. auch Kap. 1.3.3.6.), aber außerhalb des Interaktion mit zellulärem bzw. adaptivem Immunsystem ablaufen [vergl. [86], Diskussion].

Wie bei Tiermodellen stößt man auch bei *in vitro*-Modellen auf eine Vielfalt an Spezies (z.B. Schweine, Ratten und Mäuse). Das in dieser Arbeit verwendete Organmodell besitzt den Vorteil, dass die Bebrütung von Hühnereiern sehr unkompliziert ist. Im Unterschied zu Modellen auf der Basis von Säugetieren ist keine weitere Ausstattung für Tierhaltung notwendig und es gibt kaum bürokratische Hürden [86].

4.2. Latenzetablierung von HSV-1 im Trigeminal-Modell

Latente HSV-Infektionen definieren sich durch den Nachweis der Transkription des LAT-Gens bei gleichzeitig fehlender Expression anderer viraler Gene [254]. Der Nachweis über die Latenzetablierung von HSV-1 17syn⁺ im vorliegenden TG-Modell ist durch Hafezi et al. (2012) [86] mittels (RT-)PCR erbracht worden. Andere Methoden, latente Viren nachzuweisen sind die ISH, der Northern Blot und die Kombination von ISH und RT-PCR (*in situ*-PCR) [18; 26; 161]. Allen Methoden ist gemeinsam, dass sie sich auf die Detektion von LAT-Transkripten verlassen. Dabei ist LAT aufgrund seiner komplexen Funktion im Latenz-Reaktivierungs-Kreislauf auch über den Nachweis der Latenzetablierung hinaus eine interessante Zielstruktur. Hinter den Bestrebungen, ein ISH-Protokoll für HSV-LAT zu etablieren, stand initial die Idee, die Ergebnisse der übrigen Infektionsversuche dieser Arbeit mithilfe der ISH auszuwerten. Die ISH sollte auf latente und produktive Infektionsverläufe angewendet werden. Da ein hinreichend sicheres Verfahren für die Quantifizierung LAT-RNA-positiver Neurone nicht in angemessener Zeit zur Verfügung stand, wurde auf die bereits etablierte RT-PCR zurückgegriffen (vergl. Kap. 2.2.6.2.).

4.2.1. *in situ*-Hybridisierung im Trigeminal-Modell

Es ist in dieser Arbeit gelungen, LAT-Zielsequenzen im Modus produktiver HSV-Infektionen in Zellkultur und im TG-Modell nachzuweisen. In Kombination mit einer DAPI-Kernfärbung eigneten sich Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse auch für eine nährungsweise Quantifizierung LAT-Zielsequenz-positiver Neurone. Im latenten Infektionsmodus konnten LAT-Zielsequenzen hingegen nicht mit zufriedenstellender Sicherheit nachgewiesen werden, wobei auch hier zunächst nur per Definition zwischen LAT-DNA- und LAT-RNA-Protokoll unterschieden wurde. Ursächlich für die Unsicherheit des LAT-Nachweises war vermutlich eine zu geringe Sensitivität des ISH-Protokolls. Verschiedene Faktoren nehmen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit der ISH:

Der bedeutendste Aspekt ist natürlich die Quantität der Zielstruktur. Die Infektionsrate ist bei einer retrograden Infektion des TG-Modells naturgemäß niedriger als bei Infektion der IC. In diesem Kontext spielt auch die räumliche Verteilung latent infizierter Neurone eine Rolle, die sich vorwiegend am Rand des TG befinden [86], sodass sie bei der Ernte eventuell eher in der IC verbleiben können als zentral gelegene Zellen.

Es ist wahrscheinlich, dass der Trypsin-Kollagenase-Verdau vor der Zytozentrifugation der TG-Zellen zu einer Verminderung intakter Nukleinsäuren führt (vergl. Kap. 2.2.3.1.), z.B. indem

ubiquitäre DNAsen und RNAsen freigelegte Nukleinsäuren abbauen. Bei Experimenten zur Bestimmung einer geeigneten Dauer des Pepsinverdau im ISH-Protokoll war bspw. zu beobachten, dass bereits ein zehnminütiger Verdau in Verozellen dazu führte, dass die Versuchsgruppe von den mock-infizierten Kontrollen optisch kaum zu unterscheiden war. Die Vermutung wird nachträglich auch durch die Ergebnisse aus der RT-PCR gestützt (vergl. Kap. 4.2.2.). Ein Ansatz zur Optimierung des ISH-Protokolls könnte darin bestehen, die Dauer des Trypsin-Kollagenase-Verdau der TG zu reduzieren oder (kostenintensivere) mechanische Verfahren, wie die Kryodissektion, zu verwenden.

Um Sensitivität und Spezifität des ISH-Protokolls zu erhöhen, wurden eine LAT-RNA-Antisense-Sonde mittels in vitro-Transkription hergestellt (vergl. Kap. 3.3.1.2.). Laut Hersteller des DIG RNA Labeling Kits (Roche) wird bei diesem Verfahren alle 20 – 25 Basenpaare ein DIG-markiertes Uridin-Nukleotid in die Sequenz integriert, sodass bei einer Größe von 888bp mehr als 35 DIG-Markierungen entstehen. Dieser Schritt führte zwar nicht zu einem sicheren LAT-Transkript-Nachweis. Es wurde aber beobachtet, dass die Lokalisation von LAT-DNA im Zellkern mit der RNA-Antisense-Sonde deutlicher zur Darstellung gebracht werden konnte als mit der einfach markierten Sonde HSV-1 LAT 5DIG. Außerdem verringerte sich die zur Detektion notwendige Zeitspanne in Verozellen merklich (vergl. Kap. 3.3.1.1.; Kap. 3.3.1.3.).

Die Zuverlässigkeit der ISH hing auch von der Dauer des Denaturierungsschrittes ab: Bei einer Dauer von vier Minuten z.B. war die Reproduktion von Ergebnissen bei ansonsten stabilen Bedingungen unsicher. Aus diesem Grund und weil die Ergebnisse des DNA-Protokolls nicht durch das Fehlen RNase-freier Bedingungen beeinflusst wurden, ist davon auszugehen, dass es sich bei den nachgewiesenen LAT-Zielsequenzen überwiegend um genomische LAT-Sequenzen handelte. Auf die genauere Bestimmung, z.B. mittels DNase- bzw. RNase-Verdau, wurde zugunsten weiterer Infektionsversuche mit HSV-Nachweis durch IF verzichtet.

Bemerkenswert ist, dass es bisher insgesamt selten gelungen ist, *latente HSV-Genome* mittels ISH nachzuweisen [14; 24; 161; 242]. Wagner und Bloom (1997) sind der Auffassung, dass als Ursache dafür auch sterische Gegebenheiten, wie die episomale Struktur oder die nukleosomale Verpackung des latenten Virus in Frage kommen [242]. Im Unterschied zur Latenzphase liegt das HSV-Genom während der lytischen Infektion in linearer Form vor (vergl. Kap. 1.3.3.2.). Diese Faktoren können auch die Ergebnisse dieser Arbeit beeinflusst

haben: Unter der Annahme, dass das DNA-ISH-Protokoll (vergl. Kap. 2.2.8.4.) ebenfalls nicht in der Lage ist, latente HSV-Genome darzustellen und zudem nur ein Teil der HSV-positiven Neurone nach axonaler Infektion LAT-produziert [245] (vergl. Kap. 4.2.2., LAT-Heterogenität), muss davon ausgegangen werden, dass die LAT-RNA-Detektion sich auf einzelne Neurone beschränken würde, was die optische Auswertung erschwert.

Kaye et al. (2000) weisen darauf hin, dass der Nachweis von Antigenen (mittels IF-Mikroskopie) hinsichtlich des Funktionsstatus von HSV nicht per se mit der Replikation von Virus-DNA gleichgesetzt werden kann [113]. So finden sich bspw. Spuren lytischer Transkripte auch während der Latenzphase [155]. Das hier etablierte ISH-Protokoll weist LAT-Nukleinsäure-Sequenzen (wahrscheinlich DNA) nach und bietet daher einen alternativen Ansatz zur Quantifizierung lytisch infizierter TG-Zellen.

4.2.2. Nachweis der Latenzetablierung von HSV-1 im Trigeminal-Modell mittels RT-PCR

Der Nachweis von HSV-1-LAT-Transkripten nach retrograder Infektion des TG-Modells wurde durch die Anwendung der RT-PCR erbracht (vergl. Kap. 3.3.2.1.). Auf diese Weise wurden einerseits Experimente nachvollzogen, die von Hafezi et al. (2012) [86] bereits publiziert worden sind. Die Wahl des Zeitpunkts (8 d.p.i.) erfolgte z.B. in Anlehnung an diese Arbeit. Ein neuer Aspekt im experimentellen Setting war die Aufteilung von TG-Zellen *derselben* DK in zwei Äste zur getrennten Untersuchung mittels RT-PCR und IF-Mikroskopie. (Dabei wurde die Vorbereitung aller TG wie bei der Auswertung mittels IF-Assay durchgeführt.) Auf diese Weise konnte in Übereinstimmung mit Hafezi et al. auch auf der Ebene *einzelner* DK bestätigt werden, dass die gemessenen HSV-1-Genom-Konzentrationen (mit hoher Wahrscheinlichkeit) nicht Folge selten beobachteter produktiver Infektionen in vereinzelt Zellen (vergl. z.B. Tab. 13) waren. Darüber hinaus konnte ein direkter Vergleich zwischen dem Verhalten von HSV-1 und HSV-2 gezogen werden.

Während die RT-PCR-Ergebnisse für genomische LAT-Kopien die vorherigen Ergebnisse der Arbeitsgruppe widerspiegeln, wurde bei den LAT-Transkripten eine Verminderung der Konzentration um zwei bis drei Zehnerpotenzen beobachtet (Maßstab: Relative Transkriptlevel). Es ist daher wahrscheinlich, dass durch den für die Zytozentrifugation erforderlichen Trypsin-Kollagenase-Verdau ein erheblicher Teil der LAT-Transkripte verloren geht (vergl. auch Kap. 4.2.1.) und die beobachtete Verminderung der LAT-Spiegel daher durch Unterschiede in der Präanalytik erklärt werden kann.

In zwei von neun DK wurden zwar HSV-1-Genome aber keine LAT-Transkripte gefunden (vergl. Tab. H2; DK 8, DK 12, im Haupttext). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung bietet das unter dem Begriff der LAT-Heterogenität bekannte Phänomen, dass nur ein geringer Teil latent HSV-infizierter Neurone eines neuronalen Ganglions auch tatsächlich LAT transkribiert [24; 25; 161; 245]. Catez et al. (2012) und Perng und Jones (2010) vermuten, dass die LAT-Produktion einzelner Neurone Ausdruck einer höheren Viruslast ist und die LAT-Transkription in diesem Zusammenhang dazu dient, die Apoptose des Neurons zu verhindern [24; 189]. Da die PCR-Ergebnisse mit dem hier verwendeten Organmodell nur Aussagen über die Gesamtheit der betrachteten TG-Zellen treffen (vergl. auch [86]), geht aus ihnen nicht hervor, welche Anzahl latent infizierter Neuronen tatsächlich für die LAT-Produktion verantwortlich ist. Es ist daher möglich, dass nur wenige Neuronen die gesamte Menge an LAT-RNA produzieren. Durch die Aufteilung der TG-Resuspension kann daher eine Konstellation entstehen, bei der sich LAT-RNA-positive Neuronen überwiegend oder vollständig in der mittels IF untersuchte Gruppe wiederfinden.

Insbesondere für DK 12 besteht auch ein alternativer Erklärungsansatz (vergl. Kap. 3.3.2.1): Die überdurchschnittlich hohen LAT-gDNA-Spiegel bei gleichzeitig fehlendem Nachweis von LAT-Transkripten in DK 12 können eventuell auch durch eine lytische Infektion mit HSV-DNA-Replikation in einer oder mehrerer einzelner Zellen zustande gekommen sein, denn der LAT-Transkript-Spiegel sinkt während einer lytischen Infektion dramatisch ab (vergl. [86]).

4.3. Charakterisierung des Verhaltens von HSV-1 im Trigeminal-Modell mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die methodischen Grundlagen für die Ernte, Zytozentrifugation und IF-Färbung von TG-Explantaten wurden von Hafezi et al. (2002) etabliert [85]. In Kap. 3.1.1. wurde gezeigt, dass die Identifizierung produktiv HSV-1-infizierter Zellen und deren Differenzierung in Neuronen und Begleitzellen sicher gelang.

In Übereinstimmung mit vorherigen PCR-Ergebnissen der Arbeitsgruppe wurde nach Infektion der IC eine exponentielle Zunahme HSV-Antigen-positiver Neurone bzw. Begleitzellen beobachtet (vergl. Tab. 1 – 3; vergl. [86; Fig. 2 u. 3]). Dabei führte eine Erhöhung der Infektionsdosis von 5×10^4 PFU auf $5,5 \times 10^5$ PFU zu einer Verdopplung Antigen-positiver Neurone 48 Stunden nach Infektion (vergl. Tab. 3, Tab. sowie Tab. C14; Tab. 16; Tab. C17).

Die Resultate aus den in der OC infizierten DK spiegelten ebenfalls Beobachtungen wider, die in der Arbeitsgruppe mittels IF-Assay mit einem EGFP-exprimierenden HSV-1 17syn⁺-Mutanten

(unter der Kontrolle des CMV-IE-Promoter) gemacht worden sind (vergl. [86, Fig.2 u. 3]. So konnte beobachtet werden, dass nach der axonalen Infektion in einem Teil der DK einzelne Neurone (und Begleitzellen) produktiv infiziert waren, während im Großteil der Zellen kein Antigen detektiert wurde. Dabei wurde in der Tendenz auch die in Hafezi et al. (2012) [86, Fig. 2 D - E]) beschriebene Kinetik abgebildet, nach der 4 d.p.i. die maximale Anzahl produktiv infizierter Neurone erreicht und in der Folgezeit eine stetige Abnahme produktiv infizierter Neurone verzeichnet wird (vergl. Kap. 3.1.1.4.).

Insgesamt kann daher festgehalten werden, dass die hier angewandte Methodik zur sicheren Identifizierung und Quantifizierung HSV-Antigen-positiver Neurone und Begleitzellen geeignet war.

Bemerkenswert ist allerdings, dass bei Betrachtung der OC-Infektion der Anteil an positiven DK und auch die Summe positiver Neurone, die unter gleichen Bedingungen mittels EGFP-Expression beobachtet wurden [86, Fig.2 D - E], jeweils etwas höher war als in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Einen möglichen Erklärungsansatz dafür bietet die These, dass ein Teil der EGFP-positiven Neurone eine *molekulare Reaktivierung* vollzieht. Der Begriff bezeichnet einen Prozess, bei dem zwar einzelne Virusbestandteile aber keine infektiösen Viruspartikel hergestellt werden [32; 71; 86 (Diskussion)]. Eventuell wird dieser Funktionszustand mittels IF-Test auf Basis eines polyklonalen HSV-1-Antikörpers schlechter erfasst. Außerdem ist es möglich, dass ein kleiner Teil der Neurone einer DK während der präanalytischen Schritte verloren geht. Das würde auch die gelegentliche Abwesenheit Antigen-positiver Neuronen bei gleichzeitigem Vorliegen produktiv infizierter Begleitzellen erklären (vergl. Kap. 3.1.1.4.). (Allerdings könnte diese Beobachtung auch mit dem Eintritt des initial produktiv infizierten Neurons in den Latenzzustand begründet werden (vergl. [86, Fig. 2 D - E]).) Eventuell müssen aber auch Verzerrungseffekte beim Vergleich unterschiedlicher Auswertungsmethoden in Betracht gezogen werden, bspw. in Hinsicht auf die optische Differenzierung zwischen Neuronen und Begleitzellen oder dem Bezugsrahmen für positive Zellen (TG-Explantat vs. DK). Unabhängig davon, welche Begründung richtig ist bzw. größere Bedeutung besitzt, lässt sich das Vorhandensein Antigen-positiver Begleitzellen als Hinweis auf (zeitgleich oder zu einem früheren Zeitpunkt) produktiv infizierte Neurone in der DK deuten.

Anzahl und Ausmaß produktiver Infektionen in den DK nach Inokulation der OC waren von der Virusmenge abhängig: Bei der anfangs gewählten Infektionsdosis von $2,6 \times 10^7$ PFU wurde eine

relativ hohe Anzahl Antigen-positiver DK beobachtet (vergl. Tab. C2; Tab. 9). Um die Sensitivität der folgenden (Reaktivierungs-)Versuche zu erhöhen, wurde die Dosis auf 5×10^6 PFU reduziert.

Die TG-Explantate konnten auch an Tag 12/13 bzw. Tag 19/20 der Kultivierung noch ähnlich produktiv infiziert werden wie an Tag 4/5 (vergl. Kap. 3.1.1.3.), sodass in nachfolgenden Versuchen mit potentiellen Stimulanzen eine fehlende Suszeptibilität des Organmodells als Ursache für negative Testergebnisse ausgeschlossen werden konnte.

4.4. Charakterisierung des Verhaltens von HSV-2 *strain* 333 im Trigeminal-Modell mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und RT-PCR

Anders als für HSV-1 ist das biologische Verhalten von HSV-2 in vorliegenden TG-Modell weniger ausführlich beschrieben worden [86]. Es traten prägnante Unterschiede zu Tage:

Nach der retrograden Infektion mit HSV-2 wurden zwei verschiedene Infektionsmuster beobachtet. Entweder entwickelte sich analog zu HSV-1 eine stumme Infektion ohne detektierbare Antigenexpression. Bemerkenswert war jedoch, dass in diesem Fall die Transkription von LAT unterhalb der RT-PCR-Nachweisgrenze blieb und die Anzahl an Genomkopien circa um eine Zehnerpotenz geringer war als bei HSV-1. Oder es kam zu einer produktiven Infektion, die sich schnell im gesamten TG ausbreitete. Korrelat waren hohe Genom- und LAT-Transkript-Spiegel in der PCR sowie ein meist hoher Anteil Antigen-positiver Neuronen und Begleitzellen, sodass die retrograde HSV-2-Infektion dem Phänotyp nach einer HSV-1-Infektion der IC entsprach.

Mit Blick auf das Ausbleiben der LAT-Transkription in Antigen-negativen DK einerseits und einer fehlenden Selbstlimitation der produktiven HSV-2-Infektion andererseits kann man zu dem Schluss gelangen, dass das TG-Modell eine spontane Latenzetablierung - bzw. Unterhaltung von HSV-2 nur unvollständig unterstützt.

Diese Folgerung steht nicht im Widerspruch zu vorherigen (PCR-)Untersuchungen der Arbeitsgruppe, in denen nach der OC-Infektion bis zum Zeitpunkt 2 d.p.i. nur geringe und stagnierende HSV-2-Genom-Spiegel gemessen worden sind [86, Fig. 7 A)]. Denn einerseits war die Anzahl der in dieser Arbeit gezählten Antigen-positiven Zellen bis zum Zeitpunkt 24 h.p.i. ebenfalls sehr gering (vergl. Tab. 21; Tab. 28). Andererseits beruhten die vorherigen PCR-Ergebnisse der Arbeitsgruppe auf einer limitierten Stichprobe von nur 3 DK [86].

Dass die Fähigkeit zur Latenzetablierung von HSV-2 wahrscheinlich nicht *in vollem Umfang* gestört ist, geht einerseits daraus hervor, dass sich ein Teil der retrograd infizierten DK durch die Abwesenheit von Antigenexpression bei gleichzeitigem Vorhandensein von Virusgenomkopien im TG auszeichnet. Da allerdings keine LAT-Transkripte als typisches Zeichen einer latenten Infektion produziert werden, kann angezweifelt werden, ob es sich um eine „echte“ Latenzetablierung handelt oder ob die detektierten Genome tatsächlich aus Neuronen stammen. Als indirekter Hinweis auf eine stattgehabte Latenzetablierung kann angesichts der hohen Ausbreitungsgeschwindigkeit der HSV-2-Infektion vielleicht die Beobachtung gelten, dass es vier und acht Tage nach der Inokulation noch immer DK gab, in denen die Anzahl Antigen-positiver Neurone (und Begleitzellen) verhältnismäßig gering war (vergl. Tab.23, DK 2; vergl. Tab. 24, DK 7). Hinzu kommt, dass mit zunehmender Zeit nach der Infektion in der Tendenz mehr Antigen-positive DK gesehen wurden (nicht signifikant). Insgesamt lässt sich daraus folgern, dass es in der Zeit nach der OC-Infektionen wahrscheinlich in einzelnen Neuronen zur Reaktivierung von HSV-2 aus einem vorherigen Latenzzustand kommt und sich die produktive Infektion anschließend im gesamten TG ausbreitet.

Auch bei Infektion der IC mit HSV-2 konnte eine aggressive Ausbreitung der produktiven Infektion beobachtet werden, sodass 2 d.p.i. bereits über 70% der Neuronen und ein großer Teil der Begleitzellen Antigen-positiv waren. Das Verhalten von HSV-2 im hier untersuchten TG-Modell steht damit in krassem Widerspruch zu Ergebnissen aus Versuchen in einem neuronal differenzierten PC12-Zellkultur-System: Danaher et al. (2000) stellen fest, dass HSV-2 in PC12-Zellen sogar dann in den Latenzzustand eintritt, wenn auf eine (in äquivalenten HSV-1-Versuchen benötigte) Applikation von ACV verzichtet wird [45]. Welche Gründe es für diese paradox erscheinenden Modell-Abweichungen gibt, bleibt spekulativ. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den *in vitro*-Modellen von Danaher et al. und dieser Arbeitsgruppe ist das Vorhandensein von Gliazellen im TG-Gewebe. Allerdings wird im Allgemeinen angenommen, dass Gliazellen zur Kontrolle von Virusinfektionen beitragen und die Latenz von HSV begünstigen (– auch wenn ein Teil dieser Kontrolle auf der Aktivierung des adaptiven bzw. zellulären Immunsystems beruht, vergl. Kap. 1.3.3.6.) [146; 198]. Es ist auch denkbar, dass die Unreife der embryonalen Neuronen und Begleitzellen für die Permissivität gegenüber der umfassenden HSV-2-Infektion (insbesondere bei Inokulation der IC) mitverantwortlich ist (vergl. Kap. 1.2.6.).

Es ist wahrscheinlich, dass die unterschiedliche Virulenz von HSV-1 und HSV-2 im TG-Modell Folge der ausgeprägten Organotropie innerhalb der Herpesviridae ist (vergl. Kap. 1.2.). Als Beispiel für organspezifische Latenz-Kontrollmechanismen kann die heterogene Akkumulation von HSV-1-LAT-Transkripten in verschiedenen latent infizierten Strukturen im Maus-Modell angeführt werden: Maillet et al. (2006) zufolge sind HSV-1-LAT-Spiegel in latent infizierten TG gegenüber anderen Geweben erhöht. HSV-1-LAT übt in diesem Zusammenhang vermutlich u.a. eine negative Kontrolle über den Spleißvorgang von ICP-0 aus, das für die Reaktivierung eine wichtige Rolle spielt (vergl. Kap. 1.3.3.2.) [155]. Sawtell und Thompson (1992) wiederum haben darauf hingewiesen, dass HSV-1-LAT große funktionelle Bedeutung für eine erfolgreiche Latenzetablierung und -unterhaltung in TG besitzt, hingegen aber in Sakralganglien kaum Einfluss auf die Latenzetablierung nimmt [207].

Darüber hinaus wird sogar die Präferenz für unterschiedliche Neuron-Subtypen durch LAT bestimmt: Während HSV-1 bspw. in Neuronen mit dem Zellmarker KH-10 selten Latenz etabliert, werden KH-10-positive Zellen von HSV-2 in dieser Hinsicht bevorzugt [104; 254]. Dass die unterschiedliche Fähigkeit zur Latenzetablierung von HSV-1 und HSV-2 auch im vorliegenden Organmodell von genetischen Abweichungen zwischen LAT-1 und LAT-2 bestimmt werden könnte, wird auch von der Beobachtung gestützt, dass der Austausch bestimmter LAT-Sequenzen das Infektionsmuster von HSV-1 im Mausmodell in Richtung eines HSV-2-Musters verändert [104].

Ein weiterer in der Entscheidung zwischen latenter und lytischer Infektion zentraler Faktor, dessen Rolle im vorliegenden TG-Modell darüber hinaus genauer bestimmt worden ist, ist VP-16 (vergl. Kap. 1.3.3.2.): Die viruseigene Transaktivierungsfunktion von VP-16 (vergl. auch Kap. 1.3.3.2.) kann im TG-Modell noch sieben Tage nach axonaler HSV-1-Infektion durch Inokulation der IC mit einem HSV-2-Helfer-Virus ersetzt werden. Die Transaktivierung durch HSV-1 hingegen funktioniert nur bei gleichzeitiger Inokulation der IC. In der Folge kommt es zu einer floriden HSV-1-Infektion bzw. Reaktivierung von HSV-1 [86]. Es ist daher denkbar, dass VP-16-abhängige Faktoren auch zu den in dieser Arbeit beobachteten Unterschieden zwischen HSV-1 und HSV-2 beitragen. Auf Ebene der Proteinstruktur ist die für die Transaktivierung bedeutsame VIC-formende VP-16-Region zwar hochkonserviert. Die Struktur der transkriptionelle Aktivierungsdomäne hingegen unterscheidet sich innerhalb der Unterfamilie der α -Herpesviren und kann potentiell unterschiedliche Transkriptionsfaktoren binden [57; 257].

Die in Kap. 3.3.2.1. beschriebenen Unterschiede zwischen HSV-1 und HSV-2 hinsichtlich der Anzahl an Genom-Kopien in Antigen-negativen DK nach axonaler Infektion werfen diverse Fragen auf:

Unter Bezugnahme auf die bereits angedeutete Organspezifität der Funktionalität von LAT kann man argumentieren, dass die verminderte Anzahl an HSV-2-Genomen aus dem Scheitern resultiert, einen HSV-1-äquivalenten Latenzstatus einzurichten. Möglicherweise sind HSV-2-infizierte Neurone aufgrund der fehlenden antiapoptotischen Wirkung von LAT-Transkripten auch anfälliger für Apoptosesignale (vergl. Kap. 1.3.3.4.), sodass einige Virus-beherbergende Neuronen bis zum Zeitpunkt 8 d.p.i. absterben. Da sich die Größenordnung der Genom-Spiegel in (höchstwahrscheinlich) Antigen-negativen DK ab dem Zeitpunkt 12 h.p.i. aber offenbar nicht ändert [86, Fig. 7 A], scheint diese Erklärung eher nicht von zentraler Bedeutung zu sein.

Auch ein Effekt der spezifischen Infektiosität der verwendeten Virus-Stämme als Ursache für die beobachteten Unterschiede zwischen HSV-1 und HSV-2 kann nicht ausgeschlossen werden. Aufschlussreich war die lichtmikroskopische Begutachtung der OC zum Zeitpunkt 8 d.p.i. Trotz der höheren Virulenz von HSV-2 waren ausschließlich die Neuriten retrograd HSV-1- infizierter Neuronen größtenteils zerstört. Die morphologische Desintegrität war nur in Neuriten der OC, aber nicht in denen der IC zu sehen. Deshalb liegt es nahe, dass als Ursache dafür das Virus-Entry (oder der axonale Transport von Virus-Bestandteilen) und weniger die Infektion im Soma selbst in Frage kommt. Es scheint daher plausibel anzunehmen, dass die vergleichsweise geringen HSV-2-Genom-Spiegel in der IC vielleicht einen verminderten Virus-Entry in die Neuriten bzw. den verminderten axonalen Transport widerspiegeln. Hinweise auf eine geringere Bindungsfähigkeit von HSV-2 an Heparansulfat-Rezeptoren sind auch von Trybala et al. (2000) beschrieben worden [236]. (Funktionelle Unterschiede im axonalen Transport von α -Herpesviren werden allerdings nur im *anterograden* System diskutiert [52; 103; 206] (vergl. auch Kap. 1.3.2.)). Insgesamt bleiben die Gründe für die unterschiedliche Höhe der Genom-Spiegel von HSV-1 und HSV-2 hier aber unklar.

Aufgrund der unvollständigen Latenzetablierung wurden retrograd HSV-2-infizierte TG mit ACV behandelt (vergl. Kap. 3.2.3.). Ziel des Versuchs war es, eine mögliche Reaktivierung von HSV durch den anschließenden Entzug von ACV nachzuweisen. Eine Schwäche des Versuchsdesigns lag darin, dass die Etablierung einer stummen HSV-2-Infektion unter ACV nicht explizit nachgewiesen wurde. Hier wurde auf vorherige Erfahrungen der Arbeitsgruppe zurückgegriffen (unveröffentlichte Ergebnisse). Da die Neuronanzahlen in allen Versuchs-

Gruppen (inklusive „mock“) gering war, können toxische Effekte durch ACV nicht sicher ausgeschlossen werden. Angesichts der Beobachtung, dass die Integrität und das Wachstum der Neuriten bis 20 d.p.i. nicht beeinträchtigt waren (vergl. Abb. C2 und C3), kann aber auch vermutet werden, dass die gewählte Methodik (Ernte, Zytozentrifugation, IF-Färbung) mit zunehmendem Alter der TG an ihre Grenzen stößt, denn die Kultivierung der TG-Explantate selbst gelingt über mehrere Wochen [86]. (Schwankungen in der Neuronanzahl wurden auch in Versuchen ähnlicher Dauer beobachtet (vergl. Kap. 3.1.1.3).)

Aufgrund der oben thematisierten aggressiven Ausbreitung produktiver HSV-2-Infektionen im TG wurde aus der vollständigen Antigen-Negativität der Begleitzellen aller DK bei gleichzeitig negativen Ergebnissen im Plaque-Assay geschlossen, dass der Entzug von ACV nicht zur Reaktivierung von HSV-2 führte.

4.5. Infektionsversuche in Trigeminalganglien-Explantaten unter Einfluss von HMBA

HMBA ist ein ein acetyliertes Diamin; sein Eigenschaftsprofil wird in verschiedenen Disziplinen erforscht:

HMBA ist im Rahmen der Tumorforschung als hybrid-polares Differenzierungsagens entdeckt worden [199]. Eine klinische Phase-II-Studie zeigte, dass die Applikation von HMBA bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom und akuter myeloischer Leukämie zur Differenzierung der myeloischen Vorläuferzellen und einer Verbesserung des Tumorleidens beitragen kann. Dosisabhängige Nebenwirkungen traten u.a. in Form gravierender Thrombozytopenien auf, sodass HMBA die dritte Studienphase nicht erreichte [3; 36]. In letzter Zeit wird der Einsatz von HMBA in geringeren Dosen z.B. in der Therapie von Mammakarzinomen wieder erwogen [56; 219].

Die molekularbiologischen Wirkmechanismen von HMBA sind vielgestaltig und verändern die Transkriptionsmuster einer großen Anzahl an Genen. Die Unterbrechung der TNF α -sensitiven MAP-Kinase- und Akt-Signalwege nimmt z.B. hemmenden Einfluss auf den Transkriptionsfaktor NF κ B, die Cyclin-D1-Akkumulation und die Phosphorylierung des „Zellcycluswächters“ pRB und begünstigt so G1-Arrest und Apoptose-Induktion [56; 93].

Auch in der Infektiologie besitzt HMBA (in mehrfacher Hinsicht) potentiell klinische Relevanz: Da die Substanz den Replikationszyklus von HIV in humanen T-Helfer-Zellen aktiviert, wird ein möglicher medikamentöser Einsatz in Betracht gezogen, um latente Virusgenome, die ähnlich

wie bei Herpes simplex ein lebenslanges und für das Immunsystem unzugängliches Reservoir bilden, angreifbar zu machen [29; 214].

Die von HMBA ausgehende Entwicklung differenzierungsinduzierender hybrid-polarer Substanzen wie Vorinostat (SAHA) stellt zudem weiterhin einen modernen Ansatz sowohl in der Therapie maligner Tumorerkrankungen als auch der antiretroviralen Therapie dar [81; 105].

HMBA ist außerdem als IE-Gen-Aktivator – auch im vorliegenden TG-Modell – bekannt [86; 160]. Aufgrund der fördernden Wirkung auf die HSV-Replikation [261], wurde auch der klinische Einsatz als Enhancer für onkolytische Herpesviren diskutiert [172]. In einigen *in vitro*-Modellen kann HMBA darüber hinaus eine Reaktivierung von HSV aus der Latenzphase begünstigen [11] und auch während klinischer Studien fiel eine leichte Häufung oraler Herpesinfektionen auf [36; 63]. Vorherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe wurden anhand verschiedener HSV-1-Mutanten gewonnen [86]. Wie Loutsch et al. (1999) gezeigt haben, können bereits geringfügige Veränderungen im HSV-Genom den Reaktivierungsphänotyp des Virus verändern [149] (vergl. auch Kap. 4.8). Daher sollte die Wirkung von HMBA im TG-Modell insbesondere in Hinsicht auf ein mögliches Reaktivierungspotential anhand der Wildtypen HSV-1-17syn⁺ und HSV-2 333 beschrieben werden (vergl. Kap. 3.1.2.1.; Kap. 3.2.2.).

Im Einklang mit vorherigen Beobachtungen besaß HMBA sowohl bei IC- als auch OC-Infektionen eine starke Enhancer-Wirkung, die die Ausbreitung des Virus im TG unabhängig vom Zeitpunkt der HMBA-Zugabe beschleunigte, sofern eine produktive Infektion nachgewiesen wurde. Neben Neuronen waren davon auch Begleitzellen in hohem Maße betroffen. Dieselbe Wirkung wurde bei axonaler Infektion mit HSV-2 333 beobachtet.

Die Ergebnisse im axonalen Infektionsmodus hinsichtlich der *Rate Antigen-positiver DK* unterschieden sich in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe von HMBA: Bei sofortiger Exposition nach der Infektion gab es tendenziell mehr Antigen-positive DK als in der Kontrollgruppe (nicht signifikant; vergl. Kap. 3.1.2.1.2.; Tab. 6 – 13 sowie C5 – C8).

HMBA besitzt daher insgesamt eine latenzhemmende Wirkung im TG-Modell. Möglicherweise inhibiert es in Folge verstärkter IE-Gentranskription einen erfolgreichen Eintritt in den Latenzzustand nach anfänglich produktiver Infektion in einzelnen Neuronen (vergl. Kap. 4.3., Dynamik produktiv infizierter Zellen sowie Kap. 4.4., VP-16).

Wurde HMBA dem Medium zu einem späteren Zeitpunkt (8 d.p.i.) zugesetzt, veränderte sich das Bild; HMBA konnte im HSV-1-Reaktivierungsversuch (im Sinne einer Erhöhung der Anzahl Antigen-positiver DK) keine sichtbare Verschiebung des Systems in Richtung einer produktiven Infektion hervorrufen.

Die Beobachtung, dass das Reaktivierungspotential von HMBA Spezies- bzw. Modell-abhängig ist, zeigten bereits Untersuchungen von Bernstein und Kappes (1988) sowie Blondeau und Aoki (1992): Erstere wiesen einen erhöhten Anteil HSV-2-reaktiver Spinalganglion-Explantate (aus latent infizierten Meerschweinchen) nach, wenn die Explantate während der Kultivierung mit HMBA behandelt wurden [11]. Blondeau und Aoki zeigten dagegen, dass HMBA in latent HSV-1-infizierten Spinalganglion-Explantaten von Ratten zwar die Dauer bis zum Virus-Nachweis verkürzt, aber nicht die Quote HSV-positiver Ganglien erhöht [13].

Die hier erhobenen Ergebnisse stehen daher in Übereinstimmung mit der Arbeit von Blondeau und Aoki.

4.6. Infektionsversuche in Trigeminalganglien-Explantaten unter Einfluss von Rapamycin

Rapamycin gehört strukturell zur Gruppe der Makrolide [211]. Rapamycin greift den mTORC1 an und inhibiert ihn [137]; die weitreichenden Wirkungen dieser Blockade werden klinisch genutzt bzw. erprobt:

Die Unterbrechung der in Kap. 1.3.3.5. grob beschriebenen Signalkaskade auf mTOR-Ebene führt allgemein zu einer dramatischen Verringerung der Translation. Die immunsuppressive Wirkung von Rapamycin entsteht durch die Hemmung des adaptiven Immunsystems. Die Aktivierung und Proliferation von B- und T-Zellen als Antwort auf die Freisetzung von IL-2 bleibt aufgrund der fehlenden S6-Kinase-Aktivierung durch mTORC1 aus [20; 112]. In der Transplantationsmedizin ist Rapamycin (Sirolimus) daher ein Basismedikament zur Unterdrückung von Organabstoßungen [57; 225].

Trotz möglicher Nebenwirkungen wie Hyperlipdämie, Ödembildung, Proteinurie und Thrombozytopenie [192] ist die Verwendung von Rapamycin attraktiv, weil die unter Immunsuppression normalerweise erhöhte Neigung zur Tumorbildung durch das Medikament selbst unterbunden wird [67]. Für dieses Phänomen wird v.a. der durch die mTOR-Hemmung ausgelöste Zellcyclus-Arrest in Phase G1 verantwortlich gemacht [75; 179]. Bezeichnenderweise sind viele der Tumore, die sich unter Immunsuppression entwickeln, virusassoziiert. Beispiele für HHV (Humanes Herpes-Virus) assoziierte Neoplasien sind PTLDs (*post-transplant lymphoproliferative disorders*) durch das Epstein-Barr-Virus und das Karposi-

Sarkom durch HHV-8. Welchen Einfluss Rapamycin in diesem Kontext auf Virusinfektionen unterhält, ist weitgehend unbekannt [75].

Etabliert ist Rapamycin auch als Medikament in beschichteten Stents zur Prophylaxe von Restenosen, die durch das Einwachsen von Intimagewebe verursacht werden [159]. Dabei wird die antiproliferative Wirkung von Rapamycin ausgenutzt [123].

Rapamycin besitzt zudem das Potential, die Tumorangio-genese durch die Verminderung von HIF-1 (*hypoxia induced factor*) zu blockieren [232]. Ob Rapamycin (und seine Derivate) als Medikament auch in der onkologischen Therapie angewendet werden kann, wird derzeit untersucht [4; 68].

Die in Kap. 1.3.3.5. beschriebene PI-3-/Akt-Signalkaskade bildet einen zentralen Pfeiler für den Latenzerhalt von HSV. Die Hemmung einzelner Faktoren dieser Kaskade begünstigt daher den Reaktivierungsprozess; wie Kobayashi et al. (2012) in DK-Zellkulturen aus dispergierten Spinalganglien (aus Rattenembryonen) gezeigt haben, gilt dies auch für den mTORC-1, der durch Rapamycin inhibiert wird [122]. In diesem Kontext wird daher auch die Möglichkeit vorgeschlagen, Rapamycin als Enhancer α -Herpes-Virus-basierter onkolytischer Virotherapien zu nutzen [74].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Rapamycin unter den gewählten Bedingungen keinen erkennbaren Einfluss auf die verschiedenen HSV-Infektionsmodi im TG hatte. Aus welchem Grund die Ergebnisse von Kobayashi et al. in Hühner-TG-Explantaten nicht reproduziert werden konnten, bleibt unklar. Prinzipiell ist Rapamycin in Hühnerembryonen wirksam [83]. Eine entscheidende Rolle spielt offenbar die Dauer der Rapamycin-Exposition, da die Substanz bei längerer Anwendung auch die Virusreplikation hemmt [122]. Die hier gewählte Expositionszeit von 22 Stunden wurde aus der Arbeit von Kobayashi et al. übernommen.

4.7. Infektionsversuche in Trigeminalganglien-Explantaten unter Einfluss von Valproat

Valproat ist das Anion der Carbonsäure Valproinsäure. Biochemisch entfaltet Valproat zahlreiche Wirkungen: Es hemmt spannungsabhängige Natrium- und NMDA-Kalzium-Kanäle und greift u.a. durch Verminderung des Abbaus in den Metabolismus der Neurotransmitter GABA und Hydroxybuttersäure ein [148]. Gleichzeitig agiert die Substanz auf epigenetischer

Ebene als HDAC-Inhibitor und ruft auf diese Weise unterschiedliche Effekte innerhalb der Zelle hervor [12; 80].

In der Klinik ergibt sich daher ein breites Anwendungsspektrum: Valproat gehört zu den Standardtherapeutika zur Prophylaxe generalisierter tonisch-klonischer Epilepsie-Anfälle und Absencen [78; 148]. Außerdem wird Valproat zur Prophylaxe von Migräne-Episoden sowie als Phasenprophylaxe bei bipolaren Störungen angewandt [222]. Zu möglichen unerwünschten Wirkungen einer Valproat-Therapie gehören u.a. Hepatotoxizität, Induktion einer Pankreatitis und Teratogenität. Folge einer Einnahme während der Schwangerschaft können Spina bifida, Hypospadie und Autismus-Syndrom sein [27; 33; 66; 240].

Weil die Hemmung von HDAC in entarteten Zellen Differenzierungsprozesse und Apoptosemechanismen anstößt, versucht man Valproat experimentell zur Tumor-Behandlung, z.B. bei malignen Gliomen zu nutzen [9; 80].

Es ist auch bekannt, dass HDAC-Inhibitoren (wie Trichostatin A, Natriumbutyrat und Valproat) die Reaktivierung latenter α -Herpesviren und auch HIV auslösen können [5; 100]. Verschiedene Gruppen erforschen daher die Möglichkeiten, diese infektionsunterstützende Wirkung im Rahmen gen- und virotherapeutischer Ansätze gegen Tumore einzusetzen [2; 173; 182; 205] oder das latente HIV-Reservoir mittels HDAC-Inhibitoren angreifbar zu machen [100]. Die infektionsfördernde Wirkung von Valproat beruht dabei vermutlich auf unterschiedlichen Mechanismen. In Kap. 1.3.3.2. wurde auf die transkriptionshemmende Funktion von HDAC bzw. epigenetischer Regulationsprozesse im Allgemeinen eingegangen. Darüber hinaus greift Valproat auch modulierend in den JAK/STAT-Signalweg ein (Aktivierung von STAT 3, Inhibition von STAT 5) und inhibiert dadurch Interferon-abhängige Prozesse [2; 182] (vergl. Kap. 1.3.3.6.).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuchen mit HSV-1 konnte keine Enhancer-Funktion für Valproat im TG-Modell beobachtet werden. Auch wirkte die Substanz nicht als Reaktivierungs-Trigger. Unter der Annahme, dass eine effiziente epigenetische Manipulation durch HDAC-Hemmer auf mittelfristige Veränderungen in der Zelle beruht, wurden die TG (außer im Reaktivierungsversuch) vor der Infektion mit Valproat vorbehandelt. Der gewählte Zeitraum lag dabei in einer Größenordnung, die in anderen Arbeitsgruppen zu positiven Ergebnissen führte [173; 182]. Wie auch im Fall der übrigen betrachteten Agenzien steht die allgemeine Wirksamkeit von Valproat in Hühner-Embryonen außer Zweifel [98].

Bemerkenswerterweise haben auch andere Autoren abweichende Beobachtungen gemacht: So kann Valproat in bestimmten Gliazellkulturen statt einer fördernden auch eine infektionshemmende Wirkung haben [40].

Aus welchen Gründen es mithilfe von Valproat nicht gelingt, die Bedingungen für eine produktive HSV-1-Infektion in Hühner-TG zu schaffen, bleibt aber unbekannt.

4.8. Infektionsversuche in Trigeminalganglien-Explantaten unter Einfluss von Forskolin und DMSO

DMSO ist ein Prototyp innerhalb der Gruppe zellulärer Differenzierungsagenzien. Es beeinflusst die Entwicklung erythroider Zellen [73; 230].

Heute kann die Substanz medikamentös zur dermalen Applikation bei stumpfen Traumata angewandt werden, u.a. ist sie in der Lage, freie Radikale zu binden [215]. Große Bedeutung besitzt DMSO aber als ubiquitäres Lösungsmittel in Medizin- und Laborprodukten. Hier diente es als Lösungsmittel für Forskolin und Rapamycin. Es ist allerdings bekannt, dass DMSO in einigen Modellen die Fähigkeit besitzt, die Replikation und auch die Reaktivierung von HSV zu begünstigen. Die in den DMSO-Kontrollen für Forskolin verwendete Konzentration von 1% liegt dabei in einem Bereich, in dem die Substanz wirksam ist [140; 247].

In Übereinstimmung mit vorherigen Ergebnissen wurde für HSV-1 und HSV-2 eine dezent infektionsfördernde Wirkung von DMSO im TG beobachtet (vergl. Kap. 3.1.2.4.1., Kap. 3.2.2.). Die Ergebnisse waren statistisch zwar nicht signifikant, aber in qualitativer Hinsicht zeigte sich eine deutliche Tendenz ab. Es wurde kein reaktivierungsfördernder Effekt gesehen.

Forskolin ist ein Diterpen und stammt aus dem Blütenstrauch *Coleus forskohlii*, der in Indien in traditionellen phytotherapeutischen Ayurveda-Verfahren genutzt wird.

Die biochemische Wirkung von Forskolin beruht v.a. auf der Aktivierung von Adenylatcyclasen, sodass die Substanz bei der Erforschung cAMP-abhängiger Prozesse eine große Rolle spielt [111]. Die Aktivierung von Adenylatcyclasen hat in verschiedenen Geweben zahlreiche Wirkungen. Der Second Messenger cAMP steuert u.a. über die Aktivierung der Proteinkinase-A zahlreiche intrazelluläre Funktionen. Dazu gehören bspw. die Phosphorylierung (und damit Öffnung) bestimmter Calciumkanäle (z.B. zur Steigerung der Kontraktilität von Herzmuskelfasern) oder auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB [17; 170].

Auch die Entspannung glatter Muskelfasern (z.B. zur Vasodilatation) wird durch cAMP vermittelt [191], weshalb der therapeutische Einsatz von Diterpenen wie Forskolin bei kardiovaskulären Erkrankungen insgesamt Gegenstand aktueller Forschung ist [17]. Speziell für Forskolin wird auch eine Anwendung zur Reduktion des Augeninnendrucks bei Glaukomerkrankungen erwogen [241].

Forskolin kann in verschiedenen *in vitro*-Modellen die Reaktivierung latenter HSV-1- und / oder HSV-2-Genome hervorrufen [45; 46; 50; 101]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dagegen, dass Forskolin die produktive HSV-1-Infektion in Hühner-TG in hohem Maße hemmt. Für HSV-2 wurde kein fassbarer Effekt beobachtet. Es wurde darüber hinaus auch keine (re-)aktivierende Wirkung nach axonaler HSV-1- oder HSV-2-Infektion beobachtet.

Dies stand in (scheinbarem) Widerspruch zu unveröffentlichten Ergebnissen der Arbeitsgruppe, in denen eine HSV-1-Mutante mit der Fähigkeit, EGFP unter der Kontrolle des CMV-IE-Promoters zu exprimieren (vergl. [86]), nach der OC-Infektion von TG gegenüber Forskolin exponiert wurde. In diesen Experimenten wurden mehr EGFP-positive Zellen als in den Kontrollen ohne Forskolin detektiert, gleichzeitig erhöhte sich die mittels (RT-)PCR gemessene Transkription von LAT, UL-44 und UL-27 sowie die Anzahl an HSV-1-Genomen. Im Rückblick lassen sich diese Beobachtungen vermutlich wie folgt erklären: Der CMV IE-Promotor reagiert positiv auf Forskolin [154; 224]; dies bedingte in vorherigen Versuchen wahrscheinlich einerseits die vermehrte EGFP-Expression und führte andererseits offenbar auch zu einer Enthemmung des übrigen Virusgenoms.

Da der LAT-Promoter LAP-1 zwei cAMP-bindende Elemente (CRE) enthält, ist es auch denkbar, dass die Forskolin-bedingte Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB die Ursache für erhöhte LAT-Spiegel darstellte [139; 168; 189].

Obwohl diese Überlegungen den inneren Widerspruch gegensätzlicher Beobachtungen innerhalb desselben Systems auflösen können, sagen sie wenig darüber aus, warum die beobachtete Wirkung von Forskolin auf HSV-1 im vorliegenden Modell derart prägnant von den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen abweicht. (Eine mögliche Unwirksamkeit von Forskolin in Hühner-Embryonen kommt als Begründung nicht in Betracht [89].) Denn es wird angenommen, dass die Aktivierung von CRE im LAT-Promotor (aber nicht im IE-Promotor von ICP-0 [46]) unter normalen Umständen für die Einleitung des Reaktivierungsprozesses mitverantwortlich ist [139; 168; 196].

Formal können toxische Effekte durch die Behandlung mit Forskolin nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der beschriebenen Vorergebnisse der Arbeitsgruppe und unter Beachtung der unauffälligen Neuronanzahlen und -morphologie (vergl. Kap. 3.1.2.4.1.) sowie des unveränderten Phänotyps der HSV-2-Infektion (vergl. Kap. 3.2.2.) scheint dieser Einwand nicht ausreichend für eine Erklärung der Beobachtungen zu sein.

Wie in Kap. 1.3.3.4. geschildert kann LAT abhängig vom Versuchssetting sowohl die Latenzunterhaltung als auch den Reaktivierungsprozess fördern. Unter der (spekulativen) Annahme, dass die LAT-Transkription auch im Falle der Infektion mit Wildtyp-HSV-1 17syn⁺ Forskolin-bedingt erhöht ist, könnten die Ergebnisse dieser Arbeit damit erklärt werden, dass die latenzfördernde gegenüber der reaktivierungsfördernden Komponente von LAT in Hühner-TG-Explantaten überwiegt und infolgedessen die Neigung des Virus zur Latenzetablierung (auch nach Infektion der IC) zunimmt.

Ein alternativer Ansatz könnte sich auf verschiedene (teils aber auch cAMP-bedingte) pleiotrope Effekte von Forskolin beziehen: Dazu gehört u.a. die Hemmung des zellulären Glukose-Transports und die Modifizierung verschiedener Ionenkanäle [38; 101; 136; 212]. Hunsperger et al. (2003) haben z.B. gezeigt, dass Forskolin den Kalziumeinstrom über Vanilloid-Rezeptoren verstärken kann und dieser Mechanismus über die Adenylatcyclase-Aktivierung hinaus einen positiven Einfluss auf die Reaktivierung von HSV besitzt [101]. Pleiotrope Effekte spielen mit Blick auf die HSV-Infektion im Allgemeinen also durchaus eine Rolle.

4.9. Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf, dass die Reaktivierungstrigger für Herpes simplex unter Laborbedingungen sehr modellabhängig sind. Es wurde gezeigt, dass für das getestete Trigeminalmodell ein partieller Modell-Mismatch hinsichtlich der Untersuchung der Latenz von HSV-2 vorliegt. Demgegenüber ist das Modell zur Beschreibung von HSV-1-Latenz gut geeignet. Trotz der Beobachtung von Enhancer-Effekten durch HMBA konnte kein einfacher chemischer Reaktivierungstrigger gefunden werden, der es ermöglicht, mit dem untersuchten Modell auch Prozesse während der Reaktivierung nachzuvollziehen. Für weitere Reaktivierungsexperimente steht daher bspw. die Möglichkeit im Raum, Kombinationen aus verschiedenen Triggersubstanzen bzw. nicht-chemischen Triggern zu verwenden. Wie im Falle von Rapamycin beschrieben spielen auch der Zeitpunkt und die Dauer der Exposition eine weiter zu untersuchende Rolle. Um den Moment der Reaktivierung bzw. die floride Infektion nach

Infektion des Außenkammer-Kompartiments zeitlich genauer aufzulösen, können zudem Versuche mit ausbreitungsdefizienten Viren sinnvoll sein.

Mit Blick auf die divergierenden Beobachtungen zur Wirkung von Forskolin zwischen vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe und den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich allerdings auch die Bedeutung von Versuchen mit *Wildtyp*-Herpesviren. Offenbar können schon geringe Manipulationen im Virusgenom, z.B. das Einfügen zusätzlicher einzelner Promotoren, erheblichen Einfluss auf den gesamten Infektionsverlauf nehmen.

Für zukünftige Versuche stellt sich außerdem die Frage, warum Forskolin in unterschiedlichen Modellen verschiedene Effekte auf die HSV-Infektion haben kann und welche Mechanismen dafür verantwortlich sind.

Zur genaueren Untersuchung der Latenz von HSV kann das hier etablierte *in situ*-Hybridisierungs-Protokoll weiterentwickelt werden, um sicher zwischen latenten und produktiv infizierten Zellen zu unterscheiden. Ein Ansatzpunkt hierfür bietet sich z.B. bei der Verarbeitung des Probenmaterials; mittels Kryosektionierung könnte der Verlust an Transkripten besser begrenzt werden. Eine weitere Möglichkeit bietet die Optimierung der Sensitivität, z.B. durch Kombination mehrerer Nukleinsäure-Sonden oder den Einsatz eines *in situ*-PCR-Schrittes.

5. Literaturverzeichnis

1.

Aggarwal, A., Miranda-Saksena, M., Boadle, R.A., Kelly, B.J., Diefenbach, R.J., Alam, W. & Cunningham, A.L. Ultrastructural visualization of individual tegument protein dissociation during entry of herpes simplex virus 1 into human and rat dorsal root ganglion neurons. *J. Virol.* *86*, 6123–6137 (2012).

2.

Alvarez-Breckenridge, C.A., Yu, J., Price, R., Wei, M., Wang, Y., Nowicki, M.O., Ha, Y.P., Bergin, S., Hwang, C., Fernandez, S.A., Kaur, B., Caligiuri, M.A. & Chiocca, E.A. The histone deacetylase inhibitor valproic acid lessens NK cell action against oncolytic virus-infected glioblastoma cells by inhibition of STAT5/T-BET signaling and generation of gamma interferon. *Journal of Virology* *86*, 4566–4577 (2012).

3.

Andreeff, M., Stone, R., Michaeli, J., Young, C.W., Tong, W.P., Sogoloff, H., Ervin, T., Kufe, D., Rifkind, R.A. & Marks, P.A. Hexamethylene bisacetamide in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia: a phase II clinical trial with a differentiation-inducing agent. *Blood* *80*, 2604–2609 (1992).

4.

Annesley, C. E. & Brown, P. Novel agents for the treatment of childhood acute leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology* *6*, 61–79 (2015).

5.

Arthur, J.L., Scarpini, C.G., Connor, V., Lachmann, R.H., Tolkovsky, A.M. & Efstathiou, S. Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro. *Journal of Virology* *75*, 3885–3895 (2001).

6.

Atanasiu, D. & Fraser, N.W. The stable 2-kilobase latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 can alter the assembly of the 60S ribosomal subunit and is exported from nucleus to cytoplasm by a CRM1-dependent pathway. *Journal of Virology* *81*, 7695–7701 (2007).

7.

Baines, J. D. Herpes simplex virus capsid assembly and DNA packaging: a present and future antiviral drug target. *Trends in Microbiology* *19*, 606–613 (2011).

8.

Baldwin, J. Members of 3-O-sulfotransferases (3-OST) family: a valuable tool from zebrafish to humans for understanding herpes simplex virus entry. *The Open Virology Journal* *7*, 5–11 (2013).

9.

Berendsen, S., Broekman, M., Seute, T., Snijders, T., van Es, C., de Vos, F., Regli, L. & Robe, P. Valproic acid for the treatment of malignant gliomas: review of the preclinical rationale and published clinical results. *Expert Opinion on Investigational Drugs* *21*, 1391–1415 (2012).

10.

Berger, J.R., and Houff, S. Neurological complications of herpes simplex virus type 2 infection. *Archives of Neurology* *65*, 596–600 (2008).

11.

Bernstein, D. I. & Kappes, J. C. Enhanced in vitro reactivation of latent herpes simplex virus from neural and peripheral tissues with hexamethylenebisacetamide. *Arch. Virol.* 99, 57–65 (1988).

12.

Blaheta, R. A., Michaelis, M., Driever, P. H. & Cinatl, J. Evolving anticancer drug valproic acid: Insights into the mechanism and clinical studies. *Medicinal Research Reviews* 25, 383–397 (2005).

13.

Blondeau, J. M. & Aoki, F. Y. In vitro reactivation of latent herpes simplex virus by the demethylating compound hexamethylene-bis-acetamide. *J. Virol. Methods* 40, 323–329 (1992).

14.

Bloom, D. C., Giordani, N. V. & Kwiatkowski, D. L. Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1799, 246–256 (2010).

15.

Bode, K.A., Schroder, K., Hume, D.A., Ravasi, T., Heeg, K., Sweet, M.J. & Dalpke, A.H. Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. *Immunology* 122, 596–606 (2007).

16.

Boom, R., Geelen, J.L., Sol, C.J., Raap, A.K., Minnaar, R.P., Klaver, B.P. & van der Noordaa, J. Establishment of a rat cell line inducible for the expression of human cytomegalovirus immediate-early gene products by protein synthesis inhibition. *J. Virol.* 58, 851–859 (1986).

17.

Boullaran, C. & Gales, C. Cardiac cAMP: production, hydrolysis, modulation and detection. *Frontiers in Pharmacology* 6: 203 (2015).

18.

Brinkman, K. K., Mishra, P. & Fraser, N. W. The half-life of the HSV-1 1.5-kb LAT intron is similar to the half-life of the 2.0-kb LAT intron. *J. Neurovirol.* 19, 102–108 (2013).

19.

Bustin, S. A. & Nolan, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol Tech* 15, 155–166 (2004).

20.

Calvo, V., Crews, C. M., Vik, T. A. & Bierer, B. E. Interleukin 2 stimulation of p70 S6 kinase activity is inhibited by the immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7571–7575 (1992).

21.

Camarena, V., Kobayashi, M., Kim, J.Y., Roehm, P., Perez, R., Gardner, J., Wilson, A.C., Mohr, I. & Chao, M.V. Nature and duration of growth factor signaling through receptor tyrosine kinases regulates HSV-1 latency in neurons. *Cell Host & Microbe* 8, 320–330 (2010).

22.

Carr, D. J. J., Austin, B. A., Halford, W. P. & Stuart, P. M. Delivery of Interferon- γ by an adenovirus vector blocks herpes simplex virus Type 1 reactivation in vitro and in vivo independent of RNase L and double-stranded RNA-dependent protein kinase pathways. *Journal of Neuroimmunology* 206, 39–43 (2009).

23.

Carthew, R.W. Transcript in situ hybridization of whole-mount embryos for phenotype analysis of RNAi-treated drosophila. *Cold Spring Harbor Protocols* 2006 3, Protokoll 4519 (2006).

24.

Catez, F., Picard, C., Held, K., Gross, S., Rousseau, A., Theil, D., Sawtell, N., Labetoulle, M. & Lomonte, P. HSV-1 genome subnuclear positioning and associations with host-cell PML-NBs and centromeres regulate LAT locus transcription during latency in neurons. *PLoS Pathogens* 8, Artikel e1002852 (2012).

25.

Chen, X.-P., Mata, M. & Fink, D. J. Use of laser capture microdissection together with in situ hybridization and real-time PCR to study distribution of latent herpes simplex virus genomes in mouse trigeminal ganglia. *Methods Mol. Biol.* 293, 285–293 (2005).

26.

Chen, X.-P., Mata, M., Kelley, M., Glorioso, J. C. & Fink, D. J. The relationship of herpes simplex virus latency associated transcript expression to genome copy number: A quantitative study using laser capture microdissection. *Journal of Neurovirology* 8, 204–210 (2002).

27.

Chomiak, T., Turner, N. & Hu, B. What we have learned about autism spectrum disorder from valproic acid. *Patholog Res Int* 2013, 712758 (2013).

28.

Chong, E.-M., Wilhelmus, K.R., Matoba, A.Y., Jones, D.B., Coats, D.K. & Paysse, E.A. Herpes simplex virus keratitis in children. *Am. J. Ophthalmol.* 138, 474–475 (2004).

29.

Choudhary, S. K., Archin, N. M. & Margolis, D. M. Hexamethylbisacetamide and disruption of human immunodeficiency virus type 1 latency in CD4(+) T cells. *J. Infect. Dis.* 197, 1162–1170 (2008).

30.

Cliffe, A.R., Garber, D.A. & Knipe, D.M. Transcription of the herpes simplex virus latency-associated transcript promotes the formation of facultative heterochromatin on lytic promoters. *Journal of Virology* 83, 8182–8190 (2009).

31.

Cliffe, A.R., and Knipe, D.M. Herpes simplex virus ICP0 promotes both histone removal and acetylation on viral DNA during lytic infection. *Journal of Virology* 82, 12030–12038 (2008).

32.

Cliffe, A.R. & Wilson, A.C. Restarting lytic gene transcription at the onset of herpes simplex virus reactivation. *Journal of Virology* 91, e01419-16 (2017).

33.

Cofini, M., Quadrozzi, F., Favoriti, P., Favoriti, M. & Cofini, G. Valproic acid-induced acute pancreatitis in pediatric age: case series and review of literature. *G Chir* 36, 158–160 (2015).

34.

Cohen, J.I. Vaccination to reduce reactivation of herpes simplex virus 2. *Journal of Infectious Diseases* 215, 844–846 (2017).

35.

Cohrs, R.J., Randall, J., Smith, J., Gildeen, D.H., Dabrowski, C., van Der Keyl, H. & Tal-Singer, R. Analysis of individual human trigeminal ganglia for latent herpes simplex virus type 1 and varicella-zoster virus nucleic acids using real-time PCR. *J. Virol.* 74, 11464–11471 (2000).

36.

Conley, B.A., Forrest, A., Egorin, M.J., Zuhowski, E.G., Sinibaldi, V. & Van Echo, D.A. Phase I trial using adaptive control dosing of hexamethylene bisacetamide (NSC 95580). *Cancer Res.* 49, 3436–3440 (1989).

37.

Conrady, C. D., Zheng, M., Fitzgerald, K. A., Liu, C. & Carr, D. J. J. Resistance to HSV-1 infection in the epithelium resides with the novel innate sensor, IFI-16. *Mucosal Immunology* 5, 173–183 (2012).

38.

Coombs, J. & Thompson, S. Forskolin's effect on transient K current in nudibranch neurons is not reproduced by cAMP. *J. Neurosci.* 7, 443–452 (1987).

39.

Corey, L., Wald, A., Celum, C. L. & Quinn, T. C. The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 35, 435–445 (2004).

40.

Crespillo, A.J., Praena, B., Bello-Morales, R., Lerma, L., Vázquez-Calvo, A., Martín-Acebes, M.A., Tabarés, E., Sobrino, F. & López-Guerrero, J.A. Inhibition of herpes virus infection in oligodendrocyte cultured cells by valproic acid. *Virus Res.* 214, 71–79 (2016).

41.

Curtin, N. M., Boyle, N. T., Mills, K. H. G. & Connor, T. J. Psychological stress suppresses innate IFN-gamma production via glucocorticoid receptor activation: reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. *Brain Behav. Immun.* 23, 535–547 (2009).

42.

Daikoku, T., Tannai, H., Honda, M., Onoe, T., Matsuo, K., Onoye, Y., Nishizawa, M., Kawana, T., Okuda, T., Hasegawa, T. & Shiraki, K. Subclinical generation of acyclovir-resistant herpes simplex virus with mutation of homopolymeric guanosine strings during acyclovir therapy. *Journal of Dermatological Science* 82, 160–165 (2016).

43.

Danaher, R. J., Jacob, R. J. & Miller, C. S. Establishment of a quiescent herpes simplex virus type 1 infection in neurally-differentiated PC12 cells. *J. Neurovirol.* 5, 258–267 (1999).

44.

Danaher, R. J., Savells-Arb, A. D., Black, S. A., Jr, Jacob, R. J. & Miller, C. S. Herpesvirus quiescence in neuronal cells IV: virus activation induced by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) involves the protein kinase A pathway. *J. Neurovirol.* 7, 163–168 (2001).

45.

Danaher, R. J., Jacob, R. J. & Miller, C. S. Herpesvirus quiescence in neuronal cells: antiviral conditions not required to establish and maintain HSV-2 quiescence. *J. Neurovirol.* 6, 296–302 (2000).

46.

Danaher, R. J., Jacob, R. J. & Miller, C. S. Herpesvirus quiescence in neuronal cells. V: forskolin-responsiveness of the herpes simplex virus type 1 alpha0 promoter and contribution of the putative cAMP response element. *J. Neurovirol.* 9, 489–497 (2003).

47.

Dancey, J. E. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. *Cancer Biology & Therapy* 5, 1065–1073 (2006).

48.

Davison, A. J. Herpesvirus systematics. *Veterinary Microbiology* 143, 52–69 (2010).

49.

De Clercq, E. Selective anti-herpesvirus agents. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 23, 93–101 (2013).

50.

De Regge, N., Van Opdenbosch, N., Nauwynck, H.J., Efstathiou, S. & Favoreel, H.W. Interferon alpha induces establishment of alphaherpesvirus latency in sensory neurons in vitro. *PLoS ONE* 5, e13076 (2010).

51.

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

52.

Del Rio, T., Ch'ng, T. H., Flood, E. A., Gross, S. P. & Enquist, L. W. Heterogeneity of a fluorescent tegument component in single pseudorabies virus virions and enveloped axonal assemblies. *J. Virol.* 79, 3903–3919 (2005).

53.

Derfuss, T., Segerer, S., Herberger, S., Sinicina, I., Hübner, K., Ebel, K., Knaus, H.-G., Steiner, I., Meinel, E., Dornmair, K., Arbusow, V., Strupp, M., Brandt, T. & Theil, D. Presence of HSV-1 immediate early genes and clonally expanded T-cells with a memory effector phenotype in human trigeminal ganglia. *Brain Pathology* 17, 389–398 (2007).

54.

Deshmane, S. L. & Fraser, N. W. During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J. Virol.* 63, 943–947 (1989).

55.

Devi-Rao, G.B., Goodart, S.A., Hecht, L.M., Rochford, R., Rice, M.K. & Wagner, E.K. Relationship between polyadenylated and nonpolyadenylated herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts. *J. Virol.* 65, 2179–2190 (1991).

56.

Dey, A., Wong, E., Kua, N., Ling Teo, H., Tergaonkar, V. & Lane, D. Hexamethylene Bisacetamide (HMBA) simultaneously targets AKT and MAPK pathway and represses NF- κ B activity: Implications for cancer therapy. *Cell Cycle* 7, 3759–3767 (2008).

57.

Di Benedetto, F., Di Sandro, S., De Ruvo, N., Spaggiari, M., Montalti, R., Ballarin, R., Cappelli, G. & Gerunda, G.E. Sirolimus monotherapy effectiveness in liver transplant recipients with renal dysfunction due to calcineurin inhibitors. *J. Clin. Gastroenterol.* 43, 280–286 (2009).

58.

Diefenbach, R. J., Miranda-Saksena, M., Douglas, M. W. & Cunningham, A. L. Transport and egress of herpes simplex virus in neurons. *Reviews in Medical Virology* 18, 35–51 (2008).

59.

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

60.

Du, T., Zhou, G. & Roizman, B. Induction of apoptosis accelerates reactivation of latent HSV-1 in ganglionic organ cultures and replication in cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 14616–14621 (2012).

61.

Ecob-Prince, M. S., Rixon, F. J., Preston, C. M., Hassan, K. & Kennedy, P. G. E. Reactivation in vivo and in vitro of herpes simplex virus from mouse dorsal root ganglia which contain different levels of latency-associated transcripts. *Journal of General Virology* 74, 995–1002 (1993).

62.

Egan, K. P., Wu, S., Wigdahl, B. & Jennings, S. R. Immunological control of herpes simplex virus infections. *Journal of NeuroVirology* 19, 328–345 (2013).

63.

Egorin, M.J., Sigman, L.M., Van Echo, D.A., Forrest, A., Whitacre, M.Y. & Aisner, J. Phase I clinical and pharmacokinetic study of hexamethylene bisacetamide (NSC 95580) administered as a five-day continuous infusion. *Cancer Res.* 47, 617–623 (1987).

64.

Eiben, B., Trawicki, W., Hammans, W., Goebel, R. & Epplen, J. T. A prospective comparative study on fluorescence in situ hybridization (FISH) of uncultured amniocytes and standard karyotype analysis. *Prenat. Diagn.* 18, 901–906 (1998).

65.

Ellermann-Eriksen, S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virol. J.* 2, 59 (2005).

66.

Ergaz, Z., Fudim-Weinstein, L. & Ornoy, A. Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology* 64, 116–140 (2016).

67.

Euvrard, S., Kanitakis, J., Pouteil-Noble, C., Claudy, A. & Touraine, J. L. Skin cancers in organ transplant recipients. *Ann. Transplant.* 2, 28–32 (1997).

68.

Faes, S., Planche, A., Uldry, E., Santoro, T., Pythoud, C., Stehle, J.-C., Horlbeck, J., Letovanec, I., Riggi, N., Datta, D., Demartines, N. & Dormond, O. Targeting carbonic anhydrase IX improves the anti-cancer efficacy of mTOR inhibitors. *Oncotarget* 7, 36666–36680 (2016).

69.

Farooq, A.V. & Shukla, D. Herpes simplex epithelial and stromal keratitis: an epidemiologic update. *Survey of Ophthalmology* 57, 448–462 (2012).

70.

Feierbach, B., Piccinotti, S., Bisher, M., Denk, W. & Enquist, L.W. Alpha-herpesvirus infection induces the formation of nuclear actin filaments. *PLoS Pathogens* 2, e85 (2006).

71.

Feldman, L.T., Ellison, A.R., Voytek, C.C., Yang, L., Krause, P. & Margolis, T.P. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 978–983 (2002).

72.

Friedman, R. L. & Stark, G. R. alpha-Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature* 314, 637–639 (1985).

73.

Friend, C., Scher, W., Holland, J. G. & Sato, T. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 378–382 (1971).

74.

Fu, X., Tao, L., Rivera, A. & Zhang, X. Rapamycin enhances the activity of oncolytic herpes simplex virus against tumor cells that are resistant to virus replication. *International Journal of Cancer* 129, 1503–1510 (2011).

75.

Gaumann, A., Schlitt, H. J. & Geissler, E. K. Immunosuppression and tumor development in organ transplant recipients: the emerging dualistic role of rapamycin. *Transplant International* 21, 207–217 (2008).

76.

Giordani, N.V., Neumann, D.M., Kwiatkowski, D.L., Bhattacharjee, P.S., McAnany, P.K., Hill, J.M. & Bloom, D.C. During herpes simplex virus type 1 infection of rabbits, the ability to express the latency-associated transcript increases latent-phase transcription of lytic genes. *Journal of Virology* 82, 6056–6060 (2008).

77.

Giroglou, T., Florin, L., Schäfer, F., Streeck, R. E. & Sapp, M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 75, 1565–1570 (2001).

78.

Glauser, T.A., Cnaan, A., Shinnar, S., Hirtz, D.G., Dlugos, D., Masur, D., Clark, P.O., Capparelli, E.V. & Adamson, P.C. Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy. *New England Journal of Medicine* 362, 790–799 (2010).

79.

Gopalakrishnan, V. REST and the RESTless: in stem cells and beyond. *Future Neurol* 4, 317–329 (2009).

80.

Göttlicher, M. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *The EMBO Journal* 20, 6969–6978 (2001).

81.

Grassadonia, A., Cioffi, P., Simiele, F., Iezzi, L., Zilli, M. & Natoli, C. Role of hydroxamate-based histone deacetylase inhibitors (Hb-HDAIs) in the treatment of solid malignancies. *Cancers* 5, 919–942 (2013).

82.

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

83.

Guan, Y., Yang, X., Yang, W., Charbonneau, C. & Chen, Q. Mechanical activation of mammalian target of rapamycin pathway is required for cartilage development. *The FASEB Journal* 28, 4470–4481 (2014).

84.

Gunness, P., Aleksa, K., Bend, J. & Koren, G. Acyclovir-induced nephrotoxicity: the role of the acyclovir aldehyde metabolite. *Transl Res* 158, 290–301 (2011).

85.

Hafezi, W., Eing, B. R., Lorentzen, E. U., Thanos, Solon & Kühn, J. E. Reciprocal transmission of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) between corneal epithelium and trigeminal neurites in an embryonic chick organ culture. *The FASEB Journal* 16, 878–880 (2002).

86.

Hafezi, W., Lorentzen, E.U., Eing, B.R., Müller, M., King, N.J.C., Klupp, B., Mettenleiter, T.C. & Kühn, J.E. Entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) into the distal axons of trigeminal neurons favors the onset of nonproductive, silent infection. *PLoS Pathogens* 8, e1002679 (2012).

87.

Hall, D.B. & Struhl, K. The VP16 activation domain interacts with multiple transcriptional components as determined by protein-protein cross-linking in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 277, 46043–46050 (2002).

88.

Hampsey, M. & Reinberg, D. Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* 113, 429–432 (2003).

89.

Hejnova, L., Hahnova, K., Kockova, R., Svatunkova, J., Sedmera, D. & Novotny, J. Adenylyl cyclase signaling in the developing chick heart: the deranging effect of antiarrhythmic drugs. *BioMed Research International* 2014, 1–6 (2014).

90.

Henderson, G., Peng, W., Jin, L., Perng, G.-C., Nesburn, A.B., Wechsler, S.L. & Jones, C. Regulation of caspase 8- and caspase 9-induced apoptosis by the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript. *J. Neurovirol.* 8 *Suppl* 2, 103–111 (2002).

91.

Hill, J.M., Garza, H.H., Jr, Helmy, M.F., Cook, S.D., Osborne, P.A., Johnson, E.M., Jr, Thompson, H.W., Green, L.C., O'Callaghan, R.J. & Gebhardt, B.M. Nerve growth factor antibody stimulates reactivation of ocular herpes simplex virus type 1 in latently infected rabbits. *J. Neurovirol.* 3, 206–211 (1997).

92.

Himmelein, S., St Leger, A.J., Knickelbein, J.E., Rowe, A., Freeman, M.L. & Hendricks, R.L. Circulating herpes simplex type 1 (HSV-1)-specific CD8+ T cells do not access HSV-1 latently infected trigeminal ganglia. *Herpesviridae* 2, 5 (2011).

93.

Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C. & Strauss, M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2690–2698 (1999).

94.

Hjalmarsson, A., Blomqvist, P. & Sköldenberg, B. Herpes simplex encephalitis in Sweden, 1990-2001: incidence, morbidity, and mortality. *Clin. Infect. Dis.* 45, 875–880 (2007).

95.

Honess, R. W. & Roizman, B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14, 8–19 (1974).

96.

Honess, R. W. & Roizman, B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 1276–1280 (1975).

97.

Hoskote, S.S., Annapureddy, N., Ramesh, A.P., Rose, K. & Jones, J.P. Valacyclovir and acyclovir neurotoxicity with status epilepticus. *Am J Ther* 23, e304–306(2013).

98.

Hsieh, C.-L., Chen, K.-C., Ding, C.-Y., Tsai, W.-J., Wu, J.-F. & Peng, C.-C. Valproic acid substantially downregulated genes folr1, IGF2R, RGS2, COL6A3, EDNRB, KLF6, and pax-3, N-acetylcysteine alleviated most of the induced gene alterations in chicken embryo model. *Rom J Morphol Embryol* 54, 993–1004 (2013).

99.

Huang, J., Kent, J.R., Placek, B., Whelan, K.A., Hollow, C.M., Zeng, P.-Y., Fraser, N.W. & Berger, S.L. Trimethylation of histone H3 lysine 4 by Set1 in the lytic infection of human herpes simplex virus 1. *Journal of Virology* 80, 5740–5746 (2006).

100.

Huber, K., Doyon, G., Plaks, J., Fyne, E., Mellors, J.W. & Sluis-Cremer, N. Inhibitors of histone deacetylases: correlation between isoform specificity and reactivation of HIV type 1 (HIV-1) from latently infected cells. *J. Biol. Chem.* 286, 22211–22218 (2011).

101.

Hunsperger, E. A. Capsaicin-induced reactivation of latent herpes simplex virus type 1 in sensory neurons in culture. *Journal of General Virology* 84, 1071–1078 (2003).

102.

Hussin, A., Md Nor, N. S. & Ibrahim, N. Phenotypic and genotypic characterization of induced acyclovir-resistant clinical isolates of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res.* 100, 306–313 (2013).

103.

Ibiricu, I., Huiskonen, J.T., Döhner, K., Bradke, F., Sodeik, B. & Grunewald, K. Cryo electron tomography of herpes simplex virus during axonal transport and secondary envelopment in primary neurons. *PLoS Pathogens* 7, e1002406 (2011).

104.

Imai, Y., Apakupakul, K., Krause, P.R., Halford, W.P. & Margolis, T.P. Investigation of the mechanism by which herpes simplex virus type 1 LAT sequences modulate preferential establishment of latent infection in mouse trigeminal ganglia. *Journal of Virology* 83, 7873–7882 (2009).

105.

Jamaluddin, M.S., Hu, P.-W., Jan, Y., Siwak, E.B. & Rice, A.P. Short communication: the broad-spectrum histone deacetylase inhibitors vorinostat and panobinostat activate latent HIV in CD4⁺ T cells in part through phosphorylation of the T-loop of the CDK9 subunit of P-TEFb. *AIDS Research and Human Retroviruses* 32, 169–173 (2016).

106.

Jiang, X., Brown, D., Osorio, N., Hsiang, C., BenMohamed, L. & Wechsler, S.L. Increased neurovirulence and reactivation of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT)-negative mutant dLAT2903 with a disrupted LAT miR-H2. *Journal of NeuroVirology* 22, 38–49 (2016).

107.

Jin, L. & Lloyd, R. In situ hybridization: methods and applications. *J Clin Lab Anal* 11, 2–9 (1997).

108.

Jin, L., Peng, W., Perng, G.-C., Brick, D.J., Nesburn, A.B., Jones, C. & Wechsler, S.L. Identification of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript sequences that both inhibit apoptosis and enhance the spontaneous reactivation phenotype. *J. Virol.* 77, 6556–6561 (2003).

109.

Johnston, C., Gottlieb, S. L. & Wald, A. Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus prepared for WHO PD-VAC. *Vaccine* 34, 2948–2952 (2016).

110.

Kang, W., Mukerjee, R., Gartner, J.J., Hatzigeorgiou, A.G., Sandri-Goldin, R.M. & Fraser, N.W. Characterization of a spliced exon product of herpes simplex type-1 latency-associated transcript in productively infected cells. *Virology* 356, 106–114 (2006).

111.

Kavitha, C., Rajamani, K. & Vadivel, E. *Coleus forskohlii* – A comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects. *Journal of Medicinal Plant Research* 4, 278–285 (2010).

112.

Kay, J. E., Kromwel, L., Doe, S. E. & Denyer, M. Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. *Immunology* 72, 544–549 (1991).

113.

Kaye, S.B., Baker, K., Bonshek, R., Maseruka, H., Grinfeld, E., Tullo, A., Easty, D.L. & Hart, C.A. Human herpesviruses in the cornea. *Br J Ophthalmol* 84, 563–571 (2000).

114.

Kaye, S. & Choudhary, A. Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res* 25, 355–380 (2006).

115.

Kennedy, P. G. Herpes simplex virus type 1 and Bell's palsy—a current assessment of the controversy. *Journal of Neurovirology* 16, 1–5 (2010).

116.

Kent, J.R., Zeng, P.-Y., Atanasiu, D., Gardner, J., Fraser, N.W. & Berger, S.L. During lytic infection herpes simplex virus type 1 is associated with histones bearing modifications that correlate with active transcription. *Journal of Virology* 78, 10178–10186 (2004).

117.

Khanna, K.M., Bonneau, R.H., Kinchington, P.R. & Hendricks, R.L. Herpes simplex virus-specific memory CD8+ t cells are selectively activated and retained in latently infected sensory ganglia. *Immunity* 18, 593–603 (2003).

118.

Kim, J. Y., Mandarino, A., Chao, M. V., Mohr, I. & Wilson, A. C. Transient reversal of episome silencing precedes VP16-dependent transcription during reactivation of latent HSV-1 in neurons. *PLoS Pathog.* 8, e1002540 (2012).

119.

Kim, M., Osborne, N.R., Zeng, W., Donaghy, H., McKinnon, K., Jackson, D.C. & Cunningham, A.L. Herpes simplex virus antigens directly activate NK cells via TLR2, thus facilitating their presentation to CD4 T lymphocytes. *The Journal of Immunology* 188, 4158–4170 (2012).

120.

Kimberlin, D.W., Whitley, R.J., Wan, W., Powell, D.A., Storch, G., Ahmed, A., Palmer, A., Sánchez, P.J., Jacobs, R.F., Bradley, J.S., Robinson, J.L., Shelton, M., Dennehy, P.H., Leach, C., Rathore, M., Abughali, N., Wright, P., Frenkel, L.M., Van Dyke, R., Weiner, L.B., Guzman-Cottrill, J., McCarthy, C.A., Griffin, J., Parker, M., Lakeman, F.D., Kuo, H., Lee, C.H. & Cloud, G.H. Oral acyclovir suppression and neurodevelopment after neonatal herpes. *New England Journal of Medicine* 365, 1284–1292 (2011).

121.

Knickelbein, J.E., Khanna, K.M., Yee, M.B., Baty, C.J., Kinchington, P.R. & Hendricks, R.L. Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science* 322, 268–271 (2008).

122.

Kobayashi, M., Wilson, A. C., Chao, M. V. & Mohr, I. Control of viral latency in neurons by axonal mTOR signaling and the 4E-BP translation repressor. *Genes Dev.* 26, 1527–1532 (2012).

123.

König, S., Browne, S., Doleschal, B., Schernthaner, M., Poteser, M., Mächler, H., Wittchow, E., Braune, M., Muik, M., Romanin, C. & Groschner, K. Inhibition of Orai1-mediated Ca²⁺ entry is a key mechanism of the antiproliferative action of sirolimus in human arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305, 1646-1657 (2013).

124.

Kramer, M. F. & Coen, D. M. Quantification of transcripts from the ICP4 and thymidine kinase genes in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus. *J. Virol.* 69, 1389–1399 (1995).

125.

Kramer, T. & Enquist, L. Directional spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Viruses* 5, 678–707 (2013).

126.

Krause, P.R., Stanberry, L.R., Bourne, N., Connelly, B., Kurawadwala, J.F., Patel, A. & Straus, S.E. Expression of the herpes simplex virus type 2 latency-associated transcript enhances spontaneous reactivation of genital herpes in latently infected guinea pigs. *J. Exp. Med.* 181, 297–306 (1995).

127.

Kristie, T. M., Vogel, J. L. & Sears, A. E. Nuclear localization of the C1 factor (host cell factor) in sensory neurons correlates with reactivation of herpes simplex virus from latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1229–1233 (1999).

128.

Kubat, N. J., Tran, R. K., McAnany, P. & Bloom, D. C. Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. *J. Virol.* 78, 1139–1149 (2004).

129.

Kuhn, M.A., Nayak, S., Camarena, V., Gardner, J., Wilson, A., Mohr, I., Chao, M.V. & Roehm, P.C. A cell culture model of facial palsy resulting from reactivation of latent herpes simplex type 1: *Otology & Neurotology* 33, 87–92 (2012).

130.

Kulms, D., Zeise, E., Pöppelmann, B. & Schwarz, T. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene* 21, 5844–5851 (2002).

131.

Kuo, M. H. & Allis, C. D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20, 615–626 (1998).

132.

Kussmann-Gerber, S., Wurth, C., Scapozza, L., Pilger, B.D., Pliška, V. & Folkers, G. Interaction of the recombinant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase with thymidine and aciclovir: a kinetic study. *Nucleosides and Nucleotides* 18, 311–330 (1999).

133.

Kutluay, S. B. & Triezenberg, S. J. Role of chromatin during herpesvirus infections. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790, 456–466 (2009).

134.

Kwiatkowski, D.L., Thompson, H.W. & Bloom, D.C. The polycomb group protein Bmi1 binds to the herpes simplex virus 1 latent genome and maintains repressive histone marks during latency. *Journal of Virology* 83, 8173–8181 (2009).

135.

Lang, F., Li, X., Vladimirova, O., Hu, B., Chen, G., Xiao, Y., Singh, V., Lu, D., Li, L., Han, H., Wickramasinghe, J.M.A., Smith, S.T., Zheng, C., Li, Q., Lieberman, P.M., Fraser, N.W. & Zhou, J. CTCF interacts with the lytic HSV-1 genome to promote viral transcription. *Scientific Reports* 7, 39861 (2017).

136.

Laurenza, A., Sutkowski, E. M. & Seamon, K. B. Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends in Pharmacological Sciences* 10, 442–447 (1989).

137.

Law, B. K. Rapamycin: An anti-cancer immunosuppressant? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 56, 47–60 (2005).

138.

Lee, J.S., Raja, P. & Knipe, D.M. Herpesviral ICP0 protein promotes two waves of heterochromatin removal on an early viral promoter during lytic infection. *mBio* 7, e02007-15 (2016).

139.

Leib, D. A., Nadeau, K. C., Rundle, S. A. & Schaffer, P. A. The promoter of the latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 contains a functional cAMP-response element: role of the latency-associated transcripts and cAMP in reactivation of viral latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 48–52 (1991).

140.

Leib, D. A. *et al.* Immediate-early regulatory gene mutants define different stages in the establishment and reactivation of herpes simplex virus latency. *J. Virol.* 63, 759–768 (1989).

141.

Leuzinger, H., Ziegler, U., Schraner, E.M., Fraefel, C., Glauser, D.L., Heid, I., Ackermann, M., Mueller, M. & Wild, P. Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *Journal of Virology* 79, 13047–13059 (2005).

142.

Levitz, R. E. Herpes simplex encephalitis: A review. *Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care* 27, 209–212 (1998).

143.

Liang, Y., Vogel, J. L., Narayanan, A., Peng, H. & Kristie, T. M. Inhibition of the histone demethylase LSD1 blocks α -herpesvirus lytic replication and reactivation from latency. *Nature Medicine* 15, 1312–1317 (2009).

144.

Liashkovich, I., Hafezi, W., Kühn, J. M., Oberleithner, H. & Shahin, V. Nuclear delivery mechanism of herpes simplex virus type 1 genome. *Journal of Molecular Recognition* 24, 414–421 (2011).

145.

Lippelt, L., Braun, R. W. & Kühn, J. E. Genital herpes simplex virus type 1 infection: new fields for an old acquaintance? *Intervirol* 45, 2–5 (2002).

146.

Lokensgard, J. R., Cheeran, M. C.-J., Hu, S., Gekker, G. & Peterson, P. K. Glial cell responses to herpesvirus infections: role in defense and immunopathogenesis. *J. Infect. Dis.* 186, 171–179 (2002).

147.

Looker, K.J., Magaret, A.S., May, M.T., Turner, K.M.E., Vickerman, P., Gottlieb, S.L. & Newman, L.M. Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. *PLOS ONE* 10, e0140765 (2015).

148.

Löscher, W. Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Progress in Neurobiology* 58, 31–59 (1999).

149.

Loutsch, J. M. *et al.* Identical 371-base-pair deletion mutations in the LAT genes of herpes simplex virus type 1 McKrae and 17syn+ result in different in vivo reactivation phenotypes. *J. Virol.* 73, 767–771 (1999).

150.

Lu, R. & Misra, V. Potential role for luman, the cellular homologue of herpes simplex virus VP16 (alpha gene trans-inducing factor), in herpesvirus latency. *J. Virol.* 74, 934–943 (2000).

151.

Lu, R. & Misra, V. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Nucleic Acid Research* 28, 2446–2454 (2000).

152.

Luca, N. J. C., Lara-Corrales, I. & Pope, E. Eczema herpeticum in children: clinical features and factors predictive of hospitalization. *J. Pediatr.* 161, 671–675 (2012).

153.

Lundgren, G. *et al.* Acyclovir prophylaxis in bone marrow transplant recipients. *Scand J Infect Dis Suppl* 47, 137–144 (1985).

154.

Maass, A. Rational promoter selection for gene transfer into cardiac cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35, 823–831 (2003).

155.

Maillet, S., Naas, T., Crepin, S., Roque-Afonso, A.-M., Lafay, F., Efstathiou, S. & Labetoulle, M. Herpes simplex virus type 1 latently infected neurons differentially express latency-associated and ICP0 transcripts. *Journal of Virology* 80, 9310–9321 (2006).

156.

Malm, G. Neonatal herpes simplex virus infection. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 14, 204–208 (2009).

157.

Marquart, M., Bhattacharjee, P., Zheng, X., Kaufman, H., Thompson, H., Varnell, E. & Hill, J. Ocular reactivation phenotype of HSV-1 strain F(MP)E, a corticosteroid-sensitive strain. *Curr. Eye Res.* 26, 205–209 (2003).

158.

McBane, R. D. & Gross, J. B., Jr. Herpes esophagitis: clinical syndrome, endoscopic appearance, and diagnosis in 23 patients. *Gastrointest. Endosc.* 37, 600–603 (1991).

159.

McClain, J. B., Carlyle, W. C., Donohoe, D. J. & Ormiston, J. A. Technical overview on the MiStent coronary stent. *Minerva Cardioangiol* 64, 560–571(2016).

160.

McFarlane, M., Daksis, J. I. & Preston, C. M. Hexamethylene bisacetamide stimulates herpes simplex virus immediate early gene expression in the absence of trans-induction by Vmw65. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 2), 285–292 (1992).

161.

Mehta, A., Maggioncalda, J., Bagasra, O., Thikkavarapu, S., Saikumari, P., Valyi-Nagy, T., Fraser, N.W. & Block, T.M. In situ DNA PCR and RNA hybridization detection of herpes simplex virus sequences in trigeminal ganglia of latently infected mice. *Virology* 206, 633–640 (1995).

162.

Mellerick, D. M. & Fraser, N. W. Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology* 158, 265–275 (1987).

163.

Mertz, G. J., Benedetti, J., Ashley, R., Selke, S. A. & Corey, L. Risk factors for the sexual transmission of genital herpes. *Ann. Intern. Med.* 116, 197–202 (1992).

164.

Metkar, S. S., Wang, B. & Ebbs, M. L. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 160, 875–885 (2003).

165.

Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G. & Granzow, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Current Opinion in Microbiology* 9, 423–429 (2006).

166.

Mettenleiter, T. C. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: The herpesvirus assembly puzzle. *Veterinary Microbiology* 113, 163–169 (2006).

167.

Mettenleiter, T. C., Klupp, B. G. & Granzow, H. Herpesvirus assembly: An update. *Virus Research* 143, 222–234 (2009).

168.

Millhouse, S., Kenny, J. J., Quinn, P. G., Lee, V. & Wigdahl, B. ATF/CREB elements in the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript promoter interact with members of the ATF/CREB and AP-1 transcription factor families. *J. Biomed. Sci.* 5, 451–464 (1998).

169.

Millhouse, S. & Wigdahl, B. Molecular circuitry regulating herpes simplex virus type 1 latency in neurons. *J. Neurovirol.* 6, 6–24 (2000).

170.

Montminy, M. R., Gonzalez, G. A. & Yamamoto, K. K. Regulation of camp-inducible genes by creb. *Trends in Neurosciences* 13, 184–188 (1990).

171.

Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355–365 (1997).

172.

Naito, S., Obayashi, S., Sumi, T., Iwai, S., Nakazawa, M., Ikuta, K. & Yura, Y. Enhancement of antitumor activity of herpes simplex virus γ 134.5-deficient mutant for oral squamous cell carcinoma cells by hexamethylene bisacetamide. *Cancer Gene Therapy* 13, 780–791 (2006).

173.

Nakashima, H., Kaufmann, J.K., Wang, P.-Y., Nguyen, T., Speranza, M.-C., Kasai, K., Okemoto, K., Otsuki, A., Nakano, I., Fernandez, S., Goins, W.F., Glorioso, J.C., Cripe, T.P. & Chiocca, E.A. Histone deacetylase 6 inhibition enhances oncolytic viral replication in glioma. *J. Clin. Invest.* 125, 4269–4280 (2015).

174.

Neumann, D. M., Bhattacharjee, P. S. & Hill, J. M. Sodium butyrate: a chemical inducer of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 in the ocular mouse model. *J. Virol.* 81, 6106–6110 (2007).

175.

Ng, C. S., Kato, H. & Fujita, T. Recognition of viruses in the cytoplasm by RLRs and other helicases--how conformational changes, mitochondrial dynamics and ubiquitination control innate immune responses. *Int. Immunol.* 24, 739–749 (2012).

176.

Nicoll, M. P. & Efstathiou, S. Expression of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts does not influence latency establishment of virus mutants deficient for neuronal replication. *Journal of General Virology* 94, 2489–2494 (2013).

177.

Nicoll, M.P., Proenca, J.T., Connor, V. & Efstathiou, S. Influence of herpes simplex virus 1 latency-associated transcripts on the establishment and maintenance of latency in the ROSA26R reporter mouse model. *Journal of Virology* 86, 8848–8858 (2012).

178.

Nicoll, M.P., Hann, W., Shivkumar, M., Harman, L.E.R., Connor, V., Coleman, H.M., Proença, J.T. & Efstathiou, S. The HSV-1 Latency-Associated Transcript Functions to Repress Latent Phase Lytic Gene Expression and Suppress Virus Reactivation from Latently Infected Neurons. *PLoS Pathog.* 12, e1005539 (2016).

179.

Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W.M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M.H., Massague, J., Crabtree, G.R. & Roberts, J.M. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372, 570–573 (1994).

180.

Ooi, C. & Lewis, D. Updating the management of sexually transmitted infections. *Australian Prescriber* 38, 204–208 (2015).

181.

Orzalli, M. H., Conwell, S. E., Berrios, C., Decaprio, J. A. & Knipe, D. M. Nuclear interferon-inducible protein 16 promotes silencing of herpesviral and transfected DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 4492–4501 (2013).

182.

Otsuki, A., Patel, A., Kasai, K., Suzuki, M., Kurozumi, K., Chiocca, E.A. & Saeki, Y. Histone deacetylase inhibitors augment antitumor efficacy of herpes-based oncolytic viruses. *Mol. Ther.* 16, 1546–1555 (2008).

183.

Owen, D., Crump, C. & Graham, S. Tegument assembly and secondary envelopment of alphaherpesviruses. *Viruses* 7, 5084–5114 (2015).

184.

Pasdeloup, D., McElwee, M., Beilstein, F., Labetoulle, M. & Rixon, F. J. Herpesvirus tegument protein pUL37 interacts with dystonin/BPAG1 to promote capsid transport on microtubules during egress. *J. Virol.* 87, 2857–2867 (2013).

185.

Pellegrini, S. & Dusanter-Fourt, I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur. J. Biochem.* 248, 615–633 (1997).

186.

Peng, W., Vitvitskaia, O., Carpenter, D., Wechsler, S. L. & Jones, C. Identification of two small RNAs within the first 1.5-kb of the herpes simplex virus type 1–encoded latency-associated transcript. *Journal of Neurovirology* 14, 41–52 (2008).

187.

Perng, G. C., Ghiasi, H., Slanina, S. M., Nesburn, A. B. & Wechsler, S. L. The spontaneous reactivation function of the herpes simplex virus type 1 LAT gene resides completely within the first 1.5 kilobases of the 8.3-kilobase primary transcript. *J. Virol.* 70, 976–984 (1996).

188.

Perng, G.C., Slanina, S.M., Yukht, A., Drolet, B.S., Keleher, W., Jr, Ghiasi, H., Nesburn, A.B. & Wechsler, S.L. A herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript mutant with increased virulence and reduced spontaneous reactivation. *J. Virol.* 73, 920–929 (1999).

189.

Perng, G.-C. & Jones, C. Towards an understanding of the herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2010, 262415 (2010).

190.

Philbin, V.J., Iqbal, M., Boyd, Y., Goodchild, M.J., Beal, R.K., Bumstead, N., Young, J. & Smith, A.L. Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology* 114, 507–521 (2005).

191.

Pintérová, M., Behuliak, M., Kuneš, J. & Zicha, J. Involvement of BKCa and KV potassium channels in cAMP-induced vasodilatation: their insufficient function in genetic hypertension. *Physiol Res* 63, 275–285 (2014).

192.

Ponticelli, C. The pros and the cons of mTOR inhibitors in kidney transplantation. *Expert Rev Clin Immunol* 10, 295–305(2013).

193.

Prejean, C., Sarma, T., Kurnasov, O., Usacheva, A., Hemmings, B., Cantley, L., Fruman, D.A., Morrison, L.A., Buller, R.M. & Colamonici, O.R. Phosphatidylinositol 3-kinase confers resistance to encephalomyocarditis and herpes simplex virus-induced cell death through the activation of distinct downstream effectors. *The Journal of Immunology* 167, 4553–4559 (2001).

194.

Price, M. A., Cruzalegui, F. H. & Treisman, R. The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *EMBO J.* 15, 6552–6563 (1996).

195.

Raap, A.K., van de Rijke, F.M., Dirks, R.W., Sol, C.J., Boom, R. & van der Ploeg, M. Bicolor fluorescence in situ hybridization to intron and exon mRNA sequences. *Exp. Cell Res.* 197, 319–322 (1991).

196.

Rader, K. A., Ackland-Berglund, C. E., Miller, J. K., Pepose, J. S. & Leib, D. A. In vivo characterization of site-directed mutations in the promoter of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts. *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 9), 1859–1869 (1993).

197.

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

198.

Ransohoff, R. M. & Cardona, A. E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468, 253–262 (2010).

199.

Reuben, R. C., Wife, R. L., Breslow, R., Rifkind, R. A. & Marks, P. A. A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 862–866 (1976).

200.

Roizman, B. The organization of the herpes simplex virus genomes. *Annual Review of Genetics* 13, 25–57 (1979).

201.

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

202.

Roizman, B. The checkpoints of viral gene expression in productive and latent infection: the role of the HDAC/CoREST/LSD1/REST repressor complex. *Journal of Virology* 85, 7474–7482 (2011).

203.

Roizman, B. & Baines, J. The diversity and unity of herpesviridae. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 14, 63–79 (1991).

204.

Roizman, B. & Whitley, R.J. An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation. *Annual Review of Microbiology* 67, 355–374 (2013).

205.

Ryu, C.H., Park, K.Y., Kim, S.M., Jeong, C.H., Woo, J.S., Hou, Y. & Jeun, S.-S. Valproic acid enhances anti-tumor effect of mesenchymal stem cell mediated HSV-TK gene therapy in intracranial glioma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 421, 585–590 (2012).

206.

Saksena, M.M., Wakisaka, H., Tijono, B., Boadle, R.A., Rixon, F., Takahashi, H. & Cunningham, A.L. Herpes simplex virus type 1 accumulation, envelopment, and exit in growth cones and varicosities in mid-distal regions of axons. *J. Virol.* 80, 3592–3606 (2006).

207.

Sawtell, N. M. & Thompson, R. L. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcription unit promotes anatomical site-dependent establishment and reactivation from latency. *J. Virol.* 66, 2157–2169 (1992).

208.

Sawtell, N.M. & Thompson, R.L. Comparison of herpes simplex virus reactivation in ganglia in vivo and in explants demonstrates quantitative and qualitative differences. *Journal of Virology* 78, 7784–7794 (2004).

209.

Schubert, A., Gentner, E., Bohn, K., Schwarz, M., Mertens, T. & Sauerbrei, A. Single nucleotide polymorphisms of thymidine kinase and DNA polymerase genes in clinical herpes simplex virus type 1 isolates associated with different resistance phenotypes. *Antiviral Res.* 107, 16–22 (2014)

210.

Schultz, A. Die Methode der Fluoreszenz-In-Situ- Hybridisierung zur Analyse von HIV- und SIV- Genomen auf Einzelzellebene. S.18 (Universität des Saarlandes, 2009).

211.

Sehgal, S. N., Baker, H. & Vézina, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.* 28, 727–732 (1975).

212.

Sergeant, S. & Kim, H. D. Inhibition of 3-O-methylglucose transport in human erythrocytes by forskolin. *J. Biol. Chem.* 260, 14677–14682 (1985).

213.

Shen, W., Sa e Silva, M., Jaber, T., Vitvitskaia, O., Li, S., Henderson, G. & Jones, C. Two small RNAs encoded within the first 1.5 kilobases of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis. *Journal of Virology* 83, 9131–9139 (2009).

214.

Shishido, T., Wolschendorf, F., Duverger, A., Wagner, F., Kappes, J., Jones, J. & Kutsch, O. Selected drugs with reported secondary cell-differentiating capacity prime latent HIV-1 infection for reactivation. *Journal of Virology* 86, 9055–9069 (2012).

215.

Silveira, P.C.L., Victor, E.G., Schefer, D., Silva, L.A., Streck, E.L., Paula, M.M. & Pinho, R.A. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound Med Biol* 36, 44–50 (2010).

216.

Smith, G. A., Gross, S. P. & Enquist, L. W. Herpesviruses use bidirectional fast-axonal transport to spread in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3466–3470 (2001).

217.

Smith, G. A., Pomeranz, L., Gross, S. P. & Enquist, L. W. Local modulation of plus-end transport targets herpesvirus entry and egress in sensory axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16034–16039 (2004).

218.

Smith, J.S. & Robinson, N.J. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *The Journal of Infectious Diseases* 186, 3–28 (2002).

219.

Smith, K. M., Ketchart, W., Zhou, X., Montano, M. M. & Xu, Y. Determination of hexamethylene bisacetamide, an antineoplastic compound, in mouse and human plasma by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879, 2206–2212 (2011).

220.

Smith, R. L., Escudero, J. M. & Wilcox, C. L. Regulation of the herpes simplex virus latency-associated transcripts during establishment of latency in sensory neurons in vitro. *Virology* 202, 49–60 (1994).

221.

Solanki, S., Rathi, M., Khanduja, S., Dhull, C., Sachdeva, S., and Phogat, J. Recent trends: Medical management of infectious keratitis. *Oman Journal of Ophthalmology* 8, 83 (2015).

222.

Spina, E. & Perugi, G. Antiepileptic drugs: indications other than epilepsy. *Epileptic Disord* 6, 57–75 (2004).

223.

Spivack, J. G., Woods, G. M. & Fraser, N. W. 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.* 65, 6800–6810 (1991).

224.

Stamminger, T., Fickenscher, H. & Fleckenstein, B. Cell type-specific induction of the major immediate early enhancer of human cytomegalovirus by cyclic AMP. *Journal of General Virology* 71, 105–113 (1990).

225.

Stegall, M.D., Larson, T.S., Prieto, M., Gloor, J., Textor, S., Nyberg, S., Sterioff, S., Ishitani, M., Griffin, M., Kremers, W., Lund, W., Schwab, T., Cosio, F. & Velosa, J. Kidney transplantation without calcineurin inhibitors using sirolimus. *Transplant. Proc.* 35, 125–127 (2003).

226.

Steiner, I., Spivack, J.G., Deshmane, S.L., Ace, C.I., Preston, C.M. & Fraser, N.W. A herpes simplex virus type 1 mutant containing a nontransducing Vmw65 protein establishes latent infection in vivo in the absence of viral replication and reactivates efficiently from explanted trigeminal ganglia. *J. Virol.* 64, 1630–1638 (1990).

227.

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

228.

Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S. & Griffiths, G. M. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751–761 (2001).

229.

Sugimoto, K., Uema, M., Sagara, H., Tanaka, M., Sata, T., Hashimoto, Y. & Kawaguchi, Y. Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. *Journal of Virology* 82, 5198–5211 (2008).

230.

Tanaka, M., Levy, J., Terada, M., Breslow, R., Rifkind, R.A. & Marks, P.A. Induction of erythroid differentiation in murine virus infected erythroleukemia cells by highly polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 1003–1006 (1975).

231.

Thomas, D. L., Lock, M., Zabolotny, J. M., Mohan, B. R. & Fraser, N. W. 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.* 76, 532–540 (2002).

232.

Thomas, G.V., Tran, C., Mellinshoff, I.K., Welsbie, D.S., Chan, E., Fueger, B., Czernin, J. & Sawyers, C.L. Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat. Med.* *12*, 122–127 (2006).

233.

Thompson, R.L., Preston, C.M. & Sawtell, N.M. De novo synthesis of VP16 coordinates the exit from hsv latency in vivo. *PLoS Pathogens* *5*, e1000352 (2009).

234.

Tiwari, V., Tarbuton, M. & Shukla, D. Diversity of heparan sulfate and HSV entry: basic understanding and treatment strategies. *Molecules* *20*, 2707–2727 (2015).

235.

Tran, T.H.C., Stanescu, D., Caspers-Velu, L., Rozenberg, F., Liesnard, C., Gaudric, A., Lehoang, P. & Bodaghi, B. Clinical characteristics of acute HSV-2 retinal necrosis. *Am. J. Ophthalmol.* *137*, 872–879 (2004).

236.

Trybala, E., Liljeqvist, J. A., Svennerholm, B. & Bergström, T. Herpes simplex virus types 1 and 2 differ in their interaction with heparan sulfate. *J. Virol.* *74*, 9106–9114 (2000).

237.

Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M. & Giacca, M. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *276*, 3254–3261 (2001).

238.

Umbach, J.L., Nagel, M.A., Cohrs, R.J., Gilden, D.H. & Cullen, B.R. Analysis of human alphaherpesvirus microRNA expression in latently infected human trigeminal ganglia. *Journal of Virology* *83*, 10677–10683 (2009).

239.

Umbach, J.L., Kramer, M.F., Jurak, I., Karnowski, H.W., Coen, D.M. & Cullen, B.R. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* *454*, 780–783 (2008).

240.

Vajda, F. J., O'Brien, T. J., Graham, J. E., Lander, C. M. & Eadie, M. J. Dose dependence of fetal malformations associated with valproate. *Neurology* *81*, 999–1003 (2013).

241.

Wagh, V. D., Patil, P. N., Surana, S. J. & Wagh, K. V. Forskolin: upcoming antiglaucoma molecule. *J Postgrad Med* *58*, 199–202 (2012).

242.

Wagner, E. K. & Bloom, D. C. Experimental investigation of herpes simplex virus latency. *Clin. Microbiol. Rev.* *10*, 419–443 (1997).

243.

Walbaum, B. & Rada, G. Is there benefit adding antivirals to corticosteroids for Bell's palsy in adults? *Medwave* *15 Suppl 2*, e6226 (2015).

244.

Waldman, A. S., Haeusslein, E. & Milman, G. Purification and characterization of herpes simplex virus (type 1) thymidine kinase produced in *Escherichia coli* by a high efficiency expression plasmid utilizing a lambda PL promoter and cI857 temperature-sensitive repressor. *J. Biol. Chem.* 258, 11571–11575 (1983).

245.

Wang, K., Lau, T.Y., Morales, M., Mont, E.K. & Straus, S.E. Laser-capture microdissection: refining estimates of the quantity and distribution of latent herpes simplex virus 1 and varicella-zoster virus DNA in human trigeminal ganglia at the single-cell level. *Journal of Virology* 79, 14079–14087 (2005).

246.

Webre, J.M., Hill, J.M., Nolan, N.M., Clement, C., McFerrin, H.E., Bhattacharjee, P.S., Hsia, V., Neumann, D.M., Foster, T.P., Lukiw, W.J. & Thompson, H.W. Rabbit and mouse models of HSV-1 latency, reactivation, and recurrent eye diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, Article ID 612316, 1–18 (2012).

247.

Whitby, A. J., Blyth, W. A. & Hill, T. J. The effect of DNA hypomethylating agents on the reactivation of herpes simplex virus from latently infected mouse ganglia in vitro. Brief report. *Arch. Virol.* 97, 137–144 (1987).

248.

Whitley, R. J. & Roizman, B. Herpes simplex virus infections. *The Lancet* 357, 1513–1518 (2001).

249.

Wigdahl, B. L., Scheck, A. C., De Clercq, E. & Rapp, F. High efficiency latency and activation of herpes simplex virus in human cells. *Science* 217, 1145–1146 (1982).

250.

Wild, P., Senn, C., Manera, C.L., Sutter, E., Schraner, E.M., Tobler, K., Ackermann, M., Ziegler, U., Lucas, M.S. & Kaech, A. Exploring the nuclear envelope of herpes simplex virus 1-infected cells by high-resolution microscopy. *Journal of Virology* 83, 408–419 (2008).

251.

Wilhelm, J. & Pingoud, A. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem* 4, 1120–1128 (2003).

252.

Wilhelmus, K.R., Gee, L., Hauck, W.W., Kurinij, N., Dawson, C.R., Jones, D.B., Barron, B.A., Kaufman, H.E., Sugar, J. & Hyndiuk, R.A. Herpetic eye disease study. a controlled trial of topical corticosteroids for herpes simplex stromal keratitis. *Ophthalmology* 101, 1883-1895-1896 (1994).

253.

Wilhelmus, K. R. Acyclovir for the prevention of recurrent herpes simplex virus eye disease. Herpetic Eye Disease Study Group. *N. Engl. J. Med.* 339, 300–306 (1998).

254.

Wilson, A. C. & Mohr, I. A cultured affair: HSV latency and reactivation in neurons. *Trends in Microbiology* 20, 604–611 (2012).

255.

Wohlrab, J., Voß, F., Müller, C. & Brenn, L. C. The use of local concentrated heat versus topical acyclovir for a herpes labialis outbreak: results of a pilot study under real life conditions. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 6, 263–271 (2013).

256.

Wu, T. T., Su, Y. H., Block, T. M. & Taylor, J. M. Evidence that two latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 are nonlinear. *J. Virol.* 70, 5962–5967 (1996).

257.

Wysocka, J. & Herr, W. The herpes simplex virus VP16-induced complex: the makings of a regulatory switch. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 294–304 (2003).

258.

Xaus, J., Cardó, M., Valledor, A.F., Soler, C., Lloberas, J. & Celada, A. Interferon γ induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity* 11, 103–113 (1999).

259.

Yanez, A., Harrell, T., Sriranganathan, H., Ives, A. & Bertke, A. Neurotrophic factors NGF, GDNF and NTN selectively modulate HSV1 and HSV2 lytic infection and reactivation in primary adult sensory and autonomic neurons. *Pathogens* 6, 5 (2017).

260.

Yoshida, A., Koide, Y., Uchijima, M. & Yoshida, T.O. IFN- γ induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198, 857–861 (1994).

261.

Yura, Y., Kondo, Y., Iga, H., Harada, K., Tujimoto, H., Yanagawa, T., Yoshida, H. & Sato, M. Enhanced replication of herpes simplex virus by hexamethylene bisacetamide. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 186–189 (1991).

262.

Zhao, H., Zhang, C., Hou, G. & Song, J. MicroRNA-H4-5p encoded by HSV-1 latency-associated transcript promotes cell proliferation, invasion and cell cycle progression via p16-mediated PI3K-Akt signaling pathway in SHSY5Y cells. *Int J Clin Exp Med* 8, 7526–7534 (2015).

263.

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

6. Curriculum

7. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Joachim Kühn für die Ermöglichung dieser Arbeit in kollegialer und produktiver Atmosphäre sowie für seine stete Hilfsbereitschaft.

Besonderer Dank geht auch an Dr. rer. nat. Wali Hafezi für die freundliche Bereitstellung des Organmodells und inspirierende Gespräche.

Dank auch an Frau Milo Romberg für die Einarbeitung in die praktische Tätigkeit.

Ich danke auch meiner langjährigen Freundin und Lebensgefährtin für die persönliche Unterstützung und viel Geduld.

Zuletzt danke ich ganz außerordentlich meinen Eltern, ohne die ich diese Arbeit nicht hätte schreiben können.

8. Appendix

A: Abbildungen

B: Tabellen

C: Anhang auf angefügtem Datenträger

A: Abbildungen

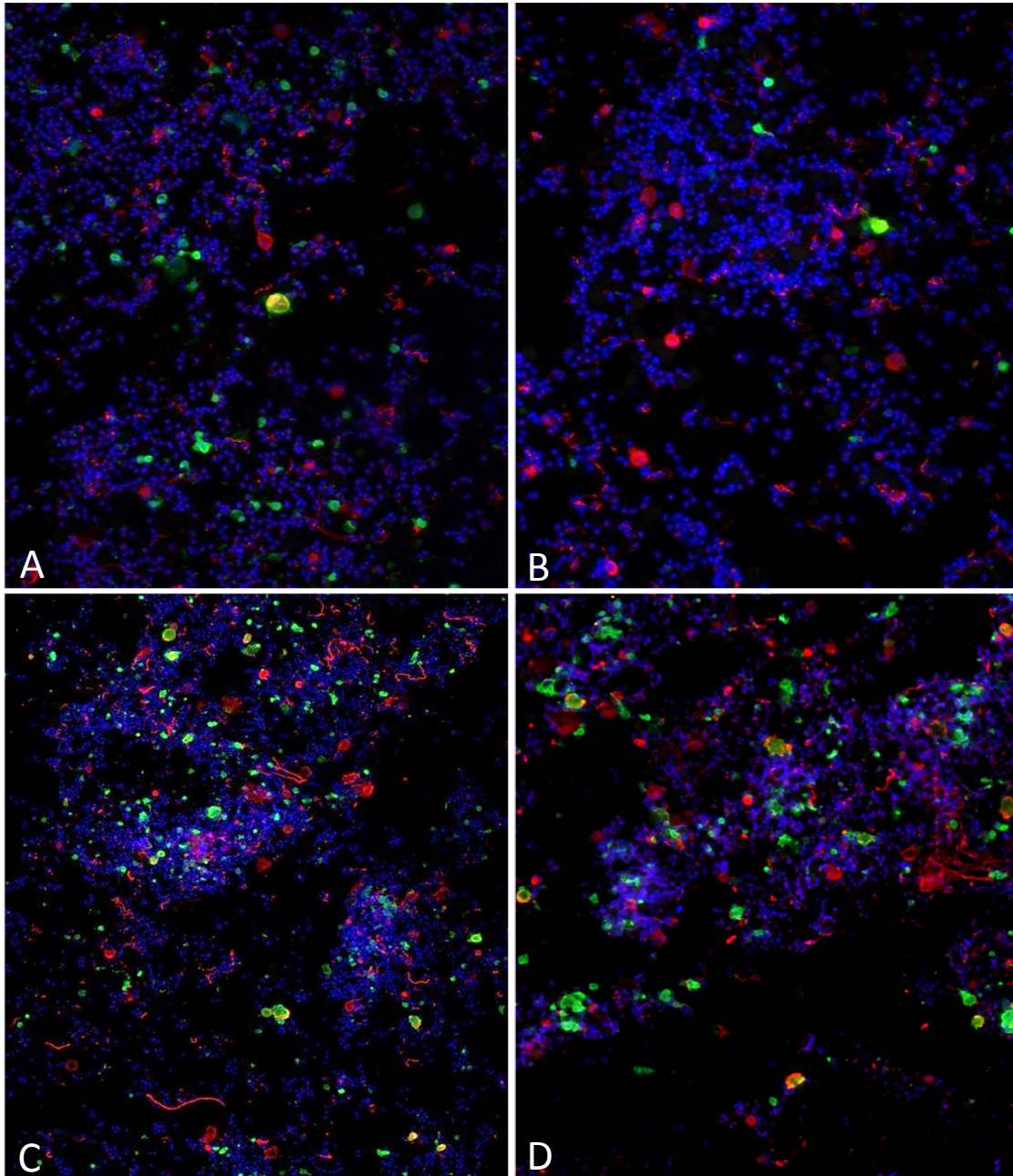


Abb. 1: Gegenüberstellung typischer Ergebnisse in der IF-Mikroskopie nach Infektion der IC mit 5×10^4 PFU HSV-1 in den Gruppen „HMBA“ (C – D) und „Kontrolle“ (A – B). Zeitpunkt 48 h.p.i. Abgebildet sind Panel-Overlays der DAKO-, DAPI- und Neurofilament-Färbung (vergl. Abb. H2 und H3 im Haupttext).

Man erkennt eine deutliche Zunahme infizierter Neurone unter HMBA. Vergrößerung: A – B: 160-fach; C – D: 100-fach.

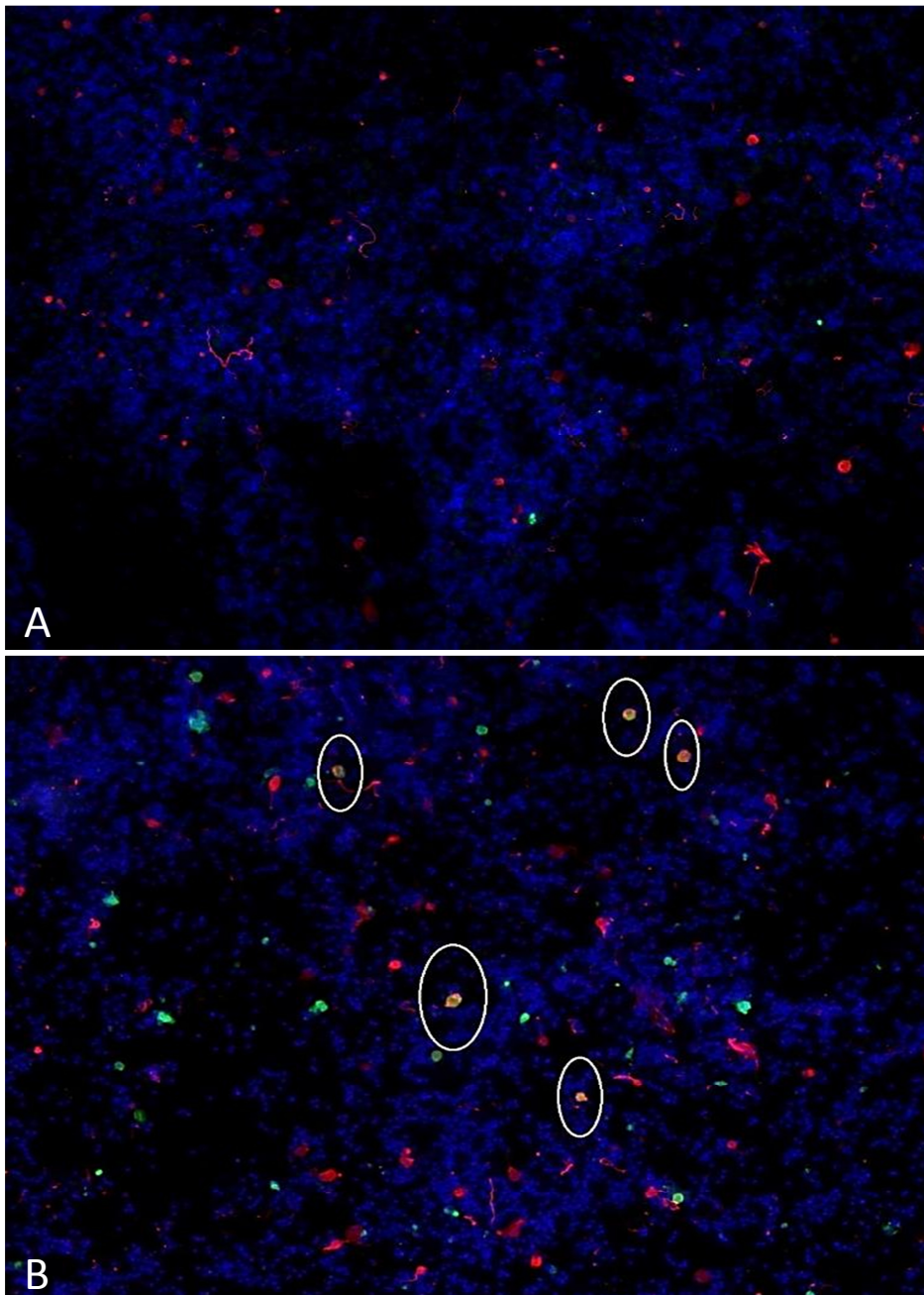


Abb. 2: Darstellung eines typischen Ergebnisses nach axonaler Infektion in der IF-Mikroskopie mit (B) und ohne (A) Zugabe von 2,5 mM HMBA bei einer Infektionsdosis von $2,6 \times 10^7$ PFU HSV-1. Aufnahme zum Zeitpunkt 47 h.p.i. Abgebildet sind Panel-Overlays der DAKO-, DAPI- und Neurofilament-Färbung (vergl. Kap. 2.2.4.1.) Infizierte Neurone sind mit einem Kreis markiert. Man erkennt eine deutliche Zunahme infizierter Neurone und Begleitzellen unter Einfluss von HMBA gegenüber der nativen Kontrolle ohne HMBA. Vergrößerung 100-fach.

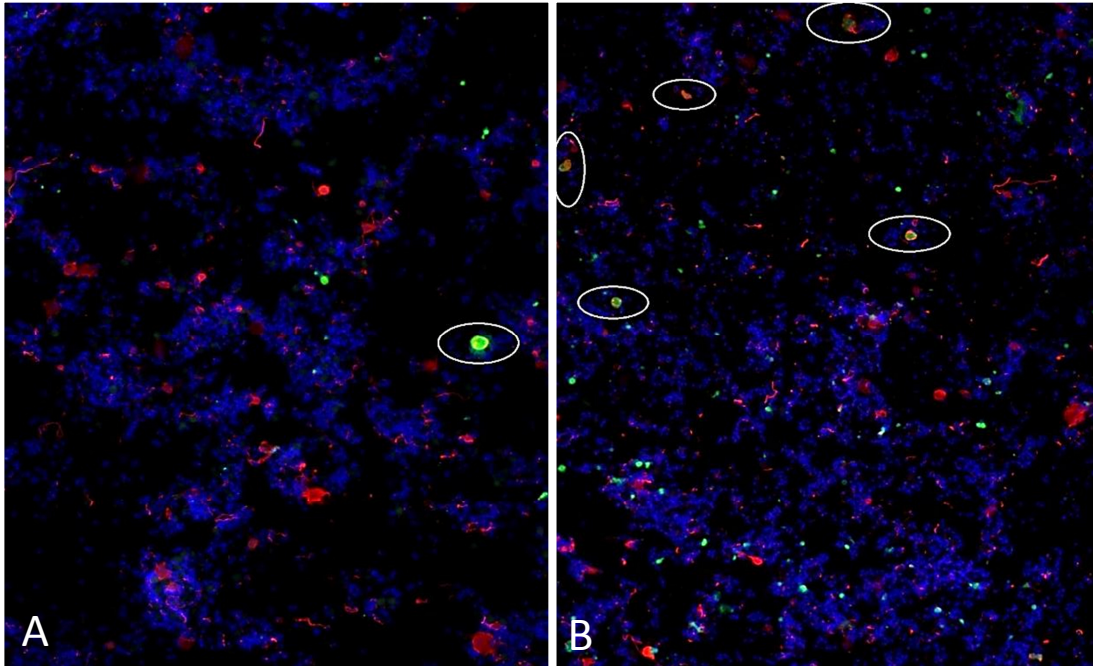


Abb. 3: Darstellung eines typischen Ergebnisses in der IF-Mikroskopie nach axonaler Infektion mit (B) und ohne (A) Zugabe von 2,5 mM HMBA bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU HSV-1. Aufnahme zum Zeitpunkt 4 d.p.i. Abgebildet sind Panel-Overlays der DAKO-, DAPI- und Neurofilament-Färbung (vergl. Kap. 2.2.4.1.) Infizierte Neurone sind mit einem Oval markiert. Man erkennt eine deutliche Zunahme infizierter Neurone und Begleitzellen unter Einfluss von HMBA. Vergrößerung 100-fach.

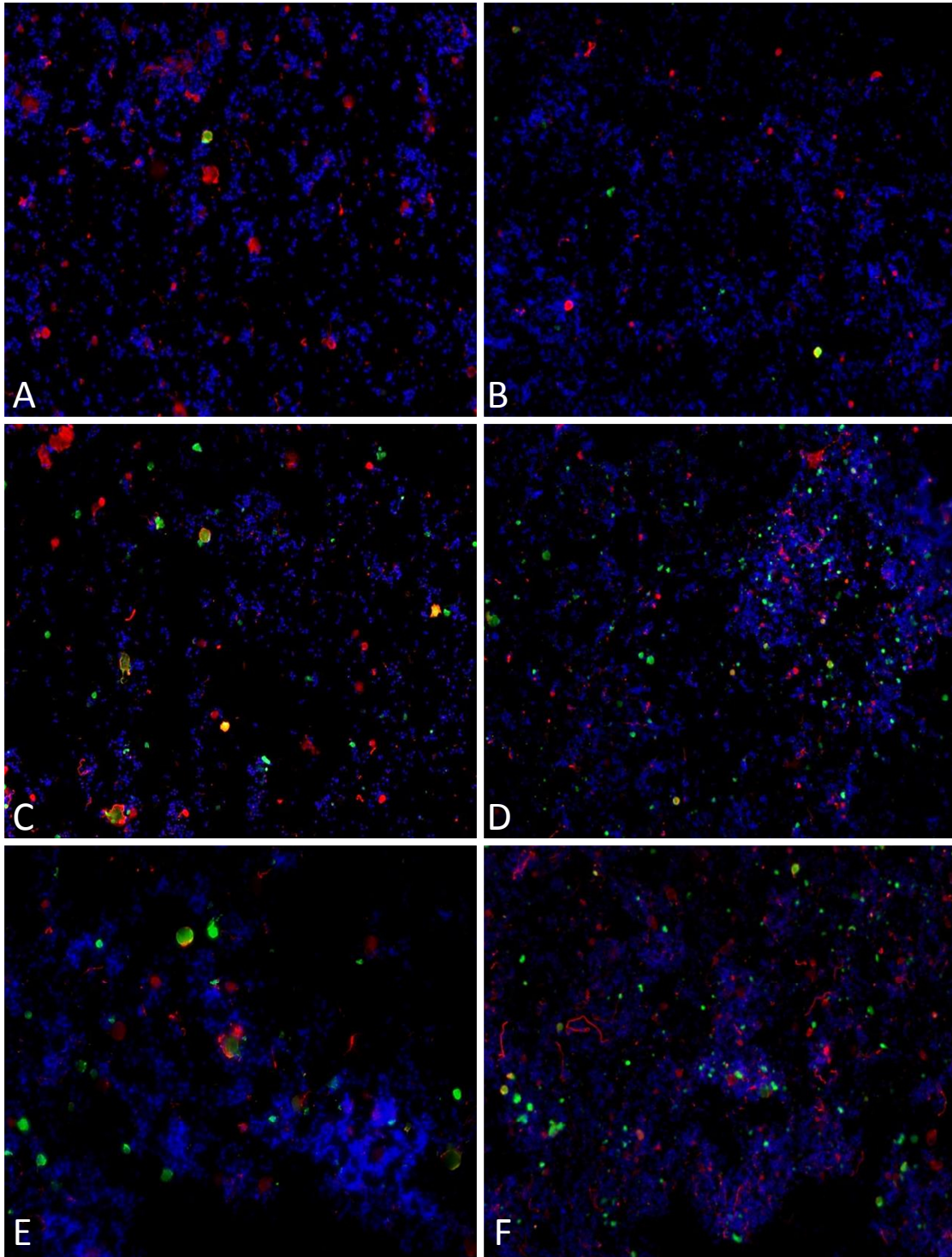


Abb. 4: Gegenüberstellung typischer Ergebnisse in der IF-Mikroskopie 48 Stunden nach Infektion der IC mit 5×10^4 PFU unter Zusatz von $100 \mu\text{M}$ Forskolin in 1% DMSO (A – B), 1 % DMSO (C – D) sowie ohne Zusatz von Agenzien (E – F: Native Kontrolle). Abgebildet sind jeweils Panel-Overlays der DAKO-, DAPI- und Neurofilament-Färbung (vergl. Kap. 2.2.4.1.). Man erkennt eine deutliche Abnahme infizierter Neurone und Begleitzellen unter Forskolin-Exposition. Vergrößerung A, C, E: 160-fach; B, D, F: 100-fach.

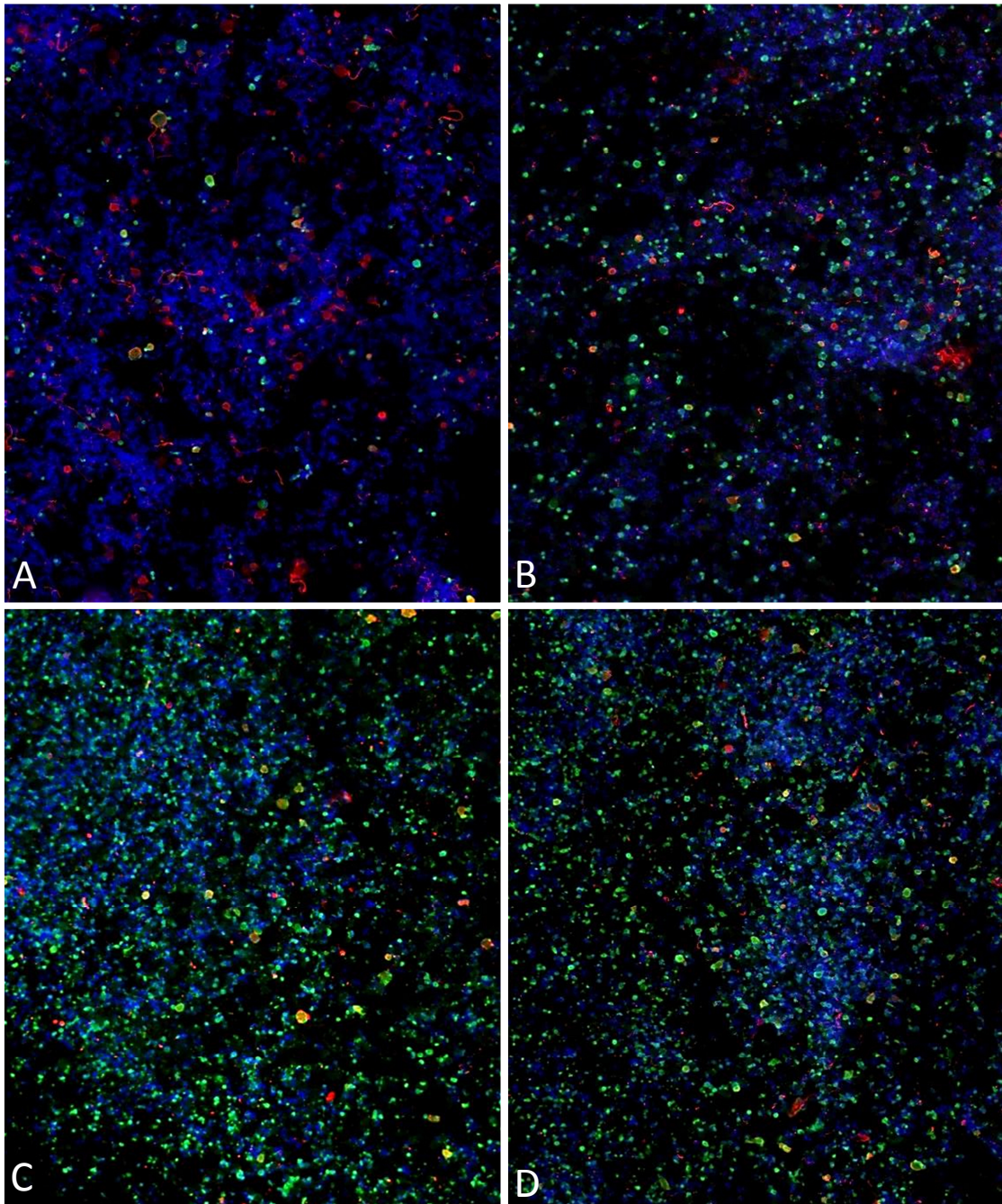


Abb. 5: Darstellung des Verlaufs einer HSV-2-Infektion in der IC. Overlays fluoreszenzgefärbter TG-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit einer Infektionsdosis von 5×10^5 PFU. **A:** 12 h.p.i. **B:** 24 h.p.i. **C – D:** 45 h.p.i. Deutlich ausgeprägter als bei HSV-1 kommt es innerhalb von zwei Tagen zu einer massiven Ausbreitung der Infektion im Ganglion (vergl. Abb. 6, beachte Dosisunterschiede). Vergrößerung 100-fach.

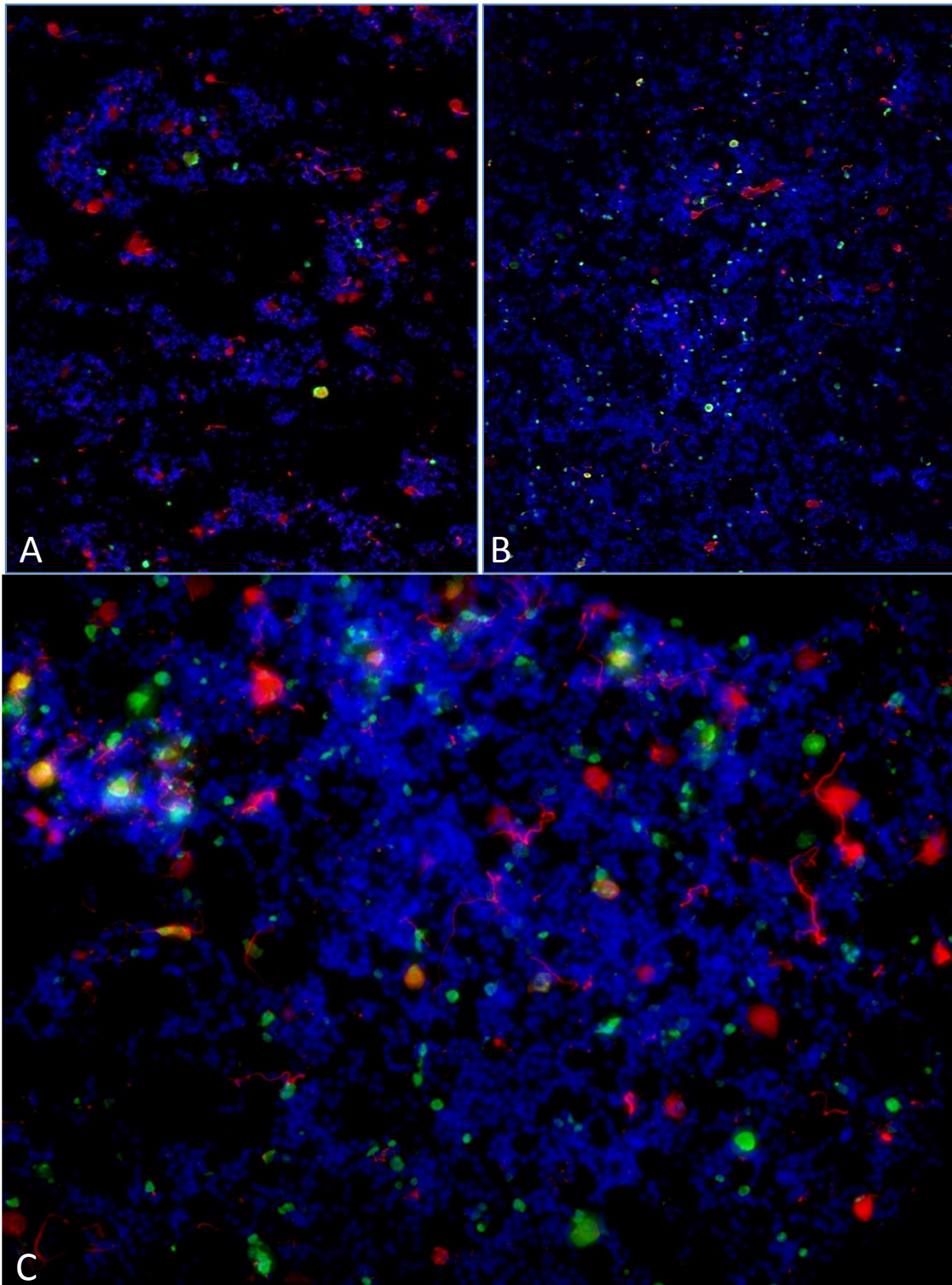


Abb. 6: Darstellung des Verlaufs einer produktiven HSV-2-Infektion in der OC. Overlays fluoreszenzgefärbter TG-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU. **A:** 45 h.p.i. **B:** 4 d.p.i. **C:** 8 h.p.i. Innerhalb der Gruppe Antigen-positiver DK stiegen die Anteile produktiv infizierter Neurone bis Tag 8 nach Infektion kontinuierlich an. Vergrößerung: A, C: 160-fach. B: 100-fach.

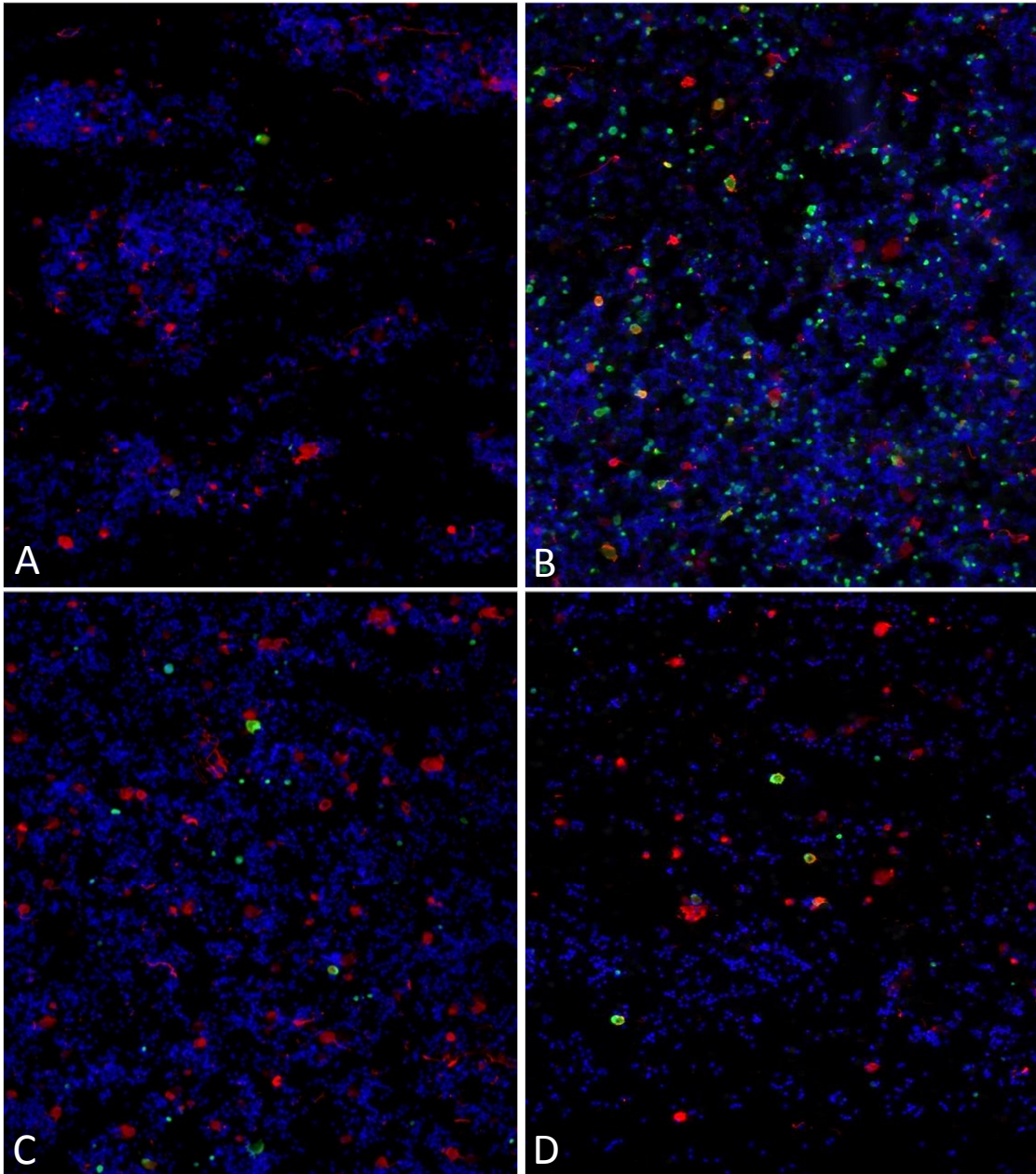


Abb. 7: Typische Ergebnisse in der IF-Mikroskopie nach Infektion der OC mit 5×10^6 PFU HSV-2 mit anschließender Exposition gegenüber HMBA (**B**), DMSO (**C**) und Forskolin (**D**) bzw. in der nativen Kontrolle (**A**). Abgebildet sind Panel-Overlays der DAKO-, DAPI- und Neurofilament-Färbung aus Antigen-positiven DK der Versuchsgruppen. Die Zunahme infizierter Neurone und Begleitzellen in der HMBA-Gruppe gegenüber der nativen Kontrolle war gravierend. Zwischen der Forskolin- und DMSO-Gruppe war kein Unterschied erkennbar. Die Ergebnisse lieferten einen Hinweis auf eine geringe stimuliernde Wirkung von DMSO auf die floride HSV-2-Infektion. Vergrößerung: 160-fach.



Abb. 8: PCR-Produkt LAT_1113-2573. 1 kb-DNA-Marker (888 bp).

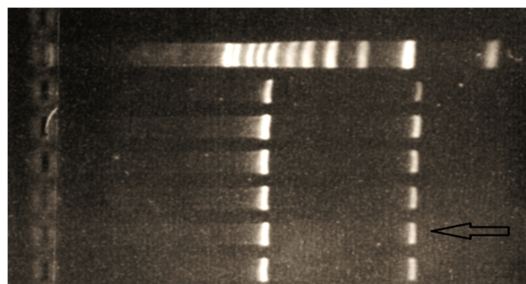


Abb. 9: Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau des Vektors pCMV-TNT-LAT_1113-2573 mit Sal I und Eco R1.

1 kb-DNA-Marker. Man erkennt das 888bp große Fragment LAT 1113-2573 (Position 1371 – 2258; rechts im Bild) sowie das Plasmid pCMV-TNT (links). Im weiteren Prozess der ISH-Sondenherstellung wurde der Klon c2 (Pfeil) zur *in vitro*-Transkription verwendet.

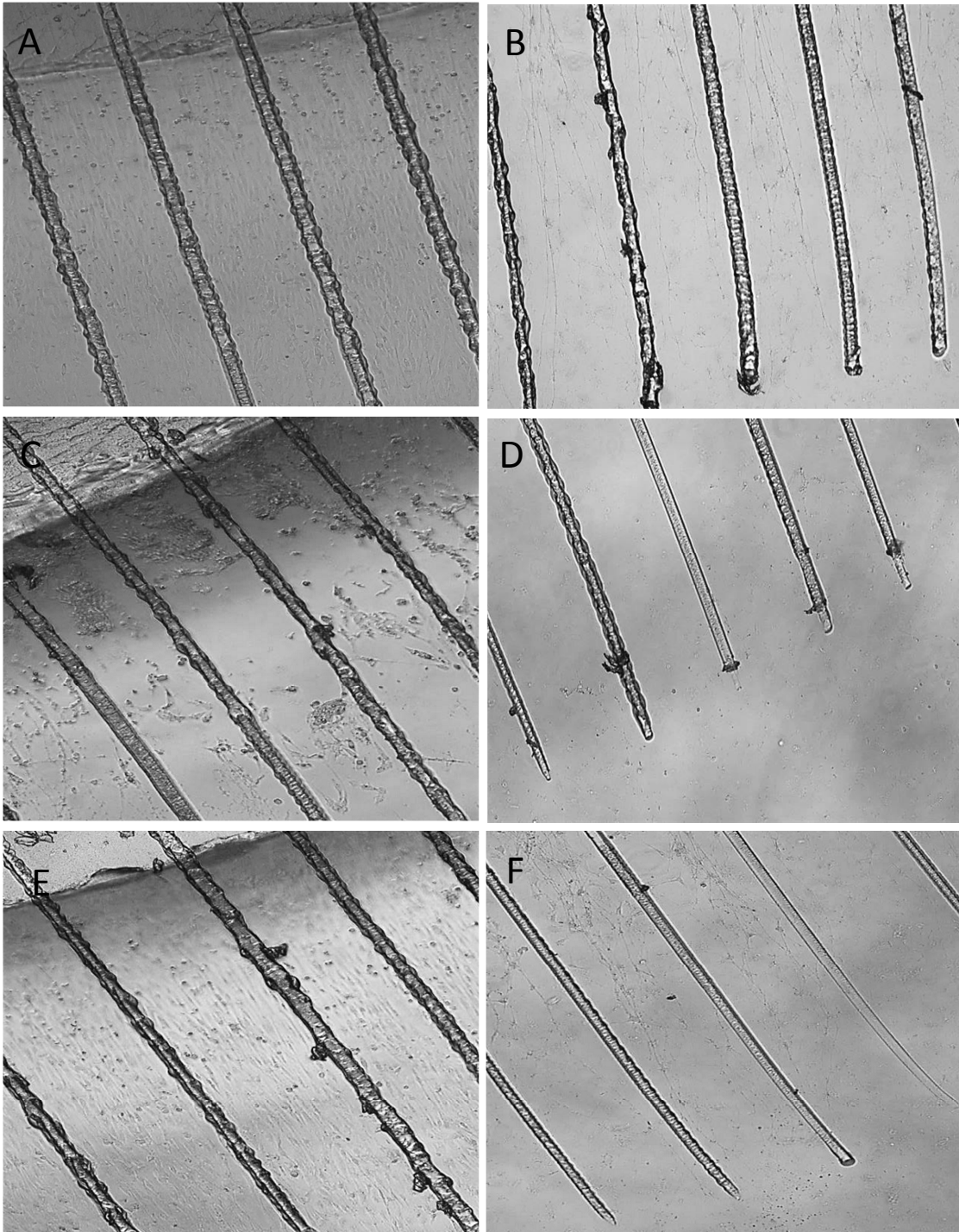


Abb. 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen der OC an Tag 8 nach retrograder HSV-Infektion. **A – B: Mock-Infektion.** **C – D: HSV-1.** **E – F: HSV-2.** Die Infektionsdosis betrug jeweils 5×10^6 PFU. Auf der linken Seite werden Bildausschnitte aus der OC nahe dem Begrenzungsring dargestellt. Der Ring ist am oberen Bildrand zu erkennen. Die Bilder auf der rechten Seite zeigen Ausschnitte, die den Zustand der Axone an den Enden der Begradigungsrillen zeigen. Es wurde beobachtet, dass die Axone bei der Infektion mit HSV-1 stärker beschädigt wurden als durch die HSV-2-Infektion. Der Abstand zwischen den Begradigungsrillen entspricht 0,25 mm.

B: Tabellen

Benennung der Doppelkammer n = 8	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	752	17	2,3	191
2	533	3	0,5	15
3	874	24	2,7	77
4	1015	33	3,3	225
5	526	5	0,9	50
6	361	6	1,7	56
7	341	6	1,8	79
8	522	26	4,9	42
Gesamtwert	4924	120		735
Mittelwert	615,5	15,0	2,3	91,9
Median	529,5	11,5	2,1	66,5
SD	241,6	11,6	1,4	75,0

Tab. 1: HSV-1-Infektion der IC ohne Zusatz von Stimulantien 12 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug $5,5 \times 10^5$ PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 8	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	1453	90	6,2	1134
2	1692	87	5,1	640
3	452	24	5,3	649
4	762	59	7,7	631
5	829	40	4,8	551
6	822	60	7,3	652
7	237	26	11,0	840
8	591	40	6,8	233
Gesamt	6838	426		5330
Mittelwert	854,8	53,3	6,8	666,3
Median	792,0	49,5	6,5	644,5
SD	490,3	25,4	2,0	254,2

Tab. 2: HSV-1-Infektion der IC ohne Zusatz von Stimulantien 24 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug $5,5 \times 10^6$ PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 8	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	382	66	17,3	1020
2	653	165	25,3	2385
3	426	126	29,6	956
4	437	105	24,0	1288
5	679	168	24,7	1532
6	588	180	30,6	1495
7	483	180	37,0	1800
8	705	186	26,4	1885
Gesamt	4353	1176		12.361
Mittelwert	544,1	147,0	26,9	1545,1
Median	535,5	166,5	25,9	1513,5
SD	127,2	43,5	5,7	474,7

Tab. 3: HSV-1- Infektion der IC ohne Zusatz von Stimulantien 48 h.p.i. Die Infektionsdosis war $5,5 \times 10^5$ PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neurone gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	581	226	38,9	1666
2	311	108	34,7	1024
3	744	212	28,5	1508
4	668	163	24,4	1714
5	1001	263	26,3	1841
Gesamt	3305	972		7753
Mittelwert	661,0	194,4	30,6	1550,6
Median	668,0	212,0	28,5	1666,0
SD	250,7	60,1	6,1	317,6

Tab. 4: HSV-1-Infektion der IC unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 48 h.p.i. Die Infektionsdosis war 5×10^4 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neurone gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	869	103	11,9	1745
2	860	63	7,3	1704
3	266	63	23,7	771
4	926	40	4,3	498
5	704	110	15,6	1510
Gesamt	3625	379		6228
Mittelwert	725,0	75,8	12,6	1245,6
Median	860,0	63,0	11,9	1510,0
SD	269,5	29,7	7,6	573,1

Tab. 5: Kontrollgruppe: HSV-1-Infektion der IC ohne HMBA 48 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 6	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	477	2	0,4	4
2	337	4	1,2	2
3	999	4	0,4	18
4	112	0	0,0	10
5	667	0	0,0	10
6	356	3	0,8	5
Gesamt	2948	13		49
Mittelwert	491,3	2,2	0,5	8,2
Median	416,5	2,5	0,4	7,5
SD	308,2	1,8	0,5	5,8

Tab. 6: Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 24 h.p.i. Die Infektionsdosis war $2,6 \times 10^7$ PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	133	0	0,0	0
2	1003	0	0,0	10
3	1021	0	0,0	0
4	944	2	0,2	5
5	366	0	0,0	0
Gesamt	3467	2		15
Mittelwert	693,4	0,4	0	3,0
Median	944,0	0	0	0
SD	414,5	/	/	4,5

Tab. 7: Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 24 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug $2,6 \times 10^7$ PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 6	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	643	4	0,6	51
2	683	30	4,4	239
3	638	24	3,8	121
4	389	36	9,3	237
5	787	12	1,5	51
6	738	0	0,0	0
Gesamt	3878	106		699
Mittelwert	646,3	17,7	3,3	116,5
Median	663,0	18,0	2,7	86,0
SD	138,5	14,6	3,4	101,7

Tab. 8: Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 47 h.p.i. Die Infektionsdosis war $2,6 \times 10^7$ PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	515	0	0	4
2	1028	0	0	13
3	640	2	0,3	16
4	693	3	0,4	13
5	779	1	0,1	18
Gesamt	3655	6		64
Mittelwert	731,0	1,2	0,2	12,8
Median	693,0	1,0	0,1	13,0
SD	191,6	1,3	0,2	5,4

Tab. 9: Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 47 h.p.i. Infektionsdosis: $2,6 \times 10^7$ PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 6	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	771	2	0,3	47
2	496	130	26,2	1356
3	553	54	9,8	750
4	310	50	16,1	326
5	648	47	7,3	930
6	485	37	7,6	440
Gesamt	3263	320		3849
Mittelwert	543,8	53,3	11,2	641,5
Median	524,5	48,5	8,7	595,0
SD	156,8	42,0	8,9	468,8

Tab. 10: Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 4 d.p.i. Die Infektionsdosis war 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	638	0	0,0	0
2	490	17	3,5	69
3	329	0	0,0	0
4	245	0	0,0	0
5	585	8	1,4	60
Gesamt	2287	25		129
Mittelwert	457,4	5,0	1,0	25,8
Median	490,0	0,0	0,0	0,0
SD	167,0	7,5	1,5	35,5

Tab. 11: Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 4 d.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 6	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	380	42	11,1	332
2	527	0	0,0	0
3	272	69	25,4	765
4	512	49	9,6	398
5	413	78	18,9	521
6	254	28	11,0	122
Gesamt	2358	266		2138
Mittelwert	393,0	44,3	12,7	356,3
Median	396,5	45,5	11,1	365,0
SD	115,5	28,3	8,7	275,1

Tab. 12: Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 8 d.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	310	1	0,3	12
2	357	1	0,3	6
3	442	0	0,0	0
4	395	0	0,0	0
5	253	0	0,0	0
Gesamt	1757	2		18
Mittelwert	351,4	/	/	/
Median	357,0	0	0	0
SD	73,4	0,5	0,2	5,4

Tab. 13: Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 8 d.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neurone	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	656	9	1,4	42
2	698	18	2,6	27
3	324	15	4,6	26
4	991	14	1,4	41
5	546	9	1,6	21
Gesamt	3215	65		157
Mittelwert	643,0	13,0	2,3	31,4
Median	656,0	14,0	1,6	27,0
SD	242,6	3,9	1,4	9,5

Tab. 14: HSV-1-Infektion der IC unter Zugabe von 100 μ M Forskolin (in 1%- DMSO-Lösung) zum Zeitpunkt 48 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neurone	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	518	105	20,3	1128
2	630	100	15,9	551
3	1027	150	14,6	610
4	661	54	8,2	355
5	550	66	12,0	820
Gesamt	3386	475		3464
Mittelwert	677,2	95,0	14,2	692,8
Median	630,0	100,0	14,6	610,0
SD	204,0	37,7	4,5	294,4

Tab. 15: Kontrolle: HSV-1-Infektion der IC unter Zugabe von 1% DMSO. Ernte zum Zeitpunkt 48 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neurone	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	797	65	8,2	1499
2	554	45	8,1	434
3	1178	127	10,8	1252
4	792	61	7,7	431
5	611	46	7,5	448
Gesamt	3932	344		4064
Mittelwert	786,4	68,8	8,5	812,8
Median	792,0	61,0	8,1	448,0
SD	244,0	33,7	1,3	521,1

Tab. 16: Native Kontrolle: HSV-1-Infektion der IC ohne Zusatz von DMSO oder Forskolin. Ernte zum Zeitpunkt 48 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 4	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neurone	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	638	13	2,0	47
2	425	20	4,7	63
3	286	9	3,1	63
4	389	15	3,9	43
Gesamt	1738	57		216
Mittelwert	434,5	14,3	3,4	54,0
Median	407,0	14,0	3,5	55,0
SD	147,9	4,6	1,2	10,5

Tab. 17: Reproduzierbarkeit der Verminderung HSV-1-Antigen-positiver Neurone und Begleitzellen durch Forskolin (in 1%-DMSO-Lösung). Infektion der IC unter Zugabe von 100 μ M Forskolin. Ernte 48 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU. Die versuchinternen Kontrollen sind in Tab. 5 sowie Tab. C16 und C17 abgebildet.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-2-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen- positive Begleitzellen
1	900	80	8,9	1774
2	1287	200	15,5	1655
3	850	163	19,2	973
4	1063	246	23,1	1164
5	1062	230	21,7	1309
Gesamt	5162	919		6875
Mittelwert	1032,4	183,8	17,7	1375,0
Median	1062,0	200,0	19,2	1309,0
SD	171,3	66,1	5,7	334,7

Tab. 18: HSV-2-Infektion der IC ohne Stimulans zum Zeitpunkt 12 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^5 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-2-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen- positive Begleitzellen
1	1511	411	27,2	4964
2	404	158	39,1	2925
3	635	317	49,9	3465
4	480	240	50,0	1338
5	855	386	45,1	4387
Gesamt	3885	1512		17079
Mittelwert	777,0	302,4	42,3	3415,8
Median	635,0	317,0	45,1	3465,0
SD	445,1	104,6	9,5	1405,4

Tab. 19: HSV-2-Infektion der IC ohne Stimulans zum Zeitpunkt 24 h.p.i. Die Infektionsdosis war 5×10^5 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-2-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen- positive Begleitzellen
1	649	441	68,0	6064
2	439	334	76,1	5002
3	619	470	75,9	3999
4	876	645	73,6	6794
5	734	482	65,7	6567
Gesamt	3317	2372	359,3	28426
Mittelwert	663,4	474,4	71,9	5685,2
Median	649,0	470,0	73,6	6064,0
SD	160,3	111,8	4,7	1168,4

Tab. 20: HSV-2-Infektion der IC ohne Stimulans zum Zeitpunkt 45 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^5 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 7	Neuronen gesamt	HSV-2-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen- positive Begleitzellen
1	469	0	0	0
2	612	0	0	0
3	652	0	0	0
4	626	0	0	0
5	432	0	0	0
6	869	0	0	0
7	535	1	0,2	5
Gesamt	4195	1		5
Mittelwert	599,3	/	/	/
Median	612,0	0	0	0
SD	144,6	/	/	/

Tab. 21: Infektion der OC mit HSV-2 zum Zeitpunkt 24 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 7	Neuronen gesamt	HSV-2-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen- positive Begleitzellen
1	453	17	3,8	79
2	1204	0	0	0
3	617	0	0	0
4	832	22	2,6	243
5	582	0	0	0
6	619	0	0	0
7	207	0	0	0
Gesamt	4514	39		322
Mittelwert	644,9	/	/	/
Median	617,0	0	0	0
SD	311,3	9,6	1,6	91,7

Tab. 22: Infektion der OC mit HSV-2 zum Zeitpunkt 45 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 9	Neuronen gesamt	HSV-2-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen- positive Begleitzellen
1	589	71	12,1	1039
2	268	0	0	2
3	601	0	0	0
4	422	0	0	0
5	700	0	0	0
6	650	0	0	0
7	549	0	0	0
8	776	0	0	0
9	336	0	0	0
Gesamt	4891	71		1041
Mittelwert	543,4	/	/	/
Median	589	0	0	0
SD	169,2	/	/	/

Tab. 23: Infektion der OC mit HSV-2 zum Zeitpunkt 4 d.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 9	Neuronen gesamt	HSV-2-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen- positive Begleitzellen
1	339	0	0	0
2	336	0	0	0
3	412	129	31,3	5232
4	373	54	14,5	1150
5	340	0	0	0
6	201	0	0	0
7	342	4	1,2	763
8	565	96	17,0	1546
9	728	0	0	0
Gesamt	3636	283		8691
Mittelwert	404,0	/	/	/
Median	342,0	0	0	0
SD	154,1	49,3	12,1	1914,2

Tab. 24: Infektion der OC mit HSV-2 zum Zeitpunkt 8 d.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 8	Neuronen gesamt	HSV-2-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen- positive Begleitzellen
1	795	282	35,5	3109
2	756	85	11,2	2121
3	672	0	0,0	0
4	1232	113	9,2	1637
5	623	115	18,5	1431
6	742	0	0,0	2
7	730	44	6,0	861
8	652	0	0,0	0
Gesamt	6202	639		9161
Mittelwert	775,3	79,9	10,1	1145,1
Median	736	64,5	7,6	1146,0
SD	193,3	95,3	12,2	1142,9

Tab. 25: Axonale Infektion mit HSV-2 zum Zeitpunkt 48 h.p.i. unter Zugabe von 2,5 mM HMBA. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 7	Neuronen gesamt	HSV-2-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen- positive Begleitzellen
1	456	13	2,9	28
2	708	58	8,2	474
3	455	6	1,3	41
4	243	0	0,0	2
5	749	0	0,0	0
6	703	0	0,0	2
7	805	0	0,0	0
Gesamt	4119	77		547
Mittelwert	588,4	/	/	78,1
Median	703	0	0	2
SD	206,1	21,3	3,0	175,3

Tab. 26: Axonale Infektion mit HSV-2 zum Zeitpunkt 48 h.p.i. unter Zugabe von 100 μ M Forskolin in 1% DMSO. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 7	Neuronen gesamt	HSV-2-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen- positive Begleitzellen
1	452	0	0,0	0
2	865	0	0,0	0
3	1044	8	0,8	124
4	850	0	0,0	0
5	1159	47	4,1	459
6	585	15	2,6	577
7	668	0	0,0	0
Gesamt	5623	70		1160
Mittelwert	803,3	/	/	/
Median	850	0	0	0
SD	251,6	17,3	1,6	247,2

Tab. 27: Kontrollgruppe: Axonale Infektion mit HSV-2 zum Zeitpunkt 48 h.p.i. unter Zugabe von 1% DMSO. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 7	Neuronen gesamt	HSV-2-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-2-Antigen- positive Begleitzellen
1	587	0	0,0	0
2	1038	0	0,0	0
3	712	0	0,0	0
4	906	0	0,0	0
5	575	0	0,0	0
6	513	4	0,8	29
7	615	0	0,0	0
Gesamt	4946	4		29
Mittelwert	706,6	/	/	/
Median	615	0	0	0
SD	194,6	/	/	/

Tab. 28: Native Kontrolle: Axonale Infektion mit HSV-2 zum Zeitpunkt 48 h.p.i. ohne Zugabe von HMBA, Forskolin oder DMSO. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Virologie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stephan Ludwig

- Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Kühn

- Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Victor Shahin

**Latenz und Reaktivierung von Herpes simplex-Virus in einem Trigeminalganglion-
Organmodell**

Westing, Yannick Christian

8. Appendix

- Teil C: Anhang auf angefügtem Datenträger -

C1: Abbildungen

C2: Tabellen

C1: Abbildungen

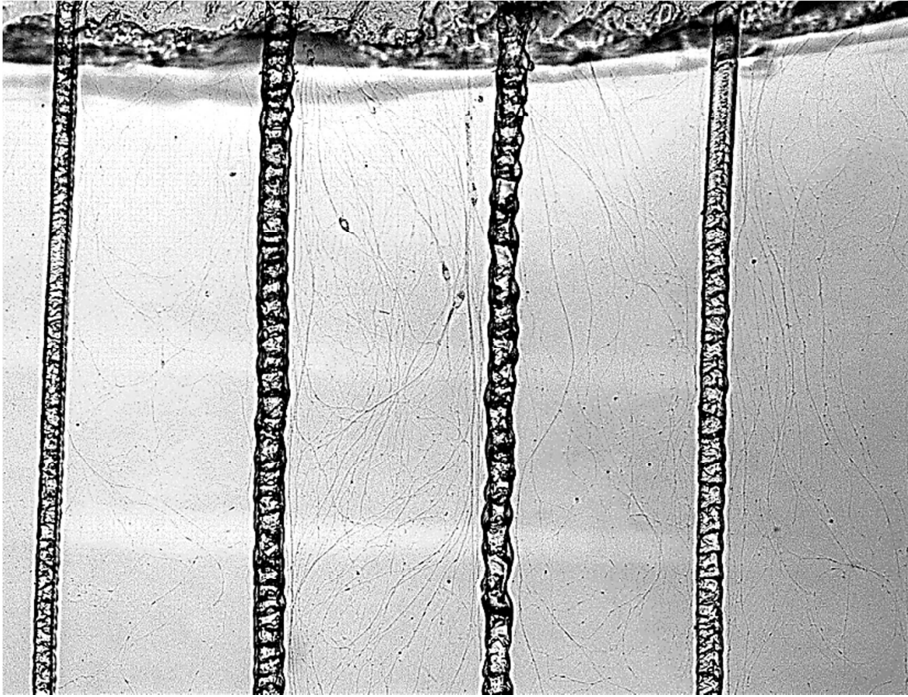


Abb. C1: Repräsentative Darstellung morphologisch intakter Axone unmittelbar vor retrograder Infektion. In diesem Versuch waren die DK zuvor 22 Stunden lang mit 2,0 mM Valproat vorbehandelt worden. Oben im Bild sieht man den Rand des Glasringes, der die IC umfasst. Intakte Axone wachsen entlang der Begradigungsritzen. Der Abstand zwischen den Begradigungsritzen beträgt 0,25 mm. Vergl. auch Abb. C2 und Abb. 10.

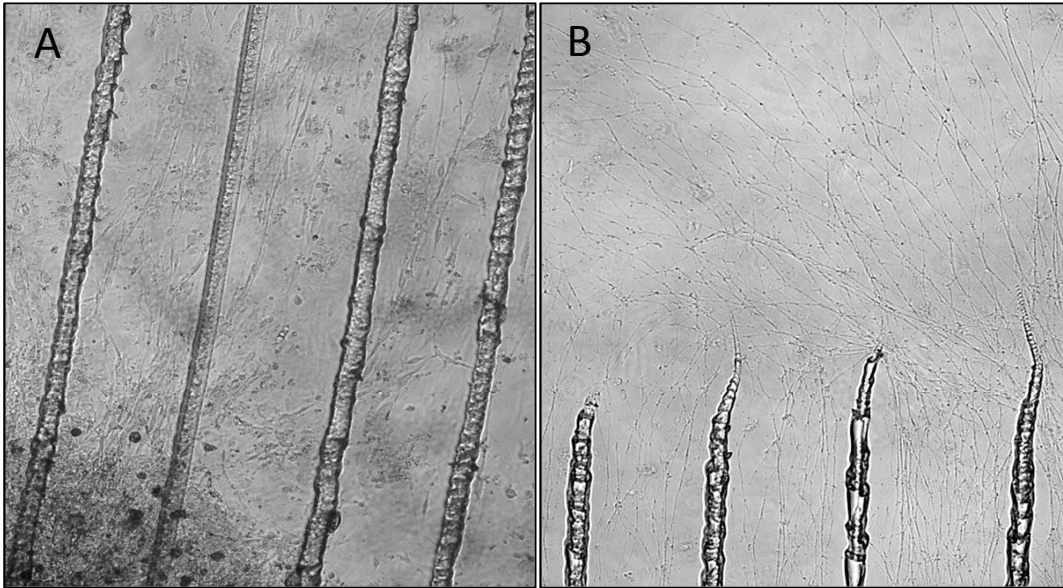


Abb. C2: Mock-Infektion mit Zugabe von 50 µg/ml ACV. Darstellung an Tag 20: **A:** IC mit einem Teil des TG. **B:** Peripherie der OC. In der Lichtmikroskopie sah man kräftig ausgeprägte Neuriten, die weit über die Enden der Begradigungsrillen hinausgewachsen waren. Das Axongeflecht war dichter als z.B. acht Tage nach retrograder Mockinfektion ohne ACV im Medium (vergl. Abb. 10). Der Abstand zwischen den Begradigungsrillen beträgt 0,25mm.

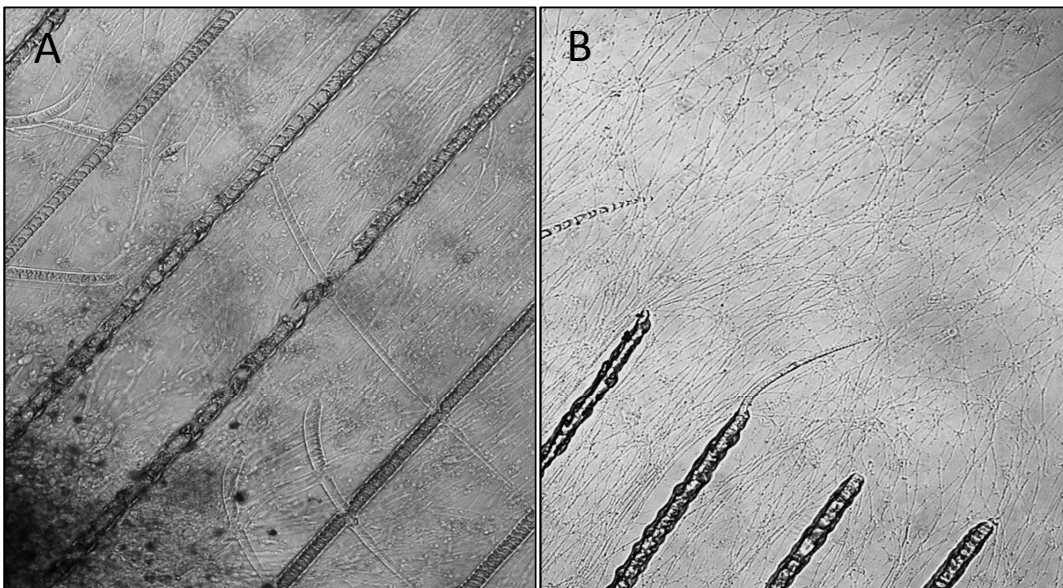


Abb. C3: Axonale HSV-2-Infektion unter Zusatz von 50 µg/ml ACV. Darstellung an Tag 20. Die Infektionsdosis war 5×10^6 PFU. **A:** IC mit einem Teil des TG. **B:** Peripherie der OC. In den HSV-2-infizierten DK war lichtmikroskopisch kein morphologischer Unterschied gegenüber den mock-infizierten DK erkennbar. Der Abstand zwischen den Begradigungsrillen beträgt 0,25 mm.

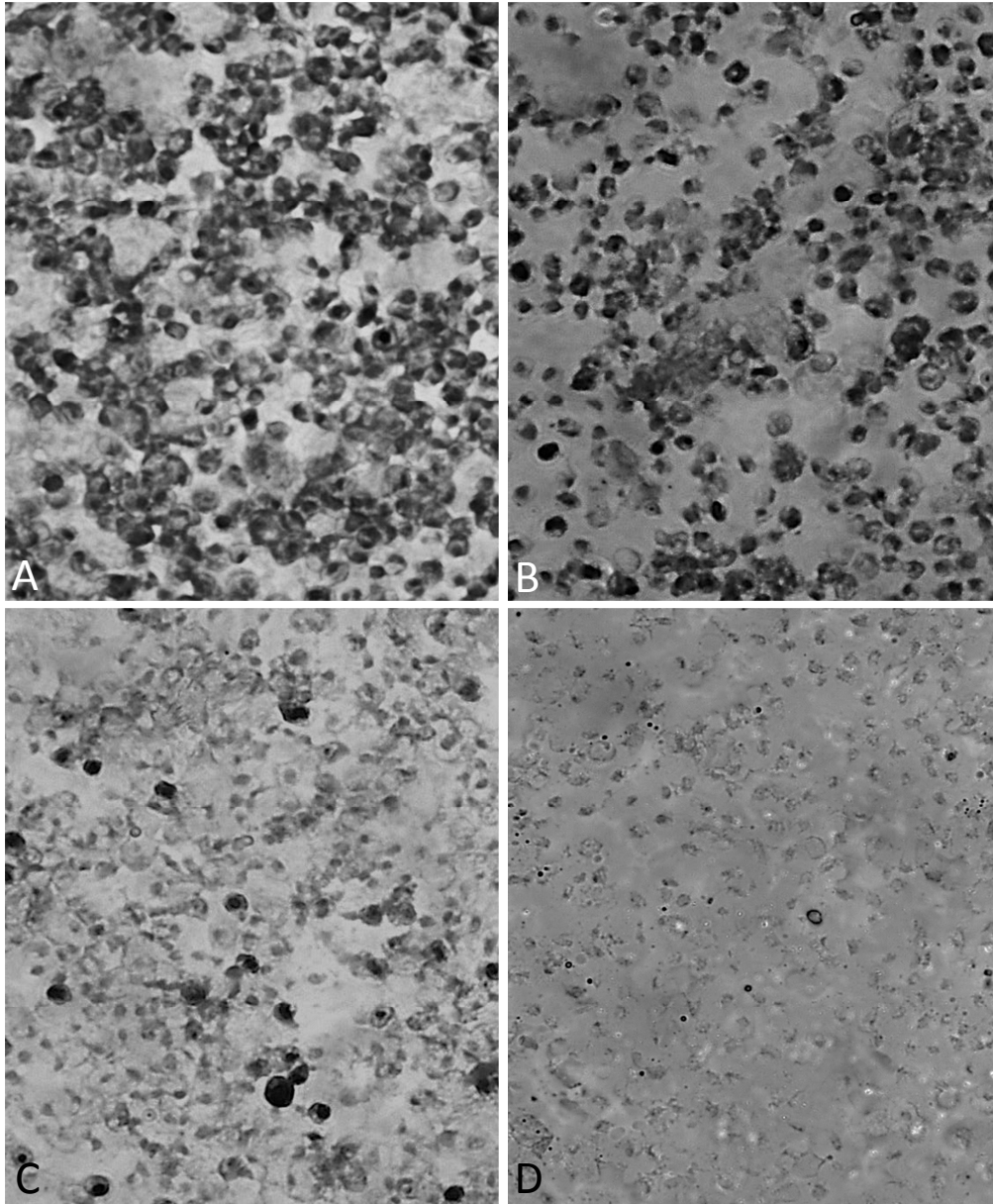


Abb. C4: ISH in HSV-1-infizierten Vero-Zellen. Verdünnungsreihe **A:** M.O.I. = 10. **B:** 1:1. **C:** 1:5. **D:** Mock-infiziert. Es wurde das in Kap. 2.2.8. DNA-Protokoll angewandt. Als Sonde wurde HSV-1 LAT_5DIG verwendet. Die Menge markierter Zellen folgte gut erkennbar dem Anteil infizierter Zellen. Vergrößerung 200-fach.

C2: Tabellen

Benennung der Doppelkammer n = 11	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	646	0	0,0	1
2	857	0	0,0	0
3	350	0	0,0	1
4	480	1	0,2	2
5	657	0	0,0	0
6	428	0	0,0	0
7	733	0	0,0	0
8	669	0	0,0	0
9	719	1	0,1	0
10	677	0	0,0	2
11	662	0	0,0	0
Gesamt	6878	2		6
Mittelwert	625,3	0,2	0,0	0,5
Median	662,0	0,0	0,0	0
SD	147,4	/	/	0,8

Tab. C1: Infektion der OC mit HSV-1 ohne Zusatz von Stimulantien 22 h.p.i. Infektionsdosis war $2,6 \times 10^7$ PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 10	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	824	0	0,0	8
2	850	4	0,5	36
3	774	5	0,6	63
4	963	0	0,0	19
5	1117	0	0,0	0
6	1527	0	0,0	0
7	633	0	0,0	0
8	1060	0	0,0	8
9	638	2	0,3	16
10	1258	2	0,2	8
Gesamtwert	9644	13		158
Mittelwert	964,4	1,3	0,2	15,8
Median	906,5	0,0	0,0	8,0
SD	283,0	1,9	0,2	20,0

Tab. C2: Infektion der OC mit HSV-1 ohne Zusatz von Stimulantien 46 h.p.i. Infektionsdosis war $2,6 \times 10^7$ PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	340	62	18,2	410
2	454	55	12,1	404
3	107	19	17,8	100
4	463	88	19	309
5	434	30	6,9	218
Gesamt	1798	254		1441
Mittelwert	359,6	50,8	14,8	288,2
Median	434,0	55,0	17,8	309,0
SD	149,4	27,3	5,2	131,4

Tab. C3: HSV-1-Infektion der IC mit einer Dosis von 5×10^5 PFU an Tag 12/13 nach der Präparation. Ernte 48 h.p.i.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	548	133	24,3	594
2	835	44	5,3	616
3	583	57	9,8	792
4	461	107	23,2	544
5	374	75	20,1	366
Gesamt	2801	416		2912
Mittelwert	560,2	83,2	16,5	582,4
Median	548,0	75,0	20,1	594,0
SD	173,7	36,5	8,5	152,9

Tab. C4: HSV-1-Infektion der IC mit einer Dosis von 5×10^5 PFU an Tag 19/20 nach der Präparation. Ernte 48 h.p.i.

Benennung der Doppelkammer n = 6	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	531	2	0,4	5
2	787	1	0,1	15
3	614	1	0,2	1
4	377	1	0,3	1
5	910	1	0,1	1
6	509	0	0,0	0
Gesamt	3728	6		23
Mittelwert	621,3	1,0	0,2	3,8
Median	572,5	1,0	0,2	1,0
SD	195,6	0,6	0,1	5,7

Tab. C5: Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 24 h.p.i. bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	485	0	0,0	0
2	577	0	0,0	0
3	969	0	0,0	0
4	465	1	0,2	0
5	609	0	0,0	0
Gesamt	3105	1		0
Mittelwert	621,0	/	/	/
Median	577,0	0	0	0
SD	203,7	/	/	/

Tab. C6: Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 24 h.p.i. bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 6	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	623	0	0,0	0
2	293	0	0,0	0
3	371	1	0,3	22
4	528	0	0,0	1
5	306	0	0,0	0
6	360	0	0,0	0
Gesamt	2481	1		23
Mittelwert	413,5	/	/	/
Median	365,5	0	0	0
SD	132,5	/	/	8,9

Tab. C7: Axonale HSV-1-Infektion unter Zugabe von 2,5 mM HMBA 48 h.p.i. bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	128	1	0,8	2
2	554	0	0,0	0
3	663	0	0,0	0
4	820	0	0,0	0
5	724	0	0,0	0
Gesamt	2889	1		2
Mittelwert	577,8	/	/	/
Median	663,0	0	0	0
SD	269,3	/	/	/

Tab. C8: Kontrollgruppe: Axonale HSV-1-Infektion ohne HMBA 48 h.p.i. bei einer Infektionsdosis von 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 6	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	717	1	0,1	0
2	319	1	0,3	5
3	511	0	0,0	0
4	361	0	0,0	2
5	574	0	0,0	0
6	403	0	0,0	0
Gesamt	2885	2		7
Mittelwert	480,8	/	/	/
Median	457,0	0	0	0
SD	149,6	0,5	0,1	2,0

Tab. C9: 24 Stunden nach Zugabe von HMBA an Tag 8 nach axonaler HSV-1-Infektion. Infektionsdosis: 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	497	0	0,0	13
2	347	2	0,6	22
3	331	0	0,0	0
4	894	3	0,3	39
5	573	0	0,0	0
Gesamt	2642	5		74
Mittelwert	528,4	1,0	0,2	14,8
Median	497,0	0	0	13,0
SD	228,3	1,4	0,3	16,4

Tab. C10: Kontrollgruppe: 24 Stunden nach Mediumwechsel an Tag 8 nach axonaler HSV-1-Infektion ohne HMBA-Zugabe. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 6	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	377	38	10,1	160
2	624	0	0,0	0
3	112	2	1,8	14
4	429	0	0,0	0
5	230	2	0,9	120
6	301	1	0,3	50
Gesamt	2073	43		344
Mittelwert	345,5	7,2	2,2	57,3
Median	339,0	1,5	0,6	32,0
SD	176,3	15,1	3,9	67,8

Tab. C11: 4 Tage nach Zugabe von HMBA an Tag 8 nach axonaler HSV-1-Infektion. Infektionsdosis: 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 6	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neuronen	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	350	0	0,0	0
2	297	0	0,0	0
3	256	0	0,0	4
4	296	0	0,0	2
5	380	0	0,0	0
6	426	1	0,2	14
Gesamt	2005	1		20
Mittelwert	334,2	/	/	3,3
Median	323,5	0	0	1,0
SD	62,8	/	/	5,5

Tab. C12: Kontrollgruppe: 4 Tage nach Mediumwechsel an Tag 8 nach axonaler HSV-1-Infektion ohne HMBA-Zugabe. Die Infektionsdosis betrug 5×10^6 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neurone	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	551	62	11,3	1164
2	655	70	10,7	1217
3	525	55	10,5	1207
4	464	83	17,9	1270
5	623	100	16,1	1496
Gesamt	2818	370		6354
Mittelwert	563,6	74,0	13,3	1270,8
Median	551,0	70,0	11,3	1217,0
SD	76,6	17,9	3,4	131,4

Tab. C13: Infektion der IC mit HSV-1 unter Zusatz von 2,0 mM Valproat. Betrachtungszeitpunkt 46 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU. Vorbehandlung der DK mit Valproat über 22 Stunden.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neurone	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	753	76	10,1	1285
2	828	72	8,7	1027
3	692	115	16,6	1903
4	540	76	14,1	951
5	668	95	14,2	1667
Gesamt	3481	434		6833
Mittelwert	696,2	86,8	12,7	1366,6
Median	692,0	76,0	14,1	1285,0
SD	107,0	18,1	3,2	410,1

Tab. C14: Kontrollgruppe: Infektion der IC mit HSV-1 ohne Valproat. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU. Mediumwechsel 22 Stunden vor der Infektion. Ernte 46 h.p.i.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neurone	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	195	22	11,3	411
2	464	121	26,1	873
3	713	98	13,7	545
4	1141	121	10,6	2248
5	383	55	14,4	1275
Gesamt	2896	417		5352
Mittelwert	579,2	83,4	15,2	1070,4
Median	464,0	98,0	13,7	873,0
SD	365,0	43,6	6,3	738,0

Tab. C15: HSV-1-Infektion der IC unter Zugabe von 100nM Rapamycin über eine Dauer von 20 Stunden. Ernte zum Zeitpunkt 48 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neurone	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	345	25	7,2	414
2	539	21	3,9	232
3	682	48	7,0	1306
4	708	104	14,7	1065
5	595	48	8,1	1127
Gesamt	2869	246		4144
Mittelwert	573,8	49,2	8,2	828,8
Median	595,0	48,0	7,2	1065,0
SD	144,7	33,1	4,0	474,5

Tab. C16: Kontrollgruppe: HSV-1-Infektion der IC unter Zugabe von 0,01% DMSO über eine Dauer von 20 Stunden. Ernte zum Zeitpunkt 48 h.p.i. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU.

Benennung der Doppelkammer n = 5	Neuronen gesamt	HSV-1-Antigen- positive Neurone	Anteil Antigen- positiver Neuronen in %	HSV-1-Antigen- positive Begleitzellen
1	519	89	17,1	1028
2	580	76	13,1	970
3	545	86	18,9	746
4	746	41	5,5	852
5	494	49	9,9	426
Gesamt	2884	341		4022
Mittelwert	576,8	68,2	12,9	804,4
Median	545,0	76,0	13,1	852,0
SD	99,8	21,9	5,4	237,8

Tab. C17: Kontrollgruppe: HSV-1-Infektion der IC ohne 0,01% DMSO oder Rapamycin 48.h.p.i. Ein Mediumwechsel erfolgte nach 20 Stunden. Die Infektionsdosis betrug 5×10^4 PFU.

**Anlage zum Antrag auf Einleitung und Durchführung des
Verfahrens zur Erlangung eines Doktorgrades der
Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

1. Erklärung der Doktorandin/ des Doktoranden
2. Genehmigung zur Einreichung der Dissertation durch die Betreuerin / den Betreuer der Arbeit

1) Name, Vorname Westing, Yannick Christian

Bei meiner Dissertation mit dem Thema :

Latenz und Reaktivierung von Herpes simplex-Virus in einem Trigeminalganglion-Organmodell

handelt es sich um

- keine tierexperimentelle Arbeit
- eine tierexperimentelle Arbeit

genehmigt durch Prof. Dr. med. Joachim Kühn

am: 28/9/17 Aktenz. : _____

T. Die Genehmigung wurde als letztes Blatt in die Dissertation eingefügt.
Außerdem wird in der Zusammenfassung unter Angabe des Datums und des
Aktenzeichens auf die Genehmigung hingewiesen

T. Falls ein Votum der Ethikkommission vorliegt, bitte ich dieses in Kopie dem
Referat beizufügen.

Hamburg , den 27.09.2017

Unterschrift

- 2) Die vorstehenden Angaben treffen zu.
Gegen die Annahme der Dissertation bestehen keine Bedenken.

Münster , den 28.09.2017

Stempel **Universitätsklinikum Münster**

Institut für Virologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Stephan Ludwig
Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Kühn
Von-Stauffenberg-Str. 36 · 48151 Münster
Tel. 0251/83-54641, Fax 0251/23-54642



Unterschrift