

**Die Bedeutung des Chemokin-Rezeptors CXCR3 in der
Pathogenese der experimentellen Herpesenzephalitis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Anna Maria Dockhorn

aus Herdecke

2016

Angefertigt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. M. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Neumann

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.01.2016

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Klockgether

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	6
2.	Einleitung	9
2.1	Herpes Simplex Virus Enzephalitis (HSE)	9
2.1.1	Klinische Beschreibung.....	9
2.1.2	Diagnostik, Therapie und Prognose.....	10
2.1.3	Pathogenese.....	11
2.2	HSV Typ 1	13
2.2.1	Taxonomie und Morphologie der Herpesviren	14
2.3	Chemokine und ihre Rezeptoren	18
2.3.1	Chemokine in der Neuroinflammation	21
2.3.2	CXCR3 und seine Liganden.....	23
2.3.3	Die Rolle der Chemokine in der Herpesenzephalitis	25
2.4	Rationale der Studie	27
3.	Material und Methoden	28
3.1	Material	28
3.1.1	Geräte	28
3.1.2	Chemikalien, Kits, Reagentien	28
3.1.3	Antikörper	30
3.1.4	Primer	31
3.1.5	Versuchstiere	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	Tierexperimentelle Methoden.....	33
3.2.2	Histologische Methoden.....	36
3.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	45
3.2.4	Statistische Auswertungen.....	48
4.	Ergebnisse	49
4.1	Das HSE-Mausmodell	49
4.1.1	Der intranasale Infektionsweg.....	49
4.2	Beschreibung des HSE-Modells in WT-Mäusen	50
4.2.1	Gewebezerstörung durch herpesvirale Infektion.....	50

4.2.2	Immunantwort der infizierten WT-Tiere	52
4.2.3	Kolokalisation - Das Herpesvirus befällt hauptsächlich Neurone, aber auch Astrozyten und Mikroglia	56
4.2.4	Molekularbiologische Analysen der WT-Tiere	58
4.2.5	Virusausbreitung in den verschiedenen Hirnarealen.....	60
4.3	Die Bedeutung des CXCR3-Rezeptors – Vergleichende Beobachtungen zwischen CXCR3-defizienten Mäusen und WT-Kontrollen	61
4.3.1	klinische Beobachtung der Tiere	61
4.3.2	Zeitlicher Verlauf der Virusausbreitung	63
4.3.3	Immunabwehr – verminderte mikrogliale und T-Zell-Aktivierung der KO-Tiere	65
4.3.4	Molekularbiologische Charakterisierung des inflammatorischen Milieus	67
5.	Diskussion.....	69
5.1	Das HSE-Mausmodell - Die nasale Infektionsroute stellt eine Alternative zur kornealen Infektion dar	69
5.2	Herpesvirales Infektionsmuster	70
5.2.1	Clusterförmige Virusausbreitung mit Gewebezzerstörung in den meisten Hirnarealen	71
5.2.2	Gewebezzerstörung durch herpesvirale Infektion.....	72
5.2.3	Befall v.a. von Neuronen, aber auch von Astrozyten und Mikroglia	73
5.3	Charakterisierung des CXCR3-Chemokinsystems in der experimentellen HSE - Vergleich CXCR3-defizienter Tiere mit ihren entsprechenden WT-Kontrollen	74
5.3.1	Klinischer Verlauf – weniger klinische Symptome und eine bessere Erholung bei CXCR3-defizienten Mäusen.....	76
5.3.2	Zeitlicher Verlauf der Virusausbreitung – verbesserte Virusclearance der KO-Tiere	77
5.3.3	CXCR3 ist an der Rekrutierung von Immunzellen im Verlauf der HSE beteiligt	78

5.3.4	Molekularbiologische Chemokinanalyse: Unterschiede in der Chemokin-Expression zwischen WT- und KO-Tieren vor allem an Tag 12 p.i.	79
5.4	Schlussfolgerung	81
6.	Zusammenfassung	83
7.	Literaturverzeichnis.....	84

1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
99mTc-HmPAO	technetium-labelled-hexa-methyl-propylene-amine-oxime [Technetium-markiertes hexa-methyl-propylen Aminooxim]
APO-1	apoptosis antigen [Apoptose-Antigen-1]
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	bovine Serum Albumine [Rinderalbumin]
CAM	Cell adhesion molecule [Zelladhäsionsmolekül]
CCT	zerebrale Computertomographie
CD	Cluster of differentiation [immunphänotypische Unterscheidungsgruppen von Zelloberflächenmerkmalen]
cDNA	complementary DNA [komplementäre DNS]
CMV	Zytomegalie Virus
Ct	Threshold cycle [Schwellenwertzyklus]
D	day [Tag]
DANN	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr Virus
EEG	Elektroenzephalogramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein [Saures Gliafaserprotein]
HE	Hematoxylin-Eosin-Färbung
HHV	Humanes Herpesvirus
HRP	Horseradish Peroxidase [Meerrettich-Peroxidase]
HSE	Herpes Simplex Virus Enzephalitis
HSV	Herpes Simplex Virus
IFN	Interferon
ICH	Immunhistochemie
IKK	IκB-Kinasen
IL	Interleukin

IN	intranasal
IP-10	Interferon inducible Protein 10 [Interferon induzierbares Protein 10]
IRAK	interleukin-1 receptor-associated kinase [IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase]
IRF	Interferon regulierender Faktor
ISRE	Interferon-stimulated response element [Interferon-stimuliertes responsables Element]
I-TAC	Interferon-induzierbarer T-Zell α -Chemoattraktor
Kb	Kilobasen
Kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KO	CXCR3-Knock-out-Tiere
LAT	Latenz assoziiertes Transkript
M	mol/l, Einheit der Michaelis-Menten-Konstante (Km)
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MCP-1	Makrophagen Chemoattractant Protein-1
MIG	Monokine induced by interferon- γ [IFN- γ induziertes Monokin]
MIP	Macrophage inflammatory protein [entzündliches Makrophagen Protein]
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NEMO	nuclear factor κ B essential modulator [essentieller Modulator des Kernfaktors κ B]
NF κ B	nuclear factor κ B [Kernfaktor κ B]
Ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OH	Hydroxy
PBS	Phosphate buffered saline [Phosphat gepufferte Salzlösung]
PCR	Polymerase chain reaction [Polymerasekettenreaktion]
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Plaque forming unit, Plaque-bildende Einheit

PRR	Pattern recognition Rezeptor [Mustererkennung-Rezeptor]
RANTES	Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
RNA	Ribonukleinsäure
SPECT	single-spect-emission-computet-tomography [Einzelphotonen-Computertomographie]
STAT	Signal transducers and activators of transcription
StAV	Streptavidin
Sup.	superior
TBK	TANK-binding-Kinase, [TANK-bindende Kinase]
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF3	TNF-Rezeptor-assoziierter-Faktor-3
TUNEL	TdT-mediated X-dUTP nick end labeling
VZV	Varizella Zoster Virus
WT	Wildtypiere
ZNS	zentrales Nervensystem

2. Einleitung

2.1 Herpes Simplex Virus Enzephalitis (HSE)

Weltweit zählen virale ZNS-Infektionen zu den häufigsten Ursachen der Enzephalitiden. Die wichtigsten viralen Erreger sind dabei das Herpes Simplex Virus (HSV), das Varizella Zoster Virus (VZV), das Epstein-Barr Virus (EBV), sowie Mumps-, Masern-, und Enteroviren (Chaudhuri und Kennedy, 2002). Dabei ist die Herpes Simplex Virus-enzephalitis (HSE) die am weitesten verbreitete Form der akuten sporadischen Viruserkrankung in den westlichen Industrieländern (Tyler, 2004). Die durch das HSV I hervorgerufene Infektion des Gehirns entspricht einer hämorrhagisch nekrotisierenden Enzephalitis, die - trotz adäquater Therapie - mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht und oftmals eine dauerhafte Hirnschädigung verursacht (Casrouge et al., 2006; McGrath et al., 1997; Whitley et al., 1998).

2.1.1 Klinische Beschreibung

Mit einer jährlichen Inzidenz von 2-4 pro 1.000.000 (Schmutzhard, 2001) handelt es sich bei der Herpes Simplex Enzephalitis um eine seltene Erkrankung. Dennoch ist sie in den westlichen Industrieländern die am weitesten verbreitete Form der akuten sporadischen Viruserkrankung. Dabei zeigt die Erkrankung eine bimodale Altersverteilung: ein Drittel der Fälle tritt bereits vor dem 20. Lebensjahr auf; die Hälfte aller Fälle jenseits der fünften Lebensdekade (Tyler, 2004).

Pathomorphologisch ist die Erkrankung vor allem durch hämorrhagisch nekrotisierende Herde im Temporallappen, unter Einbeziehung des Gyrus Cinguli und der Insula, charakterisiert (Kennedy und Chaudhuri, 2002).

Das klinische Bild ist im Anfangsstadium der Erkrankung durch unspezifische Prodromal-Symptome geprägt, die typisch für die meisten Viruserkrankungen sind (Fieber, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Myalgie und gastrointestinale Beschwerden).

Im Anschluss an die Prodromal-Phase treten zunehmend neurologische Herdsymptome wie Geruchs- und Geschmacksstörungen, Aphasien, oder Paresen, mit Reflexdifferenzen, sowie epileptische Anfälle in Erscheinung. Hinzu kommen häufig neuropsychiatrische Symptome mit psychotischen Episoden oder

Verwirrheitszuständen bis hin zu einer zunehmenden Bewusstseinsbeeinträchtigung mit Ateminsuffizienz (Shoji et al., 2002).

Insgesamt zeigt die HSE einen variablen Krankheitsverlauf, von im Durchschnitt 2-12 Tagen, wobei eine zeitnahe Therapie-Einleitung entscheidend für den Ausgang der Erkrankung ist (Booss und Esiri, 2003).

2.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose

Zur zeitnahen Therapie-Einleitung ist die zügige Diagnostik der Erkrankung von entscheidender Bedeutung. Hierzu legte das „International Herpes Management Forum“ (IHMF) Richtlinien für die Diagnosekriterien einer Herpesenzephalitis fest.

Demnach ist die Liquor-Diagnostik die Methode der Wahl, da Veränderungen (zunächst das Auftreten neutrophiler Granulozyten, gefolgt von einer lymphozytären Pleozytose) schon früh nachweisbar sind und während der gesamten Krankheitsdauer bestehen bleiben (Shoji et al., 2002). Zur Virusdetektion gilt dabei die quantitative HSV-PCR-Diagnostik als Goldstandard (Boivin, 2004).

Vor der Durchführung der Liquor-Punktion muss jedoch eine Bildgebung (CCT oder MRT) zum Ausschluss einer Hirndrucksteigerung durchgeführt werden. Zur schnellen Diagnosestellung ist die MRT-Diagnostik die Methode der Wahl. Sie stimmt sehr gut mit den Ergebnissen einer Liquor-PCR überein und zeigt schon früh Signalveränderungen des Temporallappens. Das CCT hingegen zeigt erst nach ca. fünf Krankheitstagen typische hypodense Veränderungen an.

Zur frühen Diagnose-Sicherung stehen darüber hinaus auch das EEG und die SPECT-Untersuchung, mittels ^{99m}Tc -HmPAO (technetium-labelled-hexa-methyl-propylene-amine-oxime) zur Verfügung. In der SPECT (single-photon-emission-computed-tomography) zeigt sich schon frühzeitig eine bitemporale Hyperperfusion.

Das EEG zeigt zunächst unspezifische Veränderungen, im weiteren Krankheitsverlauf folgen periodisch-lateralisierende, epileptiforme Entladungen mit einer temporalen Prädominanz (Chaudhuri und Kennedy, 2002).

Die Hirn-Biopsie als weiteres Diagnose-Kriterium wurde weitgehend von der MRT-, der Liquor-Diagnostik und den klinischen Symptomen, sowie der Effektivität antiviraler Acyclovir-Therapie abgelöst (Boivin, 2004).

Parallel zur zeitnahen Diagnostik sollte eine frühzeitige medikamentöse Behandlung erfolgen, die schon bei Verdacht eingeleitet werden sollte. Unbehandelt liegt die Mortalität der HSE bei 70% (Tyler, 2004). Durch die antivirale Acyclovir-Therapie konnte diese hohe Mortalitätsrate jedoch auf 20% gesenkt werden (McGrath et al., 1997). Die Effektivität von Acyclovir wurde in zwei großen Studien gesichert (Skoldenberg et al., 1984; Whitley et al., 1986).

Einen anderen Therapieansatz, dessen Effektivität zurzeit in einer aktuellen Studie geprüft wird, stellt die Gabe von Glukokortikoiden dar (Martinez-Torres et al., 2008). Gegen den regelmäßigen Einsatz von Kortison sprach bisher die Befürchtung, dass die durch Kortison induzierte Immunsuppression die virale Ausbreitung fördern könnte (Thompson et al., 2000). Klinische, sowie tierexperimentelle Studien konnten aber bereits einen positiven Effekt einer Kombinationstherapie von Glukokortikoiden mit Acyclovir feststellen. Dies trifft im Besonderen für Patienten hohen Alters mit niedrigem Glasgow-Coma-Scale zu (Kamei et al., 2005).

2.1.3 Pathogenese

Das HSV Typ I wird durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen. Bei der Primärinfektion können verschiedene Symptome auftreten, die vor allem die Haut und die Schleimhaut betreffen. Erkrankungen wie Gingivostomatitis, seltener auch Augeninfektionen wie Keratitis und Keratokonjunktivitis kommen dabei vor. Teilweise verläuft die Erstinfektion aber auch asymptomatisch (Sancho-Shimizu et al., 2007).

Die Durchseuchungsrate mit dem Erreger HSV Typ I liegt in der Bevölkerung bei 80% (Casrouge et al., 2006).

Nach der Primärinfektion tritt das Virus über den Tractus olfactorius in das ZNS ein und breitet sich vom primären Infektionsherd zentripetal, per retrograd axonalem Transport, entlang der Äste des Nervus trigeminus aus. Im Nervensystem verursacht das Virus eine latente Infektion unter anderem des Ganglion trigeminale (Schmutzhard, 2001).

Nach der Reaktivierung dringt das Virus typischerweise in Epithel-Zellen ein und führt in 20-30% der Fälle zu einer mukosalen Läsion, die sich meistens in Form eines Herpes-Labialis äußert (Sancho-Shimizu et al., 2007).

Nach der Latenzperiode kann das Virus jedoch auch innerhalb des Gehirns reaktiviert werden. Die Ursachen für das Auftreten einer HSE sind dabei weitgehend unbekannt. Es wird unter anderem vermutet, dass bestimmte Gen-Defekte pathogenetisch bedeutsam sind. Ein wichtiger Mechanismus stellt hierbei der UNC-93B-TLR3-IFN-Pathway dar. Bei diesem Signaltransduktionsweg wird virale Doppelstrang-RNA (nach deren Replikation) vom Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3) erkannt. Dieser Rezeptor ist der am meisten in ZNS-residenten Zellen (Neuronen, Mikroglia, Astrozyten und Oligodendrozyten) exprimierte TLR. Er besteht aus einem extrazellulären Leucin-reichen Wiederholungssequenz-Motiv, das essentiell für die Liganden-Bindung ist, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Domäne.

UNC-93B ist ein mit dem TLR3 assoziiertes Protein des endoplasmatischen Retikulums mit 12 Transmembrandomänen, das für das Fortlaufen der Signaltransduktion entscheidend ist (Casrouge et al., 2006).

Die Signal-Kaskade läuft entweder über die Proteine IKK ϵ /TBK1 oder über den IKK-Komplex, bestehend aus NEMO, IKK α , und IKK β . Beide Wege führen zur Translokation der Transkriptionsfaktoren IRF3, IRF7 und NF κ B in den Zellkern um dort die Produktion von IFN- α zu bewirken. Das IFN wird anschließend vom IFN- α -Rezeptor erkannt, der für die weitere Signaltransduktion ein STAT-Molekül benötigt. Durch die Rezeptor-Aktivierung kommt es zu einer Expression von ISRE-Genen (Interferon-stimulated response element), die anschließend zu einer Aktivierung von Makrophagen und T-Zellen führt, welche wiederum die Virus-Eliminierung bewirken (Sancho-Shimizu et al., 2007).

Es wurden bisher verschiedene humane primäre Immundefekte beschrieben, die zu einer veränderten TLR-Antwort führen: die x-chromosomal-rezessive NEMO-Defizienz (Doffinger et al., 2001), die autosomal-dominante I κ B α -Defizienz (Courtois et al., 2003), die autosomal-rezessive IRAK-4-Defizienz (Picard et al., 2003), die autosomal-rezessive UNC 93B-Defizienz (Casrouge et al., 2006), sowie die autosomal dominante TLR3-Defizienz (Zhang et al., 2007) und die autosomal-dominante TRAF3-Defizienz (Perez de Diego et al., 2010). Diese Defekte sind entscheidend für die genetische Ätiologie der HSE (Zhang et al., 2007).

Als verantwortliche Mechanismen für die hämorrhagisch nekrotisierenden Gewebsläsionen des Temporallappens wird zum einen die direkte, virusbedingte Gewebschädigung angesehen, zum anderen aber auch eine immunvermittelte Schädigung diskutiert. Eine zentrale Rolle spielen hierbei inflammatorische Chemokine und deren Rezeptoren als Mediatoren der angeborenen Immunität (Lundberg et al., 2007).

Eine primäre HSV-1-Infektion der Mukosa wird von speziellen Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR), zu denen auch die TLR 2 und 9 gehören, erkannt (Lundberg et al., 2008).

Auf die Antigenerkennung folgt eine massive Freisetzung von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen. Über verschiedene Pathways kommt es anschließend, entweder mit Hilfe der MAPK (mitogen-aktivierte Protein-Kinase) und des NF κ B zur direkten Chemokin-Produktion, oder aber zur indirekten Chemokin-Freisetzung über die Expression von inflammatorischen Zytokinen wie zum Beispiel IFN-1, TNF- α , IL-1 und IL-6 (Wuest und Carr, 2008). Dabei ist weiterhin nicht klar, ob diese immunvermittelte Reaktion schädigend oder protektiv zu werten ist (Lundberg et al., 2008). Zum einen wird vermutet, dass die immunvermittelte Reaktion entscheidend für die virale Clearance ist (Sergerie et al., 2007). Zum anderen wird die exzessive, inflammatorische Immunreaktion jedoch auch für die massive Gewebschädigung verantwortlich gemacht (Lundberg et al., 2007).

2.2 HSV Typ 1

Der HSV Typ 1 ist ein neurotropes Virus aus der Familie der Herpesviridae, das mit einer Durchseuchung von 80% beim Menschen weit verbreitet ist (Casrouge et al., 2006). Das Virus ist in der Lage eine Vielzahl an unterschiedlichen Krankheitsbildern zu verursachen, zu denen neben der selteneren HSE auch die Meningitis, Keratitis und Keratokonjunktivitis, orale, sowie genitale und Haut-, sowie Schleimhaut-Infektionen zählen (Aubert und Blaho, 1999; Knipe und Cliffe, 2008). Eine typische Eigenschaft des Virus ist seine Fähigkeit, lebenslang latent in seinem Wirt zu verbleiben, oder aber durch verschiedene Trigger-Mechanismen reaktiviert zu werden (Aubert und Blaho, 1999).

2.2.1 Taxonomie und Morphologie der Herpesviren

Die Gruppe der Herpesviren umfasst acht verschiedene humane Herpesviren-Typen, die in die drei Unterklassen (α -, β -, γ - Herpesviren) aufgeteilt werden (Tab. 1). Die Gruppe der α -Herpesviren umfasst die Herpes Simplex Viren vom Typ 1 und 2, sowie das Varizella Zoster Virus (VZV). Die Gruppe der β -Herpesviren umfasst neben dem Zytomegalie Virus (CMV) auch die humanen Herpesviren vom Typ 6 und 7. γ -Herpesviren schließen das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das humane Herpes-Virus vom Typ 8 mit ein.

Alle Herpesviren weisen eine ähnliche Morphologie auf. Sie unterscheiden sich in der Größe, wobei die α -Herpesviren die kleinsten und die β -Herpesviren (Zytomegalie-Viren) die größten Viren der Herpesgruppe darstellen (Nicholas, 2000).

Bezeichnung	Trivialname	Abkürzung	Subfamilie
HHV-1	Herpes Simplex Virus Typ 1	HSV-1	α
HHV-2	Herpes Simplex Virus Typ 2	HSV-2	
HHV-3	Varizella Zoster Virus	VZV	
HHV-4	Epstein-Barr Virus	EBV	γ
HHV-5	Zytomegalie Virus	CMV	β
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6	HHV-6	
HHV-7	Humanes Herpesvirus 7	HHV-7	
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8	HHV-8	γ

Tab. 1: Klassifikation der Herpesviren nach Nicholas (2000)

Die Struktur der humanen Herpesviren besteht aus einem Kern, der eine Doppelstrang-DNA enthält und 120-230kbp groß ist. Um den Kern haben die Herpesviren ein ikosahedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von ca. 100 nm, das 162 Kapsomere enthält. Eine amorphe Schicht, die als Tegument bezeichnet wird, umgibt das Kapsid. Abgegrenzt wird das Tegument von einer Lipiddoppelschicht-Membranhülle (envelope), auf deren Oberfläche Glykoproteine hervorragen (Boehmer und Lehman, 1997).

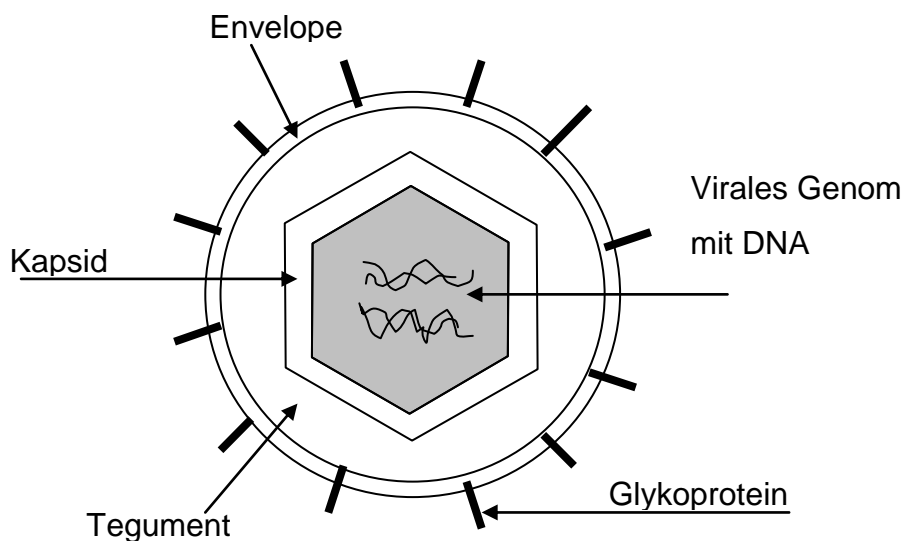


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Herpesvirus

2.2.1.1 Morphologie des Virus-Genoms

Das 152 kbp große Genom des HSV-1 besteht aus linearer Doppelstrang DNA, die aus zwei einzelnen Regionen zusammengesetzt ist. Diese Regionen, bezeichnet als U_L (unique long) und U_S (unique short), werden jeweils von Wiederholungssequenzen a, b, und c flankiert. Darüber hinaus befinden sich im HSV-1 Genom drei Origins of Replication: der erste (ori_L) befindet sich im U_L Segment. Die anderen beiden (ori_S) liegen in den Sequenzen, die das U_S -Segment flankieren (Boehmer und Lehman, 1997).

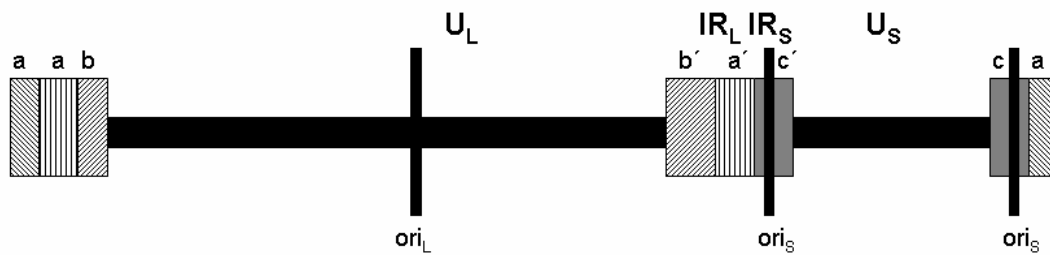


Abb. 2: Darstellung des Herpesvirus-Genoms nach Boehmer und Lehman, 1997

2.2.1.2 Virus Latenz

Charakteristisch für das Herpesvirus ist die Eigenschaft, eine latente Infektion in sensorischen Neuronen hervorzurufen, aus welchen es periodisch reaktiviert werden kann (Thomas et al., 2002).

Dieser Latenz-Reaktivierungs-Zyklus kann in drei Phasen aufgeteilt werden:

- 1) Latenz-Etablierung,
- 2) Aufrechterhaltung der Latenz,
- 3) Reaktivierung (Randall et al., 2000).

Die Latenz-Etablierungs-Phase beginnt mit dem Eindringen des Virus in das sensorische Neuron. Dabei fusioniert das Virus mit der Plasmamembran des Neurons am axonalen Terminus. Zur Adsorption und Penetration werden drei der sieben envelope Glycoproteine benötigt (gB, gD und gH) (WuDunn und Spear, 1989). Nach dem anschließenden „Uncoating“ folgt der Transport der Virus-DNA durch Membranporen in den Zellkern, wo sie nachfolgend von der Zell-DNA-abhängigen RNA-Transkriptase transkribiert wird. Die dabei entstehenden Gene kann man in drei Haupt-Transkriptions-Regulationsklassen einteilen: immediate early (iE), delayed early (dE) und late (L) Gene (Jones, 2003).

Immediate early Gene haben vor allem regulatorische Funktionen und steuern die Synthese aller viral-encodierten Proteine, sowie die Synthese der delayed early Gene (Aubert und Blaho, 1999). Diese sind wiederum zuständig für alle nicht-Struktur-Proteine, die für die virale Replikation benötigt werden. Die Late Gene machen als spät-transkribierte Gene die Struktur-Proteine des Virus aus (Boehmer und Lehman, 1997).

Anschließend folgt die Latenzperiode, während der die virale Expression gestoppt, und nur noch die Expression von Latenz-assoziierten Transkripten (LATs) aufrechterhalten

wird. Beim LAT handelt es sich um eine 8.3-8.5 kb große nicht kodierende RNA, die weiter zu kleineren Introns gespleißt werden kann. Die LATs sind zuständig sowohl für die Latenz-Etablierung als auch für die Reaktivierungsphase nach der Latenz (Thomas et al., 2002). Ihre weiteren Aufgaben sind die Sicherung des Überlebens der neuronalen Wirtszelle durch eine anti-apoptotische Wirkung (Kubat et al., 2004).

Diese Latenzperiode bleibt für die Wirtszelle lebenslänglich bestehen und kann definiert werden als eine Periode, in der laborchemisch kein infektiöses Virus detektiert werden kann (Jones, 2003).

Die Reaktivierungs-Phase kann durch externe Stimuli wie z.B. Stress, Immunsuppression, UV-Licht, Traumata, Fieber oder die Menstruation getriggert werden. Diese Triggerfaktoren stimulieren die virale Gen-Expression vor allem in den sensorischen Ganglien (Jones, 2003).

2.2.1.3 Regulierung von Apoptose durch HSV-1

Die Apoptose ist ein streng reguliertes Zell-Untergangs-Programm, dessen Hauptaufgabe die Eliminierung gealterter und geschädigter Zellen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ist (Wyllie, 1993). Darüber hinaus ist der programmierte Zelltod ein wichtiger Mechanismus der Wirtszell-Immunantwort gegen virale Infektionen.

Verschiedene Viren haben jedoch Mechanismen entwickelt um die frühzeitige Apoptose infizierter Zellen zu verhindern, wodurch das Wirtszellüberleben verlängert wird und somit die Produktion der viralen Nachkommen maximiert werden kann (Aubert et al., 1999).

Das HSV kann sowohl die Apoptose induzieren als auch antiapoptotisch wirken. Zur Induktion der Apoptose kommt es vor allem zu Beginn der Infektion, wenn noch keine antiapoptotischen Faktoren vom Virus synthetisiert werden oder, wenn die Synthese der immediate early-Gene mit deren Proteine ICP4 und ICP27, unterbrochen ist (Kraft et al., 2006). Dann nämlich sind Virus-spezifische T-Lymphozyten in der Lage infizierte Zellen zu töten, indem sie den Fas/Apo-1 Ligand (CD95) sezernieren. Dieser Ligand triggert die Apoptose, indem er entweder an seinen Rezeptor CD95 bindet oder aber die granuläre Exozytose über einen so genannten Granzym-B-Perforin-Pathway fördert. Auch das von aktivierten T-Zellen sezernierte TNF- α ist ein potentes Zytokin, das zur

Apoptose-abhängigen Zytolyse führt, indem es an den TNF- α -Rezeptor bindet. Der anschließend ablaufende TNF- α bzw. Fas-aktivierte Pathway wird durch verschiedene Mediator-Moleküle aufrechterhalten, zu denen auch die Caspasen zählen (Galvan und Roizman, 1998). Bei den Caspasen handelt es sich um Zystin-Aspartasen, die durch proteolytische Spaltung ihrer Proenzyme in die aktive katalytische Form überführt werden. Konkret führt eine Liganden induzierte Clusterung der so genannten Todesrezeptoren (Fas und TNF- α) zu einer Aktivierung verschiedener Caspasen (8,6 und 7), die letztendlich die Effektor-Caspase 3 aktivieren (Cohen, 1997).

Der zweite Pathway der Apoptose, vor allem durch Zell-Stress induziert, führt zu einer Loslösung des Cytochrom C aus Mitochondrien, was ebenfalls zur Aktivierung der Effektor-Caspase 3 führt (Galvan et al., 2000).

Durch beide Wege kommt es zu morphologischen Veränderungen, die charakteristisch für die Apoptose sind, wie Zell-Schrumpfung, DNA-Fragmentierung und Kern-Kondensierung (Aubert und Blaho, 2001).

Auf der anderen Seite ist das Herpes Simplex Virus jedoch auch in der Lage die Apoptose zu verhindern, was insgesamt zu seiner Eigenschaft der wirtseigenen Immunantwort zu entkommen, beiträgt. Dazu benötigt das Virus verschiedene virale Faktoren wie z.B. ICP4, ICP27, Us3, Us5, Glykoprotein D, und ICP22, die u.a. in der Lage sind die Aktivierung der Caspase-3 zu verhindern (Kraft et al., 2006).

2.3 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine sind immunologische Schlüssel-moleküle, welche die Verteilung und den funktionellen Status von Immunzellen im Organismus entscheidend beeinflussen und orchestrieren.

Bei den 46 identifizierten humanen Chemokinen handelt es sich um Moleküle mit einem niedrigen Molekulargewicht von 8-14 kDa (Zlotnik et al., 2006).

Untereinander weisen sie eine 20-70%ige Aminosäuresequenz-Homologie auf, wobei ihre Klassifizierung aufgrund von Strukturunterschieden, die ihr Tetra-Zystein-Grund-Motiv am N-Terminus betreffen, erfolgt (Abb. 3). Demzufolge unterscheidet man CC, CXC, CX3C und C-Chemokine (Liu et al., 2005).

Die CC-Chemokine repräsentieren die größte Gruppe der Chemokine. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass die ersten beiden der vier Zystein-Reste direkt nebeneinander liegen. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1), sowie das CCL2, das ein potenter Agonist für Monozyten, dendritische Zellen, T-Gedächtniszellen und Basophile darstellt. Andere Vertreter der CC-Chemokine sind z.B. RANTES, MIP-1 α (CCL3) und MIP-1 β (CCL5) (Charo und Ransohoff, 2006).

CXC-Chemokine enthalten eine Aminosäure zwischen dem ersten und dem zweiten Zystein. Für ihre Funktion ist ein Tripeptid-Strukturmotiv Glu-Leu-Arg (ELR-Element) entscheidend, das sich direkt vor dem ersten Zystein befindet (Liu et al., 2005). Dieses ist verantwortlich für die Orchestrierung von Granulozyten und Monozyten. Ein wichtiger Vertreter hier ist IL-8 (CXCL8).

Andere CXC-Chemokine, die kein ELR-Element besitzen (Non-ELR-CXC-Chemokine) wie z.B. das B-Lymphozyten-Chemokin (BCL) lenken Lymphozyten an ihre Bestimmungsorte (Wuest und Carr, 2008).

In der CX3C-Chemokin-Familie ist Fractalkin (CX3CL1) der einzige Vertreter. Bei diesem Molekül befinden sich drei Aminosäuren zwischen den beiden Zysteinen.

Die C-Chemokin-Klasse besitzt nur ein einziges Zystein. Diese Klasse wird durch Lymphotaktin repräsentiert (Charo und Ransohoff, 2006).

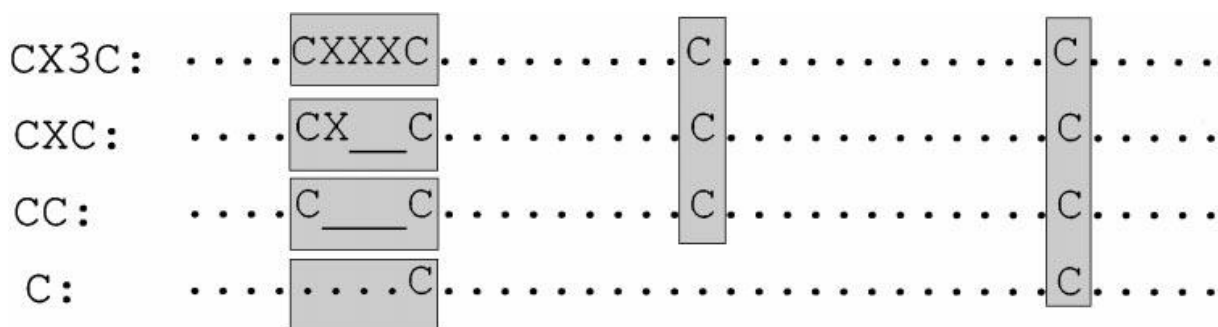


Abb. 3: strukturelle Klassifikation der Chemokine: C= Cystein, X= AS (außer Cystein) (Bajetto et al., 2001)

Die vielfältigen Funktionen der Chemokine umfassen unter anderem Chemotaxis, Adhäsion, Proliferation, Reifung, Differenzierung, Apoptose und die maligne Zelltransformation. Dabei können Chemokine prinzipiell alle Zelltypen beeinflussen. Hauptsächlich wirken sie jedoch als Chemoattraktoren für Leukozyten (Rot und von Andrian, 2004).

Die Chemotaxis erfolgt dabei entlang eines Konzentrationsgradienten, der unter anderem mit Hilfe von Glukosamino-Glycanen der Zell-Oberflächen aufgebaut wird. Durch die Bindung der Chemokine mit den Glukosamino-Glycanen erfolgt die Immobilisation der Chemokine. Dadurch bildet sich ein Chemokin-Gradient, der entscheidend für die Orchestrierung weiterer Entzündungsmediatoren ist (Koopmann et al., 1999).

Während einige Chemokine kontinuierlich exprimiert werden, erfolgt die Expression anderer erst aufgrund eines pathologischen Stimulus. Die induzierte Expression dieser Chemokine trägt ebenfalls zur Etablierung des Konzentrationsgradienten bei (Wuest und Carr, 2008).

Die Ausführung der verschiedenen Aufgaben der Chemokine erfolgt dabei durch die Interaktion mit ihren entsprechenden Chemokin-Rezeptoren, bei denen es sich um G-Protein-gekoppelte sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren handelt. Die Rezeptor-Bindung löst eine Signalkaskade aus, die letztendlich die jeweilig gewünschten zellulären Veränderungen bewirken (Charo und Ransohoff, 2006).

Den Chemokinen entsprechend können auch ihre korrespondierenden Rezeptoren in vier Haupt-Klassen eingeteilt werden: CR, CCR, CXCR, CX3CR (Roizman et al., 2006). Insgesamt sind 19 verschiedene Chemokin-Rezeptoren bekannt (Rot und von Andrian, 2004).

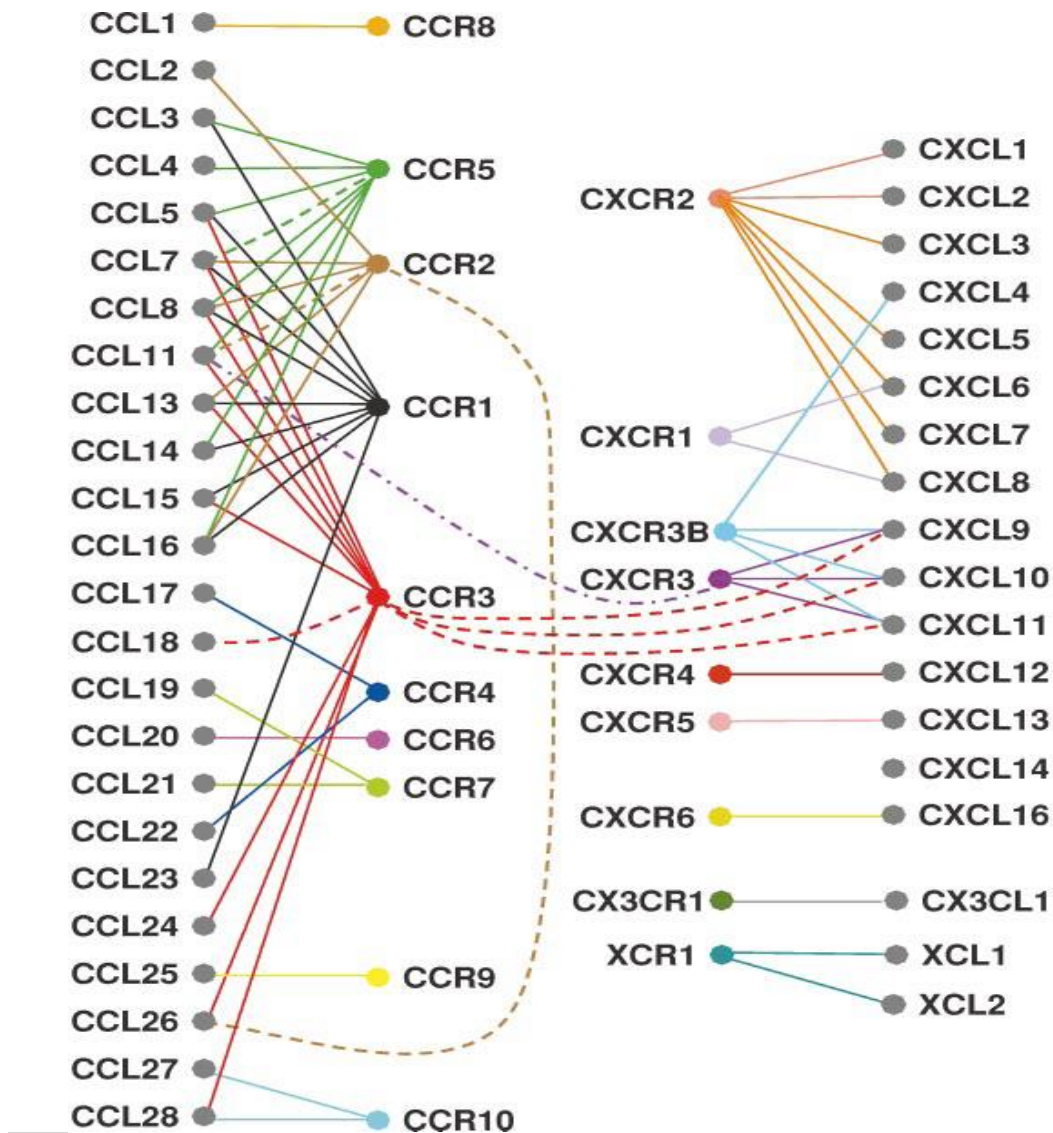


Abb. 4: humane Chemokine und ihre Rezeptoren. Gestrichelte und durchgezogene Linien zeigen agonistische und antagonistische Rezeptor-Liganden-Beziehungen an. Nach Rot und von Adrian 2004

2.3.1 Chemokine in der Neuroinflammation

Das ZNS nimmt in Bezug auf Entzündungsvorgänge eine gesonderte Stellung ein. So besteht eine Blut-Hirn-Schranke, die das ZNS vor im Blut zirkulierenden zellulären und molekularen Bestandteilen des peripheren Immunsystems schützt (Ransohoff, 2009).

Die Blut-Hirn-Schranke lässt sich in den Kapillarendothelien des Gehirns, sowie im Epithel des Plexus Choroideus nachweisen. In diesen Bereichen sind die jeweiligen Endothelzellen mit Hilfe von Tight Junctions eng miteinander verknüpft. Die Basalmembran der Endothelien ist dabei mit der glialen Basalmembran der Astrozyten-

Endfüßchen verknüpft, welche die Blut-Hirn-Schranke zum Gehirn hin, durch die Membrana limitans glialis perivascularis begrenzt.

Im Blut zirkulierende Zellen gelangen bei intakter Blut-Hirn-Schranke nur unter strenger Kontrolle ins ZNS. Dabei wird die Immunüberwachung wahrscheinlich überwiegend im Subarachnoidalraum abgewickelt, so dass das gesunde ZNS-Parenchym weitgehend frei von Leukozyten ist.

Bei den im Blut zirkulierenden Zellen, die in das ZNS gelangen, handelt es sich vor allem um aktivierte, CD4-positive, CD45Ro-positive, CD27-positive, CCR7-positive und CXCR3-positive T-Gedächtniszellen. Sie sind in der Lage die Endothelbarriere der Blut-Hirn-Schranke in mehreren Etappen zu passieren: Zunächst rollen die Lymphozyten auf der endothelialen Oberfläche. Das gelingt durch eine Interaktion zwischen endothelialen P-Selektintinen und dem Leukozyten-eigenen P-Selektin-Glycoprotein-Ligand-1 Erkennungs-Rezeptor, sowie durch die Scherkräfte des Blutflusses. Aktivierte Leukozyten-Integrine steuern anschließend den Arrest der Leukozyten auf dem Endothel mittels Zell-Adhäsionsmolekülen (CAMs). Nach der Adhäsion penetrieren migrierende Entzündungszellen mit Hilfe des Platelet-endothelial-adhesions-molecule-1 durch die endotheliale Schicht in den parenchymatösen Perivasalraum des ZNS (Roizman et al., 2006).

Die weitere Orchestrierung der inflammatorischen Zellen wird vor allem durch chemotaktische Gradienten gesteuert (Ransohoff, 2002).

Chemokine können im ZNS auch von residenten Zellen wie Mikroglia, Astrozyten und Neuronen gebildet werden, wobei ihre Expression durch Entzündungsmediatoren hämatogener Immunzellen, wie z.B Interferon- γ erheblich gesteigert wird.

Als Antwort auf eine virale Infektion werden zahlreiche inflammatorische Zytokine exprimiert, welche die gesteigerte Rekrutierung der Leukozyten ins infizierte Gewebe steuern. Dabei zeigen sich die inflammatorischen Zellen überwiegend als perivaskuläre Infiltrate. Hier befinden sich hauptsächlich CCR1-positive, sowie CCR5-positive Monozyten mit einer kleineren Population von T-Effektorzellen, die CXCR3 exprimieren (Charo und Ransohoff 2006). Gesteuert durch Chemokin-Gradienten wandern die Lymphozyten entlang der Membrana limitans glialis perivascularis weiter ins Hirn-Parenchym vor, wo sie eine inflammatorische Immunreaktion bewirken (Cardona et al., 2008).

2.3.2 CXCR3 und seine Liganden

Der Chemokin-Rezeptor CXCR3 ist ein Sieben-Transmembran-G-Protein-gekoppelter Zell-Oberflächen-Rezeptor (Liu et al., 2005). Er ist unter anderem verantwortlich für die Orchestrierung von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen als Antwort auf seine drei Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 (Muller et al., 2007).

Der aus 368 Aminosäuren bestehende Rezeptor hat ein Molekulargewicht von 40kDa. Er gliedert sich in eine extrazelluläre Domäne, sieben Transmembran-Domänen und einen intrazellulären Anteil. Die extrazelluläre Domäne enthält neben dem N-Terminus auch drei extrazelluläre Loops (ECL1-3), die zusammen agieren und verantwortlich sind für die Bindung der Chemokin-Liganden. Die sieben Transmembrandomänen unterstützen die CXCL9-, 10- und 11- induzierte Chemotaxis mit Hilfe einer so genannten DRY-Sequenz in der dritten Transmembrandomäne. Die durch die Liganden-Bindung initiierte Signaltransduktion wird von der intrazellulären Domäne gesteuert, die aus drei Loops und dem C-Terminus zusammengesetzt ist (Liu et al., 2005).

Der CXCR3-Rezeptor wird vor allem auf aktivierten CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen, T-Gedächtniszellen und NK-Zellen exprimiert, wobei sich der Rezeptor kaum unter physiologischen Bedingungen nachweisen lässt. Seine Expression steigt jedoch drastisch nach der IFN- γ -Stimulation, wie sie im Rahmen eines Entzündungsprozesses auftritt. Somit spielt der CXCR3-Rezeptor vor allem in der TH1-gewichteten Immunantwort eine entscheidende Rolle (Muller et al., 2007).

Darüber hinaus weist der humane CXCR3-Rezeptor auch Splicing-Varianten (u.a. CXCR3-B) auf, die sich durch das Bindungsprofil ihrer Liganden unterscheiden (Lasagni et al., 2003).

Die Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 (Synonyme: „monokine induced by interferon- γ “ (MIG), „Interferon inducible Protein 10“ (IP-10) und „Interferon-inducible T-Zell α -chemoattractant“ (I-TAC)) gehören funktionell zu den non-ELR CXC Chemokinen. Sie sind die Hauptliganden des CXCR3-Rezeptors. Unter physiologischen Bedingungen sind sie kaum nachweisbar. Unter pathologisch, inflammatorischen Bedingungen wird ihre Expression dagegen in Abhängigkeit von spezifischen Zytokinen stark hochreguliert. Das potenteste Zytokin diesbezüglich ist IFN- γ . Es ist in der Lage die Genexpression von allen drei Chemokinen hoch zu regulieren. IFN- γ wird überwiegend von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen gebildet (Cole et al., 1998; Farber, 1997).

Untereinander weisen die Chemokine CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 eine signifikante Strukturhomologie mit einer ca. 40%igen Übereinstimmung in ihrer Aminosäure-Sequenz auf (Clark-Lewis et al., 2003). Sie sind funktionell an der Pathogenese der Zell-gesteuerten Immunität beteiligt. In diesem Rahmen haben alle drei die Fähigkeit die gerichtete Migration von aktivierten T-Gedächtniszellen zu fördern.

Trotz vieler Gemeinsamkeiten der drei beschriebenen Chemokin-Liganden, konnten auch einige Unterschiede festgestellt werden: diese bestehen in der Kinetik, in ihrem Expressionsmuster während einer Entzündungsreaktion, sowie in ihrer Effektivität gegenüber CXCR3. So binden die Chemokine an unterschiedlichen Domänen ihres korrespondierenden CXCR3-Rezeptors: am Carboxy-Terminus befindet sich die Bindungsstelle von CXCL9 und CXCL10, wohingegen CXCL11 am dritten intrazellulären Loop des Rezeptors andockt. Durch die unterschiedlichen Bindungseigenschaften sind die drei Liganden in der Lage verschiedene Effekte auf die Zielzellen auszuüben.

Der CXCR3-Ligand CXCL9 wurde erstmals 1990 von Farber nachgewiesen (Farber, 1990). Seitdem erbrachten diverse in vitro-Studien kontroverse Ergebnisse im Hinblick auf das Expressionsmuster des Liganden. Einerseits konnte eine streng IFN- γ abhängige Expression aufgezeigt werden, die sich auf die jeweilige akute Krankheitsphase begrenzte (Liu et al., 2001). Im Gegensatz dazu wurde auch eine konstitutive Expression des Chemokin-Liganden in in vitro-Studien nachgewiesen (Salmaggi et al., 2002).

CXCL10 wurde erstmalig im Kontext von IFN- γ induzierbaren Genen beschrieben (Dufour et al., 2002; Luster und Ravetch, 1987). Das 8.7 kDa große Chemokin wird in geringen Konzentrationen kontinuierlich in lymphatischen Geweben exprimiert. Nach der Stimulation von IFN α , - β , - γ , LPS, oder einer T-Zell-Aktivierung im Rahmen einer Entzündungsreaktion, kann dessen Synthese jedoch stark gesteigert werden. Dann nämlich erfolgt die Synthese zusätzlich durch Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Astrozyten und durch Neutrophile (Dufour et al., 2002).

CXCL11 (Synonym: I-TAC, β R1, H174, SCYB11) ist der potenteste Agonist des CXCR3 und verfügt dabei über die stärkste Rezeptor-Affinität (Clark-Lewis et al., 2003). Ursprünglich wurde es in IFN- β behandelten Astrozyten identifiziert (Rani et al., 1999). Ob CXCL11 auch durch andere residente Zelltypen des ZNS exprimiert werden kann, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden.

2.3.3 Die Rolle der Chemokine in der Herpesenzephalitis

Chemotaktische Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der immunologischen Abwehr gegen die HSV-Infektion, indem sie als Vermittler zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem agieren (Wuest und Carr, 2008).

Die Chemokin-Produktion während der Infektion wird durch die Erkennung der viralen Antigene durch spezielle Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs) gesteuert. Diese Rezeptoren induzieren einen TLR-abhängigen Signaltransduktionsweg (s. oben), der letztendlich die Interferon- γ -Produktion, sowie die Expression des Tumor-Nekrose-Faktor- α hochreguliert und dadurch eine gesteigerte Synthese der Chemokine fördert. Typ-1 Interferon wiederum führt mit Hilfe von Chemoattraktoren zu einem massiven Einstrom von aktivierten T-Zellen und Makrophagen, die Teil der TH1 gewichteten Immunantwort sind.

Im Zusammenhang mit einer HSV Typ 1-Infektion konnten vier wichtige TLR nachgewiesen werden: TLR 3, 9 und die heterodimeren Rezeptoren 2 und 6. Letztere sind in der Lage virale Doppelstrang-RNA zu erkennen. Sie gewinnen ihre Bedeutung im Zusammenhang mit der HSE, da sie vor allem von aktivierten Mikroglia exprimiert werden. Das TLR 9-Signaling zeigte dagegen experimentell lediglich einen geringen Einfluss auf den Verlauf einer HSV-Infektion (Wuest und Carr, 2008).

Als entscheidend für die genetische Ätiologie der HSE erwies sich jedoch die autosomal-dominante TLR3-Defizienz im Rahmen des UNC-93B-IFN-Pathways (s. oben). Diese stellt eine der fünf humanen, primären Immundefekte mit abgeschwächter TLR-Antwort dar (Casrouge et al., 2006; Zhang et al., 2007).

Neben einem TLR-Defekt führt jedwede Störung im oben beschriebenen Signaltransduktionsweg zu einer vermehrten viralen Amplifikation und birgt dadurch das Risiko der Entstehung einer HSE.

Die effektive Kontrolle durch das angeborene Immunsystem ist vor allem wichtig für die Eindämmung der latenten Infektion, zur Reduktion der Viruslast in den sensorischen Ganglien und zur Senkung der Reaktivierungs-Frequenz (Wuest und Carr, 2008). Hierfür sind wahrscheinlich die aktivierten, virusspezifischen CD4+- und CD8+-T-Zellen sehr wichtig (Ghiasi et al., 2000; Manickan und Rouse, 1995; Simmons und Tschärke, 1992). So kommt es z.B. im latent infizierten Ganglion trigeminale zu einer Steigerung der Expression von CCR5 und CXCR3 (Cook et al., 2004; Theil et al., 2003).

Diese Chemokine bewirken somit den Erhalt der aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen im latent infizierten Ganglion trigeminale, was sowohl experimentell, als auch am Menschen beobachtet werden konnte (Khanna et al., 2003; Verjans et al., 2007; Yoneyama et al., 2005).

Die Einschränkung der viralen Replikation hingegen wird durch die Produktion von Interferon- γ , sowie durch die zytolytische Aktivität der immunreaktiven T-Zellen und NK-Zellen gewährleistet (Wuest und Carr, 2008).

Experimentell konnte der Verlauf der Expression verschiedener immunmodulatorischer Zellen bereits teilweise nachgewiesen werden. So zeigten Wickham et al. (2005), dass nach einer okulären Infektion von C57BL/6-Mäusen die Expression von CCL2, CCL5 CXCL9 und CXCL10 im Ganglion trigeminale innerhalb von 72 Stunden hochreguliert wurde. Eine weitere Studie mit intrakraniell infizierten Mäusen kam zu einem ähnlichen Ergebnis (Vilela et al., 2008).

Der Chemokin-Rezeptor CXCR3 gehört ebenfalls zu den am frühesten hochregulierten Genen während einer HSV-1-Infektion (Wickham et al., 2005; Wuest und Carr, 2008). Während der HSE ist das CXCR3-Signaling entscheidend an der Rekrutierung von NK-Zellen ins ZNS beteiligt und trägt erheblich zur anti-HSV-vermittelten Immunantwort bei. Experimentell gibt es bisher kontroverse Ansichten über den Effekt einer CXCR3-Defizienz auf den Krankheitsverlauf. Wickham et al. (2005), sowie Wuest et al. (2008) konnten in ihren entsprechenden Studien eine niedrigere Mortalität der CXCR3-Knock-out-Mäusen nachweisen, obwohl diese Tiere eine erhöhte Viruslast aufzeigten. Diese Tatsache spricht dafür, dass CXCR3 entscheidend an der Modulation von Immunprozessen beteiligt ist, diese inflammatorische Reaktion jedoch nicht nur die Viruslast reduziert, sondern gleichzeitig auch eine massive Schädigung des umgebenden Gewebes verursacht. Andererseits wird der Immunreaktion jedoch auch ein protektiver Effekt nachgesagt, der entscheidend zur Virus-Clearance beiträgt (Sergerie et al., 2007).

2.4 Rationale der Studie

Die HSE weist als wichtigste virale Enzephalitis eine hohe Morbidität und Mortalität auf. Pathogenetisch wird neben der Viruslast auch die Immunantwort als möglicher gewebschädigender Faktor diskutiert.

Der Chemokinrezeptor CXCR3 und seine korrespondierenden Liganden (CXCL9, CXCL10, CXCL11) werden als immunologische Schlüsselmoleküle in der HSE, sowie in zugehörigen Tier-Modellen stark exprimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit soll nun in erster Linie die wichtige Rolle des CXCR3 Chemokinsystems im Tiermodell der Herpes Simplex Enzephalitis näher untersucht werden. Die bisher durchgeführten experimentellen Studien ergaben bezüglich der Bedeutung von CXCR3 widersprüchliche Ergebnisse. Die Erforschung des therapeutischen Potentials dieses Chemokinsystems zur Behandlung der HSE stellt das langfristige Ziel dieses Forschungsgebietes dar.

Um die Bedeutung des Chemokin-Rezeptors CXCR3 im Besonderen näher zu erforschen, etablierten wir ein HSE-Maus-Modell mit intranasalem Infektionsweg (HSV17 syn17+) und charakterisierten den Krankheitsverlauf in CXCR3-defizienten Mäusen (CXCR3KO) und den entsprechenden Wildtyp-Kontrollen über 14 Tage. Mittels Immunhistochemie und quantitativen PCR-Analysen untersuchten wir die Viruslast des ZNS.

Letztendlich diente der Vergleich von Wild-Typ Tieren und CXCR3-defizienten Mäusen zur näheren Charakterisierung der Rolle des Chemokin-Rezeptors CXCR3 in der Herpes Simplex Enzephalitis.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Camera:	BX61 (Olympus)
Lichtmikroskop:	CX21 (Olympus)
Deckgläser:	24x50 mm, Glasdicke 0,13-0,16mm (rL)
Kryostat:	3050 S (Leica)
Objekt-Gläser:	(Histobond Marienfeld)
Pasteur-Pipetten:	(BRAND)
Vortexer:	Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
Waage:	PJ3600 Delta Range (Mettler)
Wärmeschrank:	3033 (GFL)
Wasserbad:	(GFL)
Zentrifuge:	5415 C (Eppendorf)
Spectrophotometer:	NaNoDrop 1000 (Thermo scientific)
Real-Time PCR-System:	Step One Plus (Applied Biosystems)
Thermal Cycler:	(Applied Biosystems)

3.1.2 Chemikalien, Kits, Reagentien

Im Folgenden werden die für die Versuchsreihen benötigten Chemikalien, Kits und Reagentien aufgelistet.

Immunhistochemie auf Paraffinschnitten	
Substanz	Firma
Xylen	Vogel
Paraformaldehyd, Hematoxylin, Eosin-Lösung, Clarion mounting medium	Sigma-Aldrich
Ethanol, Methanol	Merck
PBS (9,55g/l in 1000ml Aqua dest.)	Biochrom AG
Streptavidin-HRP	Invitrogen
Nova-Red substrate Kit for Peroxidase	Vector
10%BSA in PBS	PAA
DPX Mountant for Histology	Fluka

Tab. 2: Chemikalien und Reagentien für Immunhistochemie auf Paraffinschnitten

Immunhistochemie auf Cryoschnitten	
Substanz	Firma
Succrose	Merck
Tissue-Tec	Sakura Finetek USA
Biotin	Jackson Immuno-Research
Immuno-Mount (Eindickmedium)	Thermo-Fischer
DAPI	Sigma-Aldrich
AlexaFluor, A488, A594	Invitrogen

Tab. 3: Chemikalien und Reagentien für Immunhistochemie auf Cryoschnitten

TUNEL-Färbung	
Substanz	Firma
TUNEL-Kit, POD:	Roche
Labeling-Solution (fluorescein-dUTP) 5 tubes, Enzym-Solution (TdT) 5 tubes, Anti-fluorescein-POD-Konjugat, gebrauchsfertig (1:4),	
TUNEL-Dilution-Puffer	
Trinatrium-CitratDihydrat	Roth

Tab. 4: Chemikalien, Kits, Reagentien für TUNEL-Färbungen

cDNA-Synthese	
Substanz	Firma
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase RiboLock™ RNase Inhibitor ReactionBuffer 10mM dNTP Mix Oligo(dT) Primer DEPC-treated Water	Fermentas

Tab. 5: Substanzen für die cDNA-Synthese

Quantitative Real-Time-PCR	
Substanz	Firma
SYBRGreen, RNase free water	Quiagen GmbH
Primer (s. Tab. 9)	Sigma-Aldrich

Tab. 6: verwendete Substanzen für die quantitative Real-Time-PCR

3.1.3 Antikörper

Im Folgenden werden die verwendeten Antikörper tabellarisch dargestellt.

Primärantikörper	Klonalität	Funktion	Konzentration	Firma
CD3	Polyclonal rabbit	T-Zell Marker	1:200	Dako
GFAP	Monoclonal mouse	Astrozytenmarker	1:500	Dako
Herpes Simplex-1	Polyclonal rabbit	Viruspezifischer Antikörper	1:100	Dako
TomatoLectin	Lectin	Mikroglia- Makrophagenmarker	/ 1:50	Sigma Life- Science

Tab. 7: Antikörper zur Charakterisierung der Paraffinschnitte

Antikörper	Klonalität	Kolokalisation	Konentration	Firma
CD3/HSV1	Monoclonal hamster/ polyclonal rabbit	T-Zell-Marker	1:200/1:100	Dako
GFAP/HSV1	Monoclonal mouse/ polyclonal rabbit	Astrozyten- Marker	1:500/1:100	Chemikon International/ Dako
CD11b/HSV1	Monoclonal mouse/ polyclonal rabbit	Mikroglia/ Makrophagen - marker	1:50/1:100	AbD Serotec/ Dako
NeuN/HSV1	Monoclonal mouse/ polyclonal rabbit	Viruspezifischer Antikörper	1:200/1:100	Chemikon International/ Dako
Ki67/Iba-1	Polyclonal rat/ monoclonal rabbit	Proliferations- Marker/ T-Zell- Marker	1:200/1:500	Dako
Ki67/GFAP	Polyclonal rat/ monoklonal mouse	Proliferations- Marker/ Astrozyten- Marker	1:200/1:500	Dako/ Chemikon International

Tab. 8: Antikörper zur Charakterisierung der Immunfluoreszenzfärbungen

3.1.4 Primer

Im Folgenden werden die verwendeten Primer aufgelistet.

Zytokine	Primer	
	Sense Sequenz	Antisense Sequenz
TNF- α	5'-ATG AGA AGT TCC CAA ATG GCC-3'	5'-ACG TGG GCT ACA GGC TTG TC-3'
IFN- γ	5'-CAG CAA CAG CAA GGC GAA A-3'	5'-GCT GGA TTC CGG CAA CAG-3'
Chemokine		
CXCR3	5'-AAT GCC ACC CAT TGC CAG TAC-3'	5'-AGC AGT AGG CCA TGA CCA GAA G-3'
CXCL9	5'-GCC ATG AAG TCC GCT GTT CT-3'	5'-GGG TTC CTC GAA CTC CAC ACT-3'
CXCL10	5'-GAC GGT CCG CTG TTC T- 3'	5'-GCT TCC CTA TGG CCC TCAT T-3'
CCL2	5'-TGG CTC AGC CAG ATG CAG T-3'	5'-TTG GGA TCA TCT TGC TGG TG-3'
CCL5	5'-CAA GTG CTC CAA TCT TGC AGT C-3'	5'-TTC TCT GGG TTG GCA CAC AC-3'
Haushaltsgen		
GAPDH	5'-TCA CCA GGG CTG CCA TTT GC-3'	5'-GAC TCC ACG ACA TAC TCA GC-3'

Tab. 9: Auflistung der verwendeten Primer

3.1.5 Versuchstiere

Mausstamm (WT): 5 Wochen alte C57Bl/6 Mäuse

Universitätsklinik Münster

Mausstamm (CXCR3-/-):

Universitätsklinik Münster

Generierung und Stammbeschreibung: Hancock, Lu et al. 2000.

3.2 Methoden

Das in der Einleitung formulierte Ziel der Arbeit ist die genaue Charakterisierung des CXCR3-Rezeptors im Verlauf der experimentellen Herpesenzephalitis. Zur detaillierten Beurteilung der Fragestellung sind im Wesentlichen drei Methodenkomplexe erforderlich:

1. Tierexperimentellen Methoden - Etablierung eines HSE-Mausmodells
2. Histologische Methoden - Charakterisierung und Quantifizierung virusspezifischer, sowie immuninflammatorischer Zellen, wie Chemokine im Allgemeinen und dem Chemokin-Rezeptor CXCR3 im Besonderen.
3. Molekularbiologische Analysen mittels Real-Time-PCR

3.2.1 Tierexperimentelle Methoden

3.2.1.1 Etablierung des HSE-Modells

Zur Etablierung des HSE-Mausmodells führten wir zunächst ein Zeitreihen-Experiment ausschließlich mit Wildtyptieren (WT) durch (erstes Zeitreihenexperiment). Zur näheren Charakterisierung der Rolle des CXCR3-Rezeptors in der HSE, verglichen wir anschließend in einem zweiten Zeitreihen-Experiment CXCR3-defiziente Mäuse (CXCR3KO) mit den entsprechenden WT-Tieren.

Zur Durchführung des ersten Zeitreihenexperiments wurde dem WT-Mausstamm intranasal (IN) 10^6 pfu HSV-17 syn+ in 10 μ l in tiefer Anästhesie injiziert. Die Mäuse wurden klinisch beobachtet und zu festgelegten Zeitpunkten (n jeweils = 6), an Tag 3, 5, 6, 7, 8 und 9 nach der Infektion dekapitiert. Die gewonnenen Hirne wurden zur Hälfte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur anderen Hälfte in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) halbfixiert. Die Mausreihe umfasste 25 Mäuse im Alter von fünf Wochen. Darunter drei uninfizierte Kontroll-Tiere (Maus 35A1-3).

Zu jedem festgelegten Zeitpunkt wurden nun jeweils 2-6 Mäuse zu weiteren Untersuchungen dekapitiert (Tab. 10).

Tag	Maus
3	35B1-3
5	1,2,3,4
6	5,6,7,8,16,20
7	9,10,11,13
8	15,17,19
9	12,14

Tab. 10: erstes Zeitreihen-Experiment

Für das zweite Zeitreihen-Experiment standen insgesamt 38 Mäuse zur Verfügung, jeweils 19 WT- und 19 CXCR3KO-Mäuse. Auch in dieser Versuchsreihe wurden die Tiere entsprechend intranasal mit 10^6 pfu des HSV-WT-Virusstammes HSV-17 syn+ in 10µl infiziert, klinisch beobachtet und zu festgelegten Zeitpunkten (Tag 0, 3, 7, 9, 14) geopfert (Tab. 11).

Tag	WT-Tiere	CXCR3KO-Tiere
0	3	3
3	3	3
7	6	6
9	1	-
14	6	7

Tab. 11: zweites Zeitreihenexperiment

Die klinische Beobachtung der Tiere erfolgte mit Hilfe eines klinischen Scores (Tab. 12). Entsprechend dem Schweregrad der jeweiligen Erkrankung, konnten die Symptome quantifiziert werden. Für jeden Tag, an dem eine Maus betroffen war, gab es einen/zwei Punkte, dem jeweiligen Score entsprechend. Für jeden Tag der Genesung wurden die entsprechenden Punkte abgezogen.

Erscheinung:	Normal (0)	Ängstlich/zittrig (1)
Körperhaltung:	Normal (0)	Leicht gekrümmt (1), gekrümmt (2)
Neurologie:	Normal (0)	Anfälle /Krämpfe (2)
Symptome Auge	Normal (0)	Katarakt/Entzündung (1)
Symptome Haut	Normal (0)	Schwellung/Entzündung (1)
Aktivität	Normal (0)	Leicht eingeschränkt, aber spontane Aktivität (1) Sehr eingeschränkt, kaum spontane Aktivität (3)

Tab. 12: klinischer Score

Erkrankte WT-Mäuse		
Tag p.i. (d)	Klinik	Punkte (Score)
d7	ab d5: ängstlich, ab d6 krank	3
d14	d10-d11: Katarakt rechts	2
d14	d9: Entzündung rechts d10: sehr krank, rechte Körperhälfte geschwollen	2
d14	d12: leicht gekrümmte Haltung	1
d14	d8+9: träge d10+11: ängstlich	4
d14	d8: träge, ängstlich d9: rechte Körperhälfte geschwollen d10+d11: rechte Körperhälfte geschwollen, Anfälle, Krämpfe	8
d14	d5: ängstlich d6+7: ängstlich, gekrümmte Haltung d8+9: sehr krank (Präp d9)	7

Tab. 13: klinische Beschreibung der einzelnen WT-Mäuse mit Score-Punktzahl-Bewertung im zeitlichen Verlauf

erkrankte KO-Mäuse		
Tag p.i. (d)	Klinik	Punkte (Score)
d7	ab d6: ängstlich, gekrümmte Haltung ab d7: krank	3
d7	d5+6: krank, zittrig d7: sehr krank	3
d14	d9+10: zittrig	2
d14	d9-11: zittrig	3

Tab. 14: klinische Beschreibung der einzelnen KO-Mäuse mit Score-Punktzahl-Bewertung im zeitlichen Verlauf

3.2.2 Histologische Methoden

Zur Durchführung der histologischen Untersuchungen wurde jeweils eine Hirnhälfte der Mäuse in Paraffin eingebettet, wohingegen die andere Hälfte für die Kryo-Schnitt-Untersuchungen schock-gefroren wurde.

3.2.2.1 Prinzip der immunhistochemischen Färbemethode

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Färbe-Methode handelt es sich zum einen um eine indirekte Immunfluoreszenz-Technik (Gefrier-Schnitte). Dazu bindet ein antigenspezifischer unkonjugierter primärer Antikörper an das Antigen. Um diese Bindung zu visualisieren, wird ein fluoreszenz-markierter, sekundärer Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist, verwendet. Durch die Fluoreszenz-Farbmarkierung kann das Antigen im Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen werden.

Die andere in dieser Arbeit verwendete Färbetechnik (Paraffin-Schnitte) beruht auf der Biotin-(Strept-)Avidin-Methode. Hierzu muss zunächst ein primärer Antikörper spezifisch das nachzuweisende Antigen binden. Darüber hinaus benötigt man einen sekundären Antikörper, der spezifisch an den ersten binden kann und Biotin-gekoppelt ist. Das anschließend verwendete Molekül Streptavidin zeigt eine hohe Affinität ($K_m = 10^{-15}$ M) für Biotin und kann jeweils vier Moleküle binden, wodurch diese Nachweismethode sehr sensitiv ist. Das aus dem Pilz *Streptomyces avidinii* gewonnene Streptavidin-HRP ist ein

peroxidasegekoppelter Avidin-Biotin-Komplex (HRP = Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase). Das HRP-Enzym aus der Wurzel der Meerrettichpflanze besitzt eine eisenhaltige Hämgruppe (Hämatin) als aktives Zentrum und ist in Lösung braun gefärbt. Während der anschließenden Farbreaktion bildet Hämatin zuerst einen Komplex mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und zerfällt anschließend in Wasser (H_2O) und molekularen Sauerstoff (O_2). Das Enzym Peroxidase wird abschließend über ein Chromogen (NovaRed-Reaktion, Vector) sichtbar gemacht.

Diese Methode erlaubt eine vielfache Signalverstärkung bei einer verringerten Hintergrundfärbung (Boenisch, 2003).

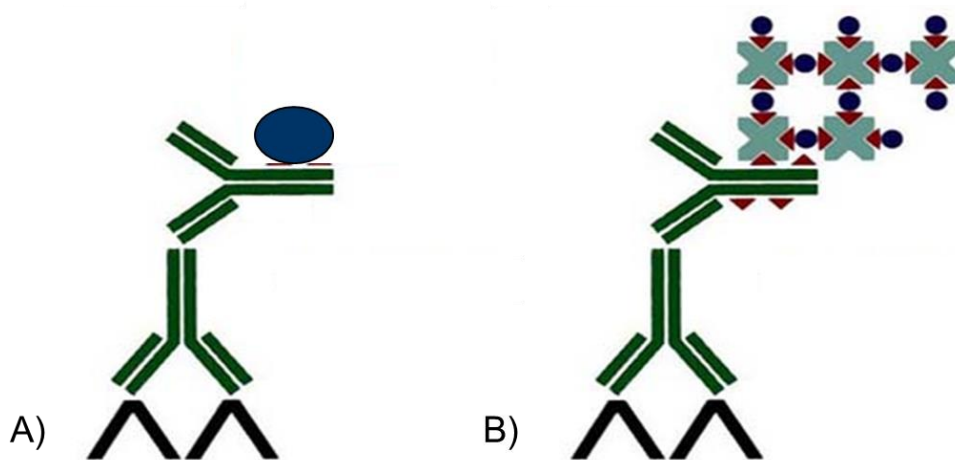


Abb. 5: A) indirekte Immunfluoreszenz-Methode; B) Biotin-Streptavidin-Methode

3.2.2.2 Einbettung der Hirne in Paraffin

Direkt nach der Dekapitierung der Mäuse wurde das Gehirn entnommen und eine Gehirnhälfte (median-sagittal geschnitten) über Nacht in PBS-gepuffertem, 4%igem Paraformaldehyd (PFA, Sigma) bei $4^{\circ}C$ fixiert. Anschließend wurde die Hirnhälfte in PBS ausgewaschen und in Paraffin eingebettet (Tab. 15). Aus dem eingebetteten Gewebe wurden folgend $10\mu m$ dicke Schnitte angefertigt.

Vorteil der Paraffin-Einbettung ist eine gute Erhaltung der zytomorphologischen Details bzw. der Immunlokalisation der Antigene bei minimaler Antigendemaskierung. Der Nachteil ist allerdings der durch die Formalin-Fixierung verursachte Verlust der Immunreaktivität vieler Antigene.

Paraffin-Einbettung nach Behandlung mit 4% PFA		
> Waschen mit 0.2 M PO ₄ - Puffer		3 x 15 min.
>Dehydrierung	50 % Ethanol	30 min.
	70 % Ethanol	30 min.
	85 % Ethanol	30 min.
	96 % Ethanol	30 min.
	100 % Ethanol	2 x 30 min.
>Paraffinisierung	Ethanol + Butanol (3:1)	45 min.
	Ethanol + Butanol (1:3)	45 min.
	Butanol	1 h
	Butanol + Paraffin (3:1)	1 h, 60°C
	Butanol + Paraffin (1:3)	1 h, 60°C
	Paraffin (Schmelzpunkt bei 48°C)	45 min.
	Paraffin (Schmelzpunkt bei 53°C)	45 min.
	Paraffin (Schmelzpunkt bei 58°C)	45 min.
	Härtung bei Raumtemperatur	über Nacht

Tab. 15: Durchführung der Paraffin-Einbettung

3.2.2.3 Durchführung der Immunhistochemie (IHC) für Paraffin-Schnitte

Der immunhistochemische Nachweis von Herpes Simplex mit Hilfe von Herpes Simplex spezifischen Antikörpern (1:100, polyclonal rabbit, Dako) erlaubte die Virus-Lokalisation, sowie die Virus-Ausbreitung zu studieren. T-Zellen wurden durch CD3-Antikörper (1:200, polyclonal rabbit, Dako) nachgewiesen. Mikroglia wurden mithilfe Lectin (1:50, Tomato Lectin, Sigma) angefärbt und GFAP (1:500, monoclonal mouse, Dako) ermöglichte eine Detektion der Astrozyten.

Für die jeweiligen immunhistochemischen Färbungen wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert, nachdem sie zunächst in Xylen deparaffinisiert worden waren. Anschließend folgte ein mehrmaliges

Waschen in PBS. Um die spezifischen Bindungen der primären Antikörper zu reduzieren, inkubierten wir die Schnitte mit 10% BSA für 30 Minuten, was schließlich das Auftragen der Primär-Antikörper (Anti-HSV-1, CD3, Lectin und GFAP) zur Über-Nacht-Inkubation auf die Schnitte ermöglichte. Für den CD3-Antikörper benötigte man einen biotinierten Sekundär-Antikörper (1:200), der nach dreimaligem Waschen mit PBS auf die jeweiligen Schnitte aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach dem Waschen folgte das Auftragen des Streptavidin-gekoppelten HRP (1:200, Invitrogen) für weitere 30 Minuten.

Für die Entwicklung der Färbungen wurde anschließend NovaRed den Herstellerangaben entsprechend aufgetragen.

Nach der Gegenfärbung mit Hematoxylin für eine Minute, wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkohol-Reihe erneut dehydriert und anschließend mit Hilfe des DPX-Mounting-Medium eingedeckt. Die Präparate konnten, nachdem sie ausreichend getrocknet waren, unter dem Durchlicht-Mikroskop (Olympus BX61 oder CX21) betrachtet werden.

Ein detailliertes Protokoll für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen der Paraffin-Schnitte zeigt Tab. 16.

IHC für Paraffin-Schnitte		
Prozess	Zeit	Substanz
1) Entparaffinierung	10 min. (2 x wdh.)	Xylol
	5 min.(2 x wdh.)	100% Ethanol
	5 min. (2 x wdh.)	95% Ethanol
	5 min.	80% Ethanol
	5 min.	50% Ethanol
	3 x	Aqua dest.
	6 x	PBS
2) Blockieren	15-30min.	10% BSA
3) Primärer Antikörper	über Nacht	Primärer Antikörper
4) Waschen	3 x	PBS
5) Sekundärer Antikörper	30-45 min.	Sekundärer Antikörper
6) Waschen	3 x	PBS
7) Signalverstärkung	30-45 min.	StAV-HRP
8) Waschen	3 x	PBS
9) Färbung	10-20 min.	NovaRed
	10 min.	Aqua dest.
	30-90 sek.	Hematoxylin
	3 x	Aqua dest.
10) Dehydrierung	2 min.	50% Ethanol
	2 min.	80% Ethanol
	2 min. (2 x wdh.)	95% Ethanol
	2 min. (2 x wdh.)	100% Ethanol
	10 min (2 x wdh.)	Xylol
11) Eindickmedium		
12) Deckglas		

Tab. 16: Protokoll zur Anfertigung von immunhistochemischen Schnitten auf Paraffin

3.2.2.4 Einbettung der Hirne für Gefrierschnitte

In der Immunhistochemie bieten Gefrierschnitte (Kryostatschnitte) eine viel bessere Erhaltung der Antigene als Paraffinschnitte. Jedoch sind die morphologischen Details bei Gefrierschnitten normalerweise deutlich schlechter erhalten als bei paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten.

Gefrier-Schnitte müssen auf spezielle Weise vorbehandelt werden, um eine Zerstörung des Gewebes, z.B. durch die sich bildenden Eiskristalle zu verhindern. Dafür wurden die Paraformaldehyd-fixierten (s. oben) Gehirnhälften über Nacht in einer 50 %igen Sucrose-Lösung inkubiert, bis die Präparate vollständig durchtränkt waren und aufgrund ihrer Schwere allmählich zu Boden sanken. Anschließend wurden die stabilisierten Hirne in mit Tissue-Tek (Sakura Finetec) gefüllte Plastik-Förmchen gegeben. Diese Förmchen wurden dann in 2-Methylbutan (AppliChem) getaucht und darauffolgend mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Nachfolgend wurden mit Hilfe des Kryostaten 9 µm dicke Schnitte von diesem Kryoblock angefertigt. Ein Kryostat stellt ein Rotationsmikrotom dar, das in einer Gefrierkammer steht. Die Behandlung der Schnitte in der Kryostatkammer und die Aufbewahrung bei -20°C führen zu einem Gefriertrocknungseffekt, der die Gewebsstrukturen zusätzlich stabilisiert. Die Schneidetechnik mit Hilfe des Mikrotoms ermöglicht ein schnelles und schonendes Auffrieren, sodass auch unfixiertes Material verwendet werden kann. Dies ist besonders beim immunhistologischen Nachweis von empfindlichen Antigenen wichtig, da diese durch die Vorbehandlung mit Fixierschritten, Alkohol-Reihen, oder bei der Paraffin-Einbettung auftretenden höheren Temperaturen, zerstört werden können (Boenisch, 2003; von Bohlen und Halbach und Dermietzel, 1999).

3.2.2.5 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung auf Gefrier-Schnitten

Zur Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung wurden die auf Raumtemperatur temperierten Schnitte zunächst für eine halbe Stunde mit 10%igem BSA blockiert um die spezifischen Bindungen der primären Antikörper zu verringern. Anschließend wurden die jeweiligen Primär-Antikörper für eine Über-Nacht-Inkubation aufgetragen. Nach dem mehrmaligen Waschen in PBS benötigte der CD11b-Antikörper eine biotinierte Signalverstärkung (Biotin, Jackson, 1:150). Als nächster Schritt erfolgte das Auftragen der fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper (Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 488,

Invitrogen, 1:150) für jeweils 45 Minuten. Nach erneutem Waschen mit PBS und destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit einem speziellen Eindeckmedium für Fluoreszenz-Färbungen (Immu-Mount (Thermo-Fischer) mit DAPI (Sigma-Aldrich) versetzt, 1:1000) eingedeckt.

Die Immunfluoreszenzfärbungen dienen vor allem der Kolo-kalisation. So wurde auf den 9 µm dicken Kryoschnitten mit Hilfe der entsprechenden Antikörper eine Doppelfärbung mit dem Herpes Antikörper HSV1 (Dako) durchgeführt: NeuN (Chemikon International) färbt dabei spezifisch Neurone, GFAP (Chemikon International) ist ein Astrozytenmarker und CD11b (AbD Serotec) weist Mikroglia bzw. Makrophagen nach.

Immunfluoreszenz-Färbung für Kryo-Schnitte	
10 min.	Auftauen der Präparate
30 min.	10% BSA
über Nacht	Primär-Antikörper
3x	PBS
45 min.	evtl. Biotin
3x	PBS
45 min.	Sekundär-Antikörper
3x	PBS
1x	Aqua dest.
-	Eindeckmedium
	Deckglas

Tab. 17: Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung auf Gefrierschnitten

3.2.2.6 TUNEL-Färbung

Bei der TUNEL-Färbung handelt es sich um einen indirekten, in situ-TUNEL-Markierungs-Versuch, der auf der Detektion von DNA-Doppelstrang-Brüchen in apoptotischen Zellen beruht und unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden kann.

DNA-Degradierung und Fragmentierung ist charakteristisch für das späte Apoptose-Stadium. DNA-Bruchstücke enthalten sowohl niedermolekulare Doppel-Strang-DNA als auch einzelsträngige hochmolekulare DNA. Diese DNA-Strang-Brüche können durch

eine Enzym-Markierung der freien 3'-OH-Termini mit modifizierten Nukleotiden (z.B. X-dUTP, X = Biotin) detektiert werden. Übliche Enzym-Markierungen beinhalten DNA-Polymerase zur Detektion von Strangbrüchen und terminale deoxynucleotidyl Transferase (TdT) als End-Markierung. Diese End-Markierungs-Methode wird auch als TUNEL (TdT-mediated X-dUTP nick end labeling) bezeichnet und ermöglicht einen hoch-sensitiven Apoptose-Nachweis im Gewebe und in einzelnen Zellen.

Falls freie 3'-Enden der DNA mit biotiniliertem dUTP markiert sind, kann das gebundene Nukleotid in einem zweiten Inkubationsschritt mit Strept-Avidin detektiert werden. Dieser Immunkomplex ist leicht visualisierbar, wenn das Strept-Avidin an eine Peroxidase gekoppelt ist, die nach der Entwicklung eine Farbreaktion zeigt.

Diese Enzymmarkierung erlaubt die Detektion eines apoptotischen Ereignisses, noch bevor es zu morphologischen Zell-Veränderungen kommt und sogar bevor DNA-Fragmente im Zytoplasma nachweisbar sind.

3.2.2.7 Durchführung der TUNEL-Färbung auf Paraffin-Schnitten

Für diese Färbungen wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert, nachdem sie zunächst in Xylol deparaffinisiert worden waren.

Nach dem dreimaligen Waschen in PBS folgte das Kochen der Schnitte in einem 0,1 M Citratpuffer bei 95° C über 30 Minuten, was der Antigendemaskierung diente und die Zellen für die TUNEL-Reaktion zugänglicher machte. Anschließend wurden die Schnitte abgekühlt, erneut in PBS gewaschen und mit dem TUNEL-Mix, bestehend aus der Enzym-Solution, der Label-Solution und einem TUNEL-dilution-Puffer (1:200) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das darin enthaltene TdT katalysiert die Bindung des Fluoreszein-dUTP (ebenfalls darin enthalten) zum freien 3'-OH-Ende der DNA. Zur Blockade der unspezifischen Antikörper-Bindungen wurden die Schnitte nach wiederholtem Waschen für 45 Minuten mit 10%igem BSA blockiert. Darauf folgte eine Inkubation der Schnitte für 30 Minuten bei 37°C mit einem Converting-POD (1:4), der an das DNA-gebundene Fluoreszein bindet und anschließend durch die enthaltene Peroxidase über ein Chromogen sichtbar gemacht wurde, was in der nachfolgenden NovaRed-Reaktion erfolgte. Nach der Gegenfärbung mit Hematoxylin für eine Minute, wurden die Schnitte in der aufsteigenden Alkohol-Reihe erneut dehydriert und

anschließend mit Hilfe des DPX-Mounting-Medium eingedeckt. Die Präparate konnten, nach ausreichendem Trocknen, unter dem Durchlicht-Mikroskop (Olympus BX61 oder CX21) betrachtet werden. Die Durchführung ist in Tab. 18 zusammengefasst.

TUNEL-Färbung auf Paraffin-Schnitten		
1) Entparaffinierung	10 min. (2 x wdh.)	Xylol
	5 min. (2 x wdh.)	100% Ethanol
	5 min.(2 x wdh.)	95% Ethanol
	5 min.	80% Ethanol
	5 min.	50% Ethanol
	3x	PBS
2) TUNEL-Methode	60 min.	TUNEL-Mix (37°C)
	3x	PBS
	45 min.	10% BSA
	30 min.	Converter Pod (1:4, 37°C)
	3x	PBS
3) Färbung	10-20 min.	NovaRed
	10 min.	Aqua dest.
	30-90 sec.	Hematoxylin
	3x	Aqua dest.
4) Dehydrierung	2 min.	50% Ethanol
	2 min.	80% Ethanol
	2 min. (2 x wdh.)	95% Ethanol
	2 min. (2 x wdh.)	100% Ethanol
	10 min. (2 x wdh.)	Xylol
	5) Eindickmedium	
6) Deckglas		

Tab. 18 Protikoll zur Durchführung der TUNEL-Färbung auf Paraffin-Schnitten

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

Für diesen Teil der Experimente wurde RNA aus den Mäusehirnen extrahiert und anschließend in cDNA umgeschrieben, mit deren Hilfe im Folgenden die quantitative Real-Time-PCR durchgeführt werden konnte.

3.2.3.1 Quantitative Real-Time-PCR

Bei der quantitativen Real-Time-PCR handelt es sich um eine Vervielfältigungs-Methode für Nucleinsäuren, die zusätzlich auch die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht.

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase-chain-reaction, PCR) kann jede Nucleinsäure-Sequenz in einem thermo-zyklischen Prozess amplifiziert werden, um eine große Anzahl an identischen Kopien zu erhalten und diese auch zu analysieren. Für diese Reaktion benötigt man eine DNA-Sequenz (zuvor generierte cDNA), eine hitzestabile Polymerase, Magnesium-Ionen zur DNA-Stabilisierung, sowie zwei Oligonucleotid-Primer (Desoxyribonucleosidtriphosphate, dNTPs), welche die jeweilige DNA-Sequenz flankieren und für die DNA-Amplifizierung zuständig sind.

Die quantitative Real-Time-PCR läuft in einem 40-zykligen Prozess ab, der durch ständige Temperaturveränderungen geprägt ist. Zunächst wird über 10 Minuten die Temperatur auf 95°C hochgefahren. Diese hohe Temperatur bewirkt die Denaturierung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge, die im nächsten Schritt (Abkühlung auf 60°C) mit Primern versehen werden können. Nach dem anfänglichen Aufheizen folgt der 40-zyklige Prozess, wobei jeweils 15 Sekunden bei 95°C zur Denaturierung der neu-synthetisierten DNA benötigt werden und die Temperatur anschließend eine Minute auf 60°C heruntergefahren wird, um die Anlagerung der Primer und die Extension der Nucleinsäuren zu ermöglichen (Abb. 6). Die Menge der auf diese Weise amplifizierten Produkte kann während der Reaktionszeit mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen beurteilt werden, die in die Reaktion integriert sind und deren Signal proportional zur Menge der gebildeten Produkte ist. So wird die Anzahl der Amplifikationszyklen, die notwendig ist um eine bestimmte DNA-Menge (Schwellenwert-Level) zu erhalten, registriert. Zu Beginn der Zyklen ist das Signal noch zu schwach und kann nicht vom Hintergrund unterschieden werden. Die Menge der Endprodukte akkumuliert aber im

weiteren Verlauf der Reaktion, so dass das Signal exponentiell ansteigt und bei ca. 10^8 Amplikon-Kopien ein Plateau erreicht. Diese Signal-Sättigung kommt dadurch zustande, dass störende Einflüsse hinzukommen. Zum Beispiel können Primer oder Nucleotide knapp werden, oder diese werden durch die anhaltend hohen Temperaturen zerstört.

Die Zahl der Zyklen, die benötigt werden um ein bestimmtes Schwellenwert-Level zu erreichen, heißt Ct-Wert (Ct = Threshold cycle).

Fluoreszenz-Farbstoffe sind eine übliche Detektions-Methode in der Real-Time-PCR. Einer dieser Farbstoffe ist SYBR-Green, ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff. Dieser hat zwei aromatische Systeme, die jeweils ein Nitrogen enthalten und durch eine Methinbrücke verbunden sind. SYBR-Green bindet nur an doppelsträngige DNA, was zur Bildung eines DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexes führt. Dabei kommt es zur Rotation um die Methin-Brücke, die zu einer Änderung des Emissionmaximums führt, sodass bei einer Wellenlänge von $\lambda = 494$ nm blaues Licht absorbiert, und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 521$ nm grünes Licht emittiert wird.

In freier Lösung zeigt SYBR-Green kein Fluoreszenzsignal, da die Schwingungen der beiden aromatischen Systeme von elektrischer Erregungs-Energie direkt in Hitze umgewandelt werden, die in der umgebenden Lösung verschwindet (Newton und Graham, 1994)

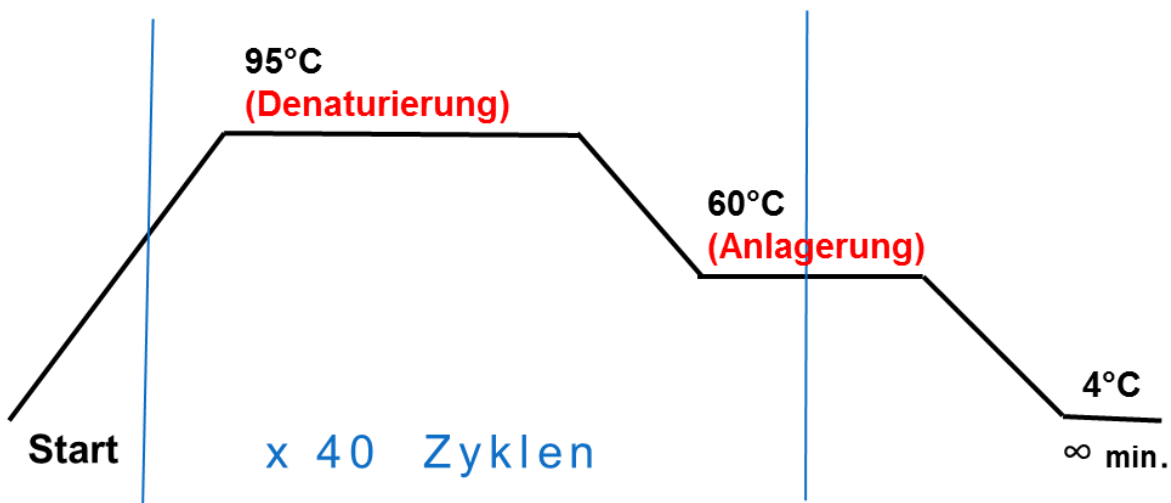


Abb. 6: Ablauf der quantitativen Real-Time-PCR

3.2.3.2 Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR dient dazu die Menge der vorhandenen Zytokine und Chemokine im Verhältnis zur vorhandenen mRNA-Menge zu bestimmen.

Zu Beginn erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA aus den jeweiligen Mäuse-Hirnen mit Hilfe von Trizol (AG Kühn, Universitäts-Klinikum Münster, Virologie). Bei der Gesamt-RNA handelt es sich um ein Gemisch unter anderem aus ribosomaler RNA, Transfer-RNA und messenger-RNA (mRNA), wobei die mRNA daran nur einen Anteil von ca.2 % ausmacht, was für die meisten Anwendungen allerdings ausreichend ist. Entsprechend der unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen verwendeten Proben, wurde eine bestimmte Menge der Gesamt-RNA daraufhin mit Hilfe einer RevertAid™ M-MuLV Reversen Transkriptase (Fermentas cDNA-Kit) revers zu cDNA transkribiert. cDNA steht für complementary DNA und ist das Ergebnis eines Umkehrprozesses, der es ermöglicht mit Hilfe einer viralen Reversen Transkriptase die cDNA aus RNA zurück zu erhalten. Mit der so gewonnenen cDNA konnte im nächsten Schritt die quantitative Real-Time-PCR durchgeführt werden. Hierzu verwendete man einen SYBR-Green-Master-Mix, bestehend aus 12,5 µl SYBR-Green, 8,8µl Wasser und jeweils 1µl entsprechende Sense- und Anti-Sense-Primer (Tab. 9), zu dem anschließend 1,7 µl cDNA, korrespondierend zu 900ng Gesamt-RNA, hinzupipettiert wurden.

Die Proben wurden simultan für die mRNA-Levels der verschiedenen Zytokin- und Chemokin-Targets sowie der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, einem Haushaltsgen als interne Kontrolle) analysiert. Dabei wurden mit Hilfe der StepOne-Software quantitative Werte von separaten Standard-Kurven extrapoliert. Jede Probe wurde im Duplett analysiert und anschließend im Verhältnis zu GAPDH normalisiert, indem man die Replikations-Ct-Mittelwerte der GAPDH-Expression von den Ct-Mittelwerten der Gen-Targets subtrahierte.

3.2.4 Statistische Auswertungen

Zur statistischen Analyse der histologischen Daten wurden semiquantitative Auszählungen der positiv angefärbten Zellen pro Schnitt unternommen. Dabei wurde je Tier ein kompletter und korrespondierender Sagittalschnitt des gesamten Gehirns berücksichtigt. Mittels T-Test wurden die quantitativen Analysen auf ihre Signifikanz geprüft. Als signifikant wurde ein Ergebnis angesehen, das einen p-Wert von < 0.05 aufzeigte. Die angegebenen Fehlerbalken beziehen sich jeweils auf den Standardfehler des Mittelwertes (SEM = Standard error of the mean). Als Software diente GraphPad Prism.

Molekularbiologische Ergebnisse wurden mit Hilfe der StepOne-Software analysiert, wobei quantitative Werte von separaten Standard-Kurven extrapoliert wurden.

4. Ergebnisse

4.1 Das HSE-Mausmodell

In einem ersten Zeitreihen-Experiment (über neun Tage) etablierten wir zunächst ein HSE-Mausmodell unter ausschließlicher Verwendung von WT-Tieren. Als Infektionsroute wählten wir die intranasale Infektion.

Histopathologisch wurde die Virusausbreitung, sowie eine korrespondierende Gewebezerstörung in den verschiedenen Hirnarealen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten beurteilt. Mittels Immunfluoreszenz-Färbung konnte die Kolo-kalisation der herpesviralen Infektion genauer beurteilt werden. Darüber hinaus dienten molekularbiologische Untersuchungen der Charakterisierung der virusbedingten inflammatorischen Reaktion. Zur Untersuchung der Rolle des CXCR3-Rezeptors in der HSE verglichen wir in einem zweiten Experiment (über 14 Tage) den Verlauf der HSE in CXCR3-defizienten Mäusen mit den entsprechenden WT-Tieren.

Vor allem zu späteren Untersuchungszeitpunkten nach der Infektion konnten sowohl klinische Beobachtungen der entsprechenden Tiere, als auch histopathologische Untersuchungen und Viruslast-Studien Unterschiede zwischen WT- und KO-Tieren nachweisen.

4.1.1 Der intranasale Infektionsweg

Anstelle der in bisherigen Studien meist verwendeten kornealen Infektion, wählten wir eine intranasale Infektionsroute. Dieses Verfahren erwies sich als schonender für die Tiere, die insgesamt eine relativ niedrige Mortalität aufwiesen: lediglich drei der insgesamt 38 infizierten Mäuse erkrankten durch die Infektion so stark, dass sie vor ihrem vorgesehenen Termin an Tag 14 p.i. getötet werden mussten. Durch den von uns gewählten Infektionsweg konnte zudem vor allem die Anzahl an belastenden Begleitsymptomen, wie schwerwiegende Entzündungen der Augen gesenkt werden. So war eine Katarakt bei nur einem Versuchstier nachweisbar. Zwei der infizierten Mäuse wiesen eine geschwollene rechte Körperhälfte auf. Alle übrigen Versuchstiere zeigten - wenn überhaupt- erst im späteren Krankheitsverlauf systemische klinische Symptome.

4.2 Beschreibung des HSE-Modells in WT-Mäusen

Die histopathologischen Untersuchungen dienten der Charakterisierung der Virusausbreitung in den verschiedenen Hirnarealen, sowie der Beurteilung korrespondierender Gewebeerstörung und der Apoptose. Außerdem konnten mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Mehrfachfärbungen die Virus-infizierten Zelltypen detektiert werden. Verwendet wurde hierfür das entsprechende Hirn-Gewebe aus dem ersten WT-Zeitreehen-Experiment.

4.2.1 Gewebeerstörung durch herpesvirale Infektion

Mit Hilfe von entsprechenden Serienschnitten wurde in korrespondierenden Routinefärbungen (HE) deutlich, dass in den Gewebeabschnitten mit erheblicher herpesviraler Infektion eine starke Gewebeerstörung vorliegt (Abb. 7).

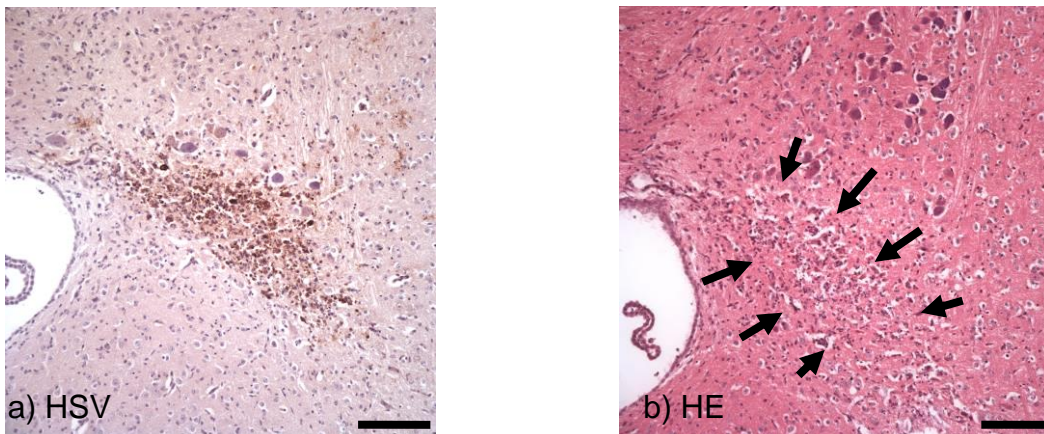


Abb. 7: WT, Tag 9 p.i.: Gewebeerstörung [b)] an den Orten der herpesviralen Infektion [a)]. Maßstab 100µm

Durch die histologische Analyse ließ sich jedoch nicht klären, ob die Gewebeerstörung viral oder immunvermittelt bedingt ist, da entsprechende Areale ebenfalls eine erhöhte mikrogliale Aktivierung, sowie eine große T-Zell-Invasion aufzeigten (Abb. 8).

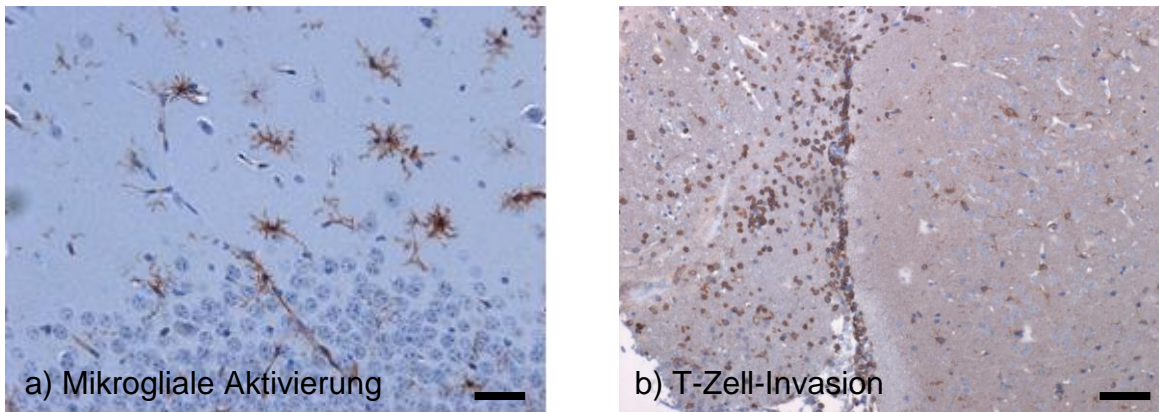


Abb. 8: Immunabwehrreaktion: a) mikrogliale Aktivierung, b) T-Zell-Invasion. Maßstab a) 20µm, b) 40µm

Daneben zeigte sich in den mit HSV befallenen Arealen auch eine gesteigerte Apoptose-Rate. Diese konnte histologisch mit Hilfe der TUNEL-Färbung nachgewiesen werden. TUNEL-positive Zellen weisen eine Kern-Kondensierung auf, bzw. je nach Zeitpunkt der Apoptose auch eine Kern-Fragmentierung (Abb. 9).

Die TUNEL Färbung belegt, dass das Virus in der Lage ist die Apoptose in der Wirtszelle zu induzieren, da sich apoptotische Zellen, verglichen mit dem Serienschnitt, am gleichen Ort wie die mit Herpes infizierten Zellen befinden. Dies gilt nicht nur für die regionale Ebene (Abb. 10), sondern auch für die zelluläre Ebene (Abb. 11).

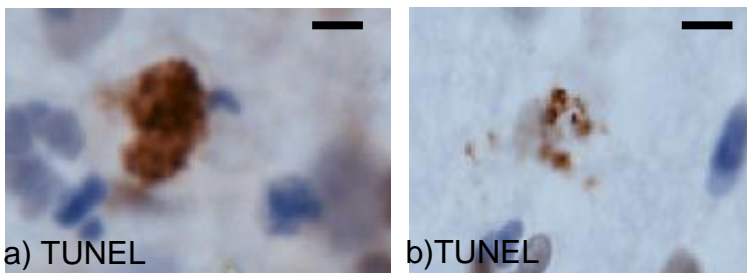


Abb. 9: apoptotische TUNEL-positive Zellen; a) Kern-Kondensierung, b) Kernfragmentierung im Rahmen der Apoptose. Maßstab 10µm

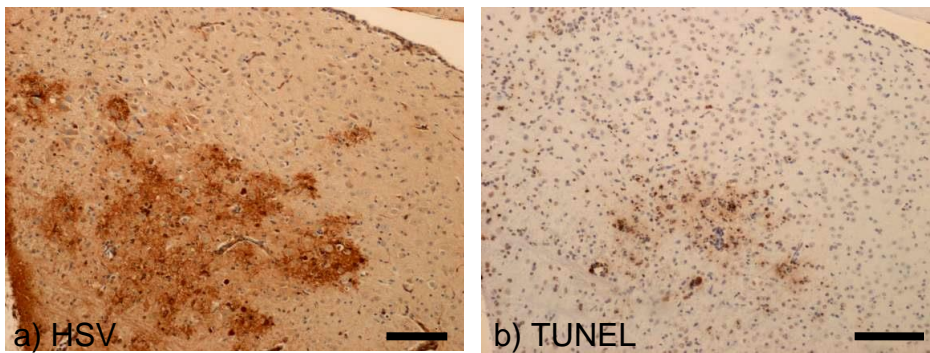


Abb. 10: Ein herpesinfiziertes Areal [a)] weist apoptotische Zellen auf [b)]. Maßstab 100µm

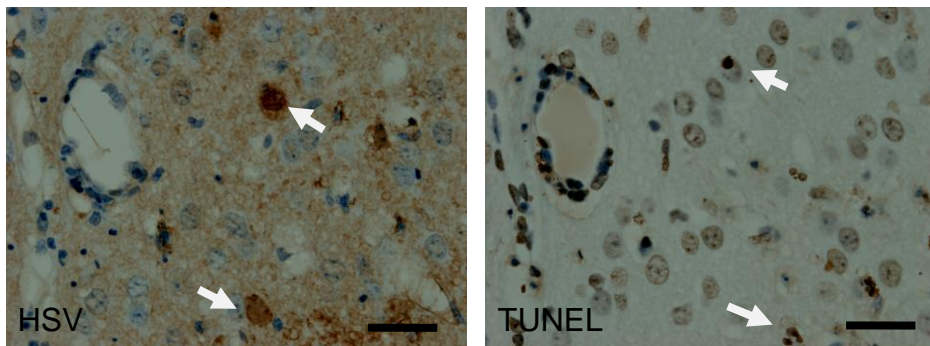


Abb. 11: zelluläre Ebene: herpesinfizierte Neurone weisen eine Kernkondensierung als Zeichen einer Apoptose auf. Maßstab 20µm

4.2.2 Immunantwort der infizierten WT-Tiere

Ebenfalls mit der Hilfe von 10 µm dicken Paraffin-Serienschnitten konnte die Immunreaktion in WT-Mäusen genauer beobachtet werden. Dabei wurde deutlich, dass sich an Stellen der herpseviralen Infektion auch eine vermehrte Immunreaktion mit einer Mikroglia-, Makrophagen-Infiltration, sowie einer T-Zell-Invasion darstellte.

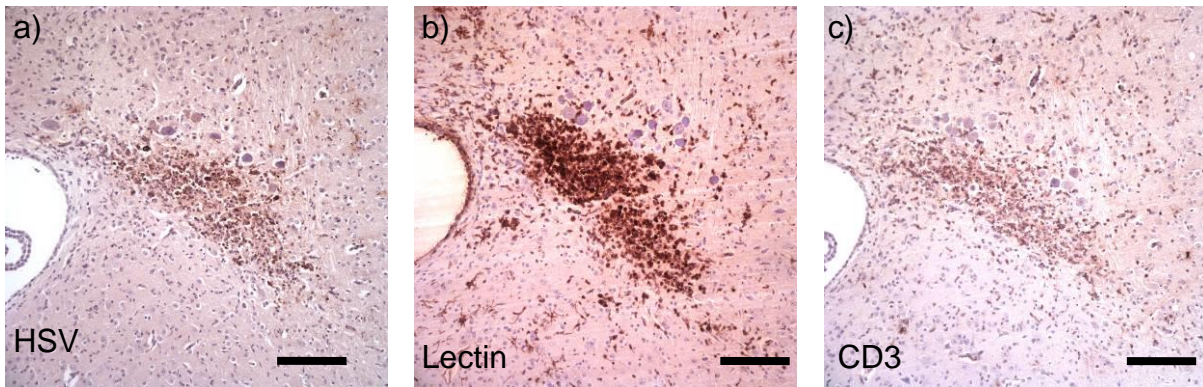


Abb. 12: a) WT-Tier, HSV: herpesvirale Infektion; b) Lectin: Mikroglia-Makrophagen-Infiltration; c) CD3: T-Zell-Infiltration. Maßstab 100µm

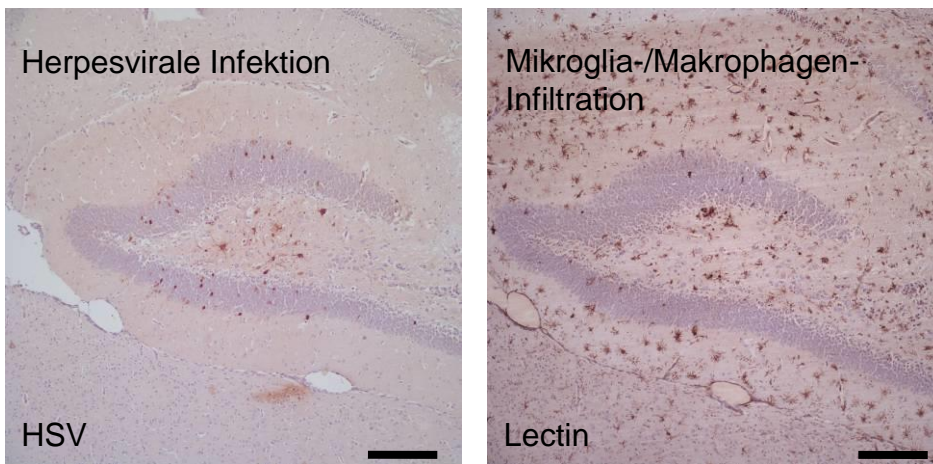


Abb.13: WT-Tier: Hippocampus. Massive Makrophagen-Infiltration in der Umgebung der herpesviralen Infektion. Maßstab 100µm

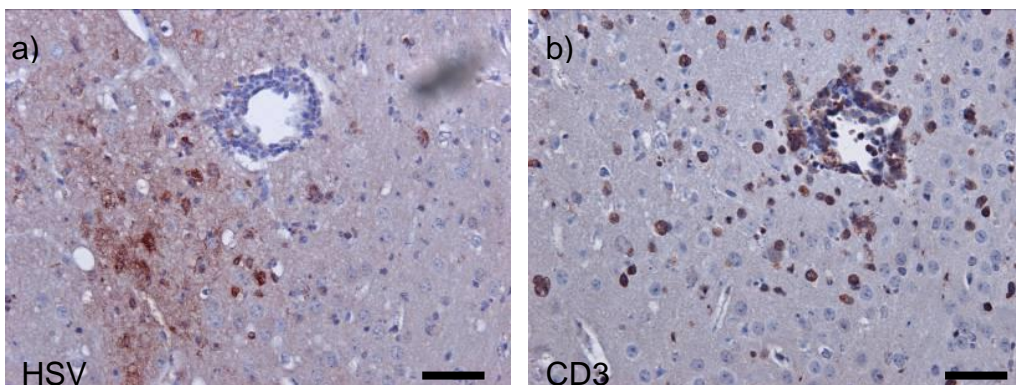


Abb. 14: WT-Tier, Gefäßanschnitt. T-Zell-Infiltration [b]) im Areal des Virusbefalls [a)]. Maßstab 50µm

4.2.2.1 Zeitlicher Verlauf der Immunantwort

Semiquantitative Analysen der Immunzellen machten deutlich, dass die T-Zell-, Makrophagen-, sowie Astrozyten-Infiltration einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie die herpesvirale Infektion aufzeigten. Bis zum sechsten Tag p.i. war eine stetige Zunahme an infizierten Zellen zu verzeichnen. Anschließend wurde die Anzahl infizierter Zellen geringer. Die Reaktion der immunvermittelten Abwehr-Zellen stellte sich zeitversetzt, nach der viralen Ausbreitung dar. T-Zellen, Makrophagen, sowie Astrozyten erreichten das Maximum ihrer Infiltration am siebten Tag p.i. Bis zu diesem Zeitpunkt nahm die Anzahl der immunreaktiven Zellen stetig zu. Nach dem siebten Tag war die Anzahl der T-Zellen, Makrophagen, sowie Astrozyten kontinuierlich abnehmend. Pro Tier wurde ein kompletter und korrespondierender Teilschnitt des gesamten Gehirns ausgewertet.

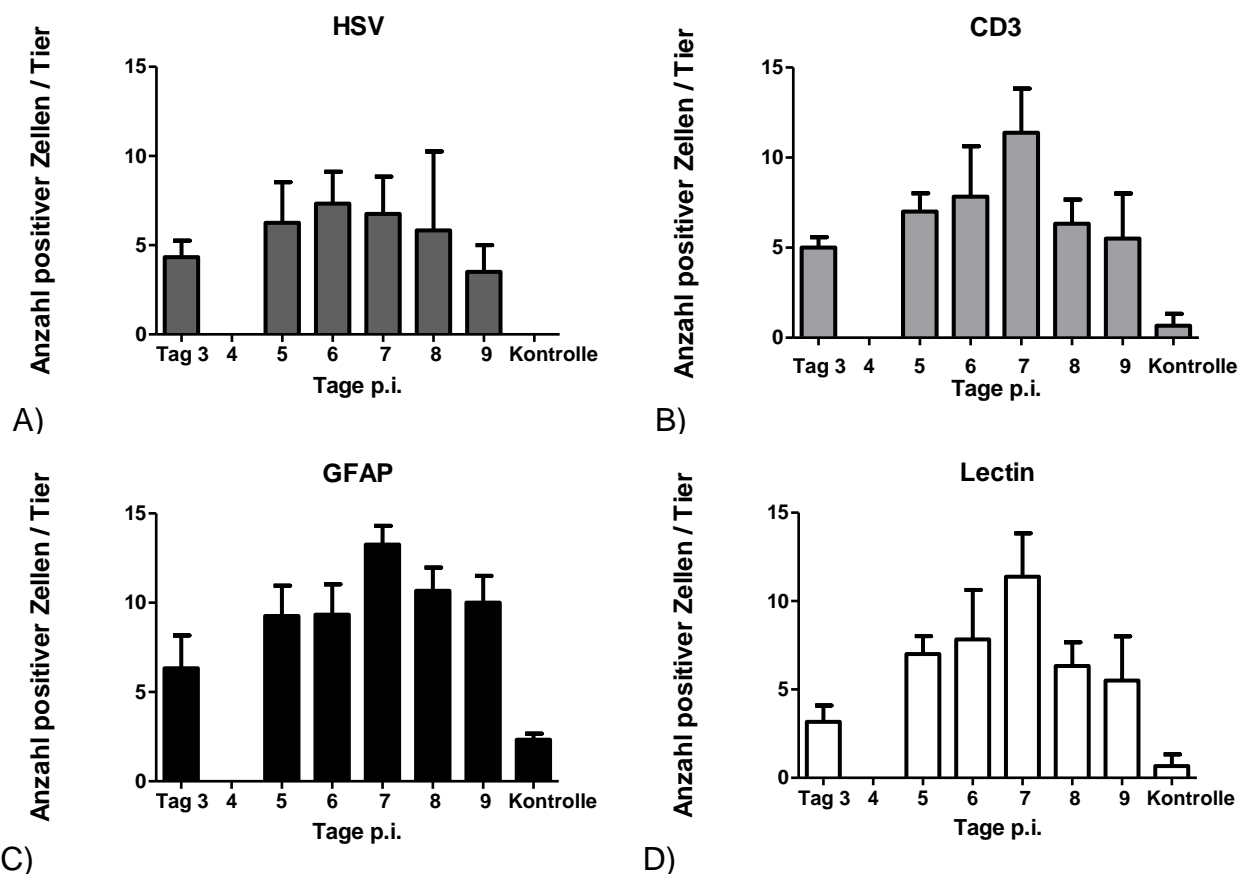


Abb. 15: zeitlicher Verlauf der Immunreaktion [B)-D)] im Vergleich zum herpesviralen Befall [A)]. Das Maximum der Virusinfektion wurde an Tag 6 p.i. erreicht, wohingegen T-Zellen [CD3, B)], Astrozyten [GFAP, C)], sowie Mikroglia [Lectin, D)] erst am siebten Tag p.i. ihr Maximum an inflammatorischen Zellen erreichten. (An Tag 4 wurden keine Daten erhoben). Anzahl der Tiere n = 2-6

4.2.2.2 Räumliche Ausbreitung der Immunreaktion

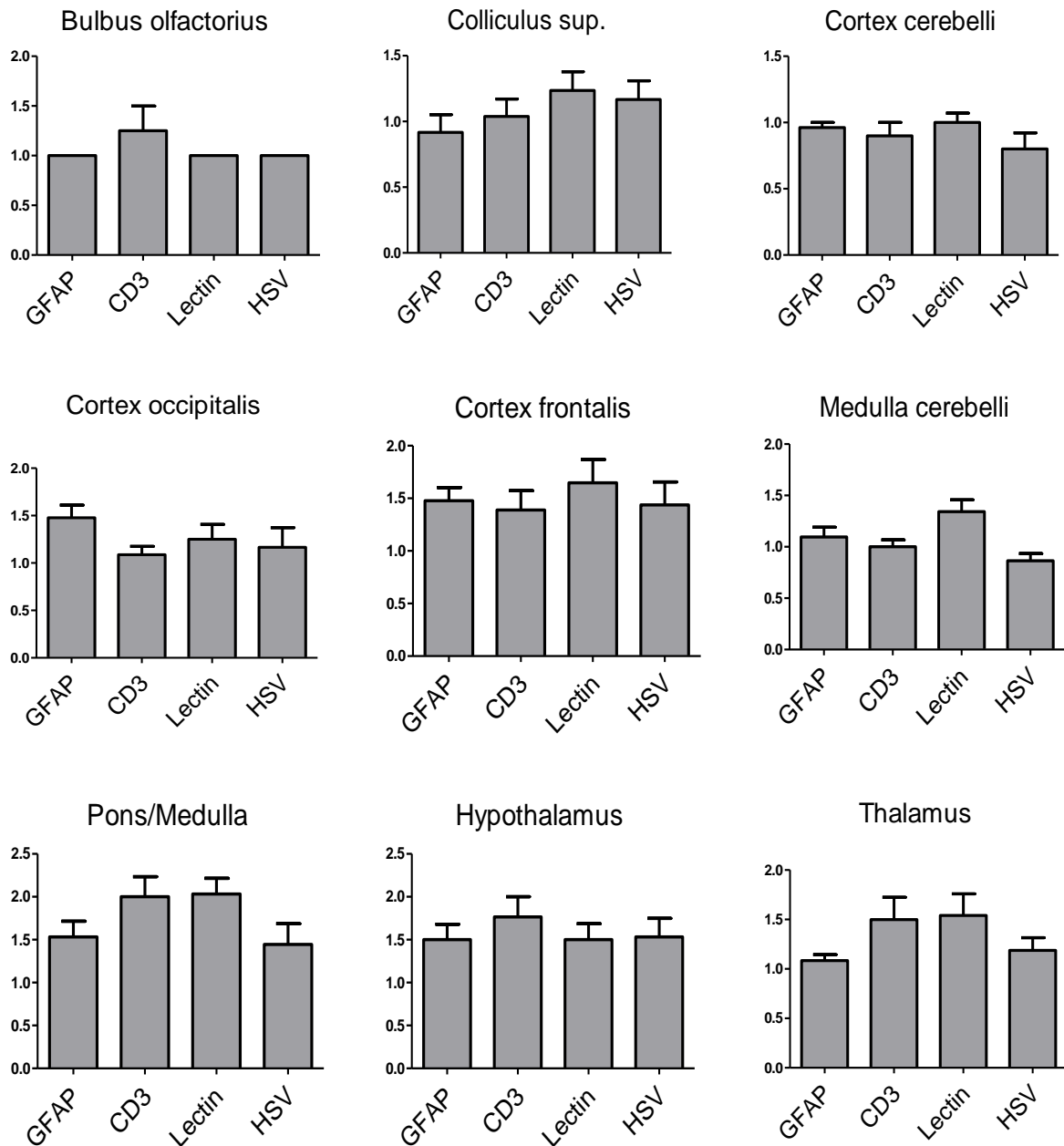


Abb. 16: Räumliche Ausdehnung der Astrozyten (GFAP), T-Zellen (CD3) und der Mikroglia (Lectin) im Vergleich zu den HSV-infizierten Zellen in den verschiedenen Hirnarealen. y-Achse: Anzahl positiver Zellen pro Tier; n = 2-6.

Betrachtete man die räumliche Ausbreitung der Immunzellen in den verschiedenen Hirnarealen, fielen unterschiedliche Verteilungsmuster auf. In den meisten Hirnarealen (Hypothalamus, Cortex frontalis et occipitalis, Cortex et Medulla cerebelli, Bulbus

olfactorius und Colliculus superior) fand sich eine ähnlich große Anzahl aller beobachteten Zellen. Dagegen zeigten sich im Thalamus, sowie in der Pons/Medulla-Region verhältnismäßig mehr T-Zellen (CD3) und Mikroglia (Lectin).

4.2.3 Kolokalisation - Das Herpesvirus befällt hauptsächlich Neurone, aber auch Astrozyten und Mikroglia

Auf zellulärer Ebene ist nachzuweisen, welche Zellen durch das Virus infiziert werden. Hierzu wurden Kolokalisationen mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die entsprechenden Doppelfärbungen mit dem Herpes-Antikörper HSV1 (Dako) und NeuN (Chemikon International) konnten spezifisch virusbefallene Neurone nachweisen, GFAP (Chemikon International) zeigte infizierte Astrozyten auf und CD11b (AbD Serotec) wies in der Doppelfärbung befallene Mikroglia bzw. Makrophagen nach. Diese spezifischen Immunfluoreszenzfärbungen ergaben, dass die Herpesviren sich weitgehend in den Neuronen befinden, gelegentlich aber auch Astrozyten und Mikroglia befallen (Abb. 17).

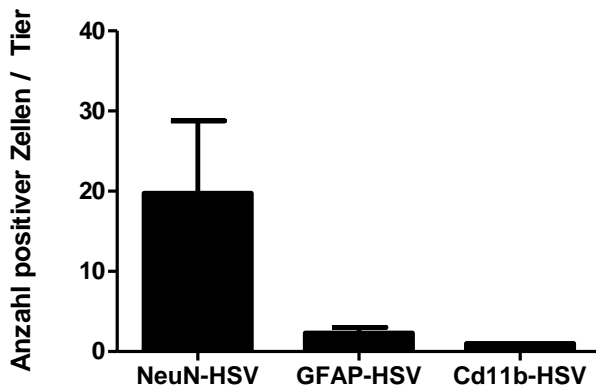


Abb. 17: semiquantitative Bewertung der Anzahl vom Virus befallener Zellen (angefärbte Zellen pro Schnitt, Anzahl der Tiere n = 2-6)

Vom Bildaspekt her zeigten sich befallene Neurone in den bereits beschriebenen clusterförmigen Arealen, wohingegen befallene Mikroglia/Makrophagen, sowie infizierte Astrozyten nur vereinzelt vorkamen.

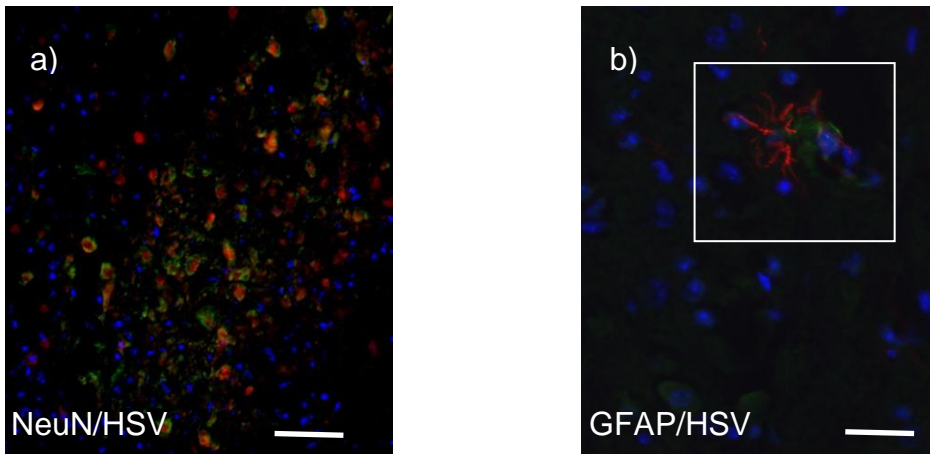


Abb. 18: Clusterförmiger Befall der Neurone, wobei Astrozyten nur vereinzelt befallen sind. (HSV = grün, GFAP/NeuN = rot, DAPI-Kernfärbung = blau) Maßstab; a) 40 μ m, b)10 μ m

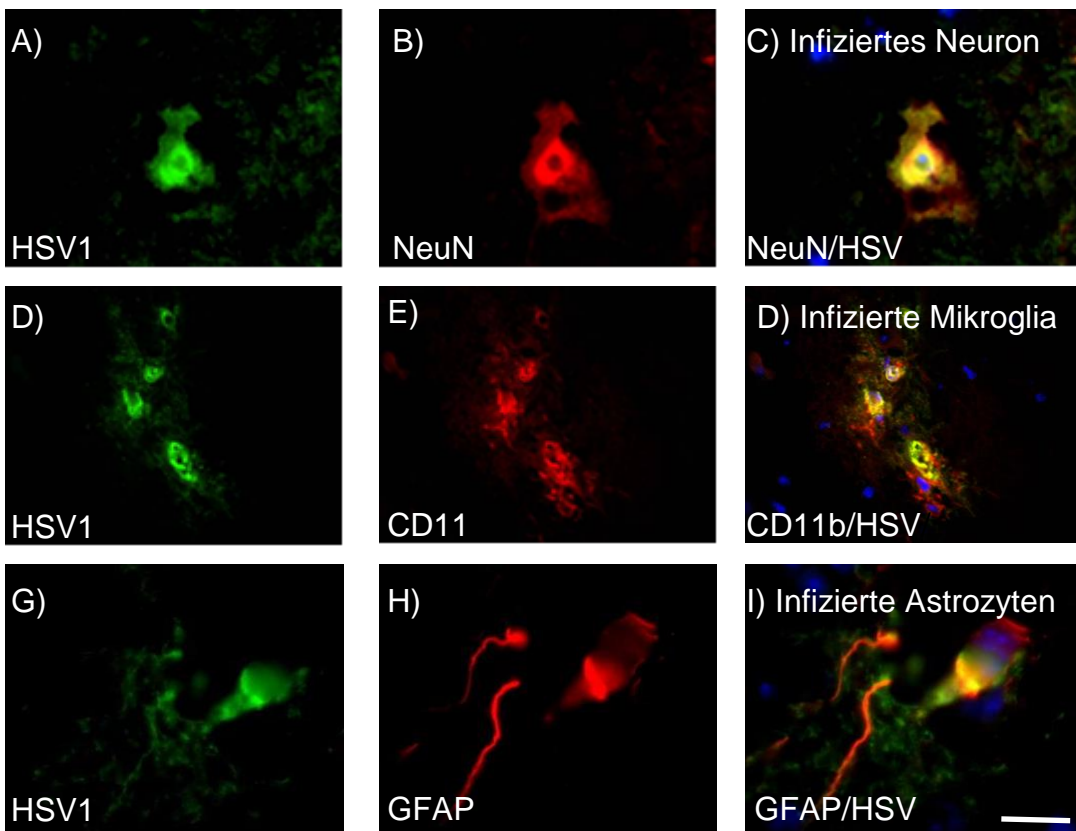


Abb. 19: Kolokalisation virusbefallener Zellen in WT-Mäusen auf 8 μ m dicken Kryoschnitten. Der Herpes Antikörper HSV1 stellt den Virusbefall dar, NeuN färbt spezifisch Neurone, GFAP ist ein Astrozytenmarker und CD11b weist Mikroglia bzw. Makrophagen nach. Durch die Doppelfärbung mit dem HSV1 Antikörper [A), D), G)] gelingt der Nachweis infizierter Neurone [C)], virusbefallener Mikroglia [F)], sowie infizierter Astrozyten [I)]. Maßstab 10 μ m

4.2.4 Molekularbiologische Analysen der WT-Tiere

Zur systematischen Beurteilung der neuroinflammatorischen Reaktion wurde neben der histologischen Begutachtung auch die Bestimmung von relevanten Zytokinen mittels Real-Time-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der auf diese Weise durchgeführten Zytokinanalysen bestätigten dabei die vorher gewonnenen histologischen Daten.

Passend zum bisher beschriebenen Infektionsverlauf erfolgte auch die Expression des CXCR3-Rezeptors. Bis zum siebten Tag p.i. kam es zu einem stetigen Anstieg der Expression. Anschließend wurden reduzierte Mengen der Chemokinrezeptor-RNA nachgewiesen.

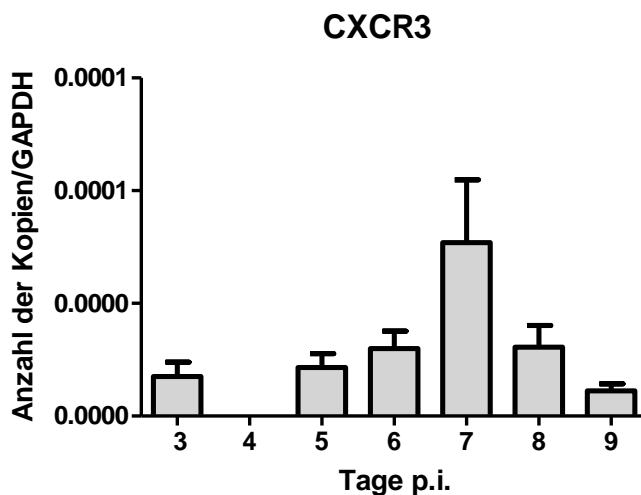


Abb. 20: Expressionsmuster des CXCR3-Rezeptors. Stetiger Anstieg der Rezeptor-Expression bis zu Tag 7 p.i. Anschließend abnehmende Expression. (An Tag 4 wurden keine Daten erhoben)

Eine ähnliche Entwicklung des RNA-Expressionsmusters zeigten auch die anderen untersuchten Chemokine: nach einem stetigen Anstieg erreichte die Chemokin-Expression am siebten Tag p.i. ihr Maximum. Anschließend nahm die Chemokin-synthese mit Ausnahme der CXCL10-Produktion wieder ab. Am neunten Tag p.i. war bei allen untersuchten Chemokinen ein deutlich geringeres Expressionsniveau festzustellen als bei den uninfizierten Kontrolltieren.

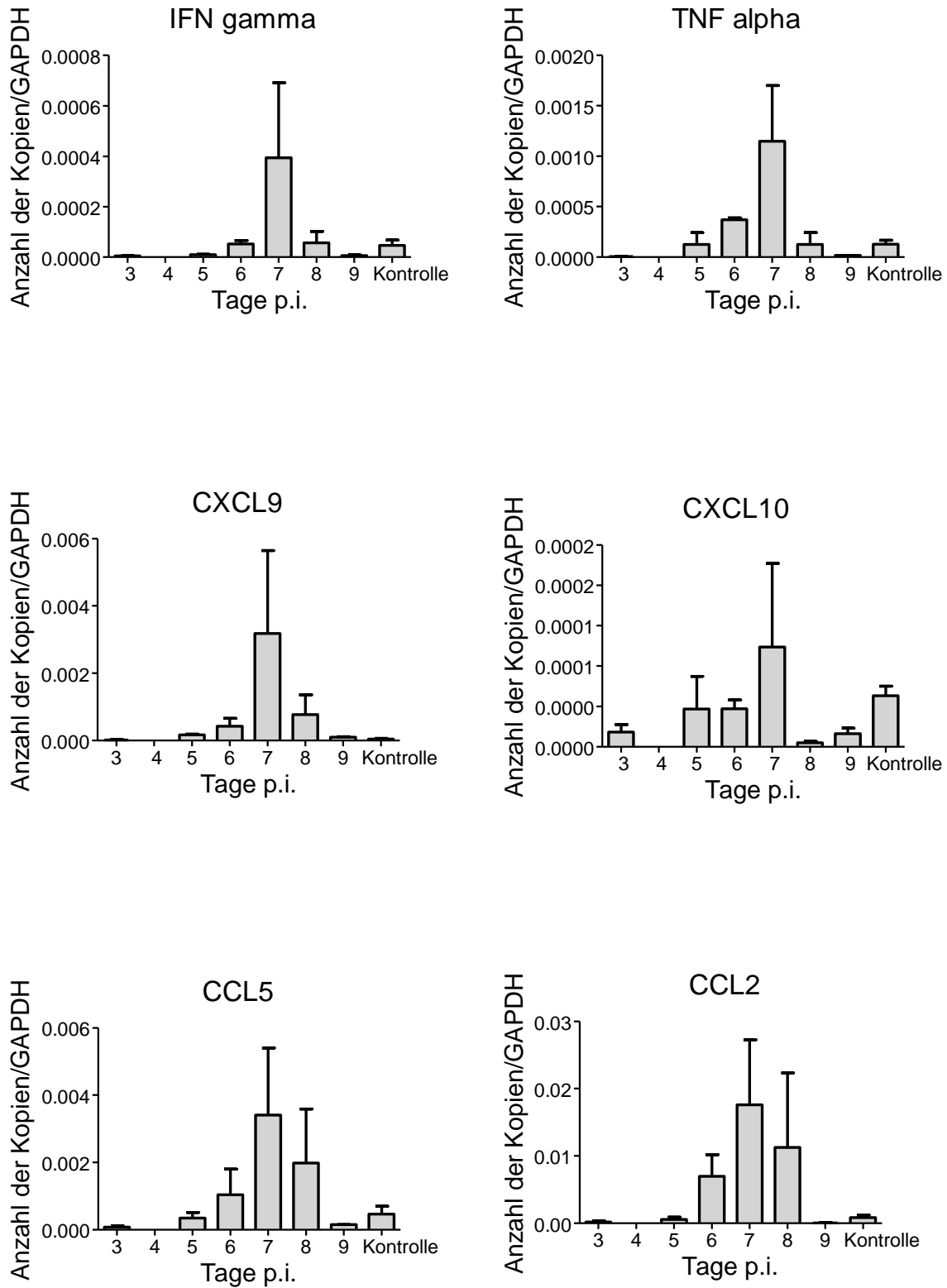


Abb. 21: Chemokinanalyse. Maximum der Chemokin-Expression an Tag 7 p.i. (An Tag 4 wurden keine Daten erhoben)

4.2.5 Virusausbreitung in den verschiedenen Hirnarealen

Zur genauen Quantifizierung der Virusausbreitung erfolgte zunächst der Nachweis von HSV-Protein auf Hirngewebeschnitten mit einem Herpesprotein-spezifischen Antikörper (HSV1, Dako). Anschließend wurden die Hirnschnitte in verschiedene morphologische Areale eingeteilt (Cortex, Medulla Cerebelli, occipitaler, frontaler Cortex Cerebri, Bulbus olfactorius, Hippocampus, Colliculus sup. (Mittelhirn), Thalamus, Hypothalamus, Pons und Medulla).

Anhand von Tabellen konnte nun die semiquantitative Auswertung der herpesinfizierten Areale durchgeführt werden, wobei jeweils die positiven Zellen gezählt wurden. Unterschieden wurde dabei in Areale mit 1-3 befallenen Zellen, bis zu 20 infizierten Zellen und Regionen mit mehr als 20 positiven Zellen.

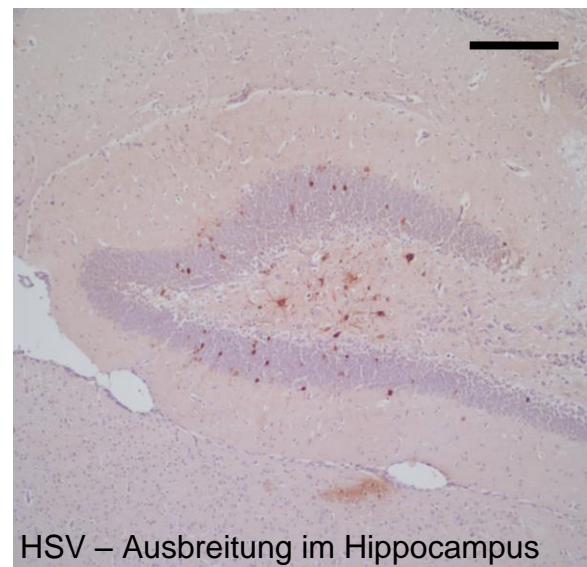
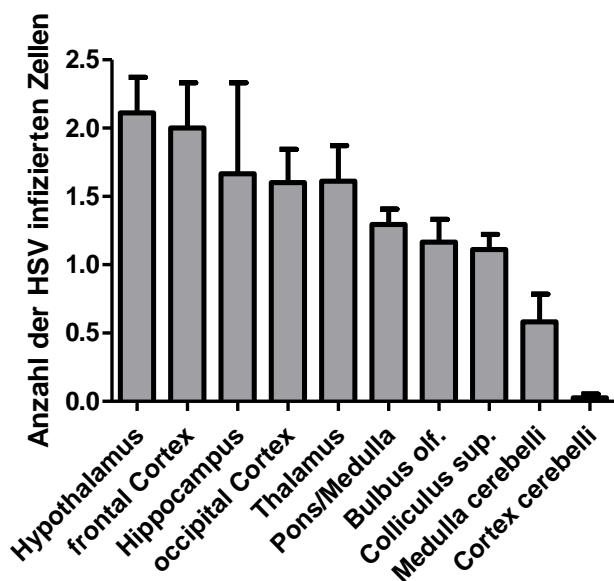


Abb. 22: Lokalisation der Virusausbreitung im Gehirn. Die meisten virusinfizierten Areale fanden sich im Hypothalamus, sowie im frontalen Kortex. Das Cerebellum war von der herpesviralen Infektion am wenigsten betroffen. Maßstab 100µm; Anzahl angefärbter Zellen pro Schnitt n = 2-6

Beobachtungen der Virusausbreitung im Gehirn legten nahe, dass das Virus weitgehend alle Hirnareale befällt (Abb. 22). Die am stärksten befallenen Regionen waren dabei

jedoch der Cortex cerebri, der Thalamus und Hypothalamus, sowie der Hippocampus. Wenige infizierte Zellen zeigten sich dagegen im Cerebellum.

Histopathologisch stellte sich die Herpesinfektion überwiegend als eine clusterförmige Läsion dar, wobei zahlreich befallene Zellen dicht beieinander lagen (Abb. 23). Im Cluster ließen sich die einzelnen infizierten Zellen gut gegeneinander abgrenzen.

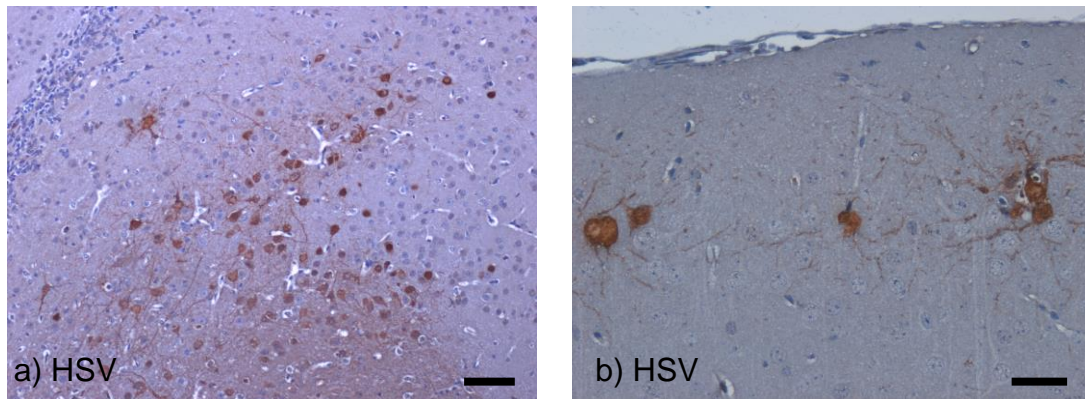


Abb. 23: Herpesinfektion. a) Clusterförmig befallene Areale. b) Vergrößerung einzelner infizierter Zellen im Cluster. Maßstab a) 40µm, b)20µm

4.3 Die Bedeutung des CXCR3-Rezeptors – Vergleichende Beobachtungen zwischen CXCR3-defizienten Mäusen und WT-Kontrollen

Um die Rolle des CXCR3-Rezeptors im Modell der experimentellen HSE näher zu charakterisieren, verglichen wir den Verlauf der HSE in CXCR3-defizienten Mäusen mit entsprechenden WT-Kontrollen über einen Zeitraum von 14 Tagen.

4.3.1 klinische Beobachtung der Tiere

Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden die HSV-infizierten Mäuse kontinuierlich beobachtet und deren klinische Symptome dokumentiert. Die Symptome waren dabei sowohl fokal-neurologischer Art (Anfälle, Krämpfe), als auch allgemeiner Art, wie Ängstlichkeit oder zitteriges Verhalten. Darüber hinaus zeigten sich –wesentlich seltener– ophthalmologische Symptome wie eine Katarakt oder eine Entzündung/Schwellung der Haut. Mit Hilfe des bereits beschriebenen klinischen Scores (Tab. 12), konnten nun, entsprechend dem Schweregrad der jeweiligen Erkrankung, die Symptome quantifiziert

werden. Anhand der Ergebnisse wurde deutlich, dass die Tiere, wenn überhaupt, erst an Tag 7 p.i. erkrankten (Abb. 24). Zu diesem Zeitpunkt war anhand des Scores noch kein Unterschied zwischen den WT Tieren und den CXCR3-KO-Tieren festzustellen. Ein leichter, jedoch statistisch nicht signifikanter Unterschied konnte erst an Tag 14 festgestellt werden, wobei hier die WT-Tiere etwas stärker erkrankten als die KO-Tiere.

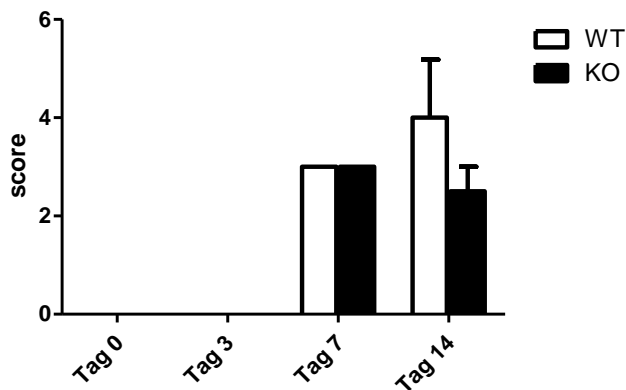


Abb. 24: klinischer Score: Quantifizierung der Symptome über 14 Tage. n =3-7

Beobachtete man die Gewichtsentwicklung als Maß der Erkrankungsschwere der Mäuse, die täglich gewogen wurden, wiesen lediglich die KO-Tiere eine altersentsprechend zu erwartende Gewichtszunahme auf (Abb. 25). Die WT-Tiere zeigten hingegen eine gestörte Gewichtsentwicklung, die für einen im Vergleich zu den KO-Tieren schwereren Krankheitsverlauf spricht.

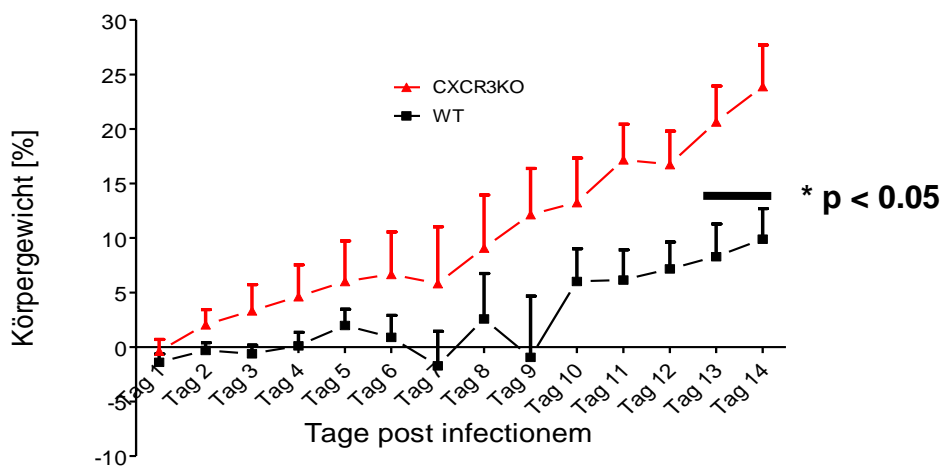


Abb. 25: Entwicklung des Körpergewichtes der KO-Tiere im Vergleich zu ihren WT-Kontrollen. Signifikanter Unterschied an Tag 13 und 14. * $p < 0.05$. n = 3-7

4.3.2 Zeitlicher Verlauf der Virusausbreitung

Durch semiquantitative Auswertung der mit HSV-1-Antikörpern markierten Gewebeschnitte konnte auch der zeitliche Verlauf der Virusausbreitung über 14 Tage beschrieben werden.

Bis zum Maximum der herpesviralen Infektion an Tag 7 p.i. zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Virus-infizierten Zellen. An Tag drei fanden sich im Durchschnitt 0.67 ± 1.155 (WT) bzw. 0.577 (KO) herpesvirale Läsionen. Am siebten postinfektiösen Tag ließen sich im Durchschnitt 5.25 ± 3.711 Läsionen in den WT-Tieren nachweisen und 5 ± 4.858 Läsionen in den KO-Mäusen. Bis zu diesem Zeitpunkt waren WT- und KO-Tiere noch etwa gleich stark vom Virus befallen. Ein Unterschied konnte erst an Tag 14 festgestellt werden. Hier waren die WT-Tiere mit im Durchschnitt 4.5 ± 4.805 nachweisbaren Läsionen stärker befallen als die KO-Tiere mit im Durchschnitt 1.29 ± 1.113 herpesviralen Läsionen.

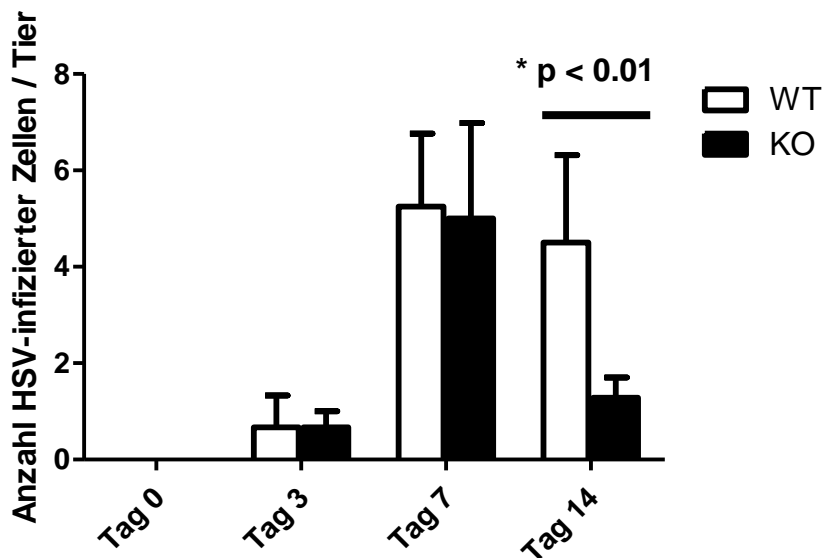


Abb. 26: zeitlicher Verlauf der herpesviralen Infektion. * $p < 0.01$. $n = 3-7$

Besonders deutlich stellte sich der Unterschied im histologischen herpesviralen Infektionsmuster dar (Abb. 27). WT-Tiere von Tag 14 wiesen einen vermehrten Virusbefall auf, wohingegen KO-Tiere an vergleichbaren Stellen keine oder nur eine geringe Anzahl an virusinfizierten Zellen aufwiesen.

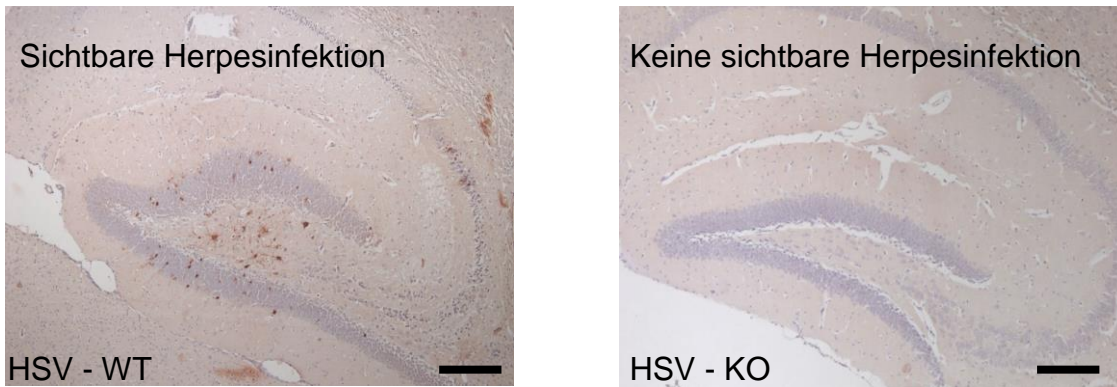


Abb. 27: Hippocampus, Tag 14: Sichtbare Herpesinfektion im Hippocampus einer WT-Maus, wohingegen die gleiche Hirnregion einer KO-Maus nicht vom Virus befallen war. Maßstab 100 μ m

Eine molekularbiologische Bestimmung der Viruslast an Tag 7 und an Tag 14 p.i. konnte die histologischen Ergebnisse bestätigen (Abb. 28).

An Tag 7 p.i. war das Maximum der Virusinfektion erreicht, wobei sowohl WT- als auch KO-Tiere eine ähnlich hohe Viruslast aufwiesen. Im Unterschied zu den histologischen Daten zeigte die Viruslastbestimmung jedoch auf, dass es den KO-Tieren bis hin zu Tag 14 gelang das Virus vollständig zu eliminieren. Die WT-Tiere dagegen zeigten auch an Tag 14 eine Viruslast von knapp 3×10^7 viralen Kopien.

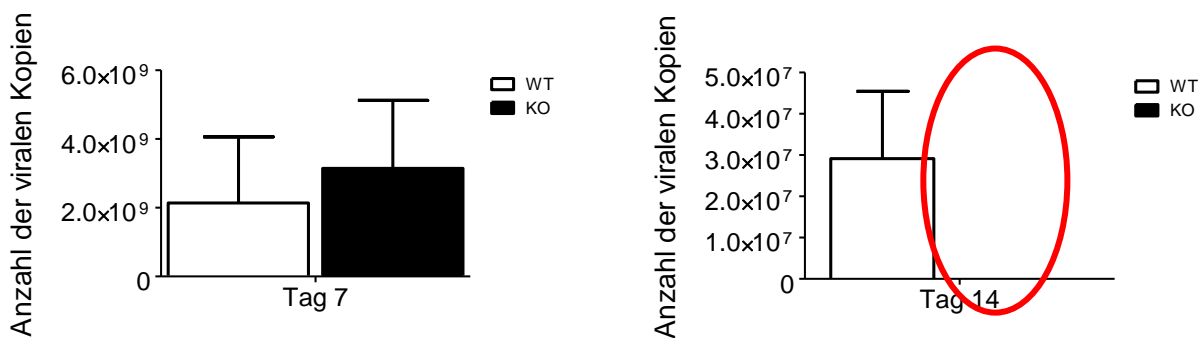


Abb. 28: Viruslast: an Tag 14 p.i. gelingt es den KO-Tieren das Virus vollständig zu eliminieren. n = 6-7

4.3.3 Immunabwehr – verminderte mikrogliale und T-Zell-Aktivierung der KO-Tiere

Zur Darstellung der virusbedingten lokalen Immunreaktion wurden Paraffin-Schnitte zunächst mit entsprechenden Antikörpern für T-Zellen, Astrozyten und Mikroglia/Makrophagen angefärbt (Abb. 29).

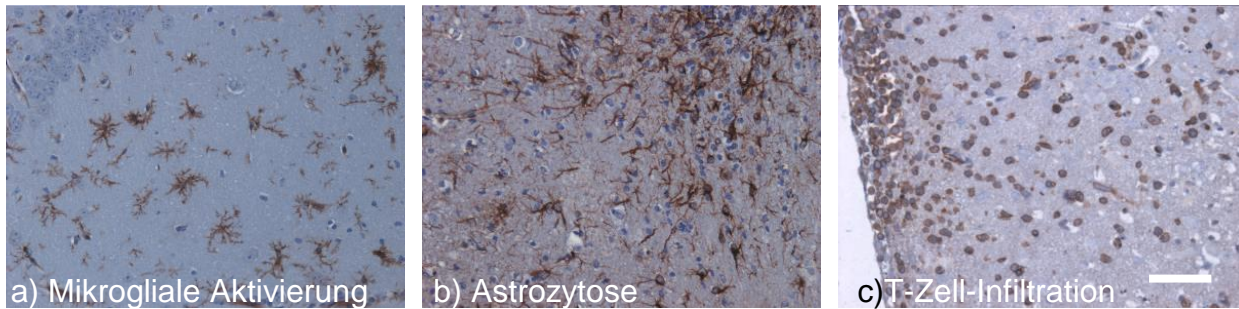


Abb. 29: Zellen der Immunaktivierung: a) Mikroglia, b) Astrozyten, c) T-Zellen. Maßstab 50µm

Um den zeitlichen Verlauf des Auftretens der Abwehr-Zellen beurteilen zu können, erfolgte ähnlich der viralen Auswertung, auch hier eine semiquantitative Beurteilung der histologischen Schnitte (s. oben).

Die Ergebnisse dieser Auswertung (Abb. 30) zeigten bei den WT-Tieren sowohl eine kontinuierliche Mikroglia-/Makrophagen-Infiltration (Lectin) als auch eine T-Zell-Invasion (CD3) bis zum Tag 14 p.i. Dabei war im zeitlichen Verlauf ein deutlicher Unterschied zwischen WT- und KO-Tieren zu beobachten: im Gegensatz zu den WT-Tieren, fand die Expression der T-Zellen, aber auch die der Mikroglia/Makrophagen bei den KO-Tieren auf einem deutlich reduzierten Niveau statt.

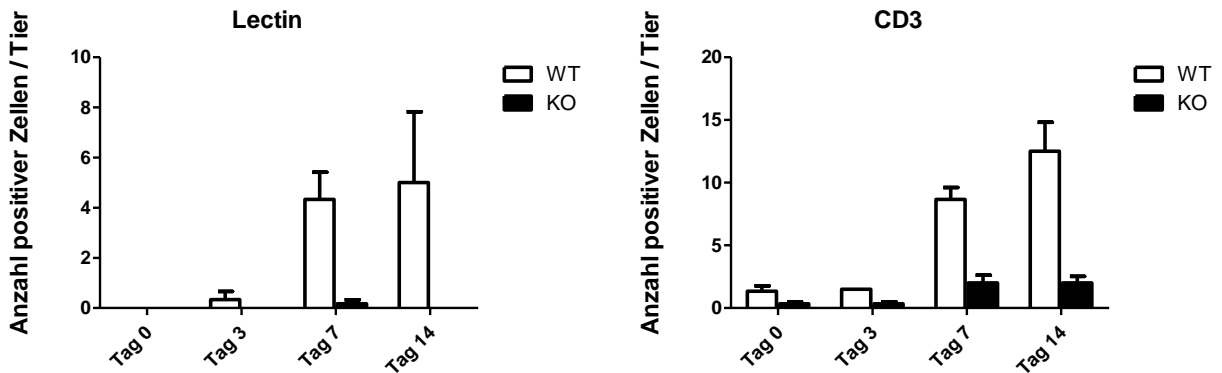


Abb. 30: zeitlicher Verlauf der T-Zell-, sowie der Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung. Signifikante Unterschiede zwischen WT- und KO-Tieren fallen ab Tag 7 (Lectin) bzw. ab Tag 14 (CD3) auf. Lectin: ab Tag 7: * $p < 0.001$. CD3: An Tag 14 * $p < 0.005$. $n = 3-7$

Allerdings wurde bei den Beobachtungen deutlich, dass sich Mikroglia/Makrophagen, aber auch T-Zellen an den Orten des clusterförmigen Virusbefalls nur in den WT-Tieren, nicht aber in den KO-Tieren histologisch darstellen ließen (Abb. 31, Abb. 32).

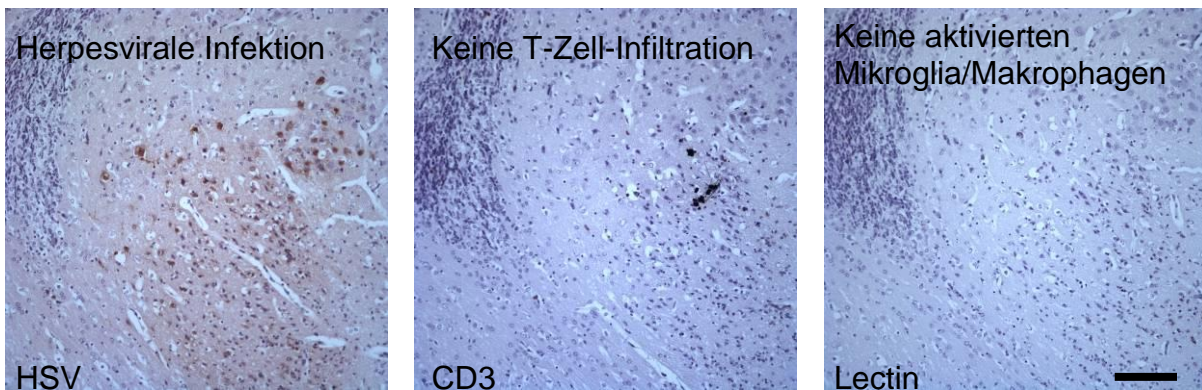


Abb. 31: CXCR3-KO-Tier: Cortex, Tag 7. Herpesvirale Infektion bei fehlender T-Zell-Infiltration und fehlender Mikroglia-/Makrophagen-Aktivierung. Maßstab 100 μm

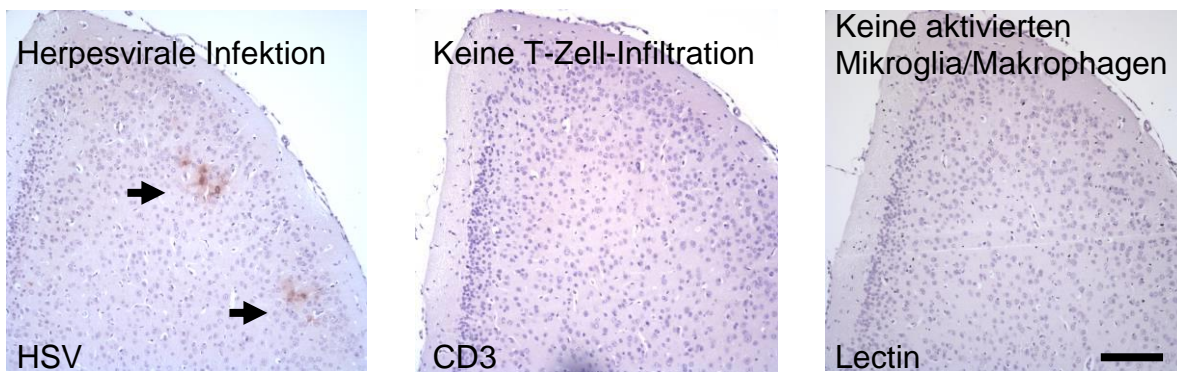


Abb. 32: CXCR3-KO-Tier, Tag 14, Cortex. Herpesvirale Infektion bei fehlender T-Zell-Infiltration und fehlender Makrophagen-/Mikroglia-Aktivierung. Maßstab 100 μ

Demzufolge induziert die Herpesinfektion eine virusbedingte Mikroglia/Makrophagen-Aktivierung, sowie eine T-Zell-Infiltration. Dabei wiesen jedoch CXCR3-defiziente Tiere eine reduzierte Akkumulation von Mikroglia/Makrophagen, sowie von T-Zellen auf.

4.3.4 Molekularbiologische Charakterisierung des inflammatorischen Milieus

Zur Beurteilung des inflammatorischen Milieus der WT- und KO-Tiere im Vergleich dienten erneut molekularbiologische Charakterisierungen. Die Ergebnisse der mittels Real-Time-PCR durchgeführten Chemokinanalyse bestätigten dabei die vorher gewonnenen histologischen Daten, sowie die Ergebnisse der Viruslast-Untersuchung. Demnach ergab sich auch aus der molekularbiologischen Analyse ein Maximum im Expressionsmuster der proinflammatorischen Zytokine am siebten Tag nach der Infektion. Anschließend war die Quantität der Chemokine und deren Rezeptoren wieder rückläufig, wobei wiederum an Tag 14 p.i. ein Unterschied im Expressionsmuster zwischen WT- und KO-Tieren festgestellt werden konnte: die KO-Tiere wiesen im Vergleich zu den WT-Tieren gar keine, bzw. nur noch eine sehr geringe Konzentration an Chemokinen auf (Abb. 33).

Der CXCR3-Rezeptor wurde nur von WT-Tieren exprimiert. Daher ließ sich dessen Expressionsmuster nicht mit dem der KO-Tiere vergleichen (Abb. 20).

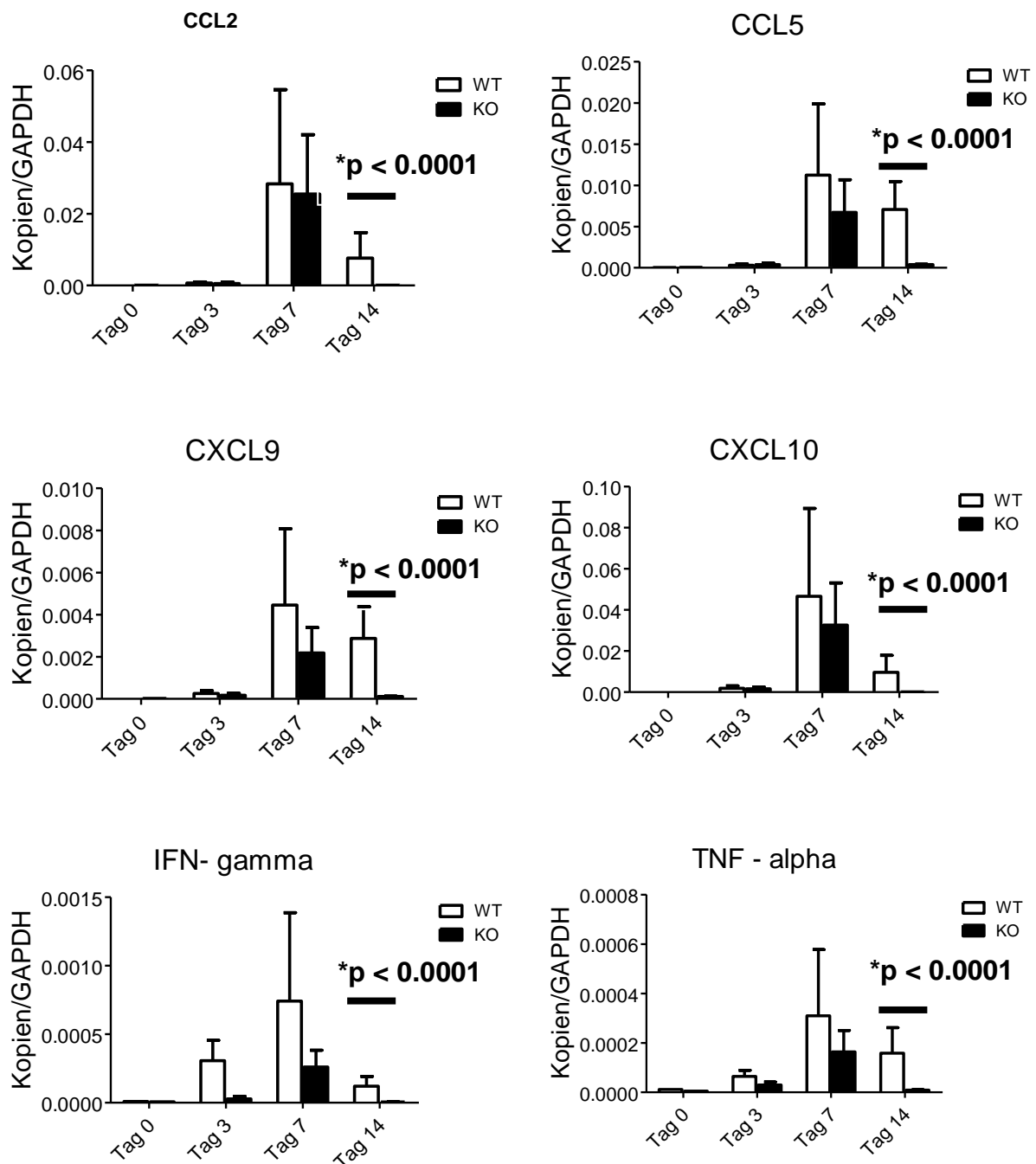


Abb. 33: Real-Time-PCR: Darstellung der einzelnen proinflammatorischen Zytokine. Maximale Chemokin-Expression an Tag 7 p.i. Deutlicher Unterschied der Chemokin-Expression der WT- und KO-Tiere an Tag 14: gar keine / sehr geringe Chemokin-konzentration der KO-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren. * $p < 0.0001$. $n = 3-7$

5. Diskussion

Die HSE ist die häufigste sporadisch auftretende fatale Enzephalitis in der westlichen Zivilisation, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht. Trotz der bereits erreichten therapeutischen Verbesserung durch das Virustatikum Acyclovir, bleiben oftmals schwere neurologische Folgeschäden bestehen, weshalb noch immer ein großer Bedarf an der Entwicklung einer neuen potenten Therapie besteht.

Pathogenetisch wird neben einer direkten Schädigung durch das Virus auch die Immunantwort als möglicher gewebeschädigender Faktor diskutiert. Der nähere Mechanismus der Gewebeschädigung im Verlauf der Herpesenzephalitis ist nicht bekannt.

Bezüglich der Bedeutung des CXCR3-Chemokinsystems im Verlauf der HSE ergaben die bisher durchgeführten experimentellen Studien widersprüchliche Ergebnisse. Die Erforschung des therapeutischen Potentials dieses Chemokinsystems zur Behandlung der HSE stellt das langfristige Ziel dieses Forschungsgebietes dar.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, die funktionelle Rolle des CXCR3-Chemokinsystems in der Pathogenese der HSE näher zu charakterisieren.

5.1 Das HSE-Mausmodell - Die nasale Infektionsroute stellt eine Alternative zur kornealen Infektion dar

Für die Etablierung des HSE-Mausmodells wählten wir eine intranasale Infektionsroute (Armien et al., 2010; Wacher et al., 2007) Im Vergleich zur kornealen Infektion, die ebenfalls eine etablierte Methode in anderen Studien darstellt (Lundberg et al., 2007; Wickham et al., 2005), bot die intranasale Infektionsroute verschiedene Vorteile. So stellte sich diese Methode in unserer Studie als gut verträglich für die Versuchstiere dar. Es zeigten sich keine an den Infektionsort gekoppelten frühen kornealen Symptome oder eine Keratitis, wie sie bei der kornealen Infektionsroute beschrieben wurden (Lundberg et al., 2007). Darüber hinaus wiesen die Versuchstiere erste krankheitsbezogene Symptome erst am siebten postinfektösen Tag auf. Für eine gute Verträglichkeit des intranasalen Infektionsweges sprach außerdem, dass der Bulbus olfaktorius in den meisten Mäusehirnen nicht durch die herpesvirale Infektion zerstört wurde und folglich histologisch untersucht werden konnte. Das histologische

Ausbreitungsmuster der Infektion zeigte an der Eintrittsstelle eher eine mäßige Infektion (Abb. 22) im Vergleich zu anderen infizierten Hirnarealen.

Auch die relativ niedrige Mortalität der Versuchstiere unterstrich die gute Verträglichkeit der intranasalen Infektionsroute: lediglich drei der insgesamt 38 infizierten Mäuse erkrankten so stark, dass sie vor ihrem vorgesehenen Termin an Tag 14 p.i. geopfert werden mussten, was einer Überlebensrate von 92.1% entspricht. Eine ebenfalls hohe Überlebensrate von 85% bei intranasal infizierten WT-Mäusen konnten auch Sergerie et al. nachweisen (Sergerie et al., 2007). Als Virusstamm wurde in dieser Studie allerdings der klinische Virusstamm H25 im Gegensatz zu dem bei uns eingesetzten neurovirulenten Virusstamm syn 17+ verwendet, wodurch nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit möglich ist.

Hinzu kommt, dass das intranasale Infektionsmuster eine große Ähnlichkeit zur Pathogenese der humanen HSE aufzeigt (Armien et al., 2010; Sheridan und Beck, 2009). Wie oben bereits beschrieben, tritt bei der humanen HSE das Virus nach der Primärinfektion über den Tractus olfactorius in das ZNS ein. Von dort aus breitet sich der Erreger vom primären Infektionsherd zentripetal, per retrograd axonalem Transport, entlang der Äste des Nervus trigeminus aus (Schmutzhard, 2001). Dieses Ausbreitungsmuster konnte auch im Tierexperiment nachvollzogen werden (Armien et al., 2010).

Zusammenfassend konnten wir ein alternatives Modell zur Induktion einer experimentellen Herpesenzephalitis etablieren. Die nasale Infektion wurde von den Tieren gut toleriert, führte zuverlässig zu einer Enzephalitis mit niedriger Mortalität und einem der humanen Pathogenese ähnlichen viralen Ausbreitungsmuster.

5.2 Herpesvirales Infektionsmuster

Die herpesvirale Infektion zeigte ein clusterförmiges Befallsmuster mit Gewebezerstörung der meisten Hirnareale. Dabei waren vor allem Neurone vom herpesviralen Befall betroffen. Diese Eigenschaften werden im Folgenden diskutiert.

5.2.1 Clusterförmige Virusausbreitung mit Gewebeerstörung in den meisten Hirnarealen

Die histopathologische Quantifizierung der Virusausbreitung im Gehirn legt nahe, dass das Virus weitgehend alle Hirnareale befällt. Die am stärksten befallenen Regionen sind dabei jedoch der Cortex cerebri, der Thalamus und Hypothalamus, sowie der Hippocampus. Wenige infizierte Zellen zeigen sich dagegen im Cerebellum.

Diese Ergebnisse entsprechen dabei weitgehend bisherigen Studien auf diesem Gebiet. Margolis et al. (1989) fanden heraus, dass sich die Virusausbreitung nach intraoculärer Infektion per axonalem Transport zunächst am Tag vier und fünf p.i. im Hirnstamm ausbreitet. Anschließend, ab dem siebten Tag p.i. waren auch andere Hirnareale, ohne direkte Nähe zum Hirnstamm, wie die Amygdala, der Hippocampus, sowie der Cortex cerebri betroffen. Aus diesem viralen Ausbreitungsmuster schlussfolgerten Margolis et al. (1989), dass die virale Ausbreitung nicht diffus lokal erfolgt, sondern sich gezielt über axonale Projektionen aus dem Hirnstamm ausbreiten kann.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Kastrukoff et al. (2012). Ihre Studie zeigte ein diffuses virales Ausbreitungsmuster im gesamten Hirn bei den meisten untersuchten Mäusen. Ähnlich wie bei Margolis et al. (1989) war der zeitliche Verlauf der Infektion derart, dass zunächst der Hirnstamm vom Virus befallen war. Ab dem sechsten Tag p.i. fand sich auch ein zerebellärer Befall mit HSV-1. Am siebten post infektiösen Tag war auch das Cerebrum betroffen.

Neben dem diffusen Ausbreitungsmuster des Virus in den meisten Hirnarealen, war auch das clusterförmige Befallsmuster auffällig. Dieses Phänomen konnte ebenfalls von Kastrukoff et al. (2012) beschrieben werden. Demnach ist die Entstehung der Cluster durch den viralen Replikationszyklus v.a. in Neuronen bedingt. Dieser führt zu einer Freisetzung neu-replizierter viraler Zellen. Gleichzeitig ist mit dem Replikations-zyklus aber auch eine Degeneration infizierter Zellen, sowie der nachfolgende Verlust der zellulären Integration verbunden.

Darüber hinaus sind auch Gliazellen, die eine hohe HSV-Affinität aufweisen, an der clusterförmigen Ausbreitung des Virus beteiligt. Vor allem im Bereich von desintegrierten Neuronen werden Glia-Zellen vermehrt vom Herpesvirus befallen (Kastrukoff et al., 2012).

Folglich kommt es zunächst zu einer lokalen Aktivierung des viralen Replikationszyklus mit clusterförmiger Virusausbreitung am Ort der Infektion. Zusätzlich etablieren die Viren ihren lebenslang persistierenden Latenz-Reaktivierungszyklus. Dieser ermöglicht die virale Ausbreitung, bedingt durch verschiedene Triggerfaktoren, auch zu späteren Zeitpunkten nach der Primärinfektion (Knipe und Cliffe, 2008).

Die diffuse Ausbreitung erfolgt anschließend per axonalem Transport in die Hirnareale, die über Synapsen mit dem jeweiligen Ausgangsareal in Verbindung stehen, sodass im Gehirn das Bild eines diffusen Ausbreitungsmusters entsteht (Margolis et al., 1989).

Zwar zeigten die Ergebnisse ein diffuses Ausbreitungsmuster in den meisten Hirnarealen. Dennoch stellte sich heraus, dass der Thalamus und Hypothalamus, sowie der Cortex und Hippocampus die am stärksten betroffenen Areale waren. Dies entspricht weitgehend dem Infektionsmuster der humanen Herpesencephalitis, bei der vor allem der Temporallappen befallen ist (Kennedy und Chaudhuri, 2002).

5.2.2 Gewebeerstörung durch herpesvirale Infektion

Die Serienschnitte dieser Arbeit konnten aufzeigen, dass in Hirnregionen mit hoher Anzahl infizierter Neurone auch eine starke Gewebeerstörung vorliegt.

Unklar bleibt an dieser Stelle, ob die virale Infektion oder die nachfolgende inflammatorische Reaktion die Gewebeerstörung bedingt. Auch in der aktuellen Studienlage sahen einige Studien die Ursache der zerebralen Gewebedestruktion in der gegen das Virus gerichteten Immunantwort (Lundberg et al., 2007; Wickham et al., 2005; Wuest und Carr, 2008), wohingegen andere Untersuchungen der Immunantwort einen protektiven Effekt nachweisen konnten (Sergeie et al., 2007).

Folgt man der These von Kastrukoff et al. (2012), so ist die Gewebeerstörung durch einen Verlust der Integrität der Neuronenverbände im Rahmen des viralen Replikationszyklus bedingt (s. oben).

Auf der anderen Seite zeigten sich histologisch, in den Arealen der viralen Infektion, ebenfalls eine hohe Invasion von Mikroglia und Makrophagen, sowie zahlreiche T-Zellen. Dies könnte darauf hinweisen, dass auch die immunvermittelte Reaktion an der Gewebeerstörung beteiligt ist. So konnten einige Studien aufzeigen, dass die Immunreaktion für verschiedene Mechanismen der Infektionsbekämpfung entscheidend ist.

Zum einen dient die Immunreaktion der Überführung einer aktiven viralen Replikation in eine latente Infektion. Zum anderen verhindert eine Immunaktivierung aber auch die virale Reaktivierung (Conrady et al., 2010). Dabei konnte auch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), sowie von Sauerstoff-Radikalen von Mikroglia als Ursache für den Gewebeschaden festgestellt werden (Hu et al., 2011; Marques et al., 2008). Ebenfalls wurde bereits die Freisetzung zytolytischer Moleküle durch T-Zellen als eine weitere gewebeschädigende Komponente diskutiert (Conrady et al., 2010).

Als zusätzlicher Mechanismus der Zellschädigung konnte mit Hilfe von histologischen Serienschnitten eine durch HSV induzierte Apoptose nachgewiesen werden.

Die Apoptose stellt dabei als streng reguliertes Zell-Selbstmordprogramm einen wichtigen Mechanismus der Wirts-Zell-Immunantwort gegen virale Infektionen dar. In bisherigen Studien wurde gezeigt, dass HSV-1 sowohl in der Lage ist Apoptose zu induzieren als auch antiapoptotisch zu wirken, was wir jedoch nicht zeigen konnten.

Die Verhinderung der Apoptose infizierter Zellen sichert das Wirtszell-Überleben und maximiert somit die Produktion der viralen Nachkommen (Aubert et al., 1999).

Zur Induktion der Apoptose kommt es vor allem zu Beginn der Infektion, wenn noch keine antiapoptotischen Faktoren vom Virus synthetisiert werden, oder wenn die Synthese der immediate early-Gene und deren Proteine ICP4 und ICP27 unterbrochen ist (Kraft et al., 2006).

5.2.3 Befall v.a. von Neuronen, aber auch von Astrozyten und Mikroglia

Das HSV Typ 1 befällt vor allem Neurone zu denen es durch axonalen Transport gelangt (Thomas et al., 2002). Dieser neuronale Befall stellt dabei einen herpestypischen Mechanismus dar, durch den das Virus dem wirtseigenen Immunsystem entkommt: das per axonalem Transport beförderte Virus ist somit unsichtbar und unangreifbar für Antikörper und Zell-gesteuerte Immunmechanismen der Wirtszelle (Nash, 2000).

Neben der neuronalen Infektion zeigten sich zudem auch einige infizierte Astrozyten und Mikroglia, was darauf hindeutet, dass auch die immunreaktiven Zellen in den herpesviralen Latenz-Reaktivierungszyklus mit einbezogen werden.

In Studien von Coughlan et al. (2000) gelang es, auch auf Neuronen die Expression von CXCR3 nachzuweisen. Im Zusammenhang mit unseren Beobachtungen, die einen stärkeren Virusbefall und einen höheren Krankheitswert der WT- im Vergleich zu den KO-Tieren zeigten, könnte dies darauf hinweisen, dass das CXCR3-Chemokinsystem eine leichtere Penetranz in die Wirtszelle ermöglicht, bzw. die Persistenz des Virus im Neuron erleichtert.

5.3 Charakterisierung des CXCR3-Chemokinsystems in der experimentellen HSE - Vergleich CXCR3-defizienter Tiere mit ihren entsprechenden WT-Kontrollen

Das CXCR3-Chemokinsystem, bestehend aus dem CXCR3-Chemokin-Rezeptor und seinen drei Liganden (CXCL9, CXCL10, CXCL11) ist verantwortlich für die Orchestrierung von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen (Muller et al., 2007).

Diverse Studien konnten bisher nachweisen, dass CXCR3 an der Modulation der Immunantwort im Rahmen der experimentellen HSE beteiligt ist. Allerdings gibt es kontroverse Ansichten über den Effekt des CXCR3-Chemokinsystems im Krankheitsverlauf der HSE. So sahen einige Studien die Ursache der zerebralen Gewebestruktur in der gegen das Virus gerichteten Immunantwort (Lundberg et al., 2007; Wickham et al., 2005; Wuest und Carr, 2008), wohingegen andere Untersuchungen der Immunantwort einen protektiven Effekt nachsagen konnten (Sergerie et al., 2007).

CXCR3-KO-Studien von Wickham et al. (2005) sowie Wuest und Carr (2008) wiesen eine niedrigere Mortalität der CXCR3-Knock-out-Mäuse im Vergleich zu ihren WT-Tieren nach, obwohl diese Tiere eine erhöhte Viruslast aufzeigten.

Demnach ist das CXCR3-Chemokinsystem sowohl an der Reduktion der Viruslast beteiligt, als auch verantwortlich für die massive Schädigung des umgebenden Gewebes.

Ähnlich wiesen auch Lundberg et al. (2007) eine geringere Mortalität in CXCR3-defizienten Tieren nach, die im Gegensatz zu ihren Kontrollen, ein geringeres CXCR3-Signaling aufwiesen, was mit einer verminderten T-Zell-Antwort einherging. Auch in dieser Studie ging eine gesteigerte Immunantwort der infizierten WT-Tiere also mit einer erhöhten Mortalität einher.

Eine andere Studie von Sergerie et al. (2007) konnte der Immunreaktion jedoch einen protektiven Effekt, der entscheidend zur Virusclearance beiträgt, nachweisen. Durch entsprechende TNF- α , bzw. Il-1 β - KO-Studien konnte gezeigt werden, dass WT-Tiere nach intranasaler Infektion mit HSV-1 geringere klinische Auffälligkeiten, sowie eine höhere Lebenserwartung aufwiesen. Darüber hinaus wurde deutlich, dass erkrankte WT-Tiere im Gegensatz zu ihren KO-Vergleichstieren in der Lage waren sich von der Erkrankung zu erholen. Dieses wurde in dieser Studie dem neuroprotektiven Effekt des TNF- α , bzw. Il-1 β zugeschrieben. Zudem vermuteten Sergerie et al. (2007), dass KO-Tiere ohne die neuroprotektive Aktivität eine gesteigerte HSV-1 Replikation aufwiesen, WT-Tiere dagegen eine bessere Virusclearance zeigten.

Neben dem CXCR3-Rezeptor selbst, gehören auch seine Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 zu den wichtigen Effektoren im CXCR3-Chemokinsystem.

Dabei ist zu erwähnen, dass C57Bl/6-Mäuse eine Deletion in der mRNA kodierenden Sequenz für den potentesten Liganden CXCL11 aufwiesen, sodass entsprechende Mäuse funktionell defizient für CXCL11 waren (Pubmed accession numbers: NT_109320, AK040051.1 und AK050012.1).

Weitere tierexperimentelle Studien zur Untersuchung der CXCR3-Liganden beruhen weitgehend auf einem Infektionsmodell mit dem Mouse Hepatitis Virus (MHV). Ähnlich der HSE verursacht auch dieser, zu den Coronaviren gehörige Erreger, eine Enzephalomyelitis bei zerebraler Infektion. Dabei werden sowohl CXCL9 als auch CXCL10 in der akuten Krankheitsphase stark exprimiert mit einem Expressionsmaximum am Tag 7 p.i. Die zentrale Aufgabe der Liganden liegt dabei in der Rekrutierung antiviraler T-Zellen in der akuten Krankheitsphase (Liu et al., 2001).

Mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern gelang es Liu et al. (2001) eine Blockade der Chemokine CXCL9/10 durchzuführen, was einen starken Anstieg der Viruslast und eine Zunahme der Mortalität infizierter Mäuse nach sich zog. Folglich wird auch in dieser Studie dem Chemokinsystem ein protektiver Effekt nachgesagt.

In einer entsprechenden KO-Studie mit CXCL10-defizienten Tieren konnte nachgewiesen werden, dass CXCL10 eine Schlüsselrolle in der Kontrolle der viralen Replikation spielt. So wiesen infizierte KO-Mäuse im Vergleich zu ihren Kontroll-Tieren weniger CD4+ und CD8+ T-Zellen, sowie weniger IFN- γ -sezernierende CD8+ T-Zellen

in der Milz auf. Insgesamt zeigte sich auch eine geringere Demyelinisierung als Folgereaktion auf die virale MHV-Infektion (Dufour et al., 2002).

Weitere Studien der Chemokinliganden erfolgten mit Hilfe von genetisch modifizierten replikationsfähigen MHV-Viren, die CXCL9, sowie CXCL10-kodierende Sequenzen aufwiesen. In entsprechenden CXCL-9/10-defizienten Tieren wurde das Chemokin folglich nur vom Virus gebildet. Es konnte beobachtet werden, dass es in virusinfizierten Arealen zu einer starken CXCL9/10-Produktion kam. Entsprechend war eine reduzierte Mortalität infizierter Mäuse, bei gleichzeitig reduzierter Viruslast und gesteigerter T-Zell-Infiltration nachzuweisen (Muller et al., 2010; Muse et al., 2008; Walsh et al., 2007).

So stellten Studien der CXCR3-Liganden das CXCR3-Chemokinsystem als protektive Komponente in der viralen Infektion dar.

Eine einheitliche Einschätzung der Rolle der proinflammatorischen Reaktion im Rahmen der HSE konnte bisher noch nicht erfolgen.

5.3.1 Klinischer Verlauf – weniger klinische Symptome und eine bessere Erholung bei CXCR3-defizienten Mäusen.

Die klinische Beobachtung der Tiere zeigte, dass die untersuchten Tiere erst im Verlauf, nämlich an Tag 7 p.i. erkrankten. Zu diesem Zeitpunkt waren WT-Tiere und CXCR3-KO-Tiere etwa gleich schwer erkrankt. Eine unterschiedliche Krankheitsentwicklung konnte erst an Tag 14 festgestellt werden, wobei hier die WT-Tiere mehr klinische Symptome zeigten als die KO-Tiere.

Analog zur Symptomausprägung zeigten die WT-Tiere eine gestörte Gewichtsentwicklung, wohingegen bei den KO-Tieren eine kontinuierliche Gewichtszunahme nachzuweisen war. Da es sich bei den Mäusen um Jungtiere handelte, war entsprechend ihrer Entwicklung eine kontinuierlich Gewichtszunahme zu erwarten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Wojtasiak et al. (2010). In ihren Studien beobachteten sie, bei intranasal mit HSV-1 infizierten Mäusen, im Vergleich zu einer uninfizierten Kontrolle, eine gestörte Gewichtsentwicklung vom fünften bis zum neunten Tag p.i. (Wojtasiak et al., 2010).

Wertet man den Gewichtsverlust als Maß für die Schwere der klinischen Erkrankung, so wird deutlich, dass vor allem infizierte WT-Mäuse durch die Virusinfektion schwer

erkranken. Der zeitliche Verlauf der Erkrankung beläuft sich dabei vor allem auf den fünften bis zum neunten post infektiösen Tag. Auffällig dabei ist, dass sich die WT-Mäuse ab dem neunten Tag p.i. ihrem Körpergewicht zu Folge, wieder zu erholen schienen.

Vergleicht man die WT-Kontrollen mit ihren entsprechenden KO-Mäusen, so fällt auf, dass CXCR3-defiziente Tiere eine nahezu kontinuierliche Gewichtszunahme zeigten, was im direkten Vergleich in etwa der Gewichtsentwicklungskurve uninfizierter Kontrolltiere entsprach.

Folglich scheinen CXCR3-KO-Tiere, im Vergleich zu ihren WT-Kontrollen nicht so stark zu erkranken. Darüber hinaus hat es den Anschein, dass sich CXCR3-defiziente Mäuse besser, schneller und früher von der viralen Infektion erholen.

5.3.2 Zeitlicher Verlauf der Virusausbreitung – verbesserte Virusclearance der KO-Tiere

Histopathologische Studien ergaben, dass bis zum Maximum der herpesviralen Infektion an Tag sieben p.i. eine kontinuierliche Zunahme der herpesviralen Zellen nachzuweisen war.

Zu diesem Zeitpunkt waren WT- und KO-Tiere noch etwa vergleichbar vom Virus befallen. Ein Unterschied konnte erst an Tag 14 festgestellt werden. Hier waren die WT-Tiere stärker befallen als die KO-Tiere.

Dies deutet darauf hin, dass CXCR3-defiziente Mäuse, im Vergleich zu den WT-Tieren in der Lage waren ab diesem Tag die weitere Virusvermehrung aufzuhalten.

Diese Tatsache verdeutlicht die wichtige Rolle des CXCR3-Chemokinsystems in der Orchestrierung und Modulation von antiviralen Chemokin-getriggerten Mechanismen.

So scheint der CXCR3-Rezeptor notwendig für die intrakranielle Ausbreitung der herpesviralen Infektion zu sein (s. oben).

Quantifizierungen der Viruslast stützen die Ergebnisse der histopathologischen Beobachtungen und deuten ebenfalls auf eine verbesserte Virusclearance der CXCR3-defizienten Tieren hin. An Tag sieben p.i. wiesen sowohl WT als auch KO-Tiere eine ähnlich hohe Viruslast auf, wobei es den KO-Tieren bis hin zu Tag 14 gelang das Virus vollständig zu eliminieren. Die WT-Tiere dagegen zeigten auch an Tag 14 eine Viruslast

von knapp 3×10^7 viralen Kopien. Histologische Daten konnten im Gegensatz dazu an Tag 14 noch vereinzelte virale Zellen nachweisen. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass in den molekularbiologischen Untersuchungen ein Nukleotid-Nachweis erfolgte, wohingegen histologisch Protein dargestellt wurde. Bei dem histochemischen Protein-Nachweis könnte es sich jedoch auch um virale Hüll-Proteine handeln. Ein Nachweis von DNA-produzierenden, vermehrungsfähigen Viren ist durch den Protein-Nachweis, im Gegensatz zum molekularbiologischen Nukleotid-Nachweis, nicht gegeben.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich folglich schließen, dass sich der Chemokinrezeptor CXCR3 als vorteilhaft für die virale Ausbreitung erweist, da ein Fehlen von CXCR3 zu einer vollständigen Viruselimination führt.

5.3.3 CXCR3 ist an der Rekrutierung von Immunzellen im Verlauf der HSE beteiligt

Die herpesvirale Infektion führt zu einer Aktivierung von Mikroglia, Astrozyten, sowie T-Zellen, was sich unter anderem durch die direkte histologische Anfärbung der immunmodulatorischen Zellen nachweisen lässt. Demnach zeigten sich eine T-Zell-Invasion, die mikrogliale Aktivierung, sowie die Astrozyten-Infiltration besonders in den mit Herpesvirus befallenen Arealen (Armien et al., 2010; Lundberg et al., 2008).

Ein Vergleich der CXCR3-defizienten Tiere mit den entsprechenden WT-Tieren zeigte zum einen, dass die Rekrutierung von Immunzellen bei beiden Gruppen stattfindet. Zum anderen wird auch deutlich, dass die KO-Tiere eine deutlich verminderte mikrogliale und T-Zell-Aktivierung zeigten. Dieser Unterschied vergrößerte sich bis hin zu Tag 14 p.i.

Dennoch ist auffällig, dass es an Tag sieben zu einer unterschiedlichen Mikroglia-Aktivierung auch bei vergleichbarer Viruslast kam. Im Gegensatz zu anderen CXCR3-KO-Studien (Muller et al., 2007) erwies sich die mikrogliale Aktivierung der KO-Tiere als deutlich geringer als die der WT-Tiere.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten also eine verbesserte Virus-Clearance der CXCR3-defizienten Tieren bei geringerer Immunantwort.

Diese Erkenntnis lässt sich durch verschiedene Hypothesen begründen: ein Erklärungsmodell könnte der Nachweis der Expression des CXCR3-Rezeptors auf

Neuronen sein (Coughlan et al., 2000). Demnach könnte der Rezeptor auf den Neuronen eine Rolle für die virale intrakranielle Ausbreitung spielen. WT-Tiere mit Rezeptor würden dadurch eine erhöhte Viruslast, sowie histologisch mehr nachweisbare viral befallene Zellen aufweisen, wie wir es in unseren Beobachtungen aufzeigen konnten. Dieser gesteigerte virale Befall könnte folglich ebenfalls die stärkeren klinischen Symptome der WT-Tiere begründen. Hinweise für eine direkte Interaktion des Herpesvirus mit neuronalem CXCR3 ergeben sich aus der Literatur jedoch nicht. In-vitro Studien bezüglich der Infektion von CXCR3-defizienten Neuronen könnten hier weiterführend sein.

Die verminderte proinflammatorische Reaktion der CXCR3-defizienten Tieren zu späten Zeitpunkten nach der Infektion (Tag 14) könnte durch die Tatsache begründet sein, dass -wie oben beschrieben- die virale Ausbreitung der KO-Tiere vermindert ist und demnach eine geringe Immunaktivierung ausreicht um die vollständige Virus-Clearance zu bewirken.

5.3.4 Molekularbiologische Chemokinanalyse: Unterschiede in der Chemokin-Expression zwischen WT- und KO-Tieren vor allem an Tag 12 p.i.

Die mittels Real-Time-PCR durchgeführte Chemokinanalyse bestätigte die Ergebnisse der histologischen Beobachtungen, sowie der Viruslast-Untersuchung. Es zeigte sich ein Maximum im Expressionsmuster der proinflammatorischen Zytokine am siebten Tag nach der Infektion. Anschließend war die Quantität der Chemokine und deren Rezeptoren wieder rückläufig. Schon am siebten Tag nach der Infektion konnte ein leichter Unterschied im Expressionsniveau zwischen WT- und CXCR3-defizienten Tieren festgestellt werden, wobei WT-Tiere eine leicht vermehrte Konzentration der gemessenen Chemokine aufwiesen. An Tag 14 p.i wurde der gemessene Konzentrations-Unterschied in den beiden Tiergruppen deutlicher: KO-Tiere wiesen im Vergleich zu ihren WT-Kontrollen gar keine, bzw. nur noch eine sehr geringe Konzentration an Chemokinen auf.

Die untersuchten Chemokine stellen Mediatoren der Th1-abhängigen Immunantwort dar. CXCL-9, sowie CXCL10 als Liganden des CXCR3-Rezeptors werden IFN-abhängig stimuliert, was deren ähnlichen Kurvenverlauf mit Maximalwerten am Tag 7 p. i. erklärt

(Liu et al., 2001; Muse et al., 2008). Ähnlich verhält sich CCL5. Dieser potente T-Zell-Chemoattraktor zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie CXCR3, benötigt aber zusätzlich die Stimulationsfaktoren IL12 und STAT4 (Appay und Rowland-Jones, 2001). Die untersuchten Chemokine stellten sich auch in anderen Studien als Virus-assoziierte Chemokine dar. So konnten Wickham et al. (2005) nachweisen, dass gleichzeitig mit der intraokulären HSV-1-Infektion auch die molekularbiologisch untersuchten Konzentrationen für CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL5 und IFN- γ anstiegen. Ähnlich unseren Beobachtungen konnten Wickham et al. (2005) in ihrer Studie zu Beginn der Infektion (Tag 3 bis Tag 5 p.i.) noch keinen wesentlichen Unterschied im Expressionsmuster der Chemokine bei WT-Tieren im Vergleich zu ihren entsprechenden CXCR3-defizienten Kontrolltieren finden. Ein Unterschied im Expressionsmuster stellte sich erst am siebten post infektiösen Tag dar. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wiesen in dieser Studie die KO-Tiere massiv erhöhte Konzentrationen an CCL5, CXCL10 und IFN- γ im Vergleich zu ihren WT-Kontrollen auf. Auch CCL3 und CXCL9 konnten vermehrt nachgewiesen werden, allerdings nicht auf einem signifikanten Niveau.

Auch Carr et al. (2008) konnten in ihren CXCR3-KO-Studien einen ähnlichen Verlauf der Chemokin-Expression wie Wickham et al. (2005) feststellen (Carr et al., 2008). Untersucht wurde in diesem Experiment jedoch der vordere Augenabschnitt. Nach cornealer HSV-1-Infektion wurden molekularbiologisch die Expressionsniveaus verschiedener Chemokine gemessen. Hier fand sich zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion ebenfalls kein Unterschied in der Chemokinexpression bei WT und KO Tieren. Erst am siebten post infektiösen Tag ließ sich ein vermehrter Anstieg der Chemokin-Konzentrationen in den CXCR3-defizienten Tieren feststellen: vor allem CXCL9, CXCL10, aber auch CCL2, CCL3 und CCL5 wiesen eine deutliche Zunahme auf. Dagegen zeigten sich IL- α , IL-6, TNF- α nicht signifikant erhöht in den KO-Mäusen. Insgesamt korreliert die vermindert Zytokinexpression in CXCR3-defizienten Tieren gut mit den histopathologischen Beobachtungen und unterstützt die Beobachtung der geringeren Immunantwort in CXCR3-defizienten Mäusen während experimenteller HSE.

5.4 Schlussfolgerung

Die Herpes Simplex Enzephalitis stellt in der westlichen Industriegesellschaft die häufigste virale Enzephalitis dar. Aufgrund der fatalen Folgen, sowie mangelnder Therapie-Möglichkeiten ist die Forschung auf diesem Gebiet von entscheidender Bedeutung.

Ein Forschungsschwerpunkt auf diesem Gebiet stellt die Untersuchung des CXCR3-Chemokinsystems dar, welcher sich auch diese Arbeit widmet.

Unseren Untersuchungen zu Folge stellt die von uns verwendete Methode der intranasalen Infektion zur Induktion einer HSE eine Alternative zur kornealen Infektion dar. So erwies sich diese Methode insgesamt als schonender und ähnlicher dem humanen Virus-Ausbreitungsmuster. Klinischen Beobachtungen zu Folge konnte festgestellt werden, dass WT-Tiere im Vergleich zu CXCR3-defizienten Tieren schwerer erkrankten. CXCR3-KO-Mäuse erholten sich dagegen besser und schneller von der viralen Infektion.

Histologisch wurde eine clusterförmige Virusausbreitung in den meisten Hirnarealen festgestellt. Dabei wurde, auch auf Grundlage anderer Studien vermutet, dass die diffuse Virusausbreitung vor allem auf viralem Transport über axonaler Projektion beruht, wohingegen die clusterförmige Virusausbreitung durch den viralen Replikationszyklus bedingt ist. Dieses Ausbreitungsmuster entspricht dabei weitgehend dem humanen Ausbreitungsmuster.

Histologisch zeigte sich zudem eine Gewebeerstörung an den Orten des viralen Befalls. Hier bleibt zunächst unklar, ob die Zerstörung durch den viralen Replikationszyklus bedingt ist, oder immunvermittelt durch die Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen aus Makrophagen, bzw. zytolytischen Molekülen aus T-Zellen. Sowohl Makrophagen, als auch T-Zellen ließen sich an virusinfizierten Arealen nachweisen.

Mittels Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnten Neuronen als Hauptlokalisation des Herpes Virus festgestellt werden. Zusätzlich wurden jedoch auch infizierte Mikroglia und Astrozyten gefunden.

Vergleichende Untersuchungen zwischen CXCR3-defizienten Tieren und ihren entsprechenden WT-Kontrollen zeigten eine verbesserte Virusclearance der KO-Tiere

auf. Ein möglicher Erklärungsansatz dieses Phänomens könnte die virale Ausbreitung über den CXCR3-Rezeptor sein, der auch auf Neuronen nachgewiesen wurde.

Molekularbiologische Analysen ergaben, dass ein Maximum des Chemokin-Expressionsniveau am siebten Tag nach der Infektion aufzuweisen war. Ein Unterschied im Expressionsmuster zwischen WT- und KO-Tieren stellte sich dabei vor allem am 14. Tag p.i. dar. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass CXCR3-KO-Tiere sich besser und schneller von der Infektion erholen und sich insgesamt gesünder darstellen, bei weniger nachgewiesener Immunantwort. Daraus lässt sich schließen, dass der CXCR3-Rezeptor und seine Liganden eine Schlüsselrolle in der Rekrutierung von Immunzellen im Verlauf der experimentellen HSE spielen, wobei das Erklärungsmodell des Pathomechanismus wie folgt zusammengefasst werden könnte: In den Neuronen der WT-Tiere mit Chemokinrezeptor CXCR3 kommt es zu einer vermehrten viralen Ausbreitung über den Rezeptor, was zu einer gesteigerten, viralbedingten Gewebeerstörung führt. Eine gesteigerte Gewebeerstörung jedoch fördert die vermehrte virale Freisetzung aus Neuronen, aber auch aus den anderen vom Virus befallenen Zellen des ZNS (Astrozyten, Mikrogliazellen). Somit wird eine chronische virale Infektion aufrechterhalten.

Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass ein Fehlen des CXCR3-Chemokinsystem eine virale Ausbreitung möglicherweise verhindern kann.

Diese Erkenntnis könnte zukünftig von therapeutischem Nutzen sein, da eine medikamentöse CXCR3-Rezeptor-Blockade zu einer Verhinderung der viralen Ausbreitung im ZNS während einer Herpesenzephalitis führen könnte.

6. Zusammenfassung

Die HSE ist die häufigste sporadisch auftretende fatale Enzephalitis in der westlichen Zivilisation. Pathogenetisch wird neben direkten virusbedingten Effekten auch die Immunantwort als gewebeschädigender Faktor diskutiert. Der Chemokinrezeptor CXCR3 und seine korrespondierenden Liganden (CXCL9, CXCL10) werden als immunologische Schlüsselmoleküle in der Herpesenzephalitis sowie in entsprechenden Tier-Modellen stark exprimiert. Die Bedeutung des CXCR3-Chemokinesystems im Verlauf der HSE konnte jedoch bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Wir etablierten ein HSE-Maus-Modell mit intranasalem Infektionsweg (HSV17 syn17+) und charakterisierten den Krankheitsverlauf, Viruslast, zerebrale Histopathologie und Zytokinprofile in CXCR3-defizienten Mäusen sowie Wildtyp-Kontrollen über einen Zeitraum von 14 Tagen.

Früh im Krankheitsverlauf (bis Tag sieben) zeigten sich in Klinik, Histopathologie und Viruslast keine signifikanten Unterschiede zwischen CXCR3KO- und Wildtyp-Kontrolltieren. Im weiteren Verlauf boten CXCR3KO-Tiere einen milderen klinischen Verlauf und damit korrespondierend einen geringeren Gewichtsverlust, verminderte entzündliche Infiltrate des ZNS, sowie eine reduzierte zerebrale Viruslast.

Zusammenfassend führt CXCR3-Defizienz im Tiermodell der HSE zu einem klinisch milderen Krankheitsverlauf mit verminderter Immunantwort und reduzierter Viruslast. Die Ergebnisse belegen die wichtige Rolle des CXCR3 Chemokinsystems in der Pathogenese der HSE und rechtfertigen weitere Studien um das therapeutische Potential dieses Chemokinsystems zur Behandlung der HSE zu untersuchen.

7. Literaturverzeichnis

Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol* 2001; 22: 83-87

Armien AG, Hu S, Little MR, Robinson N, Lokensgard JR, Low WC, Cheeran MC. Chronic cortical and subcortical pathology with associated neurological deficits ensuing experimental herpes encephalitis. *Brain Pathol* 2010; 20: 738-750

Aubert M, Blaho JA. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 is required for the prevention of apoptosis in infected human cells. *J Virol* 1999; 73: 2803-2813

Aubert M, Blaho JA. Modulation of apoptosis during herpes simplex virus infection in human cells. *Microbes Infect* 2001; 3: 859-866

Aubert M, O'Toole J, Blaho JA. Induction and prevention of apoptosis in human HEp-2 cells by herpes simplex virus type 1. *J Virol* 1999; 73: 10359-10370

Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettini G. Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22: 147-184

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

Boenisch T. *Handbuch Immunhistochemischer Färbemethoden*. Dako, 2003: 34-35

Boivin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes* 2004; 11: 48-56

Booss J, Esiri MM. *Viral encephalitis in humans*. Amer Society for Microbiology Press, 2003: 54

Cardona AE, Li M, Liu L, Savarin C, Ransohoff RM. Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 587-594

Carr DJ, Wuest T, Ash J. An increase in herpes simplex virus type 1 in the anterior segment of the eye is linked to a deficiency in NK cell infiltration in mice deficient in CXCR3. *J Interferon Cytokine Res* 2008; 28: 245-251

Casrouge A, Zhang SY, Eidenschenk C, Jouanguy E, Puel A, Yang K, Alcais A, Picard C, Mahfoufi N, Nicolas N, Lorenzo L, Plancoulaine S, Senechal B, Geissmann F, Tabeta K, Hoebe K, Du X, Miller RL, Heron B, Mignot C, de Villemeur TB, Lebon P, Dulac O, Rozenberg F, Beutler B, Tardieu M, Abel L, Casanova JL. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science* 2006; 314: 308-312

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-621

Chaudhuri A, Kennedy PG. Diagnosis and treatment of viral encephalitis. *Postgrad Med J* 2002; 78: 575-583

Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, Loetscher P. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* 2003; 278: 289-295

Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326: 1-16

Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 1998; 187: 2009-2021

Conrady CD, Drevets DA, Carr DJ. Herpes simplex type I (HSV-1) infection of the nervous system: is an immune response a good thing? *J Neuroimmunol* 2010; 220: 1-9

Cook WJ, Kramer MF, Walker RM, Burwell TJ, Holman HA, Coen DM, Knipe DM. Persistent expression of chemokine and chemokine receptor RNAs at primary and latent sites of herpes simplex virus 1 infection. *Virology* 2004; 321: 1-5

Coughlan CM, McManus CM, Sharron M, Gao Z, Murphy D, Jaffer S, Choe W, Chen W, Hesselgesser J, Gaylord H, Kalyuzhny A, Lee VM, Wolf B, Doms RW, Kolson DL. Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. *Neuroscience* 2000; 97: 591-600

Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Doffinger R, Cancrini C, Bonnet M, Puel A, Chable-Bessia C, Yamaoka S, Feinberg J, Dupuis-Girod S, Bodemer C, Livadiotti S, Novelli F, Rossi P, Fischer A, Israel A, Munnich A, Le Deist F, Casanova JL. A hypermorphic $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency. *J Clin Invest* 2003; 112: 1108-1115

Doffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, Feinberg J, Durandy A, Bodemer C, Kenwright S, Dupuis-Girod S, Blanche S, Wood P, Rabia SH, Headon DJ, Overbeek PA, Le Deist F, Holland SM, Belani K, Kumararatne DS, Fischer A, Shapiro R, Conley ME, Reimund E, Kalhoff H, Abinun M, Munnich A, Israel A, Courtois G, Casanova JL. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired $\text{NF-}\kappa\text{B}$ signaling. *Nat Genet* 2001; 27: 277-285

Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 2002; 168: 3195-3204

Farber JM. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 5238-5242

Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 246-257

Galvan V, Brandimarti R, Munger J, Roizman B. Bcl-2 blocks a caspase-dependent pathway of apoptosis activated by herpes simplex virus 1 infection in HEp-2 cells. *J Virol* 2000; 74: 1931-1938

Galvan V, Roizman B. Herpes simplex virus 1 induces and blocks apoptosis at multiple steps during infection and protects cells from exogenous inducers in a cell-type-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3931-3936

Ghiasi H, Cai S, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL. Both CD4+ and CD8+ T cells are involved in protection against HSV-1 induced corneal scarring. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 408-412

Hu S, Sheng WS, Schachtele SJ, Lokensgard JR. Reactive oxygen species drive herpes simplex virus (HSV)-1-induced proinflammatory cytokine production by murine microglia. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 123

Jones C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 79-95

Kamei S, Sekizawa T, Shiota H, Mizutani T, Itoyama Y, Takasu T, Morishima T, Hirayanagi K. Evaluation of combination therapy using aciclovir and corticosteroid in adult patients with herpes simplex virus encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 1544-1549

Kastrukoff LF, Lau AS, Thomas EE. The effect of mouse strain on herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection of the central nervous system (CNS). *Herpesviridae* 2012; 3: 4

Kennedy PG, Chaudhuri A. Herpes simplex encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 73: 237-238

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

Knipe DM, Cliffe A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 211-221

Koopmann W, Ediriwickrema C, Krangel MS. Structure and function of the glycosaminoglycan binding site of chemokine macrophage-inflammatory protein-1 beta. *J Immunol* 1999; 163: 2120-2127

Kraft RM, Nguyen ML, Yang XH, Thor AD, Blaho JA. Caspase 3 activation during herpes simplex virus 1 infection. *Virus Res* 2006; 120: 163-175

Kubat NJ, Amelio AL, Giordani NV, Bloom DC. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer/rcr is hyperacetylated during latency independently of LAT transcription. *J Virol* 2004; 78: 12508-12518

Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, Lazzeri E, Giannini S, Cosmi L, Sagrinati C, Mazzinghi B, Orlando C, Maggi E, Marra F, Romagnani S, Serio M, Romagnani P. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med* 2003; 197: 1537-1549

Liu L, Callahan MK, Huang D, Ransohoff RM. Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. *Curr Top Dev Biol* 2005; 68: 149-181

Liu MT, Armstrong D, Hamilton TA, Lane TE. Expression of Mig (monokine induced by interferon-gamma) is important in T lymphocyte recruitment and host defense following viral infection of the central nervous system. *J Immunol* 2001; 166: 1790-1795

Lundberg P, Openshaw H, Wang M, Yang HJ, Cantin E. Effects of CXCR3 signaling on development of fatal encephalitis and corneal and periocular skin disease in HSV-infected mice are mouse-strain dependent. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4162-4170

Lundberg P, Ramakrishna C, Brown J, Tyszka JM, Hamamura M, Hinton DR, Kovats S, Nalcioglu O, Weinberg K, Openshaw H, Cantin EM. The immune response to herpes simplex virus type 1 infection in susceptible mice is a major cause of central nervous system pathology resulting in fatal encephalitis. *J Virol* 2008; 82: 7078-7088

Luster AD, Ravetch JV. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 1987; 166: 1084-1097

Manickan E, Rouse BT. Roles of different T-cell subsets in control of herpes simplex virus infection determined by using T-cell-deficient mouse-models. *J Virol* 1995; 69: 8178-8179

Margolis TP, LaVail JH, Setzer PY, Dawson CR. Selective spread of herpes simplex virus in the central nervous system after ocular inoculation. *J Virol* 1989; 63: 4756-4761

Marques CP, Cheeran MC, Palmquist JM, Hu S, Urban SL, Lokensgard JR. Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis. *J Immunol* 2008; 181: 6417-6426

Martinez-Torres F, Menon S, Pritsch M, Victor N, Jenetzky E, Jensen K, Schielke E, Schmutzhard E, de Gans J, Chung CH, Luntz S, Hacke W, Meyding-Lamade U. Protocol for German trial of Acyclovir and corticosteroids in Herpes-simplex-virus-encephalitis (GACHE): a multicenter, multinational, randomized, double-blind, placebo-controlled German, Austrian and Dutch trial [ISRCTN45122933]. *BMC Neurol* 2008; 8: 40

McGrath N, Anderson NE, Croxson MC, Powell KF. Herpes simplex encephalitis treated with acyclovir: diagnosis and long term outcome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63: 321-326

Muller M, Carter S, Hofer MJ, Campbell IL. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2010; 36: 368-387

Muller M, Carter SL, Hofer MJ, Manders P, Getts DR, Getts MT, Dreykluft A, Lu B, Gerard C, King NJ, Campbell IL. CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J Immunol* 2007; 179: 2774-2786

Muse M, Kane JA, Carr DJ, Farber JM, Lane TE. Insertion of the CXC chemokine ligand 9 (CXCL9) into the mouse hepatitis virus genome results in protection from viral-induced encephalitis and hepatitis. *Virology* 2008; 382: 132-144

Nash AA. T cells and the regulation of herpes simplex virus latency and reactivation. *J Exp Med* 2000; 191: 1455-1458

Newton CR, Graham A. PCR. Spektrum Akademischer Verlag, 1994: 191-194

Nicholas J. Evolutionary aspects of oncogenic herpesviruses. *Mol Pathol* 2000; 53: 222-237

Perez de Diego R, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A, Plancoulaine S, Picard C, Herman M, Cardon A, Durandy A, Bustamante J, Vallabhapurapu S, Bravo J, Warnatz K, Chaix Y, Cascarrigny F, Lebon P, Rozenberg F, Karin M, Tardieu M, Al-Muhsen S, Jouanguy E, Zhang SY, Abel L, Casanova JL. Human TRAF3 adaptor molecule deficiency leads to impaired Toll-like receptor 3 response and susceptibility to herpes simplex encephalitis. *Immunity* 2010; 33: 400-411

Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku CL, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammas D, Davies G, Al-Ghoniaim A, Al-Rayes H, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidallo MA, Ozinsky A, Casanova JL. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 2003; 299: 2076-2079

Randall G, Lagunoff M, Roizman B. Herpes simplex virus 1 open reading frames O and P are not necessary for establishment of latent infection in mice. *J Virol* 2000; 74: 9019-9027

Rani MR, Gauzzi C, Pellegrini S, Fish EN, Wei T, Ransohoff RM. Induction of beta-R1/I-TAC by interferon-beta requires catalytically active TYK2. *J Biol Chem* 1999; 274: 1891-1897

Ransohoff RM. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis* 2002; 186 Suppl 2: S152-156

Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity* 2009; 31: 711-721

Roizman BR-M, N. M., Liu L, Cardona A, Ransohoff RM. Chemokines, mononuclear cells and the nervous system: heaven (or hell) is in the details. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 683-689

Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 891-928

Salmaggi A, Gelati M, Dufour A, Corsini E, Pagano S, Baccalini R, Ferrero E, Scabini S, Silei V, Ciusani E, De Rossi M. Expression and modulation of IFN-gamma-inducible chemokines (IP-10, Mig, and I-TAC) in human brain endothelium and astrocytes: possible relevance for the immune invasion of the central nervous system and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22: 631-640

Sancho-Shimizu V, Zhang SY, Abel L, Tardieu M, Rozenberg F, Jouanguy E, Casanova JL. Genetic susceptibility to herpes simplex virus 1 encephalitis in mice and humans. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 495-505

Schmutzhard E. Viral infections of the CNS with special emphasis on herpes simplex infections. *J Neurol* 2001; 248: 469-477

Sergerie Y, Rivest S, Boivin G. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta play a critical role in the resistance against lethal herpes simplex virus encephalitis. *J Infect Dis* 2007; 196: 853-860

Sheridan PA, Beck MA. The dendritic and T cell responses to herpes simplex virus-1 are modulated by dietary vitamin E. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 1581-1588

Shoji H, Azuma K, Nishimura Y, Fujimoto H, Sugita Y, Eizuru Y. Acute viral encephalitis: the recent progress. *Intern Med* 2002; 41: 420-428

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

Skoldenberg B, Forsgren M, Alestig K, Bergstrom T, Burman L, Dahlqvist E, Forkman A, Fryden A, Lovgren K, Norlin K, et al. Acyclovir versus vidarabine in herpes simplex encephalitis. Randomised multicentre study in consecutive Swedish patients. *Lancet* 1984; 2: 707-711

Theil D, Derfuss T, Paripovic I, Herberger S, Meinel E, Schueler O, Strupp M, Arbusow V, Brandt T. Latent herpesvirus infection in human trigeminal ganglia causes chronic immune response. *Am J Pathol* 2003; 163: 2179-2184

Thomas SK, Lilley CE, Latchman DS, Coffin RS. A protein encoded by the herpes simplex virus (HSV) type 1 2-kilobase latency-associated transcript is phosphorylated, localized to the nucleus, and overcomes the repression of expression from exogenous promoters when inserted into the quiescent HSV genome. *J Virol* 2002; 76: 4056-4067

Thompson KA, Blessing WW, Wesselingh SL. Herpes simplex replication and dissemination is not increased by corticosteroid treatment in a rat model of focal Herpes encephalitis. *J Neurovirol* 2000; 6: 25-32

Tyler KL. Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes* 2004; 11 57-64

Verjans GM, Hintzen RQ, van Dun JM, Poot A, Milikan JC, Laman JD, Langerak AW, Kinchington PR, Osterhaus AD. Selective retention of herpes simplex virus-specific T cells in latently infected human trigeminal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 3496-3501

Vilela MC, Mansur DS, Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Arantes RM, Kroon EG, Campos MA, Teixeira MM, Teixeira AL. Traffic of leukocytes in the central nervous system is associated with chemokine up-regulation in a severe model of herpes simplex encephalitis: an intravital microscopy study. *Neurosci Lett* 2008; 445: 18-22

von Bohlen und Halbach O, Dermietzel R. *Methoden der Neurohistologie*. Spektrum Akad. Verlag, 1999: 34-35

Wacher C, Muller M, Hofer MJ, Getts DR, Zabarar R, Ousman SS, Terenzi F, Sen GC, King NJ, Campbell IL. Coordinated regulation and widespread cellular expression of interferon-stimulated genes (ISG) ISG-49, ISG-54, and ISG-56 in the central nervous system after infection with distinct viruses. *J Virol* 2007; 81: 860-871

Walsh KB, Edwards RA, Romero KM, Kotlajich MV, Stohlman SA, Lane TE. Expression of CXC chemokine ligand 10 from the mouse hepatitis virus genome results in protection from viral-induced neurological and liver disease. *J Immunol* 2007; 179: 1155-1165

Whitley RJ, Alford CA, Hirsch MS, Schooley RT, Luby JP, Aoki FY, Hanley D, Nahmias AJ, Soong SJ. Vidarabine versus acyclovir therapy in herpes simplex encephalitis. *N Engl J Med* 1986; 314: 144-149

Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 541-553; quiz 554-545

Wickham S, Lu B, Ash J, Carr DJ. Chemokine receptor deficiency is associated with increased chemokine expression in the peripheral and central nervous systems and increased resistance to herpetic encephalitis. *J Neuroimmunol* 2005; 162: 51-59

Wojtasiak M, Pickett DL, Tate MD, Londrigan SL, Bedoui S, Brooks AG, Reading PC. Depletion of Gr-1+, but not Ly6G+, immune cells exacerbates virus replication and disease in an intranasal model of herpes simplex virus type 1 infection. *J Gen Virol* 2010; 91: 2158-2166

WuDunn D, Spear PG. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* 1989; 63: 52-58

Wuest TR, Carr DJ. Dysregulation of CXCR3 signaling due to CXCL10 deficiency impairs the antiviral response to herpes simplex virus 1 infection. *J Immunol* 2008; 181: 7985-7993

Wuest TR, Carr DJ. The role of chemokines during herpes simplex virus-1 infection. *Front Biosci* 2008; 13: 4862-4872

Wyllie AH. Apoptosis (the 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer* 1993; 67: 205-208

Yoneyama H, Matsuno K, Toda E, Nishiwaki T, Matsuo N, Nakano A, Narumi S, Lu B, Gerard C, Ishikawa S, Matsushima K. Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *J Exp Med* 2005; 202: 425-435

Zhang SY, Jouanguy E, Sancho-Shimizu V, von Bernuth H, Yang K, Abel L, Picard C, Puel A, Casanova JL. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol Rev* 2007; 220: 225-236

Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, Segal D, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A, Picard C, Chapgier A, Plancoulaine S, Titeux M, Cognet C, von Bernuth H, Ku CL, Casrouge A, Zhang XX, Barreiro L, Leonard J, Hamilton C, Lebon P, Heron B, Vallee L, Quintana-Murci L, Hovnanian A, Rozenberg F, Vivier E, Geissmann F, Tardieu M, Abel L, Casanova JL. TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* 2007; 317: 1522-1527

Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 2006; 7: 243