

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt für Kardiologie und  
Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Charakterisierung dendritischer Zellen  
in der frühen Phase der Enterovirusmyokarditis*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna Theresa Rahnefeld

aus Leisnig

Gutachter/in:     1. *Prof. Dr. rer. nat. Peter M. Kloetzel*  
                          2. *Prof. Dr. rer. nat. Elke Krüger*  
                          3. *Prof. Dr. rer. nat. Hansjoerg Schild*

Datum der Promotion: 07.09.2012

*Meinem Vater*



## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Virale Myokarditis und Dilatative Kardiomyopathie (DCM).....	1
1.1.1 Virale Myokarditis.....	1
1.1.2 Dilatative Kardiomyopathie (DCM).....	1
1.2 Coxsackievirus B3 induzierte Myokarditis.....	2
1.2.1 Coxsackievirus B3.....	2
1.2.2 CVB3-Myokarditis im Mausmodell.....	4
1.3 Dendritische Zellen.....	6
1.3.1 DC-Subtypen.....	6
1.3.2 Veränderungen während der Maturierung.....	7
1.3.3 Mechanismen der Aktivierung.....	7
1.3.4 Antigenpräsentation.....	8
1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	9
1.4.1 Das 20S-Proteasom und der 19S-Regulator.....	9
1.4.2 Das Immunoproteasom.....	11
1.4.3 Der Proteasomaktivator 28.....	11
1.4.4 Die Ubiquitinkaskade.....	12
1.4.5 Besonderheiten des UPS in dendritischen Zellen.....	13
1.4.6 ISG15.....	13
1.5 Herleitung der Fragestellung.....	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Geräte und Software.....	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.3 Allgemeine Substanzen, Lösungen und Puffer.....	18
2.1.4 Medien.....	24
2.1.5 Zellstimulantien und Virus.....	25
2.1.6 Antikörper.....	25
2.1.7 Oligonukleotide und Sonden.....	28

2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Tierversuche .....	28
2.2.1.1 Tierhaltung .....	28
2.2.1.2 Tierstämme .....	29
2.2.1.3 Infektion .....	29
2.2.1.4 Betäubung und Tötung .....	29
2.2.2 Präparation, Aufreinigung und Kultivierung von Zellen.....	29
2.2.2.1 Allgemeine Bedingungen .....	29
2.2.2.2 Zellzahlbestimmung .....	29
2.2.2.3 Generierung von BMDC .....	29
2.2.2.4 Herstellung von Milzeinzelzellsuspensionen.....	30
2.2.2.5 Lyse von Erythrozyten .....	30
2.2.2.6 MACS (magnetic activated cell sort) .....	31
2.2.2.7 Zellstimulationen.....	31
2.2.3 Zellvitalitätsanalysen (MTT-Test).....	32
2.2.4 Immunbiologische Methoden .....	32
2.2.4.1 FACS (fluorescence activated cell sort) .....	32
2.2.4.2 OT-I- und OT-II-Antigenpräsentationsassays .....	33
2.2.4.3 Immunfluoreszenz .....	35
2.2.4.4 ELISAs .....	36
2.2.5 Molekularbiologische Methoden .....	36
2.2.5.1 RNA-Isolierung .....	36
2.2.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung .....	37
2.2.5.3 RNA-Gelelektrophorese .....	37
2.2.5.4 cDNA-Synthese.....	37
2.2.5.5 RTq-PCR(TaqMan <sup>®</sup> ).....	37
2.2.6 Proteinbiochemische Methoden.....	39
2.2.6.1 Zellyse .....	39
2.2.6.2 Proteinquantifizierung nach Pierce.....	39
2.2.6.3 Denaturierende SDS-PAGE .....	39
2.2.6.4 Western Blotting.....	40
2.2.6.5 Proteindetektion.....	40
2.2.6.6 Strippen der Membranen .....	40
2.2.7 Statistische Auswertung.....	41
3. Ergebnisse.....	42
3.1. Reinheit und Ausbeute der DC-Isolation .....	42

3.2	Maturierung und Aktivierung durch CVB3 <i>in vivo</i> .....	43
3.2.1	DC-Maturierung in der CVB3 <i>in vivo</i> Infektion.....	43
3.2.2	Zytokininduktion in DC nach <i>in vivo</i> CVB3-Infektion .....	45
3.2.2	Induktion viraler Rezeptoren in DC nach <i>in vivo</i> CVB3-Infektion .....	47
3.3	Maturierung und Aktivierung durch LPS-Stimulation.....	47
3.3.1	LPS-induzierte Maturierung <i>in vivo</i> .....	47
3.3.2	BMDC Maturierung nach <i>in vitro</i> LPS-Stimulation.....	48
3.3.3	Zytokininduktion in BMDC nach TLR-Stimulation.....	49
3.3.4	Induktion viraler Rezeptoren in DC nach <i>in vitro</i> LPS-Stimulation.....	50
3.4	<i>In vitro</i> CVB3-Infektion von BMDC .....	51
3.5	Antigenpräsentationsassays .....	52
3.5.1	Präsentation via MHC-I .....	52
3.5.2	Präsentation via MHC-II.....	54
3.6	Das Ubiquitin-Proteasom-System während der DC-Maturierung.....	57
3.6.1	Veränderungen auf mRNA-Ebene während der <i>in vivo</i> CVB3-Infektion .....	57
3.6.2	UPS-assoziierte Proteinexpression während der <i>in vivo</i> CVB3-Infektion .....	57
3.6.3	UPS-Regulation in BMDC auf mRNA-Ebene nach TLR-Stimulation .....	58
3.6.2	UPS-Regulation in BMDC auf Proteinebene nach TLR-Stimulation .....	59
3.7	DALIS-Aggregation .....	60
3.7.1	DALIS in DC während der <i>in vivo</i> CVB3-Infektion .....	60
3.7.2	DALIS-Aggregation und Zellvitalität in LPS-stimulierten BMDC.....	61
3.7.3	Inkorporation viraler Proteine in DALIS .....	62
4.	Diskussion.....	64
4.1	Phänotypische Veränderungen der DC während CVB3 Infektion.....	64
4.1.1	CVB3 induzierte DC-Maturierung .....	64
4.1.2	Zytokininduktion durch <i>in vivo</i> CVB3 Infektion.....	68
4.1.3	Maturierung und Aktivierung von DC via LPS.....	69
4.1.4	Bedeutung der fehlenden Maturierung/Aktivierung von A.BY/SnJ DC .....	69
4.2	Antigenpräsentation.....	70
4.2.1	DC der permissiven A.BY/SnJ-Mäusen zeigen eine gestörte Kreuzpräsentation .....	70

## Inhaltsverzeichnis

4.2.2 DALIS-Persistenz in DC von A.BY/SnJ .....	72
4.2.3 Analyse UPS relevanter Proteine als Targets der CVB3 induzierten DC-Maturierung	73
4.2.3.1 Bedeutung von UBE2L6 für die Kreuzpräsentation.....	73
4.2.3.2 Induktion von freiem ISG15 und ISG15-Konjugaten.....	74
4.3 Fazit.....	75
5. Zusammenfassung .....	76
6. Abstract.....	77
7. Literaturverzeichnis .....	V
8. Abkürzungsverzeichnis.....	XIV
9. Erklärung .....	XVII
10. Danksagung .....	XVIII
11. Lebenslauf.....	XIX
12. Publikationen.....	XX



# 1. Einleitung

## 1.1 Virale Myokarditis und Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

### 1.1.1 Virale Myokarditis

Myokarditis ist ein pathologischer Prozess, der histologisch durch das Auftreten von inflammatorischen Infiltraten im Myokard sowie einhergehender Nekrose bzw. Degeneration von Kardiomyozyten ohne Anzeichen einer Ischämie definiert ist (Esfandiarei und McManus 2008).

Es wird zwischen infektiösen (z.B. viral, bakteriell etc.) sowie nicht-infektiösen Ursachen (Noxen, idiopathische Myokarditiden) unterschieden (Aretz 1987). Die klinische Manifestation ist variabel und reicht von Symptomlosigkeit über grippeähnliche Episoden, zum Teil mit kardialen Arrhythmien, Synkopen oder unspezifischen EKG-Veränderungen bis zum Herzversagen (Lieberman *et al.* 1993, Magnani und Dec 2006, Tam 2006). Die Diagnostik ist aufgrund der unspezifischen Symptome schwierig. Die histologische Bewertung einer Endomyokardbiopsie erfolgt nach den Dallas-Kriterien und stellt gleichzeitig den Goldstandard in der Diagnostik einer Myokarditis dar (Aretz 1987). Die WHO/ISFC Task Force stellt die Myokarditis als Entität histologischer, immunologischer und immunhistologischer Diagnostikkriterien dar und ordnet sie den spezifischen, inflammatorischen Kardiomyopathien zu. Danach besteht eine Myokarditis bei dem Nachweis eines entzündlichen Infiltrats von mindestens 14 T-Lymphozyten und/oder Makrophagen/mm<sup>2</sup> (Richardson *et al.* 1996). Entsprechend der WHO-Klassifikation von 1995 kann zwischen einer akuten, chronischen, persistierenden, abheilenden oder abgeheilten Myokarditis unterschieden werden (Maisch *et al.* 2000).

Als potenzielle Erreger der viralen Myokarditis gelten neben dem Parvovirus B19, Influenza A- und B-Viren, Zytomegalie-Viren, das Humane Herpesvirus 6 und Adenoviren vor allem Enteroviren mit Coxsackie B-Viren. Vor allem das Coxsackievirus B3 ist einer der häufigsten Verursacher der viralen Myokarditis (Pauschinger *et al.* 1999, Kim *et al.* 2001, Kuhl *et al.* 2005).

### 1.1.2 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Epidemiologische Daten geben vermehrt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Myokarditis und der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie, so dass diese als ein mögliches Folgestadium einer chronischen Myokarditis diskutiert wird (Selinka *et al.* 2004,

Castellano *et al.* 2008). Bei 9 bis 16 % der DCM-Patienten findet man Anzeichen für eine früher stattgehabte Myokarditis (Herskowitz *et al.* 1993, Felker *et al.* 1999). Die DCM ist charakterisiert als Dilatation eines oder beider Ventrikel sowie durch eine verminderte systolische Pumpfunktion, die klinisch zur Herzinsuffizienz führt (Dorner *et al.* 1997, Bielecka-Dabrowa *et al.* 2008). Die DCM ist die häufigste Ursache für Herzversagen bei Patienten unter 40 Jahren und zeigt eine 5-Jahresmortalität von 50% (Pathak *et al.* 1996, Magnani und Dec 2006). Neben der symptomatischen medikamentösen oder interventionellen Therapie basierend auf den ACC/AHA Heart Failure Guidelines 2005 stellt in einigen Fällen die Herztransplantation die letzte Therapieoption dar (Hunt *et al.* 2005).

## 1.2 Coxsackievirus B3 induzierte Myokarditis

### 1.2.1 Coxsackievirus B3

Das Coxsackievirus B3 (CVB3) gehört zur Familie der Picornaviridae, genauer zur Gattung der Enteroviren. CVB3 ist ein unbehülltes RNA-Virus, dessen Genom in Form von positiver Einzelstrang-RNA (+ssRNA) von einem ikosahedrischem Kapsid umschlossen wird. Die Infektion erfolgt auf fäkalem oder oralem Weg (Dunn *et al.* 2000, Harvala *et al.* 2002, Harvala *et al.* 2005).

Der Eintritt in die Zelle erfolgt hauptsächlich über zwei Rezeptoren, den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) und den *decay-accelerating factor* (DAF, CD55) (Esfandiarei und McManus 2008). In unpolaren Geweben geschieht die Aufnahme z.B. durch Clathrin vermittelte Endozytose (Coyne und Bergelson 2006). Nach Freisetzung aus den Virionen kann das 7,4 kb große Virusgenom, da es als +ssRNA vorliegt, sofort von der Wirtszelle translatiert werden. Über das VPg-Protein kann die RNA als Template für ein virales Polyprotein in das Ribosom eintreten (Dunn *et al.* 2000, Harvala *et al.* 2002, Harvala *et al.* 2005) (vgl. Abb. 1).

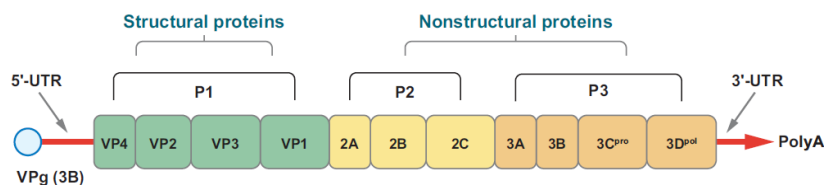


Abb. 1: Aufbau des CVB3-Genoms: Der kodierende Bereich der RNA (open reading frame) wird von nicht kodierenden Regionen (NCR) eingerahmt und die Translation des Polyproteins durch das VPg-Protein am 5' Ende eingeleitet. An der kodierenden Region ist die Unterteilung in spätere Einzelproteine erkennbar (aus Esfandiarei 2008).

Diverse Virusproteasen, z.B. 2A<sup>pro</sup> und 3C<sup>pro</sup> schneiden das Polyprotein in drei Vorläuferproteine P1, P2 und P3, wobei aus P1 mithilfe der Protease 3CD<sup>pro</sup> die Kapsidproteine VP1-VP4 und aus P2 und P3 weitere Proteasen und Polymerasen entstehen (Dunn *et al.* 2000, Harvala *et al.* 2002, Harvala *et al.* 2005) (s. Tab. 1).

Tab. 1: Proteom von CVB3 (nach (Esfandiarei und McManus 2008, Sean und Semler 2008))

Vorläuferprotein	Protein	Funktion
P1	VP1-VP4	Kapsidproteine
P2	2A <sup>Pro</sup>	Stop der Wirtszelltranslation (Zerstörung von eIF4G und poly(A)-BP) und Wirtszelltranskription (Hemmung von TBP)
		Induktion von Apoptose
		Zerstörung des Zytoskeletts (Dystrophin)
		Schnitt zwischen P1 und P2
	2B	Erhöhung der Zellmembranpermeabilität
	2C	
P3	3A	Inhibition der Wirtszellsekretion
	3B	VPg: Initiation der Translation, Primerfunktion für + und - ssRNA
	3C <sup>pro</sup>	Inhibition zellulärer Transkriptionsfaktoren
	3D <sup>pol</sup>	RNA-abhängige RNA-Polymerase
		Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren (CREP, TBP)
		Apoptoseinitiation über Induktion von Bax
		Initiation der Transkription (Uridylierung von VPg)

Während durch die verschiedenen Proteasen die Wirtszelltranskription und -translation sowie der intrazelluläre Stofftransport durch die Zerstörung des Zytoskeletts zum Erliegen kommt, wird mit Hilfe der RNA-abhängigen RNA-Polymerase aus der positiven +ssRNA ein komplementärer negativer -ssRNA-Strang transkribiert, der als Template für die Vervielfältigung des Genoms in Form von +ssRNA dient. Diese bildet in Kombination mit

neuen Kapsidproteinen wieder infektiöse Viruspartikel, die nach Zytolyse freigesetzt werden und anschließend andere Zellen infizieren (van Kuppeveld *et al.* 1997). Kann das Virus dieser Strategie ungehindert folgen, benötigt es vom Zelleintritt bis zur Freisetzung der neuen Virionen etwa neun Stunden (Esfandiarei und McManus 2008).

### 1.2.2 CVB3-Myokarditis im Mausmodell

Eines der wichtigsten Werkzeuge bei der Erforschung der CVB3-Myokarditis stellt ein sehr gut etabliertes Mausmodell dar. Nach der Infektion mit CVB3 kommt es wie im humanen System zur Virusreplikation in Herz, Pankreas, Gehirn und der Milz (Rabin und Melnick 1964, Chow *et al.* 1991). Man unterscheidet resistente Stämme (z.B. C57BL/6), die nach einer akuten Phase in der Lage sind, das Virus zu eliminieren und komplett ausheilen, von solchen (z.B. A.BY/SnJ oder BALB/c), die im Anschluss an die akute Phase durch Viruspersistenz eine chronische Myokarditis entwickeln (suszeptible oder permissive Stämme) (Rabin und Melnick 1964, Chow *et al.* 1991).

Auf welche Art und Weise die Virusinfektion zu Myokardschäden führt, ist umstritten. Es werden drei Annahmen diskutiert, deren Beitrag zur myokardialen Schädigung in den zeitlichen Kontext der Virusinfektion einzuordnen ist:

- direkte, von CVB3 vermittelte Schädigung
- Myokardschädigung im Rahmen der Immunantwort
- Initiation autoimmunologischer Prozesse

In der Initialphase der Myokarditis (d3 bis d5 p.i.) kommt es noch vor der Invasion von Immunzellen zur Schädigung der Kardiomyozyten (Woodruff und Woodruff 1974, McManus *et al.* 1993). Die These der direkt virusvermittelten Schädigung wird darüber hinaus durch die Beobachtung von zytopathischen Effekten (CPE) bei der *in vitro*-CVB3-Infektion von kardialen Fibroblasten, Kardiomyozyten und HeLa-Zellen gestützt. (Herzum *et al.* 1994, Klingel *et al.* 2004). Die kardiale Expression eines cDNA-Konstrukts des CVB3 Genoms (CVB3 $\Delta$ VP0) führt ebenfalls ohne die Bildung infektiöser Viruspartikel und in Abwesenheit inflammatorischer Vorgänge zur Myokardschädigung und zur Herzinsuffizienz (Wessely *et al.* 1998).

Anschließend kommt es zur Infiltration von Immunzellen in das Myokard. Resistente als auch suszeptible Stämme bilden nach intraperitonealer CVB3 Infektion an d4 bis d8 p.i. eine akute Myokarditis aus. Diese Phase ist durch die virale Replikation im Myokard sowie die Invasion verschiedener Immunzellen wie Makrophagen, NK-Zellen sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-

Lymphozyten gekennzeichnet (Henke *et al.* 1995, Jäkel *et al.* 2009). Antigen präsentierende Zellen (APC) nehmen virale und durch Myozytolyse frei werdende kardiale Antigene z.B. durch Phagozytose auf und präsentieren sie über MHC-I und MHC-II-Komplexe T- und B-Lymphozyten. Das führt zur Produktion von Antikörpern oder Zerstörung infizierter Kardiomyozyten z.B. durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (CTL). Weiterhin produzieren APC proinflammatorische Zytokine wie IL1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$ , welche die inflammatorischen Prozesse verstärken und aufrecht erhalten (Henke *et al.* 1992). Die These der immunvermittelten Myokardschädigung wird weiterhin durch Untersuchungen von Woodruff & Woodruff unterstützt, die im CVB3-Mausmodell eine geringere Mortalität und verminderte Myokardschädigung nach Elimination von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zeigen konnten (Woodruff und Woodruff 1974). In Zellkulturexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass auch infizierte kardiale Fibroblasten durch die Produktion von IL1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  die inflammatorischen Prozesse unterhalten und so zur immunvermittelten Myokardzerstörung beitragen (Heim *et al.* 2000).

In resistenten Stämmen wie C57BL/6 erfolgt in dieser Phase der Infektion auch die Viruseliminierung mit anschließender Genesung, während sich in permissiven Stämmen die chronische Krankheitsphase (d15-90) mit Viruspersistenz und anhaltender Inflammation anschließt. Im Falle einer unvollständigen Viruseliminierung kann es jedoch z.B. durch dauerhafte T-Zellaktivierung und die Bildung von Autoantikörpern zur weiteren Myokardschädigung im Rahmen autoimmunologischer Prozesse kommen (Gupta *et al.* 2008). In diesem Kontext gelang der Nachweis von Autoantikörpern gerichtet gegen kardiale Strukturen wie Laminin, den  $\beta$ 1-Rezeptor, die schwere Kette des kardialen Myosins oder den mitochondrialen ATP/ADP-Translokator bei Myokarditis- bzw. DCM-Patienten (de Scheerder *et al.* 1989, Wolff *et al.* 1989, De Scheerder *et al.* 1991, Caforio *et al.* 1997). Auch im Mausmodell konnten Autoantikörper detektiert werden (Dorner *et al.* 1997). Weiterhin konnten durch den Transfer myokardialer, autoantigen-spezifischer T-Zellen von Myokarditispatienten in SCID-Mäusen kardiale Schäden mit daraus folgender Verschlechterung der Herzfunktion durch Immuninfiltration hervorgerufen werden (Schwimmbeck *et al.* 1994). Ferner wurde für die gegen sarkolemmale Strukturen gerichteten Antikörper Kreuzreaktivität mit Virusepitopen gezeigt (Shikhman *et al.* 1993, Gauntt *et al.* 1995, Huber und Cunningham 1996). Im Mausmodell der chronischen Myokarditis kommt es durch zunehmende kardiale Fibrose und Ventrikeldilatation zu einer starken Einschränkung der linksventrikulären Funktion (Chow *et al.* 1991, Klingel *et al.* 1992). Diese Phase entspricht der chronischen Myokarditis und der DCM im humanen System.

Somit ist die kardiale Schädigung in der CVB3-Myokarditis ein multifaktorielles Geschehen.

### 1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (dendritic cells, DC) sind professionelle antigenpräsentierende Zellen und nehmen aufgrund ihrer Fähigkeit, naive T-Zellen zu aktivieren, einen hohen Stellenwert bei der Initiierung der adaptiven Immunantwort ein (Cella *et al.* 1997). Sie entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen, wobei sowohl myeloide (M-DC) als auch lymphoide Vorläufer (L-DC) existieren (Steinman und Cohn 1974, Manz *et al.* 2001, Ardavin 2003). Funktionelle Unterschiede scheinen dabei *in vivo* keine bedeutende Rolle zu spielen, da alle bekannten DC-Subtypen sowohl aus myeloiden als auch aus lymphoiden Vorläuferzellen entstehen können (Wu *et al.* 2001, D'Amico und Wu 2003).

#### 1.3.1 DC-Subtypen

Neben dem charakterisierenden Integrin für konventionelle dendritische Zellen (cDC) CD11c tragen DCs weitere Oberflächenmoleküle, anhand derer sie sich in Subpopulationen unterteilen lassen. Tab. 2 zeigt basierend auf Aussagen von Cerovic *et al.* (2009) sowie Süss und Shortman (1996) schematisch die Unterteilung in Subpopulationen:

Tab. 2: Einteilung der murinen cDC in CD8 $\alpha$ - und CD8 $\alpha$ + Subtypen und typspezifische Eigenschaften (Suss und Shortman 1996, Cerovic *et al.* 2009)

CD11c <sup>+</sup>	
CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>	CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <math>\downarrow</math>                      CD11b<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> </div> <div style="text-align: center;"> <math>\downarrow</math>                      CD11b<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> </div> </div>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aufnahme apoptotischer Zellen (Iyoda <i>et al.</i> 2002)</li> <li>• effiziente Aktivierung von CTL, MHC-I-Präsentation und Kreuzpräsentation (den Haan <i>et al.</i> 2000)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• bessere Phagozytosefähigkeit</li> <li>• effiziente Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und MHC-II-Präsentation (Dudziak 2007)</li> </ul>

Neben den konventionellen DC (cDC) existieren auch sog. plasmazytoide DC (pDC). pDC zeichnen sich vor allem durch eine starke Sekretion von Typ-I-IFN aus und nehmen dadurch einen hohen Stellenwert bei der viralen Immunantwort ein (Gilliet *et al.* 2008). Obwohl auch pDC in der Lage sind, Antigene aufzunehmen und zu präsentieren, wird ihre Bedeutung im Bezug auf Antigenpräsentation und T-Zell-Priming aufgrund geringerer Phagozytosefähigkeit und herabgesetzter Expression von Maturierungsmarkern wesentlich geringer eingeschätzt als

bei cDC (Robinson *et al.* 1999, Colonna *et al.* 2004, Liu 2005, Jaehn *et al.* 2008, Villadangos und Young 2008).

### **1.3.2 Veränderungen während der Maturierung**

DC existieren in zwei verschiedenen Reifungszuständen: Vor dem Kontakt mit Antigenen residieren sie in der Körperperipherie und in sekundär lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten als sog. immature DC (DC<sub>im</sub>). Nach dem Kontakt mit Antigenen können sie in einen maturen Zustand übergehen, der durch charakteristische Veränderungen gekennzeichnet ist (Reis e Sousa 2006).

Immature DC verfügen über eine ausgeprägte Fähigkeit via Phagozytose, Makropinozytose oder Clathrin-vermittelte Endozytose Antigene aufzunehmen (Lanzavecchia 1996). Die Aufnahme eines Antigens leitet die Maturierung ein, die durch folgende Veränderungen begleitet wird: Die Zellen bilden ihre namensgebenden Dendriten aus und reduzieren ihre Phagozytosekapazität. Im Gegenzug dazu steigert sich das Potential, Antigene zu prozessieren, sie über hochregulierte MHC-I- und MHC-II-Moleküle CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu präsentieren und diese damit zu aktivieren (Banchereau und Steinman 1998, Banchereau *et al.* 2000). Dies stellt nach Janeway das 1.Signal der Immunantwort dar. Um eine effiziente T-Zellaktivierung zu initiieren, ist aber das sog. 2.Signal notwendig, ohne dessen Anwesenheit keine suffiziente Aktivierung der T-Zellen erreicht, sondern eher Toleranz vermittelt wird. Gemeint ist damit die zusätzliche Expressionssteigerung von kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 oder CD40 (Reis e Sousa 2006). CD80 und CD86 (B7-1 und B7-2) interagieren mit dem CD28-Rezeptor der entsprechenden T-Zelle. CD40 interagiert mit dem CD40-Ligand (CD40L) bereits aktivierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und führt so zur Maturierung von DC, die dann in der Lage sind, zytotoxische T-Zellen (CTL) zu aktivieren (Behrens *et al.* 2004). Als 3.Signal werden sezernierte Zytokine, die zu einer Polarisierung der T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>-Zellen) in T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Antwort führen, aufgefasst (Kapsenberg 2003).

Ferner kommt es zur verstärkten Expression von Homing-Rezeptoren wie z.B. CCR7, die die Migration zu den sekundären lymphatischen Organen, den Orten des T-Zell-Primings, leiten (Banchereau *et al.* 2000, Caux *et al.* 2000).

### **1.3.3 Mechanismen der Aktivierung**

Die Aktivierung dendritischer Zellen durch Antigene erfolgt über verschiedene Mechanismen. Neben der bereits oben beschriebenen unspezifischen Phagozytose besteht die Möglichkeit der rezeptorvermittelten Endozytose bzw. die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden

durch Bindung von Pathogenen an Toll-like-Rezeptoren (TLR). TLR sind Transmembranproteine mit Homologien zur IL-1-Rezeptorsuperfamilie und werden durch Bindung von Pathogen assoziierten Mustern (pathogen associated molecular pattern PAMP) aktiviert (Kawai und Akira 2008). So führt z.B. die Bindung von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) zur Aktivierung von TLR4. TLR3 wird durch doppelsträngige (virale) RNA aktiviert (Kapsenberg 2003, Takeda und Akira 2005). Intrazelluläre Signalkaskaden führen zu den für die Maturierung charakteristischen Veränderungen von DCs (Kapsenberg 2003). Hier stehen zwei intrazelluläre Adaptormoleküle im Vordergrund: MyD88 und TRIF (Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$ ) (Yamamoto *et al.* 2002, Kawai und Akira 2008). MyD88 führt zur Aktivierung von MAP-Kinasen, NF $\kappa$ B u.a. zur Expression verschiedener Zytokine wie IL-6, TNF $\alpha$  und IL12p40 (Kawai und Akira 2008). Über die TRIF-abhängige Signalkaskade kommt es durch die Aktivierung des IFN-regulatorischen Faktors 3 (IRF-3) zur Expression von Typ I Interferonen und damit auch zur Induktion verschiedener IFN-induzierter Gene und letztendlich auch auf diesem Weg zur Aktivierung von MAP-Kinasen und NF $\kappa$ B.

Auch virale Antigene können Aktivatoren unreifer DC darstellen, wobei die Infektionsmechanismen abhängig vom Virus differieren. Oft kommt es nach unspezifischer Phagozytose erst zu antiviralen Kaskaden nach Bindung an zytoplasmatische Erkennungsproteine wie TLR-3 (virale dsRNA), TLR7/8 oder TLR9. Neben den TLR existiert die Gruppe der zytoplasmatischen RNA-Helikasen (RLR: RIG-1 like receptors) wie zum Beispiel RIG-1 (retinoic acid-inducible gene I) oder Mda5 (Melanoma differentiation-associated gene 5). Die Interaktion von RIG-1 bzw. Mda5 mit viraler RNA führt über die Aktivierung von NF $\kappa$ B, IRF1 und MAP-Kinasen zu antiviralen Effekten in der Zelle (Gabriele und Ozato 2007). Für Mda-5 wurde die Interaktion mit Picornaviren gezeigt (Gitlin *et al.* 2006). Eine dritte Möglichkeit, unabhängig von TLR und RLR virales Genom zu erkennen, bietet die PKR (RNA-activated protein kinase), deren Aktivierung durch doppelsträngige RNA die virale Replikation hemmt und zur Zytokinfreisetzung führt (Williams 1999).

### **1.3.4 Antigenpräsentation**

DC präsentieren Antigene auf verschiedene Art und Weise. Antigenpräsentation extrazellulärer Antigene via MHC-II wird auch als exogener Weg bezeichnet (Castellino und Germain 1995).



Desweiteren besteht über den endogenen Weg die Möglichkeit, zytoplasmatisch generierte Peptide über MHC-I-Komplexe zu präsentieren. Hierbei erfolgt die proteasomale Degradierung zytoplasmatischer Proteine und anschließend der Transfer über einen Transporter (transporter associated with antigen processing, TAP) ins ER. Nun kommt es mit Hilfe von Chaperonen zur Bindung des resultierenden Peptids an neu synthetisierte alpha-Ketten und beta-Microglobulin. In Exozytosevesikeln erfolgt der Transport in die Zellmembran (Pamer und Cresswell 1998). Neben den auch in anderen Zellen üblichen Möglichkeiten, Antigene über den genannten endogenen oder exogenen Weg zu präsentieren, besitzen die dendritischen Zellen die Fähigkeit der Kreuzpräsentation. Diese beinhaltet die Prozessierung exogener, endozytotisch aufgenommener Proteine und deren Präsentation für zytotoxische CD8-T-Zellen über MHC-I-Komplexe (Reis e Sousa und Germain 1995). Schuurhuis *et. al* fassen die dafür diskutierten Mechanismen so zusammen (Schuurhuis *et al.* 2006):

- TAP- unabhängige Hydrolyse von Antigenen in Endosomen
- Degradierung im Proteasom und TAP-abhängige Beladung der MHC-I-Komplexe im ER
- Degradierung im Proteasom, aber Bindung an MHC-I in Phagosomen (nicht im ER)

#### ***1.4 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)***

Um eine suffiziente Zellhomöostase zu gewährleisten, ist neben der intrazellulären Proteinsynthese auch der Abbau von defekten, überalterten oder von extrazellulär aufgenommenen Proteinen sowie auch die partielle Proteolyse von inaktiven Proteinvorstufen, z.B. im Zusammenhang mit der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, unabdingbar. Es werden dafür zwei Möglichkeiten der intrazellulären Degradierung in Betracht gezogen: ein lysosomaler und ein proteasomaler Weg (Vabulas 2007). Im Folgenden wird der Schwerpunkt auf dem Proteasom und seinen funktionellen Partnern liegen.

##### **1.4.1 Das 20S-Proteasom und der 19S-Regulator**

Das Proteasom stellt sich als multikatalytische Protease mit einem 20S-Kernkomplex und verschiedenen Regulatoren dar. Das 20S-Proteasom ist zylinderförmig, bestehend aus vier Ringen mit je sieben Untereinheiten, die in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Subtypen eingeteilt werden. Die beiden äußeren Ringe (je  $\alpha 1$  bis  $\alpha 7$ ) stellen den Eingang bzw. Ausgang für die zu degradierenden Proteine dar. Die beiden inneren Ringe (je  $\beta 1$  bis  $\beta 7$ ) beherbergen mit den je doppelt vorkommenden Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  die insgesamt sechs katalytisch aktiven Zentren

(Kloetzel 2001). Die unterschiedlichen Schnittstellenpräferenzen der katalytischen Untereinheiten fasst Tab. 3 zusammen.

Tab. 3: Eigenschaften der katalytisch aktiven Proteasomuntereinheiten und ihren induzierbaren Analogons (Tanaka 2009)

Untereinheit	Proteaseart	Spaltung nach	Immununtereinheit
$\beta 1$	Caspase-ähnlich	sauren AS	$\beta 1i$ (LMP2)
$\beta 2$	Trypsin-ähnlich	basischen AS	$\beta 2i$ (MECL-1)
$\beta 5$	Chymotrypsin-ähnlich	hydrophoben AS	$\beta 5i$ (LMP7)

Abb. 2 gibt eine Schemazeichnung des Proteasoms wieder:

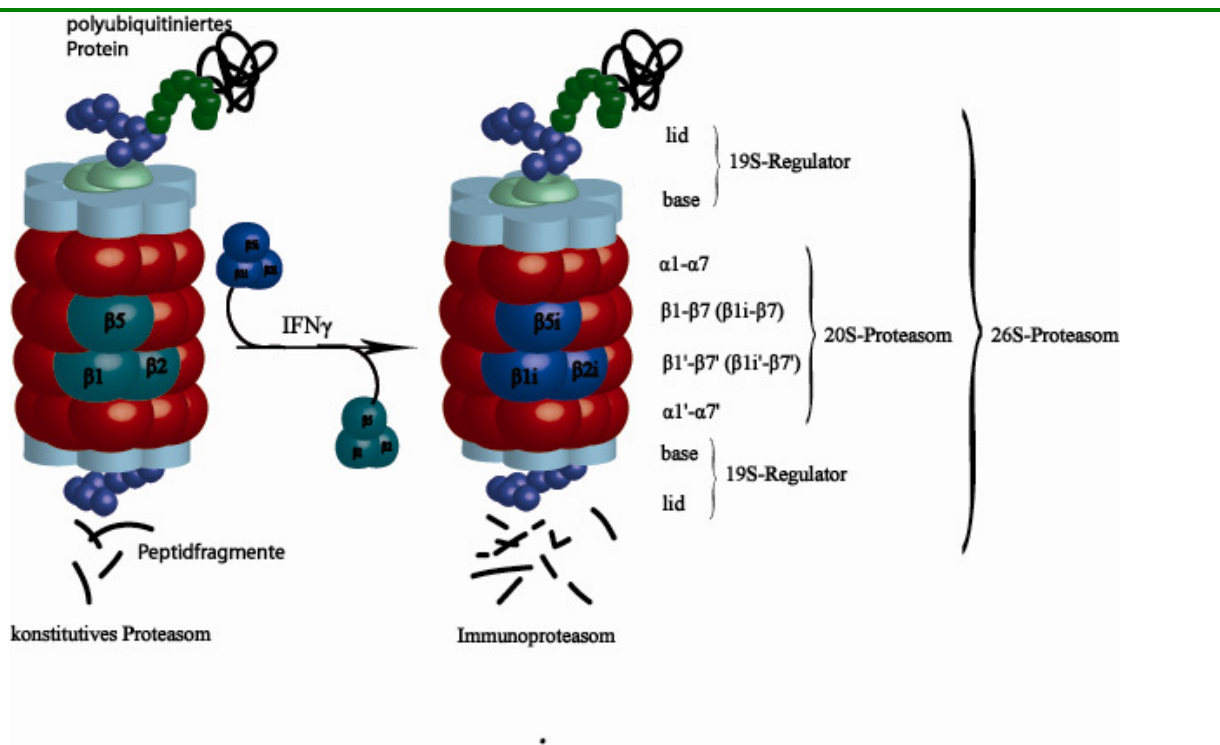


Abb. 2: Schematischer Aufbau des Proteasoms: Der 20S-Kern besteht aus vier heptameren Ringen mit je sieben  $\alpha$ -Untereinheiten außen und sieben  $\beta$ -Untereinheiten innen (rot), von denen drei katalytische Aktivität besitzen (türkis). Unter inflammatorischen Bedingungen entsteht mit dem Austausch der konstitutiven UE durch die Immununtereinheiten (blau) nach *de novo*-Synthese das Immunproteasom. Flankiert wird der 20S-Kern je durch den 19S-Regulator, bestehend aus Basis und Haube (s. Text) (Kloetzel 2001, Kloetzel 2004).

Im freien 20S-Proteasom sind die alpha-Ringe verschlossen und verhindern so den Eintritt von nicht zum Abbau bestimmten Proteinen. An dieser Stelle wird der 19S-Regulatorkomplex

benötigt (Groll *et al.* 2000, Benaroudj *et al.* 2003, Smith *et al.* 2005). Der 19S-Regulator besteht aus zwei Teilen, bezeichnet als Basis (base) und Haube (lid). Dabei beinhaltet die Basis sechs Untereinheiten mit AAA-ATPase-Aktivität (regulatory particle of triple-ATPase, Rpt 1-6) sowie vier Nicht-ATPasen (regulatory particle of non ATPase, Rpn 1, 2, 10, 13). Die AAA-ATPasen zeigen reverse Funktion zu Chaperonen, spielen also bei der Entfaltung der Substrate eine tragende Rolle. Auch öffnen sie ATP-abhängig die alpha-Ringe und gewähren so den Zugang zum katalytischen Kern. Die Haube, bestehend aus den neun Nicht-ATPasen Rpn 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 und 15, enthält Bindungsstellen für ubiquitinylierte und nicht ubiquitinylierte Proteine sowie Enzyme für den Abbau von Polyubiquitinketten (Ferrell *et al.* 2000, Kloetzel 2004, Tanaka 2009). Der Komplex aus 20S-Proteasom und zwei 19S-Regulatoren wird als 26S-Proteasom bezeichnet (Kloetzel 2001) (vgl. Abb. 2).

#### **1.4.2 Das Immunoproteasom**

Unter Inflammation kommt es unter anderem durch IFN $\gamma$ -Sekretion zum Austausch der drei konstitutiven katalytisch aktiven Untereinheiten des 20S-Proteasoms durch Immununtereinheiten  $\beta$ 1i (LMP2),  $\beta$ 2i (MECL-1) und  $\beta$ 5i (LMP7) (vgl. Abb. 2). Durch den Einbau dieser Immununtereinheiten entsteht via *de novo*-Synthese das Immunoproteasom (Kloetzel 2004).

So kommt es bei inflammatorischen Prozessen in Anwesenheit des Immunoproteasomes zu einem veränderten Repertoire von MHC-I-Epitopen. Beispielsweise werden diverse virale Epitope durch das Immunoproteasom vermehrt oder sogar abhängig von ihm generiert, während andere Epitope verstärkt oder ausschließlich durch das konstitutive Proteasom prozessiert werden (Kloetzel 2001, Kloetzel 2004, Kloetzel und Ossendorp 2004).

#### **1.4.3 Der Proteasomaktivator 28**

Der Proteasomaktivator PA28 (auch 11S Regulator) ist ebenfalls durch IFN $\gamma$  induzierbar. Dabei handelt es sich um einen heteroheptamerischen oder heterohexamerschen Komplex, bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten (Kloetzel 2001, Ossendorp *et al.* 2005, Vabulas 2007). Die Bindung erfolgt ähnlich wie beim 19S-Regulator an die äußeren  $\alpha$ -Ringe des 20S-Proteasoms, wobei neben der PA28-20S-PA28-Formation auch sogenannte Hybridproteasomen (19S-20S-PA28) entstehen (Hendil *et al.* 1998). Auf welche Art PA28 den Substratumsatz beschleunigt, ist nicht geklärt. PA28 erhöht die Aktivität des 20S-Proteasoms, ohne selbst hydrolytische Aktivität zu zeigen (Dubiel *et al.* 1992). Diskutiert wird unter anderem ein erhöhter Substratumsatz durch eine PA28 vermittelte vergrößerte Öffnung der  $\alpha$ -Ringe (Whitby *et al.* 2000, Kloetzel 2004, Strehl *et al.* 2005). Darüber hinaus

führt PA28 auch zu einem vergrößerten Spektrum resultierender Peptidfragmente (Groettrup *et al.* 1995).

### 1.4.4 Die Ubiquitinkaskade

Für die proteasomale Degradierung von Proteinen ist deren Konjugation mit Ubiquitin, einem 8,5 kDa großen Peptid bestehend aus 76 Aminosäuren, essenziell. Dieser Prozess wird als Ubiquitinylierung bezeichnet und involviert verschiedene Enzyme (vgl. Abb. 3): Zuerst entsteht ATP-abhängig eine energiereiche Thioesterbindung zwischen dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins und dem Cystein im aktiven Zentrum eines E1-Enzyms (ubiquitin-activating enzyme). Im nächsten Schritt folgt die Übertragung des Ubiquitins auf den Cysteinrest eines E2-Enzyms (ubiquitin-conjugating enzyme) und anschließend die Bindung dieses Komplexes an ein E3-Enzym (ubiquitin-protein ligase), welches das Ubiquitin auf einen Lysinrest des zu konjugierenden Substrats überträgt. Es können entweder ein einzelnes Ubiquitinmolekül an ein Substrat gebunden werden (Monoubiquitinylierung) bzw. mehrere einzelne Ubiquitinmoleküle (multiple Monoubiquitinylierung) oder es erfolgt die Konjugation mit einer Ubiquitinkette (Polyubiquitinylierung). Deubiquitinylierende Enzyme führen zur Lösung der Ubiquitinkette bzw. der Ubiquitin-Substratbindung (Liu *et al.* 2005, Hjerpe und Rodriguez 2008).

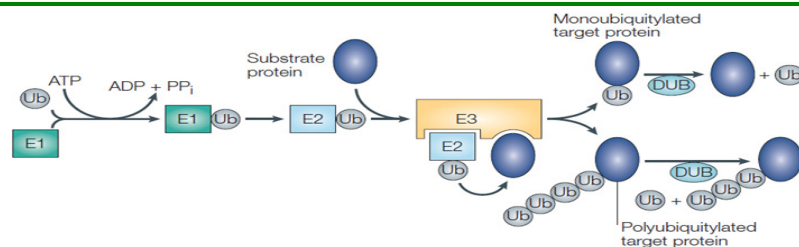


Abb. 3: Ubiquitinylierungskaskade (Liu *et al.* 2005)

Bei der Bildung von Polyubiquitinketten erfolgt die Verknüpfung der einzelnen Ubiquitinmoleküle an verschiedenen Lysinresten, in der Regel an Position 48 oder 63 (K48 und K63-linked polyubiquitin chains). Dabei scheinen verschiedene Kettenstrukturen verschiedene Effekte auf das gebundene Substrat zu haben, wobei nicht ausschließlich der proteasomale Abbau des Substrats das Ziel darstellt (Hjerpe und Rodriguez 2008). Beispielsweise reprimiert Monoubiquitinylierung die Rezeptorexpression über endosomale/lysosomale Wege, Proteininteraktionen können über K63-Polyubiquitinketten moduliert werden. Im Gegensatz dazu scheinen K48-Polyubiquitinketten tatsächlich als Degradierungssignal zu wirken. Es existieren nach Hjerpe (2008) noch weitere

Kettenverknüpfungen (insgesamt sieben: K6, K11, K27, K29, K33, K48, und K63). Die Diskriminierung der unterschiedlichen Ubiquitinbindungsstellen erfolgt durch zahlreiche UBDs (ubiquitin-binding domains) (Chen und Sun 2009).

#### **1.4.5 Besonderheiten des UPS in dendritischen Zellen**

Das UPS dendritischer Zellen weist einige Besonderheiten auf. So sind die Immununtereinheiten  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$ ,  $\beta 5i$  bereits in unreifen Zellen relativ stark exprimiert. Macagno *et al.* (1999) konnten per Immunopräzipitation zeigen, dass in unreifen DC das Verhältnis zwischen konstitutivem und induziertem Proteasom ausgeglichen ist, mit Beginn der Maturierung dann zunehmend nur noch Immunoproteasomen assembliert werden.

Während Macagno *et al.* (1999) eine Induktion sowohl von PA28 $\alpha$  als auch PA28 $\beta$  während der Maturierung darstellten, konnten Ossendorp *et al.* (2005) zeigen, dass die  $\beta$ -UE wesentlich stärker induziert wird und dass v.a. die Menge von PA28 $\beta$  entscheidend für die Anzahl vorhandener aktiver PA28 $\alpha\beta$ -Komplexe ist. Die differentielle Regulation von PA28 $\alpha$  und  $\beta$  wird durch eine nur bei PA28 $\beta$  vorhandene Bindungsstelle für NF $\kappa$ B (s.o.) in der Promotorsequenz begründet (Macagno *et al.* 1999, Ossendorp *et al.* 2005).

Während des Reifungsprozesses kommt es bei DCs zur DALIS-Bildung (DALIS: Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures) (Lelouard *et al.* 2002). Es handelt sich hierbei um eine transiente Anhäufung von neu synthetisierten, mono- und polyubiquitinylierten Proteinen im Zytosol der DCs. Die ersten DALIS treten ca. 4 Stunden nach Aktivierung der Zellen auf und erreichen ihre maximale Größe von bis zu 5  $\mu$ m nach 8 bis 12 Stunden, danach werden sie zunehmend kleiner, bis sie nach 24 bis 36 Stunden vollständig abgebaut sind. DALIS werden proteasomal degradiert (Lelouard *et al.* 2002). Die genaue Funktion der DALIS ist nicht geklärt. Ein Ansatz postuliert die Speicherung sog. DRiPs (defective ribosomal products), Proteine verschiedenster Herkunft (endogen, mutiert, viral), die entweder nicht mehr benötigt werden oder direkt nach der Synthese falsch gefaltet wurden. Betrachtet man diese Proteine als Antigenquelle, würde dies bedeuten, dass sie als Bestandteil der DALIS erst dann proteasomal degradiert und anschließend via MHC-I präsentiert werden, wenn die für eine effektive T Zelle Aktivierung nötigen kostimulatorischen Signale ebenfalls voll ausgeprägt sind (Herter *et al.* 2005).

#### **1.4.6 ISG15**

Neben Ubiquitin wurden in den letzten Jahren zahlreiche Proteine entdeckt, die durch Konjugation an verschiedenste Proteine deren Stabilität, Funktion oder zelluläre Lokalisation verändern. Zu dieser Proteingruppe der ubiquitin-like-modifier gehört auch das durch Typ-I

Interferone induzierte ISG15 (IFN-stimulated gene 15). Dieses 15 kDa große Protein besteht aus zwei Ubiquitin-ähnlichen Domänen (je ca. 30 % Homologie) (Staub 2004). Die Konjugation von Proteinen mit ISG15 (ISGylierung, reversibler Prozess) weist starke Analogien zur Ubiquitinylierung (s.o.) auf. Dabei agieren die entsprechenden E1-Enzyme (z.B. UBE1L) spezifisch für ISG15, während die E2- (UBE2L6), E3-Enzyme (HERC5, TRIM25) Funktionen in beiden Kaskaden übernehmen können (Zhao *et al.* 2004, Takeuchi *et al.* 2005). Während die Ubiquitinylierung in infizierten Zellen oft als Werkzeug der Viren genutzt wird, die Bildung neuer infektiöser Viruspartikel auf verschiedenste Weise zu erhöhen, fungiert ISG15 als antivirales Protein. Dies wurde für RNA- und DNA-Viren (Influenza A und B, Sindbisviren, HSV-1, RSV, LCMV, HIV-1 oder Ebola) gezeigt (Harty *et al.* 2009).

### ***1.5 Herleitung der Fragestellung***

Faktoren, die die unterschiedlichen Verläufe der CVB3-Myokarditis bedingen, können im Mausmodell mit resistenten C57BL/6 und suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen systematisch evaluiert werden.

Ein wichtiger Ansatz ist dabei die gerichtete Immunantwort gegen CVB3. In diesem Zusammenhang wurde bereits das Ubiquitin-Proteasom-System als potenzielle Quelle MHC-I restringierter CVB-Epitope untersucht. Jäkel *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die Induktion von Immunoproteasomen in resistenten Tieren wesentlich früher (d4 p.i.) ein Maximum erreicht als in permissiven Tieren (d8 p.i.). Die Generierung diverser CVB3-Epitope durch isolierte kardiale Proteasomen beider Stämme folgte dieser Kinetik. Dies ist vermutlich auf eine verspätete, bzw. reduzierte Typ I IFN-Antwort in den A.BY/SnJ-Tieren zurückzuführen und spiegelt sich im Expressionsmuster anderer Typ I-IFN-induzierter Gene der Antigenpräsentationsmaschinerie wie z.B. OASL-2, TAP-1 oder MHC-I wider (Jäkel *et al.* 2009). Weiterhin wiesen permissive A.BY/SnJ-Mäuse Defekte bei der spezifischen adaptiven Immunantwort auf: DC als professionelle antigenpräsentierende Zellen der suszeptiblen Tiere sezernierten wesentlich geringere Mengen der Chemokine RANTES und IP-10 als DC von resistenten C57BL/6 Mäusen. Außerdem wurde auf RNA-Ebene in plasmazytoiden DC des resistenten Stammes signifikant mehr Typ I-IFN nachgewiesen. Während in den C57BL/6-Tieren eher einen Anstieg der CD11c<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>-Population zu verzeichnen war, kam es in der Milz der A.BY/SnJ-Mäuse zu einer Zunahme der CD11c<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>-Population. (Weinzierl *et al.* 2008).

Diese und andere Beobachtungen beschreiben Defizite in der adaptiven Immunantwort im Modell der chronischen Myokarditis und suggerieren so einen Zusammenhang zur Entwicklung von Viruspersistenz. Damit stellt sich die Frage, ob bereits bei vorgeschalteten Ereignissen, also der Induktion der adaptiven Immunantwort Beeinträchtigungen existieren, die eine Chronifizierung der Erkrankung begünstigen. Als potente Initiatoren der viralen Immunantwort rücken so dendritische Zellen mit ihren charakteristischen phänotypischen Veränderungen wie Maturierung und Aktivierung bereits in der frühen Phase der CVB3-Infektion in den Fokus des Interesses.

Ziel dieser Arbeit soll es sein, den Phänotyp sowie die Funktionalität dendritischer Zellen im CVB3-Mausmodell zu charakterisieren und dabei resistente C57BL/6 und permissive A.BY/SnJ Mäusen zu vergleichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Software

Tab. 4: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Sterilbank	LaminAir® HS9 Hereaus Instruments
Brutschrank	Biosafe Integra Bioscience
Wasserbad	Memmert
Kühlzentrifugen	Sigma 4K10 Heraeus Instruments Megafuge 1.0 Hereaus/ Thermo Electron Corporation Fresco 17
Tischzentrifugen	Millifuge Millipore
Heizblock	Eppendorf Thermocycler Comfort
PCR-Cycler	Eppendorf Thermocycler Gradient
RTq-PCR-Cycler	Applied Biosystems 7300
Fluoreszenzspektrometer	PeqLab NanoDrop 1000
Durchflusszytometer	Beckman Coulter Cyan <sub>ADP</sub>
Entwicklermaschine	Colenta RDM8-1/S1
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovert 200M
Lichtmikroskop	Leica Leitz DM IL
Elektrophoresekammer	Hoefer Easy Cast B2
Power Supply	Biometra Standart Power Pack P25



Geräte	Hersteller
	PeqLab EV 202
Blotkammer	PeqLab
Schüttler	Heidolph Promax 1020
Vortexer	Heidolph Reax 2000
Plattenreader	Anthos ht III
MACS-Ständer/-Magnete	Miltenyi Biotec
Feinwaagen	Sartorius
pH-Meter	WTW

Tab. 5: Software

Software
Image J v1.41o
Summit v4.3
SDS v1.3.1
GraphPad Prism v5

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 6: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon
Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Sarstedt
PCR-Softstrips (0,2 ml)	Biozym
Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Falcon
Zellkulturschalen (6-, 24, 96-Well, 6 cm, 10 cm)	Falcon

Material	Hersteller
Zellkulturflaschen (50 ml- 750 ml)	Falcon
FACS-Röhrchen (1 ml, 5 ml)	Micronic, Falcon
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 10 µl)	Sarstedt
Kanülen, Spritzen	Braun
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec
PVDF-Membran	Immobilon-P Millipore
Chromatographiepapier	Whatman®
CL-X Posure Film	Thermo Scientific

### 2.1.3 Allgemeine Substanzen, Lösungen und Puffer

Tab. 7: Trockensubstanzen

Substanz	Hersteller
BSA	AppliChem
Kollagenase D	Roche
Agarose	Peqlab
Ovalbumin	Sigma Aldrich
OVA <sub>323-339</sub>	Institut Biochemie Charité, AG Henkelein
SIINFEKL	Institut Biochemie Charité, AG Henkelein
CVB3 P3D <sub>2170-2177</sub>	Institut Biochemie Charité, AG Henkelein
M <sub>331-346</sub> FRYYPNVVAKNIGRIR (aus dem Matrixprotein des Sendaivirus)	Institut Biochemie Charité, AG Henkelein
Coomassie brilliant blue G250	Applichem
DTT (Dithiothreitol)	Sigma Aldrich
EDTA	Serva

Substanz	Hersteller
Bromphenolblau	Biomol
Xylencyanol	Sigma Aldrich
Paraformaldehyd	Merck
NEM	Sigma Aldrich
MG132	Calbiochem
Complete Protease Inhibitor	Roche
APS	Serva
PBS	Biochrom AG
Tris-Base	Roth
SDS	Serva
Glycin	Roth
CFSE	Invitrogen
Saponin	Sigma Aldrich
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma Aldrich

Tab. 8: Lösungen

Lösung	Hersteller
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (WB), GIBCO (Kulturmedien)
Roti®-Block (10x)	Carl Roth GmbH & Co
Trizol	Invitrogen
Chloroform	Merck
Ethanol, Isopropanol	J.T. Baker

Lösung	Hersteller
Methanol	Carl Roth GmbH & Co
PBS	PAA Laboratories
Isofluran (Forene®)	Abbott
DEPC-H <sub>2</sub> O (0,1 mM EDTA)	Ambion
Ethidiumbromid	Gibco BR
Essigsäure (100 % Eisessig)	Merck
Glycerin	Merck
Tween 20®	Sigma Aldrich
BSA (ELISA)	R&D Systems
FCS	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG 10000u/ml
TEMED	Sigma Aldrich
Acrylamid	AppliChem
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck
Trypanblau	ICN Biochemicals

Tab. 9: Verwendete Puffer und deren Bestandteile

Puffer	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,5 mM CaCl <sub>2</sub>

Puffer	Zusammensetzung
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>DNA-/RNA-Visualisierung</b>	
TAE-Puffer (25x)	1 M Tris HCl 0,475 M Essigsäure 25 M EDTA, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
DNA-Ladepuffer (6x)	50 % Glycerin 50 mM EDTA 0,1-0,2 % Bromphenolblau 0,1-0,2 % Xylencyanol
100bp DNA Ladder	Invitrogen
<b>Arbeiten mit Zellen</b>	
Kollagenasepuffer	10 mM HEPES-NaOH, pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1,8 mM CaCl <sub>2</sub>
Erythrozytenlysepuffer	10 mM KHCO <sub>3</sub> 155 mM NH <sub>4</sub> Cl 0,1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
FACS-Puffer	PBA (PBS mit 1 % BSA), 0,01 % NaN <sub>3</sub>
FACS-Permeabilisierungspuffer	FACS-Puffer mit 0,05 % Saponin
MACS-Puffer	PBS (0,5 % BSA, 2 mM EDTA)

Puffer	Zusammensetzung
IF-Permeabilisierungspuffer	PBS (1 % BSA, 0,1 % Saponin, 0,1 % NaN <sub>3</sub> )
<b>ELISA (alles 0,2 µm steril filtriert)</b>	
Blockpuffer	PBS (1 % BSA, 0,05 % NaN <sub>3</sub> )
Waschpuffer	PBS (0,05 % Tween 20 <sup>®</sup> ), pH 7,2-7,4
Lösungspuffer	0,1 % BSA 0,05 % Tween 20 <sup>®</sup> 20 mM Tris-Base 150 mM NaCl pH 7,2-7,4
Substratlösung	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Tetramethylbenzidin im Verhältnis 1:1 R&D Systems
Stoplösung	2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Westernblotting</b>	
Trenngelpuffer	1,5 M Tris (pH 8,8)
Sammelgelpuffer	1 M Tris (pH 6,8)
Proteinlysepuffer	20 mM TRIS-HCl, pH 7.5 10 mM EDTA 100 mM NaCl 1 % NP40 jeweils frisch dazugeben: 10 µM MG-132 5 mM NEM Complete

Puffer	Zusammensetzung
SDS-Laufpuffer (10x)	30,25 g Tris 142,5 g Glycin 10 g SDS ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Blotpuffer (1x)	6,7 g Tris 28,15 g Glycin 500 ml Methanol ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
SDS-Ladepuffer (2x)	50 mM Tris pH 6,8 4 % SDS 12 % Glycerin 2 % β-Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau
Blockpuffer	Roti®-Block (10x) 1:10 in PBS
Waschpuffer	PBS (2 % Tween 20 <sup>®</sup> )
Strippuffer	100 mM β-Mercaptoethanol 2 % SDS 62,5 mM Tris-HCl (pH6,8)
Coomassiefärbelösung	0,5 g Coomassie brilliant blue G250 180 ml Methanol/H <sub>2</sub> O 1:1 20 ml Eisessig
Coomassieentfärber	100 ml Eisessig (Endkonzentration 10 %) 50 ml Methanol (Endkonzentration 5 %)

Puffer	Zusammensetzung
	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 1 l auffüllen
Molekulargewichtsmarker	Prestained Protein Ladder Fermentas

Tab. 10: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
IL-2 ELISA (mouse Duokit)	R&D Systems
IFN- $\gamma$ ELISA (mouse Duokit)	R&D Systems
BCA	Pierce
RT-PCR	Invitrogen
TaqMan Master Mix	Applied Biosystems

### 2.1.4 Medien

Tab. 11: Verwendete Medien

Medium	Hersteller	Zusätze
RPMI	Invitrogen	FCS (10 %, 2 %)
		P/S (1 %)
		$\beta$ -Mercaptoethanol (50 $\mu$ M)



### 2.1.5 Zellstimulantien und Virus

Tab. 12: Stimulanzen

Stimulus	Hersteller	Arbeitskonzentration
LPS	Sigma Aldrich	100 ng/ml
p(I:C)	Invivogen	50 µg/ml
CVB3 (Nancy Strain)	Prof. Dr. med. Karin Klingel Molekulare Pathologie Tübingen	MOI 1, 10, 50, 100
GM-CSF	Miltenyi Biotec	20 ng/ml

### 2.1.6 Antikörper

Tab. 13: Fluoreszenzgekoppelte Antikörper

Oberflächenmarker	Farbstoff	Hersteller
CD11c	FITC	BD Pharmingen
CD11c	PE, APC	Miltenyi Biotec
CD80	FITC	BD Pharmingen
CD86	FITC	BD Pharmingen
CD40	PE	Miltenyi Biotec
MHC-I	PE	BD Pharmingen
MHC-II	FITC	BD Pharmingen
CCR7	PE	eBioscience
CD4	APC	Miltenyi Biotec
CD3	PE	BD Pharmingen
CD8	PB	BD Pharmingen

Tab. 14: Isotypkontrollen FACS

Klon	Label	Hersteller
hamster IgG2κ	FITC	BD Pharmingen
rat IgG2a κ	FITC	Natutec
rat IgG2b	FITC	Natutec
rat IgG2a	PE	Natutec
mouse IgG2b κ	PE	Miltenyi Biotec
armenian hamster IgG	APC	eBioscience

Tab. 15: Verwendete magnetische Beads

Beads gerichtet gegen:	Zur Isolierung von:	Hersteller
CD11c	murinen cDC	Miltenyi Biotec
CD8a (Ly-2), CD45R (B220), CD49b (DX5), CD11b (Mac-1), Ter-119	ungelabelte CD4-T-Zellen	Miltenyi Biotec
CD4, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC-class II, Ter- 119	ungelabelte CD8-T-Zellen	Miltenyi Biotec

Tab. 16: Verwendete Primärantikörper für Western Blots/Immunfluoreszenz

Targetprotein	Hersteller	Klonalität	Spezies	Verdünnung
PA28α	Institut für Biochemie Charité  AG Kloetzel (K39/2)	polyklonal	rabbit	WB: 1:5000
PA28β	AG Kloetzel (K231/2)	polyklonal	rabbit	WB: 1:5000
ISG15	AG Kloetzel	polyklonal	rabbit	WB: 1:10000
Ubiquitin	Dako	polyklonal	rabbit	WB: 1:1000

Targetprotein	Hersteller	Klonalität	Spezies	Verdünnung
				(0,77 µg/ml)
FK-1 (polyubiquitinylierte Ubiquitinkonjugate)	Biomol	monoklonal	mouse	IF: 1µg/ml
UBE2L6	Biozol Diagnostika	monoklonal	mouse/ human	WB: 1:500 (0,2 µg/ml)
LMP2 (β1i)	Abcam	polyklonal	rabbit	WB: 1:1000 (1 µg/ml)
LMP7 (β5i)	AG Kloetzel (K63)	polyklonal	rabbit	WB: 1:500
CAR	Santa Cruz	polyklonal	rabbit	WB: 200 µg/ml
GAP-DH	Santa Cruz	polyklonal	rabbit	WB: 1:1000 (0,2 µg/ml)
α-Aktin	Milipore	monoklonal	mouse	WB: 1:5000 (0,2 µg/ml)

Tab. 17: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blots/Immunfluoreszenz

Reaktivität	Spezies	Konjugat	Hersteller	Verdünnung
anti-rabbit IgG	goat	HRP	Santa Cruz	1:5000 (0,08 µg/ml)
anti-mouse IgG	goat	HRP	Santa Cruz	1:5000 (0,08 µg/ml)
anti-mouse IgM	goat	Alexa 488	Invitrogen	1:1000 (2µg/ml)

### 2.1.7 Oligonukleotide und Sonden

Tab. 18: Panel (Primerpaar und Sonde) von ABI

IL-6, IL-10, IL-12p40, PA28 $\alpha$ , PA28 $\beta$ , $\beta$ 2i, $\beta$ 5i, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ OASL-1, RIG-1, Mda-5, IRF-1	Applied Biosystems TaqMan <sup>®</sup> -minor-groove-binder (MGB)-Proben (Reporter: FAM, Quencher: nicht fluoreszierend)
--	--

Tab. 19: Laboreigene TaqMan<sup>®</sup> Panel

HPRT fw	5'-ATC ATT ATG CCG AGG ATT TGG AA-3'
HPRT rev	5'-TTG AGC ACA CAG AGG GCC A-3'
HPRT Sonde	5' FAM-'TGG ACA GGA CTG AAA GAC TTG CTC GAG ATG 3' TAMRA
CVB3 fw	5'-TCC TCC GGC CCC TGA-3'
CVB3 rev	5'-GAT TGT CAC CAT AAG CAG CCA-3'
CVB3 Sonde	5'-FAM-CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT-3' TAMRA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierversuche

#### 2.2.1.1 Tierhaltung

Alle verwendeten Tiere wurden in Übereinstimmung mit dem europäischen und deutschen Gesetz zum Gebrauch von Labortieren unter Standardstallbedingungen gehalten und standardisiert mit Pellets und Leitungswasser *ad libitum* ernährt. Die hier beschriebenen Versuche waren im Rahmen der Tierschutzanträge H0076/08 (bewilligt 2008) und T0032/07 (bewilligt 2007) vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt.

### 2.2.1.2 Tierstämme

Tab. 20: Verwendete Tierstämme und deren Herkunft

C57BL/6J	Jackson Laboratories/FEM Berlin
A.BY/SnJ	Jackson Laboratories/FEM Berlin
OT-II (C57BL/6)	AG Zipp/ Klinische Neuroimmunologie Charité Berlin
OT-I (C57BL/6)	Jackson Laboratories

### 2.2.1.3 Infektion

Die Infektion mit Coxsackievirus B3 ( $1 \times 10^5$  PFU) und die LPS-Injektion (1 mg/kg KG) erfolgten intraperitoneal (i.p.) Weibchen wurden mit CVB3 ausschließlich in einem Gewichtsbereich von 16-18 g Körpergewicht infiziert, männliche Tiere zwischen 18 und 20 g.

### 2.2.1.4 Betäubung und Tötung

Am Tag der Opferung wurden die Tiere mit Isofluran<sup>®</sup> getötet und umgehend weiter verarbeitet.

## 2.2.2 Präparation, Aufreinigung und Kultivierung von Zellen

### 2.2.2.1 Allgemeine Bedingungen

Zellkulturarbeiten wurden grundsätzlich unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt und die Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert.

### 2.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden Zellen in Trypanblau (0,4 % in PBS) aufgenommen und in einer Neubauerkammer gezählt.

### 2.2.2.3 Generierung von BMDC

#### 2.2.2.3.1 Präparation des Knochenmarks

Zur Gewinnung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark (Bone Marrow Derived Dendritic Cells, BMDC) wurden die Hinterläufe von C57BL/6 und A.BY/SnJ-Mäusen entfernt und in Ethanol (75 %) desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurde Muskel- und Bindegewebe mit einem sterilen Einmalskalpell gründlich abpräpariert. Danach wurden die Knochen mit PBS gewaschen. Unter der Sterilbank konnten jetzt unter freier Sicht auf Knochen und angrenzende Gelenke die Kondylen angeschnitten und das Knochenmark aus dem Knochenmarkskanal mit

RPMI complete heraus gespült werden. Nach Resuspension und Filtration (40 µm Filter) folgte eine Zentrifugation für 8 min bei 1200 rpm und die Resuspendierung des Pellets in 6 ml RPMI complete.

#### *2.2.2.3.2 Kultivierung von BMDC*

Tag 0: Die Zellen wurden anschließend auf eine 60 mm-Schale gegeben und für eine Stunde im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Der Überstand mit den nicht adhärenen Zellen wurde abgenommen und zentrifugiert (8 min, 1200 rpm) und das Pellet in 12 ml RPMI complete, nun mit GM-CSF (20 ng/ml) versetzt, resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine 6-Well-Platte mit 2 ml Zellsuspension pro Well ausplattiert.

Tag 1: Das komplette Medium inkl. aller nicht adhärenter Zellen wurde abgesaugt und pro Well 2 ml frisches RPMI (inkl. 20 ng/ml GM-CSF) hinzugefügt.

Tag 3: Hier erfolgt die Zugabe von 3 ml RPMI (inkl. 20 ng/ml GM-CSF).

Tag 6: Zum Ernten der Zellen wurden die Platten gründlich durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gespült und die Zellen in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, abzentrifugiert und zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Im Durchschnitt konnten pro Maus 1,5 bis  $2 \cdot 10^7$  Zellen gewonnen werden.

#### *2.2.2.4 Herstellung von Milzeinzelzellsuspensionen*

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus der Milz wurden die Organe in sterilem PBS gewaschen. Um die Ausbeute an DC zu erhöhen, erfolgte eine Kollagenasebehandlung mit 2 ml Kollagenase pro Milz, 500 µl der Kollagenase wurden in die Milz injiziert, die Milz in kleine Stücke zerschnitten und für 30 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren suspendiert und über ein Nylonsieb (Durchmesser 70 µm) filtriert. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen.

#### *2.2.2.5 Lyse von Erythrozyten*

Um Erythrozyten aus der Milz zu beseitigen, wurde das Pellet in 2 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation für 2 min bei RT wurde die Reaktion mit 10 ml PBS abgestoppt, die Suspension abzentrifugiert und in RPMI Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zellzahlbestimmung (s.o.).

### **2.2.2.6 MACS (*magnetic activated cell sort*)**

Für Isolierung von Protein oder RNA aus stimulierten DC war eine Aufreinigung der BMDC-Kultur vor der Stimulation an d 6 bzw. der DC aus Splenozyten notwendig. Dies erfolgte nach dem Prinzip des Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS). Beim MACS werden Oberflächenmarker von Zellen mit für diese Oberflächenproteine spezifischen Antikörpern, die an sog. magnetic beads gebunden waren, detektiert. Anschließend lässt man die Zellsuspension über eine magnetische Säule, die sich in einem starken magnetischen Feld befindet, laufen. Die nicht gelabelten Zellen passieren die Säule ungehindert, während die gelabelten Zellen in der Säule verbleiben und anschließend außerhalb des magnetischen Feldes eluiert werden können.

Um dendritische Zellen mit hoher Reinheit zu erhalten, wurden BMDC am d 6 der Kultur mit einem CD11c-Sort gemäß einem Protokoll der Firma Miltenyi Biotec isoliert. Dabei wurde zusätzlich mit Hilfe eines Fc-Rezeptorblock (1:100 in PBS) eine unspezifische Bindung der CD11c-Beads vermindert. Die benötigte Beadmenge für die BMDC-Aufreinigung wurde in Vorversuchen optimiert und für  $1 \times 10^7$  Zellen 40  $\mu$ l Beads eingesetzt. Bei der Isolierung aus Splenozyten erfolgte das Labeling mit 100  $\mu$ l Beads/ $1 \times 10^8$  Zellen wie im Herstellerprotokoll angegeben.

Zur Erfolgsüberprüfung des Sorts wurden danach die Zellen gezählt und ein Teil für eine FACS-Analyse abgenommen, um Reinheit und Ausbeute zu bestimmen. Dazu wurde das Integrin CD11c angefärbt und tote, durch Propidiumjodid markierte Zellen von der Messung ausgeschlossen.

Für das OT-II- bzw. OT-I-Antigenpräsentationsassay war die Aufreinigung von CD4- bzw. CD8-T-Zellen aus OT-II- bzw. OT-I-Mäusen notwendig und erfolgte mit einem indirekten Sort nach Herstellerangaben.

### **2.2.2.7 Zellstimulationen**

#### *2.2.2.7.1 Stimulationen von BMDC für in vitro Maturierungsanalyse*

Für Expressionsanalysen der Reifungsmarker auf dendritischen Zellen wurden an d 6  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well einer 12-Well-Platte in frischem GM-CSF-haltigen Medium neu ausplattiert und in Kultur mit verschiedenen Stimuli bzw. dem Virus die Maturierung zu induziert (LPS 100 ng/ml; p(I:C) 50  $\mu$ g/ml, CVB3 MOI 1- MOI 100). Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren geerntet und einmal mit PBS gewaschen.

#### *2.2.2.7.2 Stimulationen für mRNA- und Proteinexpressionsanalysen*

Für Protein- und mRNA-Analysen wurden die wie in 2.2.2.6 MACS (magnetic activated cell sort) beschrieben aufgereinigten DC in frisches GM-CSF-haltigem Medium aufgenommen und

jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen (in 1 ml) erneut in 12-Well-Platten ausplattiert. Die Stimulation erfolgt wie folgt: LPS 100 ng/ml; p(I:C) 50  $\mu$ g/ml, CVB3 MOI 1- MOI 100. Nach Stimulation wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren geerntet, abzentrifugiert; das Zellpellet einmal mit PBS gewaschen und in Flüssigstickstoff weggefroren.

### **2.2.3 Zellvitalitätsanalysen (MTT-Test)**

Bei diesem Test wird nach Mosmann (1983) das gelbe Salz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) mittels zellulärer Reduktionsmittel wie NADPH oder NADH sowie teilweise durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen zu schwarzblauem Formazan umgewandelt. Dabei ist die entstehende Menge an Formazan proportional zur Anzahl lebender Zellen und kann photometrisch bestimmt werden.

Hier wurden BMDC mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen in 1 ml Medium im 24-Well-Format ausgesetzt und unterschiedlich lange (0 h, 24 h, 36 h, 48 h) mit LPS (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Jeder Zeitwert wurde dreifach angesetzt. Am Ende der Stimulation wurden die Zellen für 4 h mit MTT (0,5 mg/ml) inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm konnte das Medium abgesaugt und die Formazankristalle mit 110  $\mu$ l/Well Lysepuffer (Isopropanol mit 5 % Essigsäure) gelöst werden. Es erfolgte die Überführung von  $2 \times 50 \mu$ l in eine 96-Well-Platte, als Leerwert wurde reiner Lysepuffer pipettiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 570 nm (Referenzfilter 650 nm).

### **2.2.4 Immunbiologische Methoden**

#### **2.2.4.1 FACS (*fluorescence activated cell sort*)**

Bei der Durchflußzytometrie können zelluläre Strukturen über fluoreszenzgekoppelte Antikörper in einem Zytometer detektiert werden, wodurch sich eine Aussage über das Expressionsmuster der gesuchten Strukturen treffen lässt. Dazu werden Zellen in einer Zellsuspension in eine laminare Strömung gebracht, wobei jede Zelle einzeln eine Messkammer durchquert. Dort trifft das Licht eines Lasers auf die Zelle; der gebundene Antikörper absorbiert und emittiert das Licht in einer definierten Wellenlänge und somit entsteht ein spezifisches Signal für den entsprechenden Antikörper und damit die gesuchte zelluläre Struktur. Weiterhin wird das Licht durch die Beschaffenheit der Zelle charakteristisch gestreut, wobei das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) ein Maß über die Größe und das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) eine Aussage über die Granularität der Zelle darstellt. Folgende Farbstoffe wurden verwendet:



Tab. 21: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Farbstoff	Abkürzung	Emission (max)	Absorption (max)
Fluoreszeinisothiozyanat	FITC	520 nm	488 nm
Phycoerythrin	PE	575 nm	488 nm
Pacific Blue	PB	455 nm	405 nm
Allophycocyanin	APC	680 nm	633 nm
Indodicarbocyanin	Cy5	670 nm	649 nm
Propidiumjodid	PI	650 nm	550 nm

In diesem Fall erfolgt die Anfärbung von extrazellulär lokalisierten Oberflächenmolekülen.

Für die Analysen wurden entweder BMDC oder DC aus der Milz verwendet. Um die Population der DC zu charakterisieren, wurde das Integrin CD11c angefärbt und jeweils die anteilige Expression eines sog. Maturierungsmarkers untersucht.

Um eine unspezifische Bindung des CD11c-Antikörpers zu verhindern, wurden die Zellen vorher mit Fc-Rezeptorblock (1:100) für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit den fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern (1:100) für 30 min in Dunkelheit auf Eis. Davon abweichend wurde anti-CCR7 für 30 min bei 37°C und in Abwesenheit weiterer Farbstoffe inkubiert. Außerdem wurden den Antikörpern entsprechende Isotypkontrollen verwendet, um Gatinggrenzen zu definieren und unspezifische Bindungen zu kontrollieren.

Nach der Färbung erfolgte für 30 min bei RT die Fixierung der Zellen mit 2 % PFA und nach einem erneuten Waschschrift die Aufnahme in 300 µl FACS-Puffer. Die Analyse der Zellen erfolgte innerhalb der nächsten 24 h, allerdings frühestens zwei Stunden nach der Fixierung. Bis zur Messung wurden die Zellen bei 4°C und in Dunkelheit aufbewahrt.

#### **2.2.4.2 OT-I- und OT-II-Antigenpräsentationsassays**

In diesen Assays präsentieren DC via MHC-I, bzw. MHC-II ein bestimmtes Peptid aus Ovalbumin (OVA<sub>257-264</sub> via MHC-I bzw. OVA<sub>323-339</sub> via MHC-II). Dazu wurden sie vorher entweder mit dem kompletten Protein oder dem Peptid inkubiert. In einer Kokultur mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von transgenen OT-II-Mäusen (bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von OT-I), deren T-Zellrezeptoren ausschließlich das entsprechende Peptid erkennen, kommt es zur Proliferation und Aktivierung der T-Zellen, messbar z.B. durch IL-2- und IFN-γ-Spiegel im Kulturüberstand. Weiterhin ist es

möglich, die T-Zellen vor Beginn der Kokultur mit CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) zu färben. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an intrazelluläre Proteine und kann im FACS im FITC-Kanal detektiert werden. Da bei jeder Zellteilung der Farbstoff an die Tochterzellen weitergegeben wird, ist die Abnahme der CFSE-Fluoreszenz pro Zelle ein Maß für die Proliferationsrate.

Um die Antigenpräsentationskapazität von *in vivo* infizierten (36 h p.i.) sowie von naiven DC zu charakterisieren, wurden DC aus der Milz, wie in 2.2.2.3 und 2.2.2.4 beschrieben, gewonnen. Es folgte die Aufteilung der Zellsuspensionen in mehrere Fraktionen. Je ein Teil wurde für 2-3 h bei 37°C mit dem Peptid OVA<sub>323-339</sub> (OT-II) oder OVA<sub>257-264</sub> (OT-I) in verschiedenen Konzentrationen beladen (alternativ mit verschiedenen Konzentrationen des kompletten Proteins Ovalbumin ÜN). Als Kontrolle wurde je eine unbeladene Fraktion und eine Fraktion mit einem irrelevanten, aber dem MHC-Haplotyp entsprechenden Peptid mitgeführt (vgl. Tab. 22). Als Kontrolle für das komplette Ovalbulmin wurden die DC mit BSA inkubiert. Als Medium wurde BMDC-Medium mit reduziertem FCS-Gehalt genutzt (2 %), um die konkurrierenden Proteine zu minimieren. Danach wurden die DC mit einem Zellschaber vorsichtig vom Flaschenboden gelöst, zweimal mit PBS gewaschen, die Zellzahl bestimmt und auf eine Konzentration vom  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in BMDC Medium (10 % FCS) eingestellt.

Tab. 22: Verwendete Peptid- bzw. Proteinkonzentrationen für DC-Beladung in Antigenpräsentationsassays

	Proteinbeladung (ÜN) OT-II	Peptidbeladung (2-3 h) OT-II	Proteinbeladung (ÜN) OT-I	Peptidbeladung (2-3 h) OT-I
	Ovalbumin	OVA <sub>323-339</sub>	Ovalbumin	OVA <sub>257-264</sub> (SIINFEKL)
	0/1/10/100 µg/ml	0/0,05/0,5/5 µg/ml	0/5/10/50 µg/ml	0/0,02/0,2/2 µg/ml
Kontrolle:	BSA	Sendai virus matrix (M) protein  (M <sub>331-346</sub> )	BSA	P3D <sub>2170-2177</sub> (CVB3)
	100 µg/ml	5 µg/ml	50 µg/ml	2 µg/ml

Während der Peptid- bzw. bei Proteinbeladung am nächsten Tag wurden T-Zellen aus der Milz von OT-Mäusen isoliert. Dabei wurde wie in 2.2.2.4 und 2.2.2.5 beschrieben eine Einzelzellsuspension, allerdings unter Umgehung des Kollagenaseverdaus, hergestellt und die T-

Zellen über einen indirekten MACS CD4-, bzw. CD8-Sort (s. 2.2.2.6) isoliert. Nun erfolgte die Inkubation mit CFSE (1  $\mu$ M) für 10 min bei 37°C, wobei die Zellsuspension auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt war. Die Reaktion wurde mit dem doppelten Volumen eiskaltem PBS abgestoppt, die Suspension einmal mit PBS gewaschen und die Zellen gezählt. Anschließend erfolgt die Aufnahme in Medium in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml.

Daraufhin konnte im 96-Well-Format eine Kokultur angesetzt werden. Auf  $1 \times 10^4$  DC/100  $\mu$ l kamen  $1 \times 10^5$  T-Zellen/100  $\mu$ l. Pro Ansatz wurden mindestens 5 Wells pipettiert.

Nach 96 h (OT-II) oder 48 h (OT-I) Kokultur wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren geerntet, für 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand für spätere Zytokinanalysen in flüssigem Stickstoff weggefroren. Das Zellpellet wurde in FACS-Puffer resuspendiert und mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD3 oder CD8 gefärbt (s.2.2.3.1). Dann konnte im FACS der CFSE-Gehalt der T-Zellen als Maß für die Proliferation bestimmt werden.

### **2.2.4.3 Immunfluoreszenz**

Für Immunfluoreszenzanalysen wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in mit Deckgläsern ausgelegten 24-Well gegeben und mit 1  $\mu$ g LPS/ml für 0 h, 12 h, 24 h und 48 h stimuliert. Danach schlossen sich folgende Färbeschritte an:

- Zweimal waschen mit PBS (1 % BSA)
- 10 min Fixierung mit 2 % PFA/PBS bei RT
- Zweimal waschen mit PBS (1 % BSA)
- Permeabilisierung mit PBS/Saponin (0,1 %) (1 % BSA)
- Inkubation des Primärantikörpers (in 100  $\mu$ l/Well in Permeabilisierungspuffer) für 1 h bei RT in Dunkelheit
- Zweimal waschen mit PBS (1 % BSA)
- Inkubation des Sekundärantikörpers (1  $\mu$ g/ml in 100  $\mu$ l/Well in Permeabilisierungspuffer) für 1 h bei RT in Dunkelheit
- Zweimal waschen mit PBS (1 % BSA)
- Kernfärbung mit 4,6-Diamino-2-phenylindol (DAPI) für 10 min RT in Dunkelheit
- Zweimal waschen mit PBS
- Deckgläser mit den Zellen nach unten auf mit Medium beschichtete Objektträger überführen und ÜN trocknen lassen

#### **2.2.4.4 ELISAs**

Als Maß für T-Zellproliferation wurde im Zellüberstand aus OT-II-Assays (s.o.) die IL-2- bzw. IFN- $\gamma$ -Konzentration mittels ELISA nach Angaben des Herstellers (R&D Systems) bestimmt. Zuerst erfolgte das Coating einer 96-Well-Platte mit dem Capture-Antikörper (1  $\mu\text{g/ml}$  in PBS für IL-2, 4  $\mu\text{g/ml}$  für IFN- $\gamma$ ) ÜN bei RT. Am nächsten Tag wurde der AK abgesaugt und die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen (400  $\mu\text{l/well}$ ) und anschließend mit 300  $\mu\text{l}$  Blockpuffer/Well für 1 h bei RT blockiert. Nach der Wiederholung des Waschschriffs erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Kulturüberstand für 2 h bei RT. Nach erneutem Waschen wurde der Detektions-AK (anti-IL-2, 400 ng/ml und anti-IFN- $\gamma$ , 800 ng/ml) für 1 h bei RT inkubiert und anschließend nochmals gewaschen. Nun wurden 100  $\mu\text{l/Well}$  eines Streptavidin/HRP-Gemischs hinzugegeben und nach 20 min Inkubation bei RT und in Dunkelheit sowie einer erneuten Waschwiederholung folgte die Inkubation mit einem Substrat, das vom Streptavidin/HRP-Konjugat zu einem Farbstoff umgesetzt wurde. Die Reaktion wurde nach 20 min mit 50  $\mu\text{l/Well}$  Stopplösung beendet und die Extinktion als Doppelwert in einem Plattenreader bei 450 nm gemessen. Die Extinktion wurde über eine mitgeführte Standardkurve in entsprechende Konzentrationen umgerechnet.

#### **2.2.5 Molekularbiologische Methoden**

##### **2.2.5.1 RNA-Isolierung**

Die Isolierung von RNA erfolgte mit der Trizolmethode. Das Zellmaterial wurde in 1 ml Trizolreagenz gelöst und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Pro ml Trizol kamen 0,2 ml Chloroform hinzu, die Lösung durch starkes Schütteln emulgiert und erneut für 2-3 min bei RT inkubiert. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm in der Kühlzentrifuge (4 °C) wurde eine Phasentrennung des Gemischs erreicht. Die obere, wässrige Phase, welche die RNA enthielt, wurde daraufhin in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und die RNA ÜN bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 30 min und 12000 rpm bei 4°C zentrifugiert, dann der Überstand komplett abgenommen und das Pellet in 500  $\mu\text{l}$  Ethanol (75 %) gelöst. Nach kurzem Vortexen folgte ein letzter Zentrifugationsschritt für 5 min und 9500 rpm bei 4°C. Der Überstand wurde erneut abgenommen und letzte Ethanolreste durch Lufttrocknen beseitigt. Zur Aufbewahrung wurde das Pellet je nach Größe in 40-200  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O (0,1 mM EDTA) aufgenommen.

### 2.2.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop<sup>®</sup> den Herstellerangaben entsprechend bestimmt. Dabei wurde für hochqualitative RNA für den Quotienten der Absorptionsmaxima bei 260 nm zu 280 nm ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 angestrebt.

### 2.2.5.3 RNA-Gelelektrophorese

Je 1 µg RNA wurde in ein Agarosegel (1% Agarose in TAE-Puffer, mit Ethidiumbromid versetzt) aufgetragen, bei 160 V für 20 min aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert.

### 2.2.5.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Kit der Firma Invitrogen. Je nach Menge der vorhandenen RNA wurden zwischen 250 ng und 500 ng in einem Volumen von 9 µl eingesetzt. Tab. 23 fasst die ablaufenden Reaktionen zusammen:

Tab. 23 Reaktionsschritte der cDNA-Synthese

Reaktionsschritt	Reagenzien	Volumen/ Konzentration	Cyclerbedingungen
DNase-Verdau	DNase	0,5 µl	15 min 37°C (Aktivierung)
			5 min 75°C (Inaktivierung)
Anlagerung der Primer	Hexamere (0,5 µg/µl)	0,5 µl	10 min 70°C
Reverse Transkription	5x PCR-Puffer	4 µl	60 min 37°C
	DTT (0,1 M)	2 µl	
	dNTP (10 mM)	1 µl	
	RNAse Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	
	MMLV-Polymerase (200 U/µl)	1 µl	

### 2.2.5.5 RTq-PCR(TaqMan<sup>®</sup>)

Die quantitative RTq-PCR bedient sich dem generellen Prinzip der RT-PCR der zusätzlichen Möglichkeit, ein Gen nicht nur auf RNA-Ebene nachzuweisen, sondern auch seine Expression zu

quantifizieren. Dies gelingt durch eine an den Enden fluoreszenzmarkierte Sonde (Reporter am 5'-Ende, i.d.R. FAM und Quencher am 3'-Ende, TAMRA, bzw. nicht fluoreszierender Quencher), die sich zwischen den Primern an die cDNA-anlagert. Während der Amplifikation durch die Polymerase wird die Sonde abgebaut, wobei durch es durch die Entfernung der Sondenenden voneinander zu einem Fluoreszenzsignal des Reporters kommt. Das Fluoreszenzsignal wird am Ende jeder Elongationsphase gemessen, wodurch die Stärke des entstehenden Signals proportional zur vorhandenen Menge eines Transkripts ist.

Tab. 24 zeigt das jeweils verwendete Pipettierschema, Tab. 25 die PCR-Bedingungen. Als Kontrolle wurde pro Ansatz in einer Non-template-control (NTC) die cDNA durch Wasser ersetzt und nur Versuche ausgewertet, die hier keinen detektierbaren Wert lieferten. Stets wurden pro Sample Doppelwerte pipettiert. Als Referenzgen diente das housekeeping gene HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase).

Tab. 24: RTq-PCR-Ansatz für die Verwendung von ABI-Panel und laboreigene Sonden/Primer

Verwendung von ABI-Panel		Laboreigene Sonden/Primer	
Reagenzien	Volumen/ Endkonzentration	Reagenzien	Volumen/ Endkonzentration
Universal PCR Master Mix	6,25 µl	Universal PCR Master Mix	6,25 µl
ABI-Panel (Primerpaar und markierte Sonde)	0,5 µl	Primermix	3 µl
		Sonde	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	0,25 µl	H <sub>2</sub> O	2,25 µl
cDNA	6 µl/ 12,5 ng pro Well	cDNA	1 µl/ 12,5 ng pro Well

Tab. 25: RTq-PCR-Bedingungen

50°C	2 min	
95°C	10 min	} 40 Zyklen
95°C	15 sec	
60°C	1 min	

Die Auswertung erfolgte mit Unterstützung der Software SDS v1.3.1 nach der  $\delta$ Ct- oder  $\delta\delta$ Ct-Methode, die Expression wurde auf HPRT bezogen.

## 2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.6.1 Zellyse

Je nach Pelletgröße wurde das Zellpellet mit 50-100  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert. Es folgten drei Frier-Tau-Schritte. Nach 30 min Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C befanden sich die löslichen Proteine im Überstand. Zum Nachweis von polyubiquitinylierten Proteinen wurde das Pellet der unlöslichen Proteinfraction ÜN in 1x SDS-Probenpuffer geschüttelt und am nächsten Tag auf ein Gel aufgetragen.

### 2.2.6.2 Proteinquantifizierung nach Pierce

5  $\mu$ l des Lysats wurden mit 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt, gevortext und je zweimal 10  $\mu$ l in eine 96-Wellplatte als Doppelwert pipettiert. Als Blank diente der Lysepuffer verdünnt mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (1:5), eine Standardkurve wurde mit BSA-Lysaten bekannter Konzentration ebenfalls als Doppelwert erstellt. Hinzu kamen pro Well 200  $\mu$ l eines BCA-Gemischs (Lösung A zu Lösung B im Verhältnis 50:1). Nach 30 min bei 37°C konnte die OD in einem Plattenreader bei 570 nm gemessen werden.

### 2.2.6.3 Denaturierende SDS-PAGE

Die Proteine wurden nach Zugabe von SDS-Probenpuffer bei 95°C für 5 min unter Verlust der Sekundär- sowie Tertiärstruktur denaturiert. Die Proteine wurden dann in zu je 5 oder 10  $\mu$ g auf ein Polyacrylamidgel, bestehend aus Sammelgel und Trenngel (vgl. Tab. 26), aufgetragen. Im Falle der unlöslichen Proteinfraction wurden die Pellets ÜN in 20  $\mu$ l SDS-Probenpuffer (6 M Harnstoff) geschüttelt und 15  $\mu$ l aufgetragen. Nun erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 80 V (Sammelgel) bzw. 120 V (Trenngel). Zur späteren Identifizierung der Proteine wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt.

Tab. 26: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel im Westernblot

Komponente	Sammelgel (5 % PAA)	Komponente	Trenngel (15 % PAA)
Acrylamid	0,75 ml	Acrylamid	5,6 ml
Sammelgelpuffer (4x)	1,25 ml	Trenngelpuffer (4x)	2,8 ml
Aqua dest.	1,75 ml	Aqua dest.	2,8 ml
APS (10 %)	15 $\mu$ l	APS (10 %)	30 $\mu$ l
TEMED	1,5 $\mu$ l	TEMED	3 $\mu$ l

### 2.2.6.4 Western Blotting

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF Membran transferiert. Dazu wurde in einer Westernblot-Kammer der Blot wie in Abb. 4 gezeigt aufgebaut:

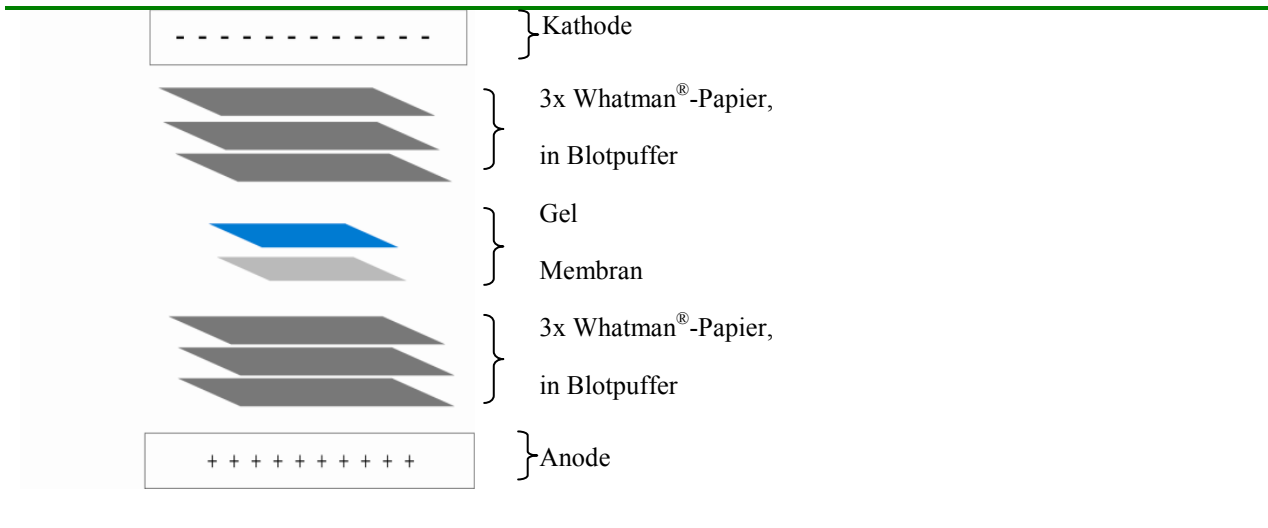


Abb. 4: Aufbau des Blots (Semidry, kontinuierlich)

Der Transfer wurde für 1 h 30 min bei 7 V, 400 mA und 3 W durchgeführt. Durch Inkubation für 5 min in Coomassielösung wurde der Proteintransfer nachgewiesen, zur Entfärbung wurde 50 % Methanol genutzt.

### 2.2.6.5 Proteindetektion

Vor der Detektion des gewünschten Proteins erfolgt für 1 h die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Roti®-Block bei RT. Nach dem Waschen der Membran (2x 3 min) wurde sie ÜN mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Dann wurde die Membranen mindestens für 4x 8 min in ausreichend Waschpuffer gewaschen, für eine weitere Stunde schüttelnd bei RT mit dem passenden Sekundärantikörper inkubiert und anschließend erneut für 4x 8 min gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte nach dem Prinzip der Chemilumineszenz. Für die Entwicklung wurde die Membran mit ECL bzw. ECLPlus für 5 min bei RT in Dunkelheit inkubiert, anschließend in einer Filmkassette positioniert und in einer Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm exponiert. Je nach Bandenausprägung und Fragestellung war die Expositionsdauer unterschiedlich lang. Die Entwicklung wurde maschinell durchgeführt.

### 2.2.6.6 Strippen der Membranen

Um pro Membran die Expression mehrerer Antikörper zu untersuchen, wurde in einigen Fällen der gebundene Primärantikörper durch „Stripping“ von der Membran gelöst. Dazu inkubierte



man die Membranen für 30 min bei 50°C rotierend in in Strippuffer. Danach wurde die Membran zweimal für 10 min in Waschpuffer gewaschen und konnte nach erneutem Blockieren für 1 h mit dem nächsten Primäantikörper inkubiert werden.

### **2.2.7 Statistische Auswertung**

In sämtlichen Diagrammen sind die Ergebnisse als Mittelwert, Fehlerbalken als SEM (standard error of the mean) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Two-Way-Anova-Tests und Bonferroni-Post-Hoc-Analyse,  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen (\*). Verglichen wurden ausschließlich Unterschiede zwischen beiden Stämmen zum gleichen Zeitpunkt. Die Berechnung und graphische Darstellung wurde softwaregestützt mit GraphPad Prism v5 vorgenommen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Reinheit und Ausbeute der DC-Isolation

Für *in vitro* Versuche wurden dendritische Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen generiert. Dabei erhielt man nach sechs Kulturtagen durchschnittlich  $2 \times 10^7$  Zellen pro Tier. Durch die Aufreinigung via MACS gelang die Herstellung einer hochreinen DC-Kultur (stets  $>95\%$  CD11c positive Zellen) mit einer quantitativen Ausbeute von ca.  $3-5 \times 10^6$  DC pro Tier. Abb. 5 zeigt exemplarisch die Bestimmung der Reinheit im FACS.

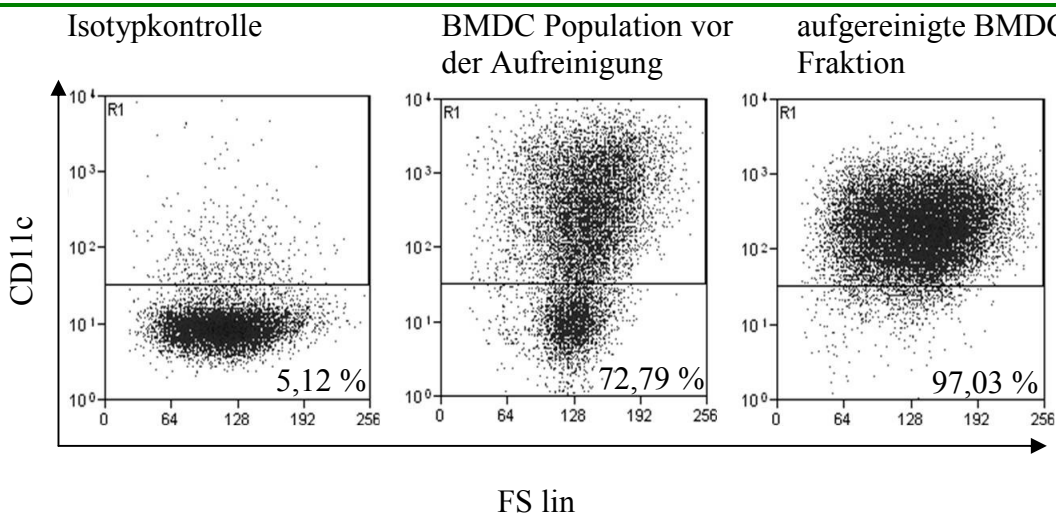


Abb. 5: Bestimmung der Reinheit eines CD11c-Sorts von BMDC: Gezeigt ist der Anteil CD11c positiver Zellen in Prozent (%), tote Zellen wurden mit Propidiumjodid gefärbt und ausgegated.

Für *in vivo* Versuche wurden dendritische Zellen aus murinen Milzen isoliert. Abb. 6 zeigt exemplarisch die Bestimmung der Reinheit eines Sorts im FACS.

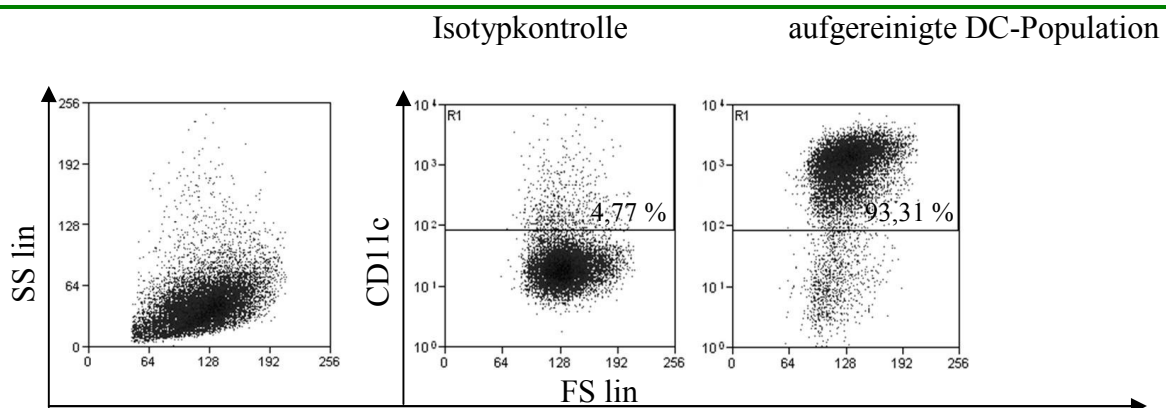


Abb. 6: Bestimmung der Reinheit eines CD11c-Sorts aus der Milz: Anteil CD11c positiver Zellen in Prozent (%) angegeben, tote Zellen wurden mit Propidiumjodid gefärbt und ausgegated.

Durch die Aufreinigung via MACS gelang die Herstellung einer hochreinen DC-Population (stets >90 % CD11c positive Zellen, Ausbeute ca. 70 %) bei einer Ausgangspopulationsgröße von knapp 3 %.

### 3.2 *Maturierung und Aktivierung durch CVB3 in vivo*

#### 3.2.1 DC-Maturierung in der CVB3 *in vivo* Infektion

Um die Maturierung von DC *in vivo* zu untersuchen, wurden die Tiere mit CVB3 infiziert und an bestimmten Zeitpunkten die DC-Population der Milz in Bezug auf die Expression der Reifungsmarker im FACS analysiert.

Um den Zeitpunkt der maximalen Maturierung zu finden, erfolgte die Opferung von C57BL/6-Tieren nach 2, 4 und 6 d p.i. Als Positivkontrolle wurde Kontrolltieren 24 h vor Opferung LPS injiziert (1 mg/kg KG). Abb. 7a zeigt ein Maximum der Maturierung, stellvertretend durch CD86 dargestellt, an d2 p.i. Um dieses Maximum genauer zu definieren, wurden neue Infektionszeitpunkte gewählt (12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h). Nach 36 h CVB3-Infektion erreichte die Expression der Maturierungsmarker den Höchstwert (Abb. 7b). Wurden hingegen A.BY/SnJ-Mäuse CVB3 infiziert, war diese Induktion wesentlich geringer und verspätet zu beobachten (Abb. 7c).

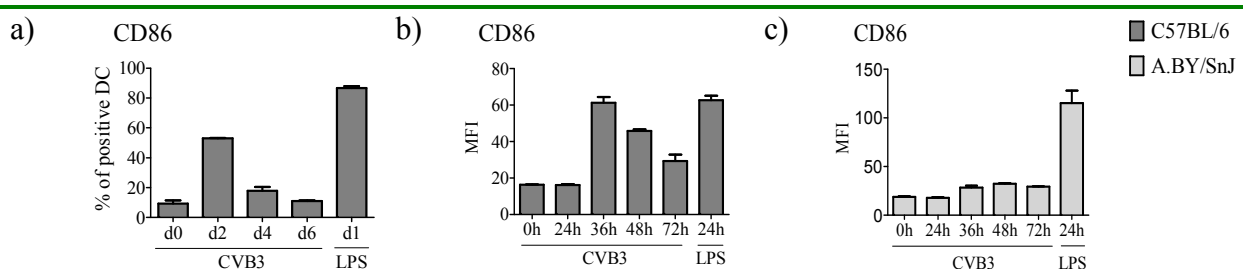


Abb. 7: C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse wurden mit CVB3 infiziert und zu bestimmten Zeitpunkt die CD86 Expression auf splenzytären DC gemessen. Als Positivkontrolle erfolgte die Injektion mit LPS (1 mg/kg KG). a) Anteile CD86 positiver DC in %, Angaben als MW  $\pm$  SEM aus n=2, b) und c) Angaben als mittlere Fluoreszenz und als Mittelwert aus n=3  $\pm$  SEM

Im folgenden Experiment wurde die Analyse der beiden Stämme simultan mit jeweils 4 Tieren pro Zeitpunkt (s. Abb. 8) durchgeführt. Dabei war nach 36 h eine signifikant stärkere Induktion der Marker CD86, CD80, CD40 sowie des Migrationsmarkers CCR7 in C57BL/6-Mäusen zu beobachten. Diese Signifikanz wurde wie in allen folgenden Versuchen mittels Two-Way-

Anova-Tests und Bonferroni-Post-Hoc-Analyse durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.2.7 Statistische Auswertung). Eine Maturierung der DC in A.BY/SnJ-Tieren war nur sehr gering ausgeprägt bzw. verspätet (s. CD40). MHC-I wurde in beiden Stämmen kaum reguliert, während für MHC-II in beiden Stämmen sogar eine Reduktion zu verzeichnen war (signifikant allerdings nur für A.BY/SnJ beim Vergleich von 0 h mit 72 h). Die Regulation von MHC-I und MHC-II zeigte im Stammvergleich keine signifikanten Unterschiede. Betrachtet man die Zahl CD11c positiver Zellen an sich, so fällt eine Abnahme dieser Zellen im Infektionsverlauf auf.

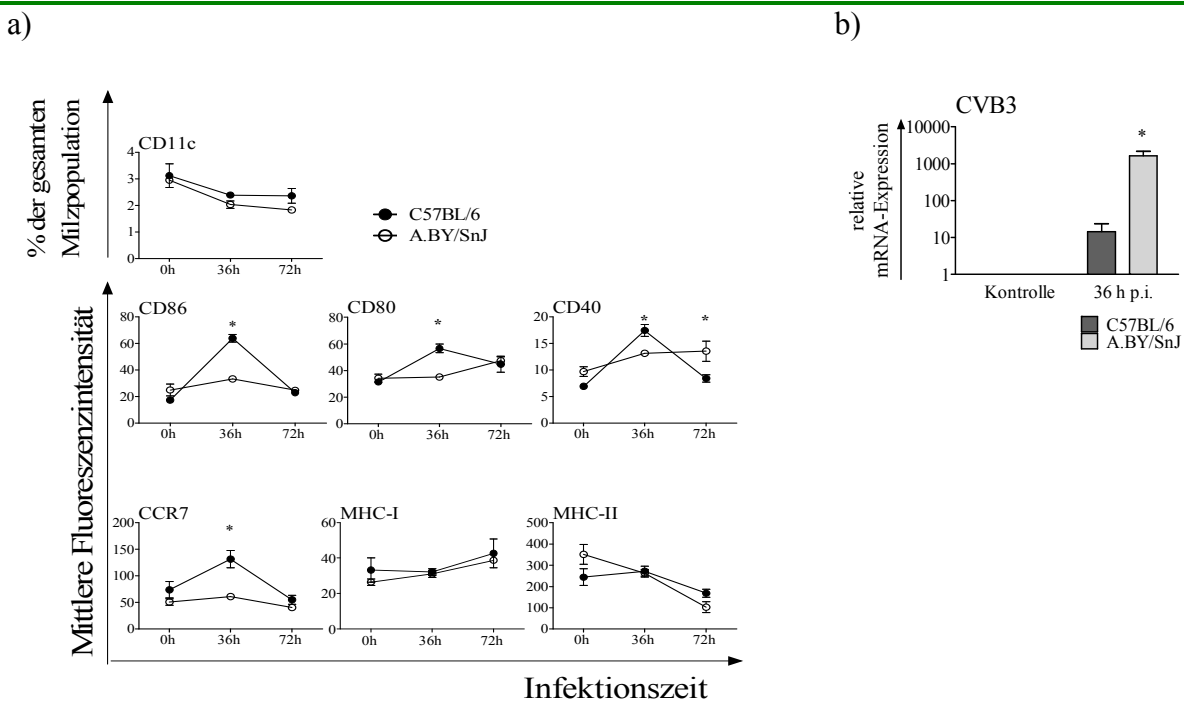


Abb. 8: a) Auf splenozytären DC aus *in vivo* infizierten C57BL/6 und A.BY/SnJ Tieren wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker per FACS analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments als mittlere Fluoreszenzintensität nach 0, 36 und 72 h als MW  $\pm$  SEM aus n=4. b): Die Menge an genomischer CVB3-RNA wurde mittels RTQ-PCR in splenozytären DC naiver und infizierter C57BL/6 und A.BY/SnJ-Tiere bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus sechs verschiedenen Pools mit jeweils n=2 Tieren aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen, p<0,05 wurde als signifikant angenommen (\*).

Um sicherzustellen, dass die schwächere Expressionssteigerung in A.BY/SnJ DC nicht auf eine geringere Virusaufnahme der Zellen zurückzuführen war, wurden per RTQ-PCR die Menge an genomischer CVB3-RNA 36 h p.i. nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass in DC von A.BY/SnJ-Mäusen wesentlich größere Mengen an Virus-RNA zu finden waren (vgl. Abb. 8b).

Damit können die fehlenden Effekte in A.BY/SnJ DC also nicht durch ein geringeres Infektionsausmaß erklärt werden.

### 3.2.2 Zytokininduktion in DC nach *in vivo* CVB3-Infektion

Im Zuge ihrer Aktivierung beginnen DC, diverse Zytokine zu sezernieren. Bei TaqMan-Analysen ausgewählter Vertreter in DC aus *in vivo* infizierten Tieren wird deutlich, dass auch hier analog zur Expression der Maturierungsmarker während der *in vivo* CVB3-Infektion die Zytokininduktion signifikant höher bei C57BL/6 Tieren ausfällt (Abb. 9). Dies betrifft sowohl die mRNA-Expression der Lymphozyten stimulierenden Proteine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12p40 als auch die Chemokine IP-10 und MCP-1 (CCL-2). Lediglich für das eher immunsuppressiv wirkende und Toleranz induzierende IL-10 konnte eine äquivalente Induktion in beiden Stämmen gezeigt werden (Abb. 9).

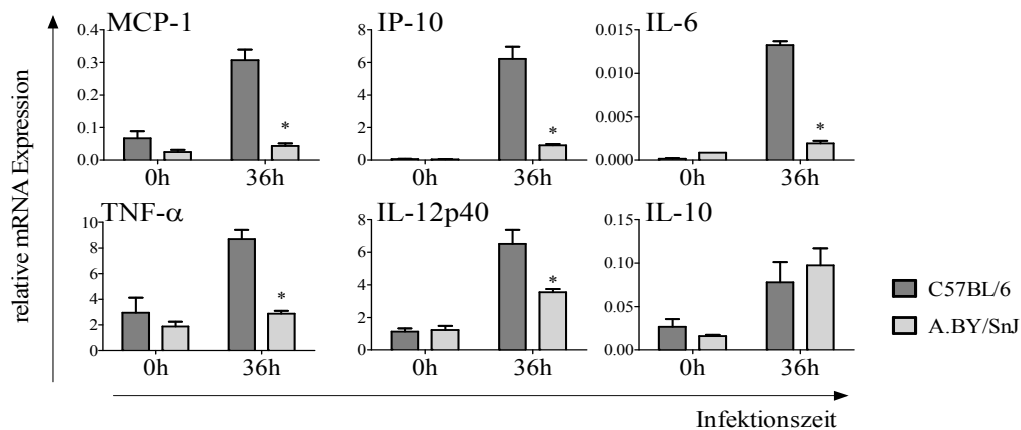


Abb. 9: Die mRNA-Expression verschiedener Zytokine bzw. Chemokine wurde mit RTQ-PCR in *in vivo* infizierten splenozytären DC aus C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen untersucht. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode, die Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SEM von drei Pools bestehend aus je 2 Tieren (insgesamt n=6),  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen (\*).

Weiterhin zeigten TaqMan-Analysen auch für die Interferonantwort eine differenzielle Regulation: DC aus A.BY/SnJ-Mäusen wiesen im Vergleich zu C57BL/6 36 h p.i. eine deutlich verminderte Interferoninduktion auf (s. Abb. 10), in dessen Konsequenz auch die Induktion des Typ-I IFN-induzierten Gens OASL-1 schwächer ausfiel.

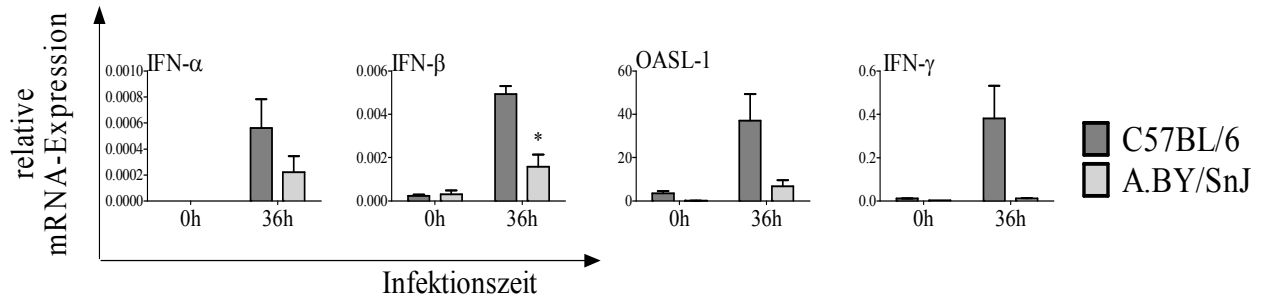


Abb. 10: Die mRNA-Expression von Interferonen wurde mit RTQ-PCR in *in vivo* infizierten splenozytären DC aus C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen untersucht. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\delta Ct}$ -Methode, die Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SEM von drei Pools bestehend aus je 2 Tieren (insgesamt  $n=6$ ).  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen (\*).

Um das Zytokinmilieu zu charakterisieren, in welchem sich die DC während der frühen Infektionsphase in der Milz befinden, wurde die mRNA-Expression diverser Zytokine im Gesamtmilzlysate analysiert. Abb. 11 zeigt, dass auch hier nach 36 h p.i. es zu einer signifikant stärkeren Induktion von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p40 sowie der IFN  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bei C57BL/6 kommt.

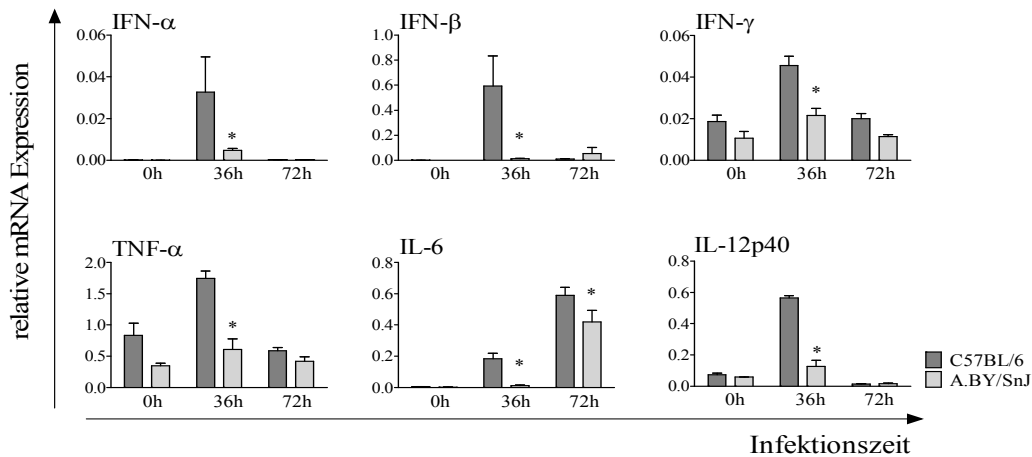


Abb. 11: Die mRNA-Expression von Zytokinen wurde mit RTQ-PCR in Gesamtmilzlysaten von *in vivo* infizierten C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen untersucht. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\delta Ct}$ -Methode, die Darstellung als MW  $\pm$  SEM mindestens  $n=3$  Einzeltieren.  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen (\*).

### 3.2.2 Induktion viraler Rezeptoren in DC nach *in vivo* CVB3-Infektion

Als potenzielle Erkennungsrezeptoren viraler RNA wurden die mRNA-Expressionsniveaus der RNA-Helikasen Mda-5 und RIG-1 in DC untersucht. Hier zeigte sich erneut eine gegenüber C57BL/6 verminderte Induktion dieser Gene bei A.BY/SnJ nach 36 h CVB3 *in vivo* Infektion. Auch der Transkriptionsfaktor IRF-1, der in der Induktionskaskade beider Gene vorangeschaltet ist, wurde analog in DC von C57BL/6 signifikant stärker reguliert (vgl. Abb. 12).

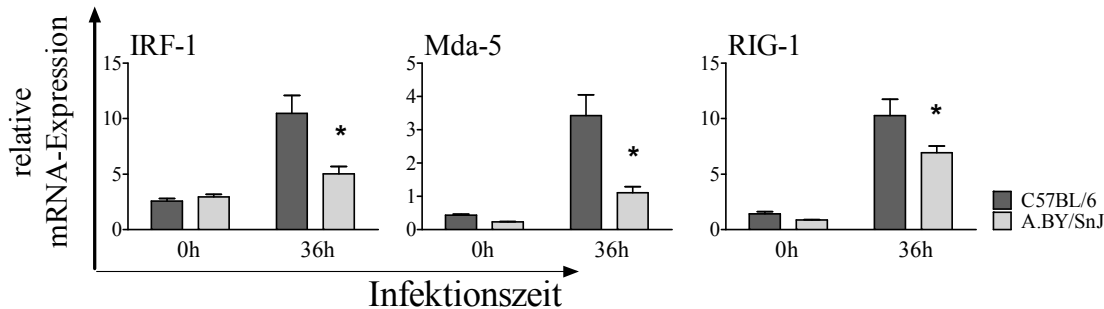


Abb. 12: Die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors IRF-1 sowie der viralen Rezeptoren RIG-1 und Mda-5 wurde mit RTQ-PCR in *in vivo* infizierten splenozytären DC aus C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen untersucht. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode, die Darstellung als MW  $\pm$  SEM von sechs Pools bestehend aus je 2 Tieren (insgesamt n=12) stammend aus drei unabhängigen Experimenten.  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen (\*).

### 3.3 Maturierung und Aktivierung durch LPS-Stimulation

#### 3.3.1 LPS-induzierte Maturierung *in vivo*

Um zu überprüfen, ob es sich bei der defizitären DC-Maturierung der A.BY/SnJ DC um ein CVB3 spezifisches Phänomen handelt, wurde die Maturierung nach *in vivo* LPS-Stimulation (1 mg/kg KG) untersucht.

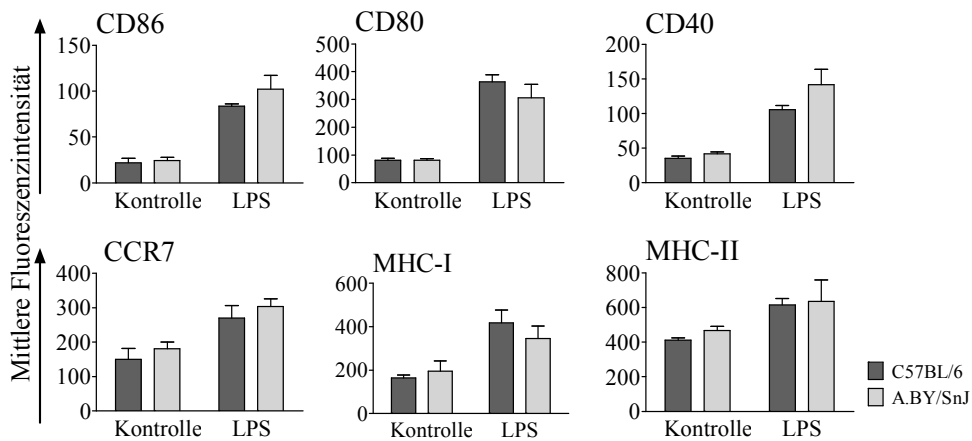


Abb. 13: Auf DC von A.BY/SnJ und C57BL/6 Mäusen wurde nach LPS-Injektion (1 mg/kg KG für 24 h) die Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern per FACS analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität nach 0 h (Kontrolle) und 24 h (LPS) als MW  $\pm$  SEM aus n=4. Für  $p < 0,05$  ergaben sich keine signifikanten stammspezifischen Unterschiede nach LPS-Behandlung.

24 h nach intraperitonealer Injektion von LPS war eine Expressionszunahme der kostimulatorischen Moleküle CD86, CD80 und CD40 wie auch des Migrationsmarkers CCR7 in beiden Stämmen zu verzeichnen. Auch die MHC-I und -II Moleküle wurden auf DC nach LPS-Injektion stärker exprimiert. In keinem Fall waren stammspezifische Unterschiede zu verzeichnen (vgl. Abb. 13).

### 3.3.2 BMDC Maturierung nach *in vitro* LPS-Stimulation

Weiterhin wurde die Maturierung von BMDC *in vitro* mit LPS, p(I:C) und CVB3 induziert und anschließend die Expressionen verschiedener Oberflächenproteine im FACS analysiert. Wie in Abb. 14 gezeigt, konnte in beiden Stämmen durch 12 h Stimulation mit LPS oder 24 h p(I:C) eine Maturierung erzielt werden, erkennbar durch eine gesteigerte Expression von CD80, CD86, CD40 und MHC-I und MHC-II.



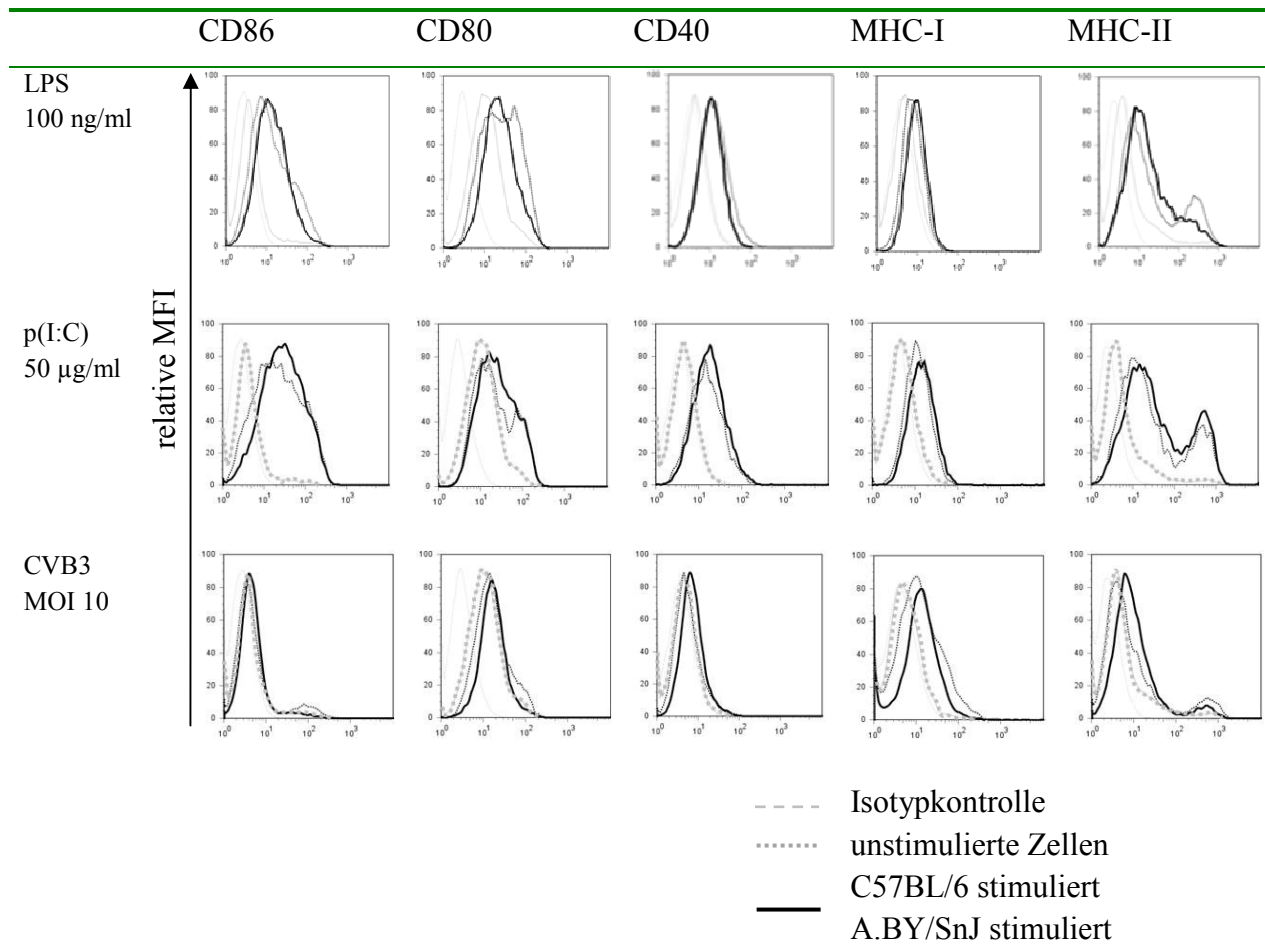


Abb. 14: FACS-Analyse von Reifungsmarkern. BMDC wurden mit LPS für 12 h, bzw. mit p(I:C) und CVB3 für 24 h stimuliert und anschließend die Expression der Reifungsmarker mit FACS analysiert. Abbildungen sind repräsentativ für eins von mindestens vier Experimenten.

Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit CVB3 in einer MOI 10 nicht zur Maturierung der Zellen, lediglich eine dezente Induktion von MHC-I konnte mehrfach gezeigt werden.

### 3.3.3 Zytokininduktion in BMDC nach TLR-Stimulation

Analog zur Maturierung wurde auch die Zytokinantwort nach Stimulation mit TLR-Liganden untersucht. TaqMan-Analysen zeigen die deutliche Induktion verschiedener Zytokine nach *in vitro* Stimulation von BMDC mit LPS oder p(I:C), v.a. TNF- $\alpha$  wird besonders stark induziert (vgl. Abb. 15). Zu erkennen ist die deutlich höhere Expression der Zytokine nach LPS-Stimulation verglichen mit der durch p(I:C) induzierten. Es existieren keine signifikanten oder konsistenten Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen.

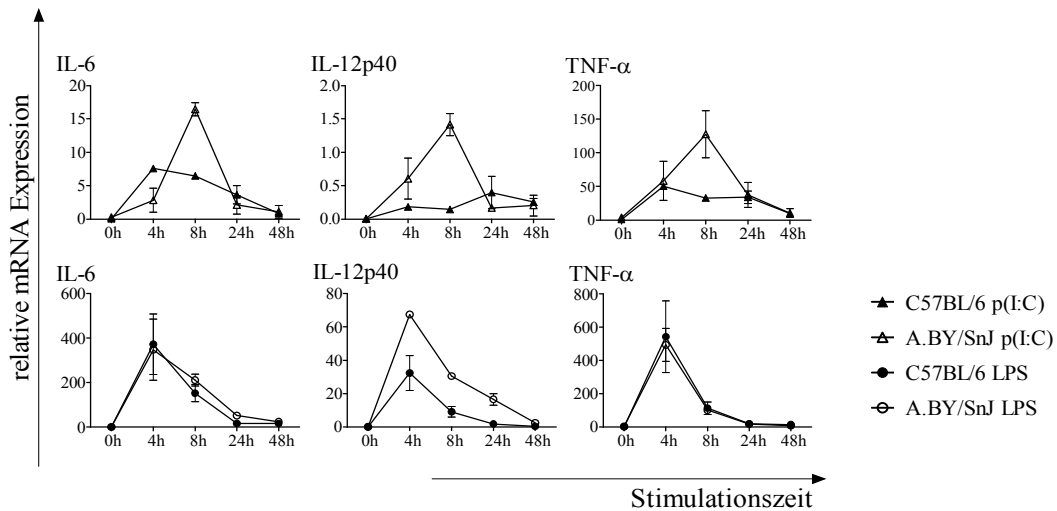


Abb. 15: BMDC (gepoolt aus je 8 Tieren) wurden mit LPS bzw. p(I:C) stimuliert. Gezeigt ist die Induktion von Zytokinen auf mRNA-Ebene nach unterschiedlicher Stimulationsdauer. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Methode, die Darstellung als MW  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils n=2 Ansätzen. Für  $p < 0,05$  ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3.3.4 Induktion viraler Rezeptoren in DC nach *in vitro* LPS-Stimulation

Analog zur Maturierung bzw. zur Zytokininduktion wurde die Expression der viralen Rezeptoren RIG-1 und Mda-5 sowie des in deren Induktion involvierten Transkriptionsfaktors IRF-1 auch nach *in vitro* LPS-Stimulation untersucht. Dabei zeigte sich in beiden Stämmen nach circa 8 h eine deutliche Expressionszunahme der untersuchten Gene (vgl. Abb. 16). Es waren keine stammspezifischen Unterschiede bei der Induktion zu verzeichnen.

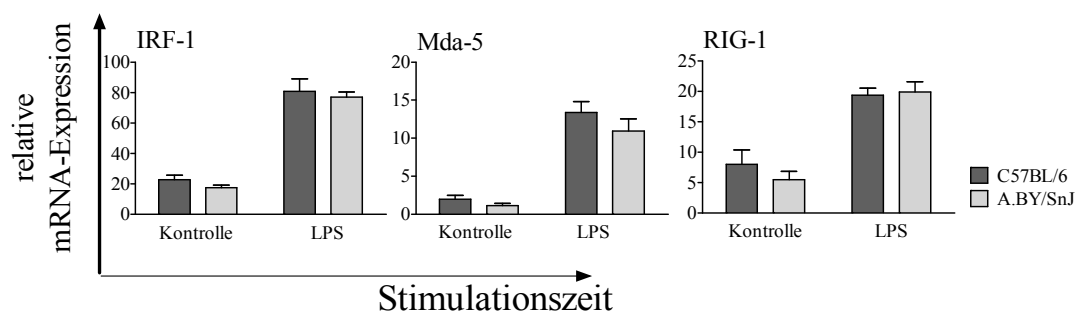


Abb. 16: Die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors IRF-1 sowie der viralen Rezeptoren RIG-1 und Mda-5 wurde mit RTQ-PCR nach 8 h *in vitro* LPS-Stimulation (100 ng/ml) in splenozytären DC aus naiven C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen untersucht. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Methode, die Darstellung als MW  $\pm$  SEM von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. In jedem Experiment wurden Dreifachwerte eines Pools von mind. n=5 Tieren bestimmt.  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen (\*).

### 3.4 In vitro CVB3-Infektion von BMDC

Die *in vitro* CVB3-Infektion führte zu keiner sichtbaren Induktion von Maturierungsmarkern auf BMDC (vgl. Abb. 14). Deshalb wurde der Effekt von CVB3 in verschiedenen Titerstufen untersucht. Dabei war festzustellen, dass auch höchste Virusmengen (MOI 100) nicht zu zytopathischen Effekten oder einer reduzierten Zellvitalität führten (s. Abb. 17a). Anders als unter LPS fand auch keine Induktion von Maturierungsmarkern statt (vgl. CD86 Expression in Abb. 17b). Auf mRNA-Ebene wurde nur eine geringe Regulation der beiden PA28-UE festgestellt. An Zytokinen wurde lediglich TNF- $\alpha$  dezent hochreguliert. Verglichen mit der Induktion unter LPS oder p(I:C) sind diese Veränderungen aber als sehr gering zu werten (vgl. Abb. 17d). Um sicherzustellen, dass die Zellen tatsächlich infiziert waren, erfolgte der Nachweis viraler RNA mittels RTQ-PCR. So konnte gezeigt werden, dass in beiden Stämmen vergleichbare Mengen an CVB3 Genom mit einem Maximum 8 h p.i. vorhanden waren (s. Abb. 17c). Allerdings scheinen BMDC den ubiquitär von CVB3 genutzten Rezeptor CAR nicht oder nur in geringer Menge zu exprimieren (vgl. Abb. 17e).

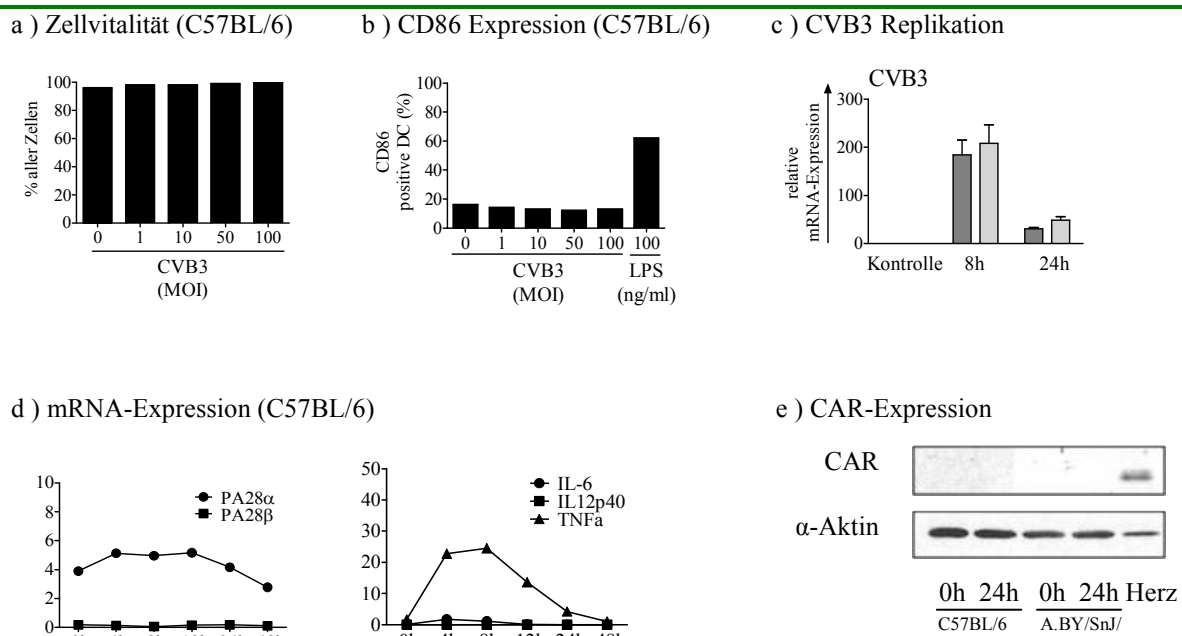


Abb. 17: Unreife BMDC (gepoolt aus 5 C57BL/6 Tieren) wurden mit CVB3 (MOI1-100) oder LPS (100 ng/ml) bis zu 48 h inkubiert. a) Bestimmung der Zellvitalität mit Trypanblaufärbung. b) FACS-Analyse der CD86-Expression. c) CVB3 RNA Nachweis nach *in vitro* Infektion von splenozytären DC mit MOI1 für 8 und 24 h, dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen mit jeweils Dreifachwerten, für  $p < 0,05$  ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. d) TaqMan-Analyse von PA28 $\alpha$  und  $\beta$ , bzw. diversen Zytokinen im Zeitverlauf. e) CAR-Detektion im Western Blot. Gezeigt sind jeweils repräsentative Ergebnisse von mind. zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Es folgte die mRNA-Expressionsanalyse der viralen Rezeptoren RIG-1 und Mda-5 sowie des Transkriptionsfaktor IRF-1, deren Expression in *in vivo* infizierten DC von C57BL/6-Mäusen induziert wurde. Dabei war bei der *in vitro* CVB3 Infektion splenozytärer DC von beiden Stämmen keine signifikante Induktion dieser Gene nach 8 h, dem Zeitpunkt der maximalen Viruslast (vgl. Abb. 17), zu verzeichnen (vgl. Abb. 18).

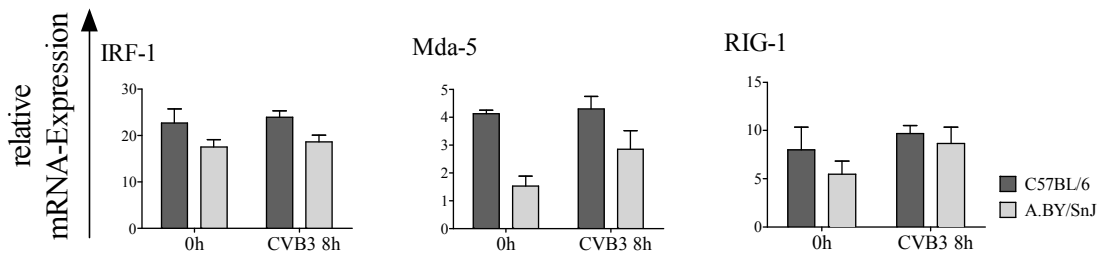


Abb. 18: Die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors IRF-1 sowie der viralen Rezeptoren RIG-1 und Mda-5 wurde mit RTQ-PCR nach 8 h *in vitro* CVB3 Infektion (MOI1) in splenozytären DC aus naiven C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen untersucht. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode, die Darstellung als MW  $\pm$  SEM von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. In jedem Experiment wurden Dreifachwerte eines Pools von mind. n=5 Tieren bestimmt.  $p < 0,05$  ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (\*).

### 3.5 Antigenpräsentationsassays

Eine der wichtigsten Fähigkeiten dendritischer Zellen ist die Präsentation von Antigenen über MHC-I oder MHC-II und die damit verbundene Aktivierung von T-Zellen. Um diese Eigenschaft sowohl in permissiven A.BY/SnJ als auch resistenten C57BL/6 Mäusen zu testen, wurden splenozytäre DC aus naiven oder infizierten Mäusen (36 h p.i.) mit Ovalbumin oder einem MHC-I- bzw. MHC-II- restringierten Ovalbuminpeptid inkubiert und anschließend mit T-Zellen aus Mäusen, deren T-Zellrezeptor transgen für das entsprechende Epitop ist, kokultiviert. Im Anschluss wurde die Proliferation der T-Zellen im FACS sowie durch die Bestimmung der Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  im Kulturüberstand beurteilt.

#### 3.5.1 Präsentation via MHC-I

Zuerst erfolgte die externe Beladung der DC beider Stämme mit dem MHC-I kompatiblen Peptid SIINFEKL.

Die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, deren TCR transgen für dieses Epitop ist, zeigten in Kokulturen mit den beladenen DC beider Stämme ähnliche Proliferationsraten. Dabei war das Ausmaß dieser Proliferation unabhängig vom Infektionsstatus des DC-Donors (vgl. Abb. 19 a und b).

Kokulturen mit DC von infizierten C57BL/6 Tieren wiesen bei einer Peptidkonzentration von 2 µg/ml signifikant höhere IFN-γ- und IL-2-Spiegel auf als Kokulturen mit DC von infizierten A.BY/SnJ Tieren (vgl. Abb. 19 c und d). In Kokulturen mit DC, die mit einem irrelevanten MHC-I-restringierten Kontrollpeptid (CVB3 P3D<sub>2170-2177</sub>; 2 µg/ml) beladen wurden, war keine T-Zellproliferation zu verzeichnen.

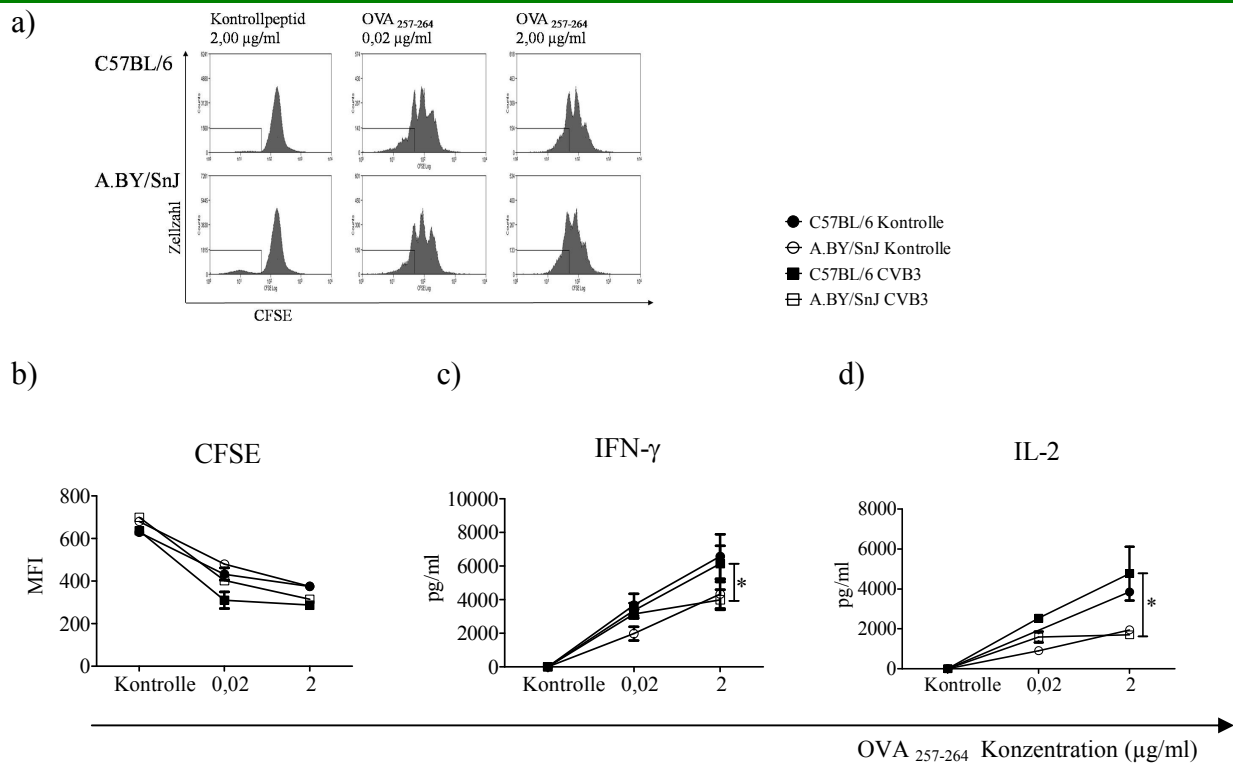


Abb. 19: MHC-I Präsentation von SIINFEKL: DC aus infizierten und naiven C57BL/6 bzw. A.BY/SnJ-Mäusen (je n=2) induzierten nach externer Beladung mit dem MHC-I-Peptid SIINFEKL die Proliferation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen von OT-I-Mäusen. Nach 48 h Kokultur zeigte sich eine konzentrationsabhängige Proliferation der T-Zellen. Als Kontrolle wurde ein irrelevantes MHC-I-restringiertes Kontrollpeptid (CVB3 P3D<sub>2170-2177</sub>; 2 µg/ml) verwendet. a) Die Reduktion des CFSE-Gehalts pro Zelle als Maß für die Proliferation wird in Histogrammen aus einem von drei unabhängig durchgeführten Experimenten (a, 36 h p.i.) bzw. als Mittelwert eines Dreifachansatzes (b) dargestellt. Als weiteres Maß für Proliferation sind die IFN-γ- (c) bzw. IL-2- (d) Konzentrationen in den Kulturüberständen bestimmt worden. Die Werte sind dargestellt als MW ± SEM aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. p<0,05 wurde als signifikant angenommen (\*).

Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation wurde durch die Präsentation von SIINFEKL via MHC-I nach Inkubation der DC mit dem intakten Protein Ovalbumin untersucht (vgl. Kapitel 1.3.4 Antigenpräsentation). Auch die IL-2-, bzw. IFN-γ-Sekretion fiel deutlich schwächer aus (vgl. Abb. 20 c und d). Weiterhin zeigten sich in Kokulturen mit infizierten C57BL/6 DC höhere Konzentrationen an IL-2 als in Kokulturen mit naiven DC desselben Stammes, hinweisend auf eine effizientere Aktivierung der T-Zellen durch die in der Infektion maturierten DC. Die IL-2-

Sekretion in Kokulturen mit DC von A.BY/SnJ stellte sich als unabhängig vom Infektionszustand der DC dar. Für IFN- $\gamma$  konnten bei C57BL/6 ebenfalls tendenziell höhere Werte in Kokulturen mit infizierten DC gemessen werden. Hier wiesen die Kokulturen mit DC von infizierten A.BY/SnJ Mäusen sogar noch geringere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen auf als Kokulturen mit DC von naiven Tieren. Als Kontrolle erfolgte die Inkubation mit BSA (50  $\mu\text{g/ml}$ ) welche nicht zur Induktion von T-Zellproliferation führte.

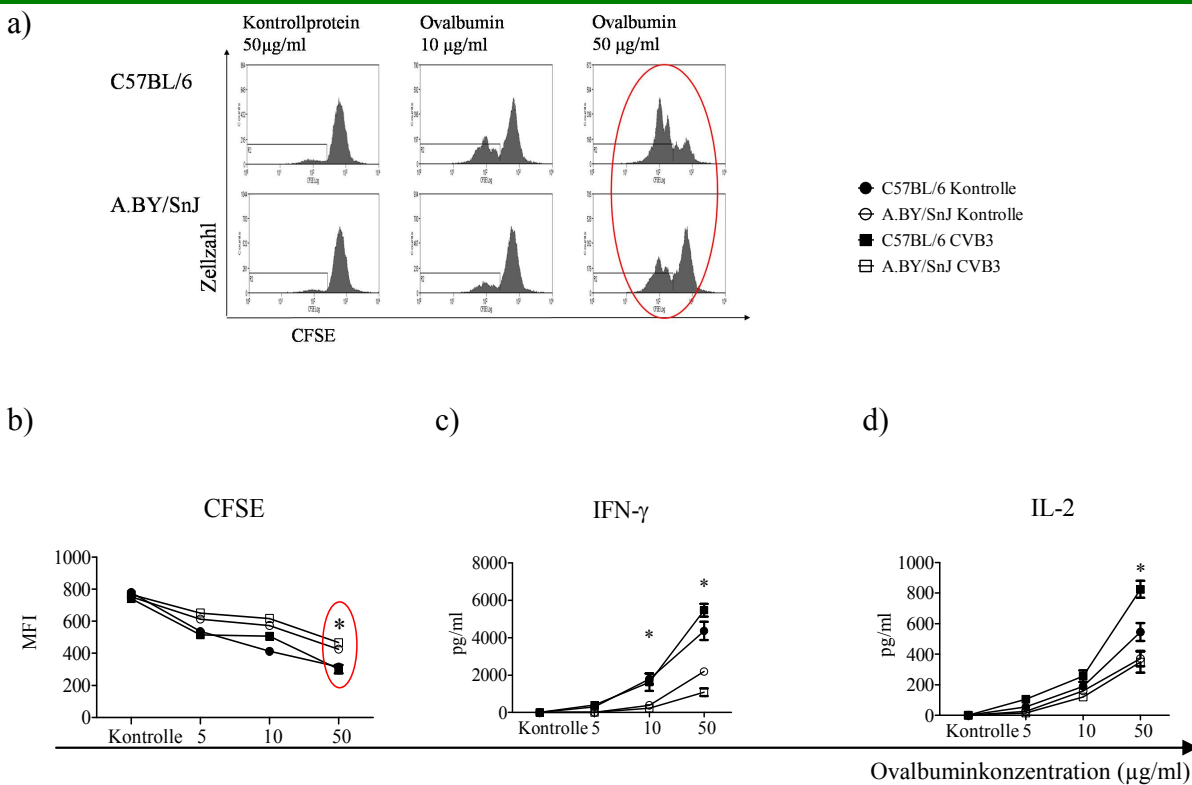


Abb. 20: Kreuzpräsentation von Ovalbumin:

DC aus infizierten und naiven C57BL/6 bzw. A.BY/SnJ-Mäusen (je  $n=2$ ) präsentierten nach Inkubation mit Ovalbumin das MHC-I-Peptid SIINFEKL und induzierten die Proliferation von  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen aus OT-I-Mäusen. Nach 48 h Kokultur zeigte sich eine konzentrationsabhängige T-Zell-Proliferation. Als Kontrolle wurde ein irrelevantes Kontrollprotein (BSA; 50  $\mu\text{g/ml}$ ) verwendet. Die Reduktion des CFSE-Gehalts pro Zelle als Maß für Proliferation wird in Histogrammen (eins von drei unabhängig durchgeführten Experimenten (a) bzw. als Mittelwert eines Dreifachansatzes (b) dargestellt. Weiterhin sind die IFN- $\gamma$ - (c) bzw. IL-2- (d) Konzentrationen der Kulturüberstände bestimmt worden. Die Werte sind dargestellt als  $\text{MW} \pm \text{SEM}$  aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten.  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen (\*: verglichen wurden jeweils die Werte für infizierte, bzw. naive DC beider Stämme).

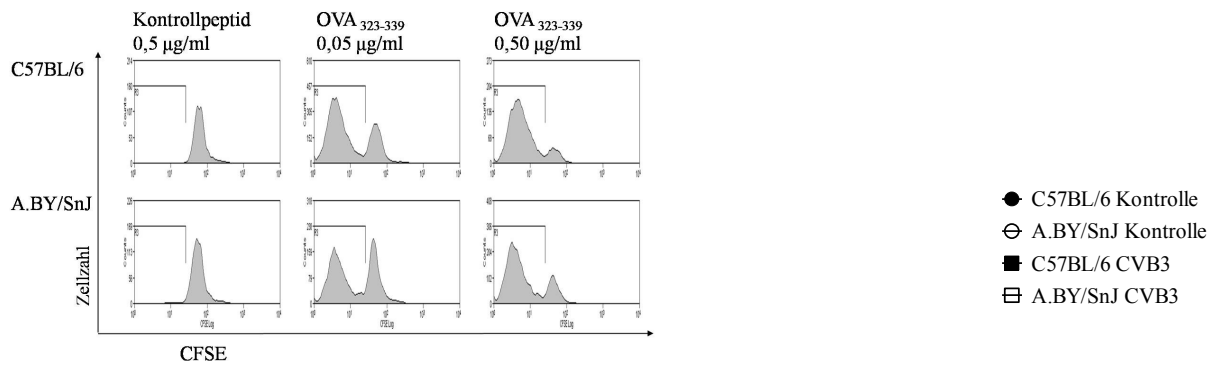
### 3.5.2 Präsentation via MHC-II

In einem weiteren Experiment wurde analog die Proliferation von  $\text{CD4}^+$ -T-Zellen in DC-T-Zell-Kokulturen nach der Inkubation der DC mit Ovalbumin (oder dem entsprechenden MHC-II

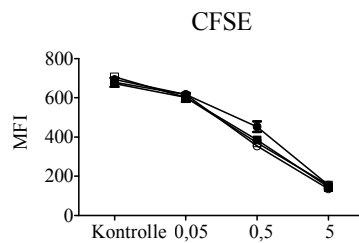
restringierten Ovalbuminepitop) untersucht, als irrelevantes Kontrollpeptid wurde M<sub>331-346</sub> FRYYPNVVAKNIGRIR des Sendaivirus-Matrix(M)-Proteins genutzt.

Hierbei zeigten sich für die Proliferationsrate der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen keine entscheidenden Unterschiede im Stammvergleich (s. Abb. 21 a) und b). Die Sekretion von IFN- $\gamma$  fiel im Allgemeinen sehr gering aus und zeigte keine relevanten Unterschiede (vgl. Abb. 21 c). Die IL-2 Konzentrationen in Kokulturen mit infizierten A.BY/SnJ DC stellten sich als signifikant niedriger heraus als in Kokulturen mit infizierten C57BL/6 DC (vgl. Abb. 21 d).

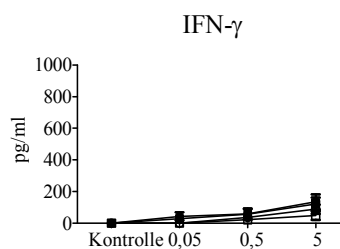
a)



b)



c)



d)

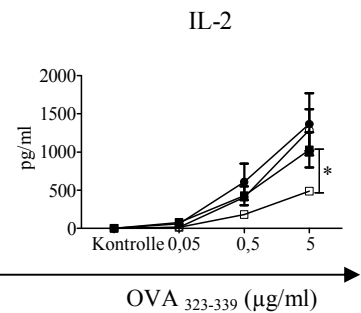


Abb. 21: MHC-II Präsentation von OVA<sub>323-339</sub>: DC aus infizierten und naiven C57BL/6 bzw. A.BY/SnJ-Mäusen (je n=2) induzierten nach externer Beladung mit dem MHC-II-Peptid OVA<sub>323-339</sub> konzentrationsabhängig die Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von OT-II-Mäusen. Als Kontrolle wurde ein irrelevantes MHC-II-restringiertes Kontrollpeptid (M<sub>331-346</sub> FRYYPNVVAKNIGRIR des Sendaivirus-Matrix(M)-Proteins; 5  $\mu\text{g/ml}$ ) verwendet. a/b: Die Reduktion des CFSE-Gehalts pro Zelle als Maß für die Proliferation wird in Histogrammen aus einem von drei unabhängig durchgeführten Experimenten (a) bzw. als Mittelwert eines Dreifachansatzes (b) dargestellt. Als weiteres Maß für Proliferation sind die IFN- $\gamma$ - (c) bzw. IL-2- (d) Konzentrationen der Kulturüberstände bestimmt worden. Die Werte sind dargestellt als MW  $\pm$  SEM aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. p<0,05 wurde als signifikant angenommen (\*).

Anschließend wurde die MHC-II-Präsentation von OVA<sub>323-339</sub> nach externer Beladung der DC mit Ovalbumin untersucht. Die Proliferationsraten stellten sich erneut als konzentrationsabhängig von Ovalbumin dar. Auch hier konnten für die Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen keine stammbezogenen Unterschiede verzeichnet werden (vgl. Abb. 22 a und b). Die IL-2- als auch die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen zeigten generell sehr geringe Werte und stellten sich als unabhängig vom Infektionsstatus oder dem Donorstamm der DC dar (s. Abb. 22 c und d).

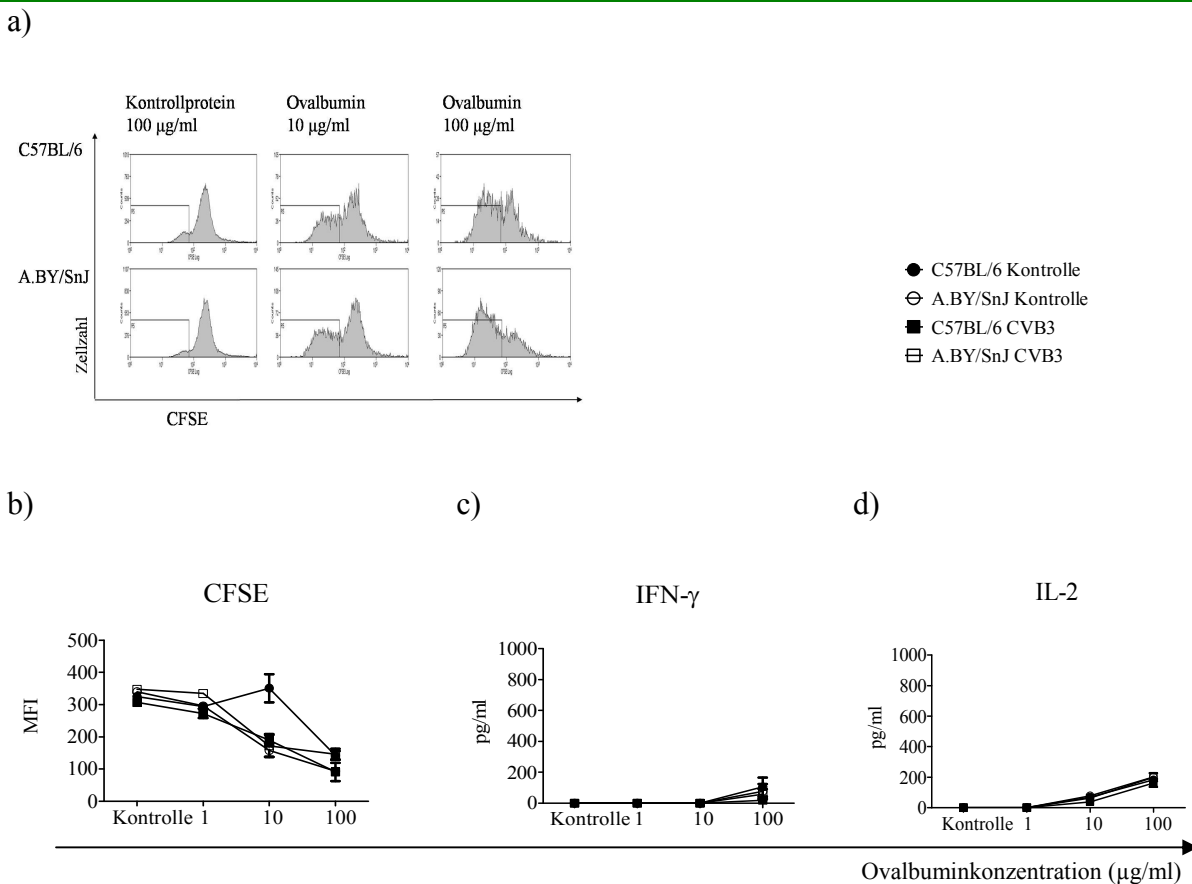


Abb. 22 MHC-II Präsentation von OVA<sub>323-339</sub> nach Inkubation der DC mit Ovalbumin

DC von C57BL/6 bzw. A.BY/SnJ-Mäusen (0 und 36 h p.i. je n=2) präsentierten das MHC-II-Peptid OVA<sub>323-339</sub> und induzierten für 96 h eine konzentrationsabhängige Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Als Kontrolle wurde BSA (100 µg/ml) verwendet. a/b: Die Reduktion des CFSE-Gehalts pro Zelle als Maß für die Proliferation wird in Histogrammen aus einem von drei unabhängig durchgeführten Experimenten (a) bzw. als MW  $\pm$  SEM eines Dreifachansatzes (b) dargestellt. Als weiteres Maß für Proliferation sind die IFN- $\gamma$ - (c) bzw. IL-2- (d) Konzentrationen der Kulturüberstände als MW  $\pm$  SEM aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. p<0,05 wurde als signifikant angenommen (\*).

Zusammenfassend ist also von den hier dargestellten typischen Wegen, Antigene zu präsentieren, vor allem die Fähigkeit der Kreuzpräsentation in den A.BY/SnJ DC verglichen mit DC von C57BL/6 deutlich eingeschränkt.



### 3.6 Das Ubiquitin-Proteasom-System während der DC-Maturierung

#### 3.6.1 Veränderungen auf mRNA-Ebene während der *in vivo* CVB3-Infektion

Als Bestandteil der Antigenprozessierungsmaschinerie wurden verschiedene proteasomale Untereinheiten bzw. Aktivatoruntereinheiten analysiert. Dabei fand sich eine signifikant stärkere Induktion der Aktivatoruntereinheiten PA28 $\alpha$  und  $\beta$  bei C57BL/6 gegenüber A.BY/SnJ (Abb. 23). Auch die Immununtereinheiten, hier exemplarisch durch LMP7 gezeigt, wurden in infizierten DC aus A.BY/SnJ Mäusen weniger stark exprimiert.

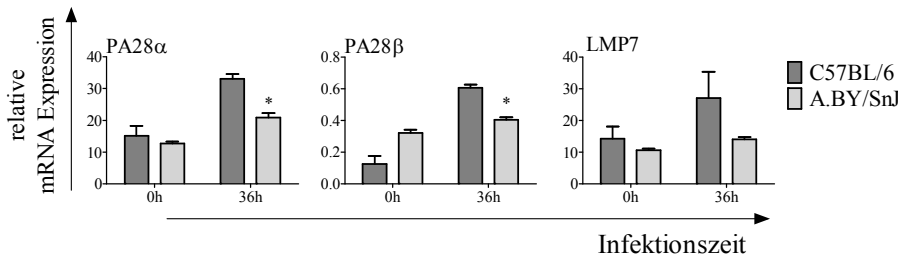


Abb. 23: TaqMan-Analysen in *in vivo* infizierten splenozytären DC aus C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen: Induktion von PA28-UE und LMP7 im Infektionsverlauf. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode, die Darstellung als MW  $\pm$  SEM von sechs Pools bestehend aus je 2 Tieren (insgesamt n=12).  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen (\*).

#### 3.6.2 UPS-assoziierte Proteinexpression während der *in vivo* CVB3-Infektion

Anschließend wurden die Expression wichtiger UPS- assoziierter Proteine im Western Blot im Verlauf der CVB3-Infektion analysiert. Dabei zeigte sich in beiden Stämmen eine Induktion von PA28 $\alpha$  und  $\beta$ , wobei für A.BY/SnJ ein geringeres Ausgangsniveau der Expression ersichtlich ist (vgl. Abb. 24a). In beiden Stämmen erkennt man eine Induktion des E2-Enzyms UBE2L6 nach 48 h p.i. Dabei fällt auf, dass die Induktion bei A.BY/SnJ wesentlich schwächer ausgeprägt ist als bei C57BL/6. Ein analoges Expressionsmuster war für die Zunahme der ISG15-Konjugate darstellbar: in beiden Stämmen kommt es nach 48 h zu einer Akkumulation der Konjugate. Dabei ist sowohl die Zunahme an ISGylierten Proteinen als auch an freiem ISG-15 bei A.BY/SnJ deutlich schwächer ausgeprägt (vgl. Abb. 24a).

Hinsichtlich der Ubiquitylierung zeigte sich ein gleichmäßiges Muster der NP40-löslichen Ubiquitinkonjugate in beiden Stämmen zu jedem Zeitpunkt der Infektion. Da man weiß, dass

Teile der Ubiquitinkonjugate in DC schwer löslich sind (z.B. DRIPs oder DALIS), wurde zusätzlich die NP40 unlösliche Fraktion aufgetragen. Hier sieht man in beiden Stämmen eine Zunahme der Konjugate. Diese ist deutlich stärker ausgeprägt bei A.BY/SnJ (s. Abb. 24b).

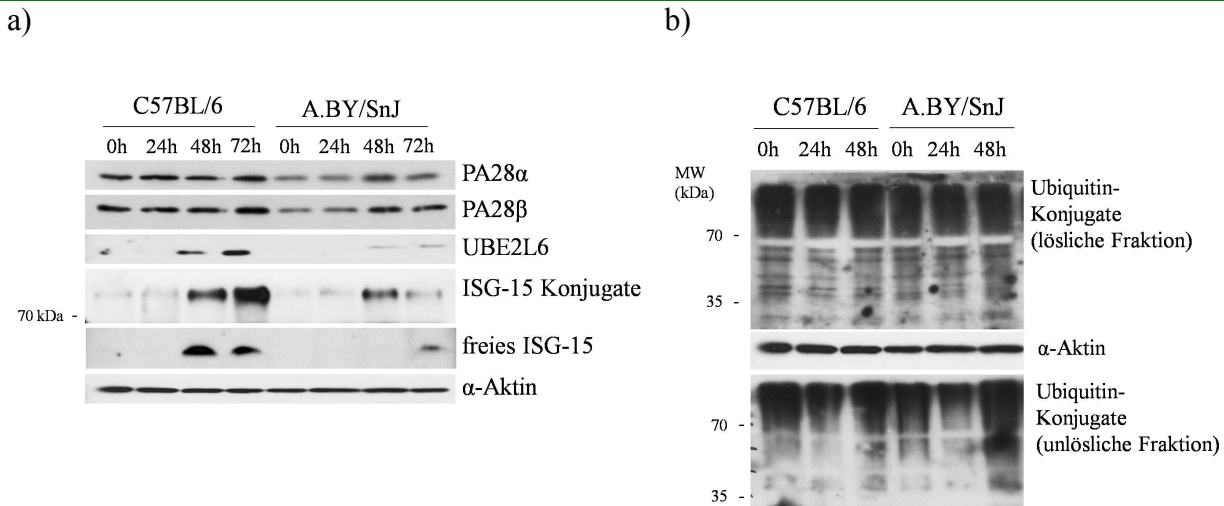


Abb. 24: Proteinexpression in splenozytären DC im Infektionsverlauf: pro Zeitpunkt wurde ein Pool aus n=3 Tieren aufgetragen, Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Experimente, a) Proteinexpression von UPS relevanten Proteinen, b) Ubiquitinkonjugate mit Unterscheidung zw. NP40-löslicher und NP40-unlöslicher Fraktion

### 3.6.3 UPS-Regulation in BMDC auf mRNA-Ebene nach TLR-Stimulation

Auch die Regulation der UPS-assoziierten Gene wurde im *in vitro* BMDC-Modell unter TLR-Stimulation analysiert. TaqMan-Analysen (vgl. Abb. 15a) zeigten eine deutliche Hochregulation der mRNA-Expression von den UPS-relevanten Genen PA28α, PA28β sowie LMP2 und LMP7 in beiden Stämmen sowohl unter LPS- als auch p(I:C)-Stimulation in ähnlicher Ausprägung. Unter LPS startete die Induktion bereits früh nach 4 h (vs. 8 h unter p(I:C)) und erreichte eher ein Maximum als unter p(I:C) (8 h vs. 24 h). Abb. 15b zeigt die Induktion verschiedener ISG-15 assoziierter Gene durch LPS: Nach 8 h erfolgt in beiden Stämmen eine vergleichbares Maximum der Induktion von ISG-15. Auch die drei Konjugationsenzyme UBE1L, UBE2L6 und TRIM25 zeigen eine ähnliche Kinetik. Bereits nach 12 h geht die Induktion wieder deutlich zurück. Auch das deISGylierende Enzym USP18 wird nach 8 h in beiden Stämmen hoch exprimiert, wenn auch wesentlich stärker in BMDC von C57BL/6-Mäusen. Zusammenfassend kann man trotz deutlicher Effekte der Stimulation auf die untersuchten Gene sagen, dass keine signifikanten oder konsistenten Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen existieren.

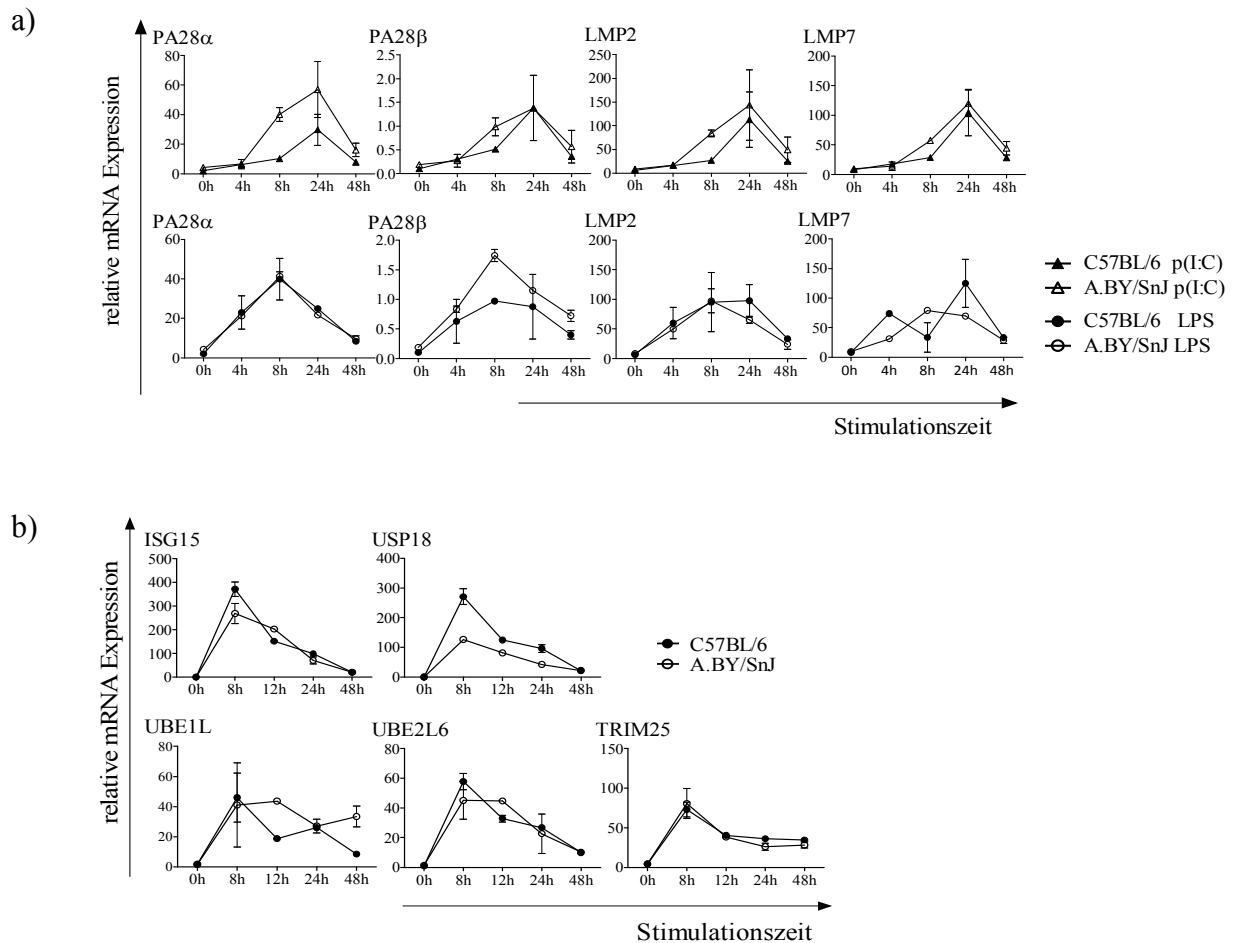


Abb. 25: BMDC (gepoolt aus je 8 Tieren) wurden mit LPS bzw. p(I:C) stimuliert. Zu sehen ist die Induktion verschiedener Gene auf mRNA-Ebene nach unterschiedlicher Stimulationsdauer. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Methode, die Darstellung als MW  $\pm$  SEM aus zwei unabhängigen Versuchen: a) Effekte auf UPS-assoziierte Gene, b) Induktion verschiedener Komponenten des ISG-15-Systems. Für  $p < 0,05$  ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

### 3.6.2 UPS-Regulation in BMDC auf Proteinebene nach TLR-Stimulation

Anschließend wurden die LPS-induzierten Veränderungen in BMDC auch auf Proteinebene untersucht. Abb. 26a zeigt eine deutliche, aber vergleichbare Induktion des Proteasomaktivators PA28 $\alpha$  in beiden Stämmen. Auch PA28 $\beta$  wird sichtbar, wenn auch weniger deutlich induziert. Die Expression der konstitutiven Proteasomuntereinheit  $\alpha 4$  unterliegt den Ladungsschwankungen, es ist keine sichtbare Induktion oder Repression zu verzeichnen.

Abb. 26b zeigt eine deutliche Zunahme der Ubiquitin- und ISG15-Konjugate in BMDC, die in beiden Fällen bei C57BL/6 weniger stark ausgeprägt zu sein scheint. Zusätzlich wurde die NP40

unlösliche Fraktion aufgetragen (Abb. 26c): Hier ist bei C57BL/6 ein deutliches Auflaufen der Konjugate nach 12 h zu erkennen, zu späteren Zeitpunkten ist dann wieder eine Abnahme der Konjugate sichtbar. Hingegen wird bei A.BY/SnJ eine deutlich stärkere Zunahme bis 24 h sichtbar und auch nach 48 h zeigen diese BMDC eine Persistenz der schwer löslichen Ubiquitinkonjugate. Diese Ergebnisse sind kongruent zur Induktion der nicht löslichen Ubiquitinkonjugate in DC *in vivo* infizierter Tiere (s.o.).

Für die unlösliche Proteinfraction ist keine Ladungskontrolle in dem Sinne möglich wie für die lösliche Proteinfraction. Um diesem Problem gerecht zu werden, wurden die Zellen vor dem Ernten gezählt, gleiche Zellzahlen pelletiert und anschließend aufgetragen.

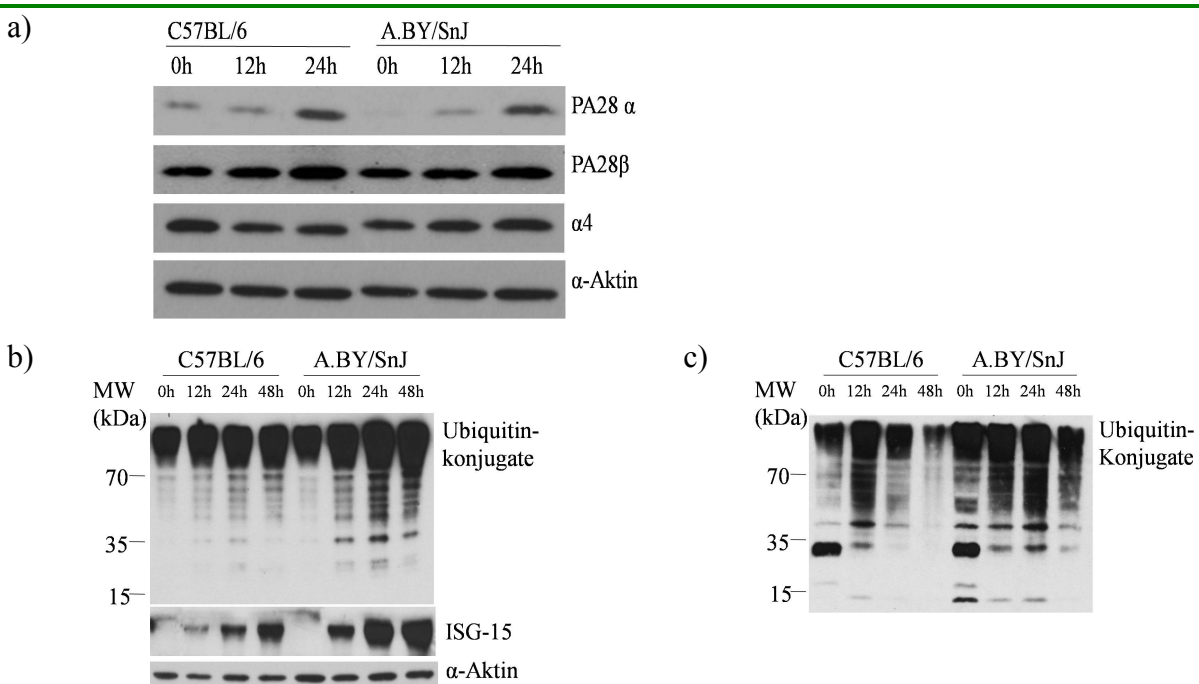


Abb. 26: Western Blot-Analysen von LPS-stimulierten BMDC. Gezeigt sind repräsentative Blots aus mind. 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, Zellen gepoolt aus 5 Tieren: a) UPS relevante Proteine, b) Ubiquitin- und ISG15-Konjugate in der NP40 löslichen Fraktion, c) Ubiquitinkonjugate der NP40 unlöslichen Fraktion.  $\alpha$ -Aktin dient als Ladekontrolle.

### 3.7 DALIS-Aggregation

#### 3.7.1 DALIS in DC während der *in vivo* CVB3-Infektion

DALIS (dendritic cell aggresome-like induced structures) stellen ein morphologisches Korrelat der unlöslichen Ubiquitinkonjugate dar. Nach 24 h, bzw. 48 h p.i. mit CVB3 wurden DALIS in splenozytären DC mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Es kommt bei beiden Stämmen zum

Auflaufen dieser Aggregate (vgl. Abb. 27a). Dabei weisen DC der A.BY/SnJ-Tiere v.a. nach 48 h Infektion eine signifikant höhere Anzahl dieser Aggregate auf als DC von C57BL/6. Um die Anzahl der DALIS pro Zelle zu objektivieren, wurden die Aggregate in ca. 100 Zellen pro Zeitpunkt gezählt und das Ergebnis aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen gemittelt (vgl. Abb. 27b).

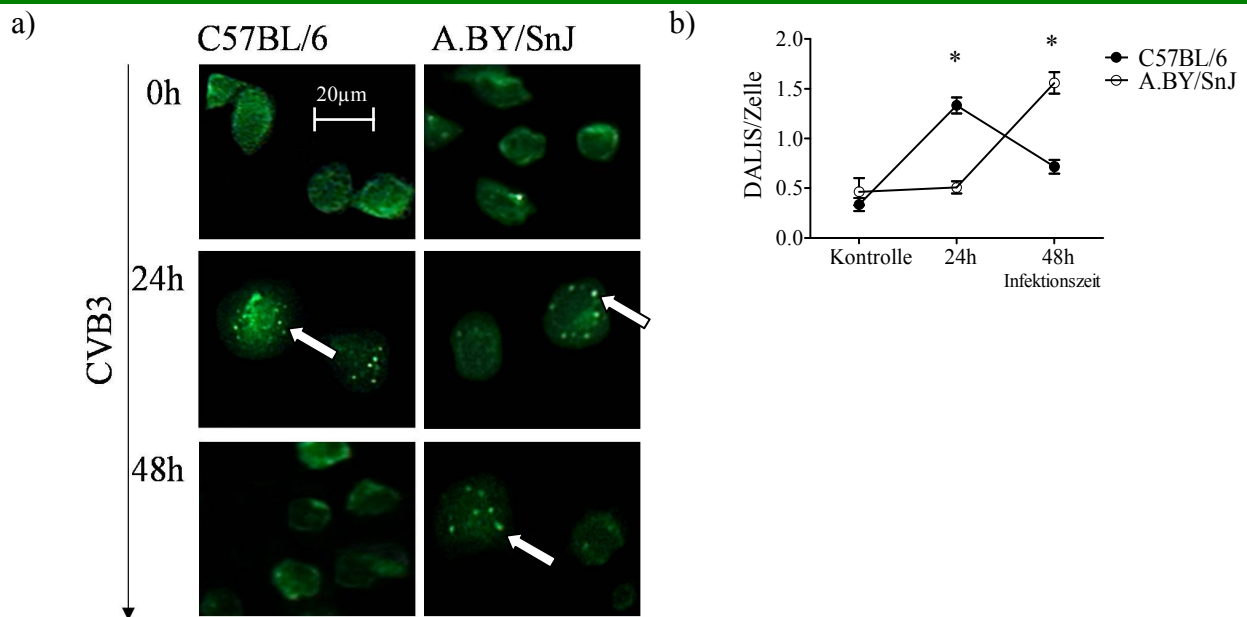


Abb. 27: DALIS-Akkumulation: DC von C57BL/6 und A.BY/SnJ (je Pool aus n=3) wurden im Infektionsverlauf isoliert und polyubiquitinylierte Proteine angefärbt. Gezeigt sind Bilder eines repräsentativen von mind. drei unabhängigen Versuchen. a) Immunfluoreszenz, Vergrößerung: 40x. b) Verblindete Auszählung der Aggregate pro Zelle in mind. 100 Zellen/ Zeitpunkt pro Versuch, dargestellt als Durchschnitt der MW  $\pm$  SEM aus den drei Versuchen.  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen (\*).

### 3.7.2 DALIS-Aggregation und Zellvitalität in LPS-stimulierten BMDC

Die beobachtete Akkumulation von DALIS sollte auch für das *In-vitro*-Modell der LPS-Stimulation mittels Immunfluoreszenz nachvollzogen werden. Man erkennt im Zytosol ein Auftreten dieser Aggregate nach 24 h Stimulation in beiden Stämmen (vgl. Abb. 28). Während die Strukturen in BMDC der C57BL/6-Tiere nach 48 h weitgehend abgebaut sind, zeigen A.BY/SnJ BMDC eine Persistenz der DALIS. Um zu überprüfen, ob die differenziellen Veränderungen in den A.BY/SnJ BMDC durch zytotoxische Effekte im Rahmen der LPS-Stimulation zu begründen sind, wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test analysiert. Dabei

wurden in BMDC beider Stämme nach 48 h eine deutliche und vergleichbare Reduktion der Zellvitalität nachgewiesen (vgl. Abb. 28c).

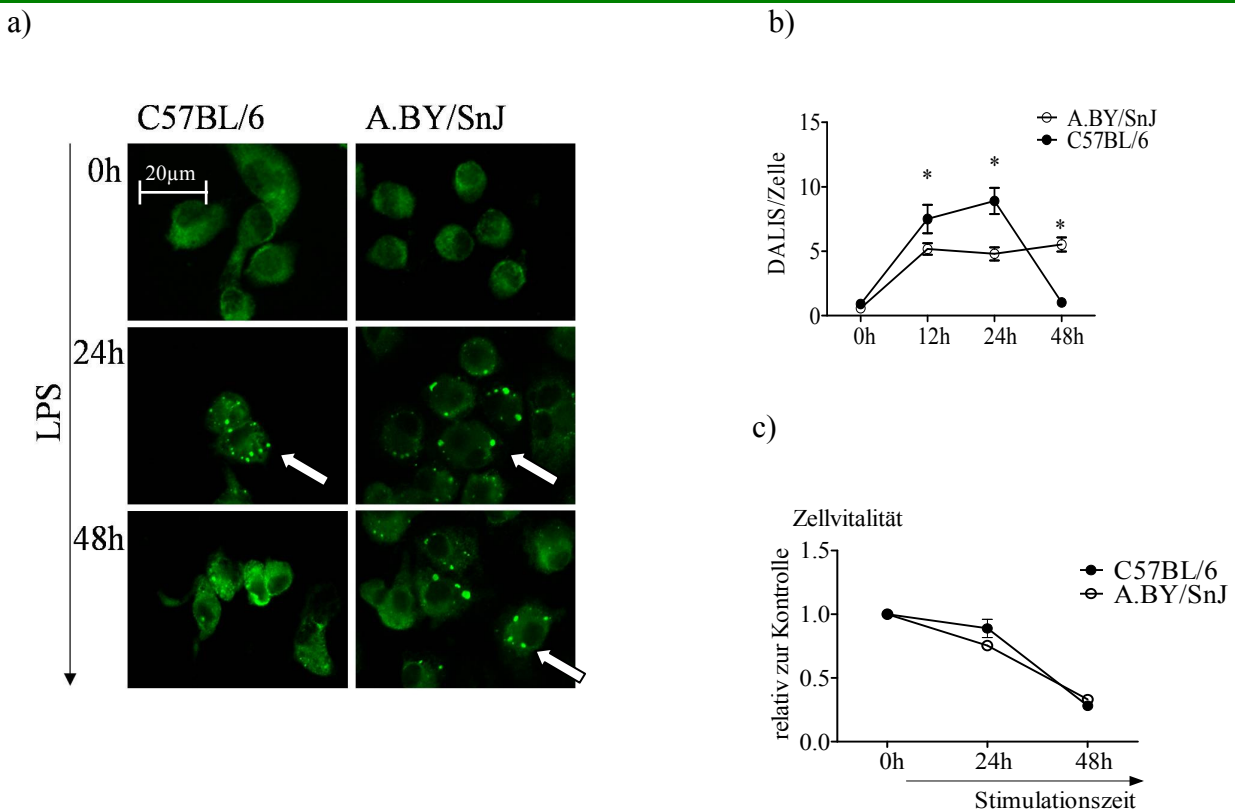


Abb. 28: Nachweis von DALIS (s. Pfeile) mittels Immunfluoreszenz in LPS-stimulierten BMDC: a) Färbung für polyubiquitinylierte Proteine. Vergrößerung: 100fach b) Auszählung der Aggregate in mind. 100 Zellen pro Zeitpunkt aus drei unabhängigen Versuchen, Werte dargestellt als MW ± SEM. c) MTT-Zellvitalitätstest: Mit LPS stimulierte BMDC wurden mit MTT inkubiert. Gezeigt ist der photometrische Umsatz von MTT zu Formazan durch lebende Zellen, normiert auf unbehandelte Zellen, Wert dargestellt als MW ± SEM aus einem Dreifachansatz.  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen (\*).

### 3.7.3 Inkorporation viraler Proteine in DALIS

DALIS werden als Speicher potentieller MHC-I-Antigene vor der finalen Prozessierung diskutiert. Um diese These für die Inkorporation von CVB3-Proteinen in DALIS zu prüfen, wurden für DC aus *in vivo* CVB3-infizierten A.BY/SnJ Mäusen eine Kofärbung des Virusproteins VP1 und der DALIS durchgeführt. In der Immunfluoreszenz zeigte sich eine Kolokalisation von VP1 in DALIS. Als Kontrolle wurden DALIS in splenozytären DC *ex vivo* mit LPS (100 ng/ml) induziert. Hier zeigte sich keine Färbung für VP1 bzw. keine Kolokalisation in DALIS.

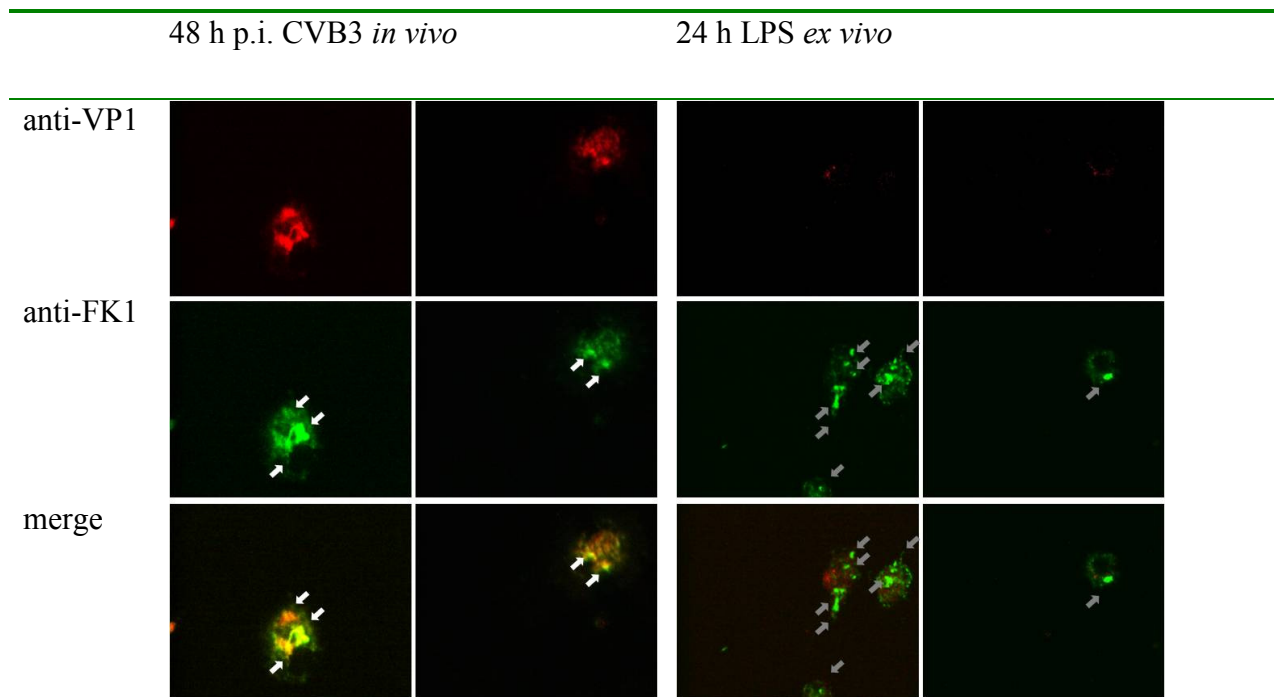


Abb. 29: VP1-Inkorporation in DALIS: DC von A.BY/SnJ (zwei Pools mit je n=2 Tiere) wurden 48 h p.i. CVB3 isoliert und eine Kofärbung für polyubiquitinylierte Proteine (anti-FK1) und das Virusprotein VP1 durchgeführt. Dabei zeigt sich eine Kolo-kalisation von VP1 in DALIS (weiße Pfeile). Als Kontrolle wurden DC aus naiven A.BY/SnJ-Mäusen (n=7) *ex vivo* für 24 h mit LPS (100 ng/ml) stimuliert, hier zeigte sich keine Färbung für VP1, bzw. keine Kolo-kalisation in DALIS (graue Pfeile). Gezeigt sind repräsentative Färbungen eines von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten.

Zur weiteren Prüfung der Spezifität wurden HeLa-Zellen für 24 h mit CVB3 (MOI10) infiziert und anschließend das Virusprotein VP1 angefärbt. Hier zeigte sich eine spezifische Färbung für infizierte HeLa-Zellen, während nicht infizierte Zellen kein Signal für VP-1 aufwiesen (vgl. Abb. 30).

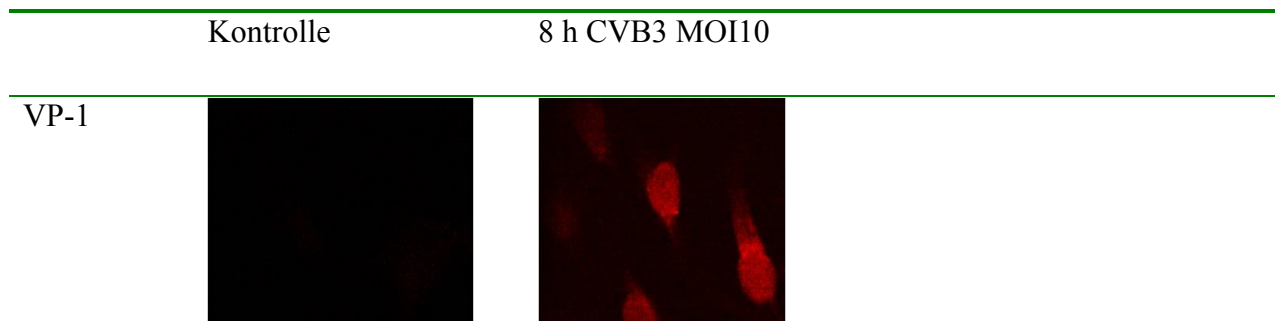


Abb. 30: Infizierte (8 h CVB3 MOI10) und nicht infizierte HeLa-Zellen wurden mit VP-1 angefärbt. Gezeigt sind repräsentative Bilder eines von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass susceptible A.BY/SnJ Mäuse im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen in der CVB3 Infektion verschiedene Defizite in der Aktivierung, Maturierung und Funktion ihrer dendritischen Zellen aufweisen. Diese Defekte spiegeln sich u.a. in einer schwachen oder fehlenden Induktion der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 oder CD40 wie auch des Migrationsmarkers CCR7 wider. Weiterhin ist die Induktion diverser proinflammatorischer Zytokine stark vermindert. Darüber hinaus stellte sich ein Defekt in der Kreuzpräsentation bei A.BY/SnJ DC dar. Im permissiven Stamm fiel außerdem ein verstärktes und verlängertes Auflaufen ubiquitinylierter Proteine in den DC auf. A.BY/SnJ DC zeigten persistierende polyubiquitinylierte Proteinaggregate (DALIS), welche u.a. das virale Protein VP1 beinhalten. Die Akkumulation ISGylierter Proteine während der CVB3-Infektion war hingegen nur in DC von C57BL/6 deutlich zu beobachten, DC von A.BY/SnJ zeigten eine deutlich geringe Induktion der ISGylierung.

### 4.1 Phänotypische Veränderungen der DC während CVB3 Infektion

#### 4.1.1 CVB3 induzierte DC-Maturierung

Eine eng gefasste Infektionskinetik bis d6 p.i. zeigte für DC von C57BL/6 ein Maximum der Expression von CD80, CD86 und CD40 36 h p.i. Auch der Migrationsmarker CCR7 folgte dieser Kinetik. Interessanterweise ergaben sich für die MHC-I Expression kaum Veränderungen, für MHC-II konnte sogar eine leichte Abnahme beobachtet werden (vgl. Abb. 8). Bisher existieren keine Untersuchungen zur Veränderung dendritischer Zellen o.ä. in solch einer frühen Phase der CVB3-Infektion, allerdings zeigen andere virale Infektionsmodelle bereits zu diesem Zeitpunkt entscheidende Veränderungen: murine DC wiesen 1,5 d nach intraperitonealer MCMV Infektion deutlich erhöhte Expressionsraten von CD80, CD86 und CD40 als auch eine massive Zytokininduktion auf (Dalod *et al.* 2003). Dieser Zeitpunkt der maximalen Maturierung korrelierte sehr gut mit der CVB3 Infektion in C57BL/6 Mäusen.

Weiterhin war eine Reduktion der CD11c<sup>+</sup> DC in der Milz um ca. ein Drittel zu beobachten (vgl. Abb. 8). Dies ist möglicherweise durch ein Auswandern der DC zu erklären. Denkbar wäre auch, dass die CD11c<sup>+</sup>-Zellen durch intensive Zell-Zell-Interaktionen oder aufgrund von Adhäsionsprozessen mit lymphatischem Gewebe der Analyse nicht zugänglich waren und so ihr Rückgang vorgetäuscht wird. Damit wird nach 72 h die Expression von CD80, CD86, CD40 und CCR7 auf vermutlich naiven, nicht mit dem Virus in Kontakt gekommenen Zellen gemessen,



was eine Erklärung für den scheinbaren Expressionsrückgang dieser Proteine darstellen könnte. Die Reduktion der Anzahl der CD11c<sup>+</sup>-Zellen konnte auch nach Injektion von LPS beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits nach intravenöser LPS-Injektion gezeigt (De Smedt *et al.* 1996).

Betrachtet man DC von A.BY/SnJ, so blieb ein Anstieg der Expression von CD86, CD80 oder CD40 aus bzw. zeigte sich deutlich später als bei DC von C57BL/6. So kam es nach 72 h nur zu einer leichten Zunahme von CD80 oder CD40. Die Maximalexpression war allerdings zu jedem Zeitpunkt deutlich geringer als bei C57BL/6 nach 36 h. Auch die CCR7-Expression erfuhr keinen mit C57BL/6 vergleichbaren Anstieg (vgl. Abb. 8). Zur Klärung der Frage, ob die Unfähigkeit, diese Marker zu regulieren ein generelles Problem des permissiven Stammes oder spezifisch für die CVB3-Infektion ist, wurde den Tieren LPS injiziert. Dabei zeigte sich in beiden Stämmen eine deutliche Expressionszunahme der Maturierungsmarker sowie von MHC-I nach 24 h (vgl. Abb. 13). Somit scheint es sich um einen virusspezifischen Mechanismus zu handeln: an einer oder mehreren Stellen der Kaskade zwischen Viruskontakt, Signaltransduktion, Transkription, Translation und Exozytose muss bei A.BY/SnJ eine Abweichung der regulären Vorgänge existieren. Indes sind DC von resistenten C57BL/6 Tieren in der Lage, die charakteristischen Stadien der Maturierung zu durchlaufen. Die Expression von CD80, CD86 und CD40 ist für die Induktion der T-Zellaktivität absolut notwendig (CD80 und CD86 im Zusammenhang mit der Aktivierung von antiviralen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die Interaktion von CD40 mit CD40L auf Seiten einer aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zelle induziert die Expression von CD80 und CD86 auf DC (Banchereau und Steinman 1998, Banchereau *et al.* 2000, Behrens *et al.* 2004)). Damit muss davon ausgegangen werden, dass die T-Zellaktivierung bei A.BY/SnJ nur rudimentär oder gar nicht abläuft.

Interessanterweise zeigten A.BY/SnJ DC die gleiche Reduktion ihrer Zahl in der Milz wie C57BL/6 (s.o.) nach 36, bzw. 72 h p.i. Somit scheint es sich dabei nicht um eine Folge der Maturierung im klassischen Sinne zu handeln. Möglich wäre aber evtl. die Interaktion mit T-Zellen, die zwar aufgrund der fehlenden kostimulatorischen Moleküle nicht zu deren Aktivierung führt, zumindest aber eine Reduktion der DC durch Zell-Zell-Kontakte hervorruft oder vortäuscht.

Um zu untersuchen, ob die Ursache für die mangelnde Aktivierung der DC von A.BY/SnJ-Tieren bereits durch eine verminderte Infektion der Zellen bedingt wird, erfolgte der Nachweis der CVB3-RNA per RTQ-PCR in RNA-Lysaten. Dabei zeigte sich, dass in DC von A.BY/SnJ-Tieren sogar vielfach größere Mengen viraler RNA vorhanden waren als in DC von C57BL/6

(vgl. Abb. 9b), was bedeutet, dass das Virus in die Zellen beider Stämme eintreten und dort auch replizieren kann. Das wurde bereits auch von Weinzierl *et al.* mithilfe von CVB3 *In-situ*-Hybridisierung und Elektronenmikroskopie gezeigt (Weinzierl *et al.* 2008). Zusätzlich wurde die Expression des vom Virus genutzten Rezeptors CAR im Western Blot untersucht. Abb. 17 zeigt deutlich, dass im Gegensatz zur Positivkontrolle (Herzgewebe) die DC beider Stämme CAR nicht in relevanter Menge exprimieren. Weinzierl *et al.* zeigten, dass das Virus CAR-unabhängig mittels Mikropinozytose oder Phagozytose von Viruspartikeln oder infizierten Zellen in die DC aufgenommen wird und dort zu replizieren beginnt (Weinzierl *et al.* 2008). Obwohl das Virusgenom in DC von A.BY/SnJ Tieren in großer Menge vorhanden ist, scheint es von den DC dieser Tiere nicht als Pathogen erkannt zu werden.

Auch bei C57BL/6 scheint die alleinige Anwesenheit des Virus nicht ausreichend zur Induktion der Aktivierung und Maturierung zu sein, wie die fehlende Aktivierung von BMDC im Zellkulturmodell zeigte: Die *in vitro* Infektion von BMDC mit CVB3 zeigte keine Effekte auf den Reifungszustand der DC. Auch in höchsten Titerstufen (MOI 100) erfolgte keine Induktion der Maturierungsmarker (in Abb. 17 stellvertretend durch CD86 dargestellt), obgleich per RTQ-PCR auch in *in vitro* infizierten splenozytäre DC ausreichend große Mengen an viralem Genom nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 17c, Daten für BMDC nicht gezeigt). Anders als bei der *in vivo* Infektion wurden hier in beiden Stämmen vergleichbare Mengen viraler RNA gefunden.

Diskrepante Befunde zwischen der *in vitro* und *in vivo* Infektion wurden bereits für andere Infektionsmodelle gezeigt: Wurden humane DC *in vitro* mit Influenzaviren infiziert, erzeugte dies nur eine geringe Expressionssteigerung der Maturierungsmarker und eine schwache T-Zellaktivierung. *In vivo* hingegen wurden CD80 oder CD86 stark induziert (Garcia-Sastre *et al.* 1998, Fernandez-Sesma *et al.* 2006). Die unterschiedliche DC-Aktivierung bei Infektion mit demselben Virus wurde u.a. auf die Typ-I IFN-Antwort *in vivo* zurückgeführt (Phipps-Yonas *et al.* 2008). Auch im Fall der CVB3-Infektion ist dies vermutlich durch ein verändertes Zytokinmilieu begründbar, z.B. durch die starke Typ-I IFN-Antwort bei C57BL/6 Mäusen, die in A.BY/SnJ vermindert und verzögert zu finden ist (Weinzierl *et al.* 2008, Jäkel *et al.* 2009). Weiterhin zeigten Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit, dass die differentielle Zytokinregulation auch im Gesamtmilzlysate zu frühen Zeitpunkten wie 36 h p.i. zu finden ist (vgl. Abb. 11). Damit befinden sich DC von resistenten C57BL/6 Zellen in einem aktivierenden Zytokinmilieu, während es bei DC von A.BY/SnJ kaum Veränderungen in diesem Sinne gibt. Als möglicher Effekt der signifikanten Induktion von IL-6, TNF- $\alpha$  oder auch IFN- $\beta$  in der Milz, also dem Umgebungsmilieu der DC von C57BL/6-Mäusen ist die Induktion des

Transkriptionsfaktors IRF-1 in DC dieses Stammes zu beobachten (vgl. Abb. 12). IRF-1 ist an der Induktion von Zytokinen, IFN als auch kostimulatorischen Molekülen in DC beteiligt (Gabriele und Ozato 2007). Tatsächlich wird IRF-1 nur *in vivo*, nicht aber in der *In-vitro*-Situation, in der die entsprechenden Zytokinstimuli aus der Umgebung unterbleiben, reguliert (Abb. 18). Dies unterstreicht die Notwendigkeit eines aktivierenden Zytokinmilieus für eine suffiziente DC-Aktivierung durch CVB3.

Bedeutend für die DC-Aktivierung ist die Induktion von IRF-1 vor dem Hintergrund, dass er als Transkriptionsfaktor der viralen RNA-Helikase RIG-1 wirkt (Su *et al.* 2007). RIG-1 dient wie das durch IFN- $\beta$  induzierbare verwandte Molekül Mda-5 als Rezeptor für virale dsRNA. Nach Bindung der viralen RNA kommt es über intrazelluläre Signalkaskaden zur Aktivierung und Maturierung der DC (Morawetz *et al.* 1998, Gabriele und Ozato 2007, Wang *et al.* 2010). Tatsächlich wiesen DC von C57BL/6 während der *in vivo* Infektion eine signifikante Induktion der Rezeptoren RIG-1 und Mda-5 36 h p.i. auf, während sie bei A.BY/SnJ ausblieb (vgl. Abb. 12). Somit ist denkbar, dass es nur in DC von C57BL/6 durch das aktivierende Zytokinmilieu der *in vivo* Infektion es zu einer Erkennung der CVB3-RNA als Pathogen mit folgender Maturierung und Aktivierung kommt. DC von A.BY/SnJ Tieren erkennen trotz großer Mengen intrazellulärer viraler RNA CVB3 (vgl. Abb. 8b) nicht als Pathogen und reagieren in der Folge nicht mit einer Aktivierung ihrer DC.

Das Phänomen der fehlenden Maturierung, wie es bei DC von A.BY/SnJ zu beobachten war, wurde bereits im Zusammenhang mit anderen persistierenden Virusinfektionen gezeigt. So führt die *in vitro* Infektion von DC mit HIV nicht zur Maturierung von monozytären oder plasmazytären DC. Weiterhin zeigten diese HIV exponierten DC eine verminderte Fähigkeit zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (Granelli-Piperno *et al.* 2004). Bei Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion wiesen infizierte DC eine geringere T-Zellstimulationskapazität auf. Bei einem Teil der Patienten war ebenfalls eine verminderte Expression an kostimulatorischen Molekülen auf deren DC nachzuweisen (Zimmermann *et al.* 2008). Besonders deutlich wird die Rolle der kostimulatorischen Moleküle in einem Modell der LCMV Infektion: Mäuse, die mit einem „regulären“ LCMV Stamm infiziert wurden, zeigten auf ihren DC eine Zunahme von CD80, CD86 und CD40 und eine adäquate T-Zell-Stimulation. Wurde im Gegensatz dazu ein modifizierter Virusstamm verwendet, der zwar ebenfalls pathogen war, allerdings keine Maturierung der DC hervorrief, so entwickelten die entsprechenden Tiere eine persistierende Infektion mit reduzierter T-Zellaktivität (Sevilla *et al.* 2004).

Anhand dieser Beispiele wird deutlich, welche Bedeutung der fehlenden Maturierung der DC bei A.BY/SnJ im Hinblick auf die Entwicklung der Viruspersistenz beizumessen ist.

#### 4.1.2 Zytokininduktion durch *in vivo* CVB3 Infektion

Durch die Sekretion von Zytokinen entstehen verschiedene Subtypen von Effektor-T-Zellen, dieser Vorgang ist besonders entscheidend für die Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen sowie von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2- und T<sub>H</sub>17-Zellen (Kapsenberg 2003). Zytokine beeinflussen auch die Rekrutierung und Aktivierung anderer Zellen über autokrine und parakrine Mechanismen.

Bei der Analyse des Zytokinmilieus per RTQ-PCR im Verlauf der CVB3 Infektion konnte gezeigt werden, dass in DC von C57BL/6 die mRNA der Lymphozyten stimulierenden Proteine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12p40 nach 36 h deutlich induziert wurde. Diese Zytokine wirken im Allgemeinen stimulierend auf die Immunantwort: TNF- $\alpha$  fördert die Migration von neutrophilen Granulozyten sowie die Phagozytose in Makrophagen, außerdem hemmt es über verschiedene Mechanismen die virale Replikation (Bartee *et al.* 2008). IL-6, ebenfalls ein Akute-Phase-Protein, nimmt eine wichtige Stellung in der Regulierung der Immunantwort ein: neben der Lymphozytenstimulierung ist es auch über eine TNF- $\alpha$  Hemmung oder eine IL-10 Aktivierung in der Lage, die Immunantwort in bestimmten Situationen zu regulieren (van der Poll *et al.* 1997, Jones 2005). IL-12p40 trägt zur Initiierung der T-Zellantwort sowie zur Migration dendritischer Zellen bei (Khader *et al.* 2006).

Weiterhin war die Expression der Chemokine IP-10 und MCP-1 zu diesem Zeitpunkt bei C57BL/6 deutlich gesteigert. Beide wirken auf verschiedene Immunzellen chemotaktisch (IP-10 v.a. auf NK- und T-Zellen, MCP-1 vorrangig auf Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten). Desweiteren weisen sie Einfluss auf die Zytokinsekretion anderer Zelltypen im Sinne einer immunmodulatorischen Wirkung auf (Adams und Lloyd 1997, Luther und Cyster 2001, Izikson *et al.* 2002). DC von A.BY/SnJ wiesen keine bzw. nur eine geringe Induktion jener Gene auf, in allen Fällen sind die Unterschiede zu C57BL/6 signifikant (vgl. Abb. 9). Lediglich IL-10, das die T-Zellantwort durch Hemmung der IL-2-, TNF- $\alpha$ - und IL-5-Ausschüttung supprimiert, wurde in beiden Stämmen in einem ähnlichen Umfang induziert. In Gegenwart von IL-10 fällt die Induktion von MHC-Molekülen oder kostimulatorischen Signalen schwächer aus, was auf indirektem Wege die T-Zellantwort hemmt (Levings *et al.* 2002). Die HIV-Infektion dendritischer Zellen führt nicht nur zu einer unzureichenden Maturierung, in Kokulturen infizierter DC mit T-Zellen wurden auch erhöhte Spiegel an IL-10 nachgewiesen (Granelli-Piperno *et al.* 2004). Zwar zeigten im CVB3 Modell auch DC resistenter C57BL/6 Tiere eine ähnliche IL-10-Induktion wie A.BY/SnJ, dies aber vor dem Hintergrund zahlreicher, die T-Zellaktivierung stimulierender Zytokine.

Weiterhin wurde die Expression von IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$  per Realtime-PCR untersucht. Hier zeigte sich erneut eine deutliche Induktion der Zytokine 36 h p.i. bei C57BL/6, hingegen keine oder eine deutlich geringere Expressionszunahme bei A.BY/SnJ. Interferone induzieren über einen JAK/STAT-Signalweg ein breites Spektrum an Genen, viele davon mit antiviraler Wirkung: Es kommt u.a. zur Hemmung der viralen Proteinsynthese oder zum gesteigerten Abbau viralen Genoms. Viele Gene der Antigenpräsentationsmaschinerie werden durch IFN vermehrt induziert, wie z.B. MHC-Klasse I und II Moleküle, PA28 oder TAP (Sijts *et al.* 2002, Giroux *et al.* 2003).

#### 4.1.3 Maturierung und Aktivierung von DC via LPS

Wurde die Maturierung der DC mit LPS induziert, so zeigte sich sowohl für die *in vitro*-Stimulation von BMDC (100 ng/ml LPS für 12 h bzw. 24 h oder 50  $\mu$ g/ml p(I:C) für 24 h) als auch nach *in vivo* LPS-Injektion (1 mg/kg KG 24 h i.p.) eine in beiden Stämmen vergleichbare Induktion der Maturierungsmarker CD80, CD86 und CD40. Auch der Migrationsmarker CCR7 wurde in DC beider Stämme deutlich induziert (vgl. Abb. 13). Ebenfalls in beiden Stämmen in vergleichbarem Maße erfolgte die Induktion der Zytokine IL-6, IL-12p40 und TNF- $\alpha$  nach Stimulation der BMDC mit LPS bzw. p(I:C) (vgl. Abb. 15).

Auch der Transkriptionsfaktor IRF-1 sowie die RNA-Helikasen RIG-1 und Mda-5, die während der *in vivo* CVB3-Infektion nur in DC von C57BL/6 hoch reguliert werden, sind in beiden Stämmen durch die *in vitro* LPS-Stimulation induzierbar (vgl. Abb. 16).

Somit scheinen die generellen Mechanismen der Aktivierung und Maturierung in DC der permissiven A.BY/SnJ-Mäusen zu funktionieren, die fehlenden phänotypischen Veränderungen während der *in vivo* Infektion scheinen spezifisch für die CVB3-Infektion und nicht einem generellen Defekt in der Aktivierungskaskade geschuldet zu sein.

#### 4.1.4 Bedeutung der fehlenden Maturierung/Aktivierung von A.BY/SnJ DC

Die Defizite in der DC Maturierung und Aktivierung in permissiven A.BY/SnJ DC stellen eine nachgeschaltete suffiziente T-Zellaktivierung in Frage. Weinzierl *et al.* wiesen eine verminderte Anzahl von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz d 8 p.i. bei A.BY/SnJ im Vergleich mit C57BL/6 nach, allerdings trafen sie keine Aussage über den Aktivierungszustand dieser Zellen (Weinzierl *et al.* 2008). Darüber hinaus wurde diesem Kontext für die Generierung MHC-I restringierter CVB3-Epitope gezeigt, dass Immunoproteasomen von A.BY/SnJ zwei bestimmte Epitope erst an Tag 8 p.i. in maximaler Menge prozessieren, während dies bei C57BL/6 bereits an Tag 4 geschieht (Jäkel *et al.* 2009, Voigt *et al.* 2010). Mögliche Konsequenz einer verminderten Aktivierung

CVB3-spezifischer T-Zellen wäre eine schwächere Eindämmung der Virusinfektion bei A.BY/SnJ in der frühen Phase der CVB3-Infektion. Dafür spricht die stärkere Inflammation und höhere Viruslast dieser Tiere in der akuten Phase der Myokarditis (Weinzierl *et al.* 2008, Jäkel *et al.* 2009).

Durch die ausgeprägte Zerstörung myokardialer Zellen ist eine gesteigerte Präsentation kardialer, körpereigener Antigene mit der gesteigerten Wahrscheinlichkeit einer Autoimmunreaktion bei A.BY/SnJ denkbar. Tatsächlich wurden bei permissiven Mausstämmen infolge der CVB3-Infektion gehäuft Autoantikörper gegen Myosin oder Aktin gefunden, die die Myokarditis über die akute Phase hinaus unterhalten (Rabausch-Starz *et al.* 1994, Takata *et al.* 2004). Auch im humanen System konnten bei Patienten mit chronischer Virusmyokarditis oder DCM-Patienten vermehrt Autoantikörper gegen Laminin, den  $\beta$ 1-Rezeptor, die schwere Kette des kardialen Myosins oder den mitochondrialen ATP/ADP-Translokator nachgewiesen werden (de Scheerder *et al.* 1989, Wolff *et al.* 1989, De Scheerder *et al.* 1991, Caforio *et al.* 1997). Die defizitäre DC-Maturierung und Aktivierung im Modell der chronischen Myokarditis liefert eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen.

## 4.2 Antigenpräsentation

### 4.2.1 DC der permissiven A.BY/SnJ-Mäusen zeigen eine gestörte Kreuzpräsentation

Da anhand der Expression von Maturierungsmarkern oder Zytokin-mRNA keine Aussage über entscheidende Funktionalität der DC im Sinne der Antigenprozessierung bzw. -präsentation getroffen werden kann, wurden diese Fähigkeiten im Rahmen von Antigenpräsentationsassays untersucht. Dazu wurde die durch Ovalbuminepitope induzierte Aktivierung von T-Zellen, deren TCR für das entsprechende Ovalbuminepitop transgen ist, gemessen.

Untersucht man die Proliferation und Aktivierung der  $CD4^+$ -T-Zellen, so erkennt man nach Kokultivierung mit DC beider Stämme eine vergleichbare Proliferationsrate, sowohl nach externer Peptidbeladung als auch nach Inkubation der DC mit dem intakten Ovalbumin (vgl. Abb. 21 bzw. Abb. 22). DC beider Stämme induzierten nach externer Peptidbeladung eine vergleichbare Proliferation der  $CD8^+$ -T-Zellen (vgl. Abb. 19).

Als entscheidende Funktion der DC wurde die Fähigkeit der Kreuzpräsentation analysiert. Dabei zeigte sich eine deutliche T-Zellproliferation nach Kokultivierung mit DC von C57BL/6, die zwischen infizierten und naiven DC vergleichbar war. Allerdings fiel die Proliferation in entsprechenden Kulturen mit DC von A.BY/SnJ deutlich schwächer aus. Dies spiegelte sich

auch in den Konzentrationen von IL-2 und IFN- $\gamma$  wider (vgl. Abb. 20). Dabei schienen infizierte DC die Proliferation sogar noch schlechter zu induzieren als naive. Anders bei C57BL/6: hier führte der Infektionsstatus, möglicherweise als Effekt der Maturierung zu einer stärkeren Induktion von IFN- $\gamma$  und IL-2.

Die unterschiedlichen Effekte auf die CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort, je nachdem, ob die DC mit dem intakten Protein oder dem bereits prozessierten Epitop beladen wurden, sind bereits im Zusammenhang mit HCV gezeigt worden: myeloide DC wurden mit RNA für das HCV-Core-Protein transfiziert und zeigten anschließend eine verminderte Fähigkeit, Ovalbumin zu prozessieren und so OT-I-Zellen zu aktivieren. Wurden die Zellen extern mit dem fertigen OVA-Epitop beladen, zeigte sich auch in transfizierten Zellen eine erhaltene T-Zellstimulationskapazität (O'Beirne *et al.* 2009). Diese Diskrepanz wurde durch eine Behinderung der Translation durch die Interaktion des Virusproteins mit dem ER erklärt.

Im Fall von CVB3 sind derartige Interaktionen theoretisch denkbar. Es ist bekannt, dass verschiedene Virusproteine mit der Wirtszelltranslation sowie dem intrazellulären Proteintransport interferieren. So führt z.B. 2A<sup>pro</sup> zum Stopp der Wirtszelltranslation durch die Zerstörung von eIF4G und poly(A)-BP (Joachims *et al.* 1999, Novoa und Carrasco 1999). Allerdings ist dies lediglich ein Erklärungsansatz für die etwas reduzierte Kapazität der infizierten DC im Vergleich mit naiven DC von A.BY/SnJ, nicht aber für die generell stark eingeschränkte Fähigkeit der Kreuzpräsentation in diesen Tieren. Darüber hinaus wurde die Kapazität der Kreuzpräsentation durch *in vivo* LPS-Stimulation weiter reduziert: Obwohl auch DC von A.BY/SnJ auf *in vivo* LPS-Stimulation mit einer Induktion der charakteristischen Maturierungsmarker reagierten (vgl. Abb. 13), wiesen Kokulturen mit DC aus Mäusen nach LPS-Injektion noch geringere Proliferationsraten der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auf als Kokulturen mit DC von naiven A.BY/SnJ Mäusen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt auf einen generellen Defekt in der Kreuzpräsentation in DC von permissiven A.BY/SnJ-Mäusen schließen.

Um potenzielle Gründe dafür zu finden, scheint eine systematische Suche erforderlich. Mit dem Wissen um den formalen Ablauf der Kreuzpräsentation sind Störungen folgender Teilprozesse denkbar:

- Aufnahme des Antigens in die Zelle
- intrazelluläre Degradierung des Antigens zu MHC-I Liganden
- Synthese des MHC-I-Komplexes
- Beladung des MHC-I-Komplexes mit dem Epitop
- Transport des MHC-Antigen-Komplexes an die Zelloberfläche

Die Aufnahme von Antigenen erfolgt bei dendritischen Zellen über verschiedene Mechanismen (vgl. Kap. 1.3.1). Gegen einen generellen Defekt auf dieser Ebene spricht die Möglichkeit der Präsentation eines OVA-Peptid nach Ovalbumininkubation via MHC-II (s.o.), die Aufnahme von CVB3-Viruspartikeln durch DC (Weinzierl *et al.* 2008) als auch die durch poly(I:C) induzierte Maturierung über intrazelluläre lokalisierte TLR3 (Kawai und Akira 2008).

Für Ovalbumin wurde die Aufnahme über Phagosomen und anschließende TAP- und proteasomabhängige, aber vom Lysosom unabhängige Degradierung gezeigt (Kovacsovic-Bankowski und Rock 1995, Norbury *et al.* 1997). Die Antigenpräsentation nach exogener Beladung durch das Peptid SIINFEKL lief unabhängig davon, da auch TAP defiziente BMDC fähig waren, nach Peptidbeladung eine T-Zellantwort zu initiieren (Norbury *et al.* 1997). Norbury *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass die Präsentation von SIINFEKL aus intaktem Ovalbumin durch BFA hemmbar, also abhängig von zytosolischen Transportmechanismen ist. Die CD8<sup>+</sup>-T-Zellaktivierung nach externer SIINFEKL-Beladung (vgl. Abb. 19) spricht für die prinzipielle Möglichkeit von A.BY/SnJ DC, MHC-I Moleküle mit SIINFEKL zu beladen und zu präsentieren. Diese Daten lassen demnach einen Defekt in der proteasomalen Degradierung sowie anschließenden intrazellulären Beladung des Peptids auf MHC-I-Moleküle am ER bei permissiven A.BY/SnJ-Mäusen vermuten.

#### 4.2.2 DALIS-Persistenz in DC von A.BY/SnJ

In der hier vorliegenden Arbeit wurden nach *in vivo* Infektion mit CVB3 in splenozytären DC DALIS mittels Immunfluoreszenz angefärbt (vgl. Abb. 27b). Dabei zeigte sich ein regelrechtes Auflaufen der DALIS bei C57BL/6 mit einem Maximum nach 24 h. Nach 48 h entsprach die Zahl der DALIS pro Zelle wieder dem Ausgangsniveau. Anders bei A.BY/SnJ: Hier erfolgte der Anstieg erst nach 48 h. Im Western Blot stellte sich ein Auflaufen der Konjugate in der NP40-unlöslichen Fraktion, das nach 48 h bei A.BY/SnJ deutlich stärker ausgeprägt war, dar (vgl. Abb. 24). Diese Beobachtung entspricht den Beschreibungen Lelouards, wonach DALIS der unlöslichen Proteinfraction der Zelle zuzuordnen sind (Lelouard *et al.* 2002). Wesentlich deutlicher zeigte sich dieses Phänomen bei der Induktion von DALIS in BMDC mit LPS, hier war mittels Immunfluoreszenz bei C57BL/6 nach 12 h ein Auftreten der Aggregate mit entsprechender Auflösung nach 48 h zu beobachten, während A.BY/SnJ BMDC eine Persistenz der DALIS auch nach 48 h zeigten (vgl. Abb. 28). Somit scheint es sich analog zur defizitären Kreuzpräsentation von A.BY/SnJ DC nicht um ein CVB3-spezifisches Problem, sondern vielmehr um einen generellen Defekt zu handeln. Postuliert man, dass DALIS DRiPs als eine Antigenquelle für MHC-I restringierte Epitope speichern, so würde eine Persistenz dieser



Aggregate eine effiziente T-Zell-Aktivierung in A.BY/SnJ durch eine verminderte Präsentation MHC-I restringierter Epitope verhindern oder zumindest verspäten. In der Tat zeigte sich für das CVB3 Protein VP1 eine Kolokalisation in den persistierenden DALIS von A.BY/SnJ (vgl. Abb. 29). Die persistierende Natur der DALIS in diesem Stamm limitiert damit die Quelle CVB3-spezifischer Epitope. Analog dazu wurde bereits die Kolokalisation des Influenzavirusproteins NP in DALIS und eine damit verbunden verzögerte Präsentation des entsprechenden Epitops gezeigt (Herter *et al.* 2005).

Neben der defizitären DC-Maturierung und Aktivierung in diesem Stamm sprechen diese Ergebnisse für ein eingeschränktes T-Zell-Priming in den permissiven A.BY/SnJ Mäusen.

Unabhängig von den inkorporierten Bestandteilen stellt sich die Frage, ob die Persistenz der DALIS in A.BY/SnJ DC eine Frage des verminderten Abbaus oder der gesteigerten Bildung ist. DALIS werden proteasomal degradiert. APC weisen bereits im unstimulierten Zustand einen hohen Anteil an Immunoproteasomen auf. LPS stimulierte BMDC beider Stämme zeigten weder auf mRNA noch auf Proteinebene Unterschiede in der Expression von LMP7 oder LMP2 (vgl. Abb. 15a). Die Proteasomaktivatoruntereinheiten PA28 $\alpha$  und  $\beta$  in BMDC zeigten eine deutliche (PA28 $\alpha$ ) bzw. mäßige (PA28 $\beta$ ) Induktion nach 24 h LPS-Behandlung. Bei A.BY/SnJ aber persistierten die DALIS trotz eines zu C57BL/6 vergleichbaren Expressionsniveaus beider PA28-Untereinheiten (vgl. Abb. 28). Die Maturierung der DC hatte in beiden Stämmen keinen Einfluss auf die proteasomale Aktivität, wie Native PAGE-Analysen mittels Substratoverlay zeigten (Daten nicht gezeigt). Eine verminderte Zellvitalität kann als Ursache für die DALIS Persistenz ausgeschlossen werden, da auch DC von C57BL/6 trotz suffizienten Abbaus der DALIS eine reduzierte Zellvitalität aufweisen (vgl. Abb. 28c). Der verstärkte Zelltod von LPS behandelten DC wurde bereits in anderen Arbeiten beobachtet und ist möglicherweise als natürliche Folge des Maturierungsprozesses zu sehen (Banchereau *et al.* 2000).

### **4.2.3 Analyse UPS relevanter Proteine als Targets der CVB3 induzierten DC-Maturierung**

#### **4.2.3.1 Bedeutung von UBE2L6 für die Kreuzpräsentation**

Für humane DC wurde die Expression des E2-Enzyms UBE2L6 als notwendig für die Kreuzfähigkeit beschrieben (Ebstein *et al.* 2009). Vor diesem Hintergrund scheint die von A.BY/SnJ gegenüber C57BL/6 verminderte Induktion von Bedeutung: schließlich ist die Kreuzpräsentation bei A.BY/SnJ deutlich eingeschränkt. Allerdings sind DC von naiven

C57BL/6 Tieren in der Lage, Ovalbumin kreuz zu präsentieren, obwohl sie zu diesem Zeitpunkt kaum bzw. gar kein UBE2L6 aufweisen (vgl. Abb. 24). Dies spricht für eine eingeschränkte Bedeutung von UBE2L6 bei der Kreuzpräsentation im murinen System. Es wäre jedoch auch denkbar, das DC von naiven C57BL/6 Tieren durch die Inkubation mit Ovalbumin UBE2L6 induzieren. Diese wäre dann von Bedeutung für die Kreuzpräsentation, wenn nur in DC von C57BL/6, nicht aber in DC von A.BY/SnJ UBE2L6 induziert würde, da auch naive, mit Ovalbumin inkubierte A.BY/SnJ DC sich unfähig zur Kreuzpräsentation darstellen. Die Eingrenzung der Bedeutung von UBE2L6 für die Fähigkeit der Kreuzpräsentation in beiden Stämmen wäre z.B. durch Ausschalten des Gens mittels siRNA zu untersuchen.

#### **4.2.3.2 Induktion von freiem ISG15 und ISG15-Konjugaten**

Die Expression von UBE2L6 ist nicht nur im Zusammenhang zur Kreuzpräsentation zu sehen, da es als E2-Enzym in der ISGylierungskaskade fungiert. Im Verlauf der CVB3-Infektion findet sich eine stärkere Bildung von ISG15-Konjugaten in C57BL/6 DC als in A.BY/SnJ DC (vgl. Abb. 24). Im Beispiel von Influenzaviren wurde gezeigt, dass der antivirale Effekt auf die Konjugation gewisser Proteine zurück zu führen ist. So zeigten UBE1L defiziente Mäuse, die zwar über freies ISG15 verfügen, nicht aber der ISGylierung fähig sind, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber der Influenzavirusinfektion (Lai *et al.* 2009). Vor dem Hintergrund der stärkeren ISGylierung bei C57BL/6 im CVB3-Modell scheint dies als potenziell protektiver Vorgang beachtenswert.

Das antiviral wirksame ISG15 entfaltet seine Wirkung nicht nur durch die Konjugation von Targetproteinen, sondern auch als freies ISG15. So interferiert ISG15 mit Ubiquitynylierung des HIV-Gag-Proteins und hemmt so die HIV-Replikation (Harty *et al.* 2009). Ubiquitynylierung als notwendiger Prozess wurde auch für die CVB3-Replikation (in diesem Fall die Ubiquitynylierung der Polymerase<sup>3D</sup>) beschrieben (Si *et al.* 2008). Allerdings kommt es trotz der differenziellen Expression von freiem ISG15 zu einer vergleichbaren CVB3-Replikation in beiden Stämmen. Vor dem Hintergrund des gegenüber A.BY/SnJ vermehrten freien ISG15 bei C57BL/6 wäre aber evtl. eine Interferenz von freiem ISG15 mit viralen Proteinen über eine Replikationshemmung hinaus denkbar (vgl. Abb. 24), in der Folge möglicherweise mit für die Maturierung der DC von C57BL/6 fördernden Effekten.

Im weiteren Verlauf müsste geklärt werden, welche Proteine in DC während der Virusinfektion ISGyliert werden. Dabei kommen neben allen bekannten Virusproteinen von CVB3 auch Wirtszellproteine in Frage. Interessant wäre auch, ob in beiden Stämmen jeweils dieselben Kandidatenproteine ISGyliert würden. In humanen DC wurde die ISGylierung und verstärkte

Expression von Genen der ISGylierungskaskade im Zuge der Maturierung beschrieben (Ebstein *et al.* 2009). Eventuell ist ISG15 an der komplexen Signalkaskade zwischen Stimulus und maturiertem Zustand einer DC beteiligt, womit die verminderte ISGylierung der A.BY/SnJ DC evtl. mit der abgeschwächten Aktivierung bzw. Maturierung in Zusammenhang zu bringen wäre.

### **4.3 Fazit**

Diese Arbeit untersucht erstmals detailliert die Rolle dendritischer Zellen in der Frühphase der CVB3-induzierten Myokarditis. Suszeptible A.BY/SnJ-Mäuse, die nach CVB3-Infektion den chronischen Verlauf der humanen Myokarditis bis zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz imitieren, zeigten dabei multiple Defizite in der Reifung, Aktivierung und Funktion ihrer dendritischen Zellen.

Die Ergebnisse zeigen deutliche Parallelen zu anderen persistierenden Virusinfektionen. Das Ausbleiben der Maturierung dendritischer Zellen nach dem Kontakt mit einem Pathogen wie es bei DC von A.BY/SnJ beobachtet wurde, assoziiert man teilweise mit der Induktion von anergen oder suppressiven T-Zellen (Jonuleit *et al.* 2001, Roncarolo *et al.* 2001). Zur Klärung der Frage, in wie weit dies im Fall von CVB3 die Chronifizierung der Myokarditis begünstigt, wäre eine Analyse der T-Zellantwort im Sinne von CVB3-spezifischen T-Zellen nötig.

Die Ergebnisse dieser Dissertation liefern einen Beitrag zur Klärung der für die Entwicklung der chronischen Virusmyokarditis prädisponierenden Faktoren im Sinne eines Defekts bei der Initiierung der frühen adaptiven Immunantwort. Dadurch ist es eventuell möglich, die Pathogenese dieser Erkrankung besser zu verstehen und so neue therapeutische Ansätze zu gewinnen. Weiterhin wäre eine Identifizierung derjenigen Patienten, die nach dem akuten Stadium eine chronische Myokarditis entwickeln, möglich, wenn sich derartige Defekte auch im humanen System fänden. Dies könnte helfen, solche prädisponierte Patienten als Kandidaten für eine intensive immunmodulatorische Therapie und eine engmaschige Nachsorge zu identifizieren. Auch die gerichtete Immuntherapie wäre denkbar.

## 5. Zusammenfassung

CVB3 gilt als ein Hauptauslöser der akuten Virusmyokarditis. Die Krankheitsverläufe variieren von subklinischen Verläufen bis zur Entwicklung einer chronischen Myokarditis mit folgender Herzinsuffizienz. Die prädisponierenden Faktoren für Chronifizierung der Infektion sind weitgehend unbekannt. Experimentell wird zur Klärung dieser Frage ein Mausmodell genutzt, worin zwei immunkompetente Stämme die verschiedenen Krankheitsverläufe imitieren: nach der akuten Phase eliminieren resistente C57BL/6 Mäuse das Virus, während permissive A.BY/SnJ Tiere durch Viruspersistenz und chronische kardiale Inflammation auffallen. In dieser Arbeit wurde die Funktion der dendritischen Zellen, potenter Initiatoren der adaptiven Immunantwort, in der frühen Phase der *in vivo* CVB3-Infektion zwischen beiden Stämmen verglichen.

Dabei zeigte sich auf DC von C57BL/6 eine regelhafte Expressionssteigerung der Maturierungsmarker CD80, CD86 und CD40 nach 36 h p.i. Die DC von A.BY/SnJ hingegen wiesen fast keine Expressionszunahme auf. Auch CCR7, ein wichtiger Migrationsmarker, konnte im Gegensatz zu C57BL/6 nicht induziert werden. Weiterhin war die defizitäre DC-Maturierung bei A.BY/SnJ anders als bei C57BL/6 nur von einer schwachen Induktion proinflammatorischer Zytokine begleitet. In DC von C57BL/6, nicht jedoch von A.BY/SnJ, wurde der Maturierungsvorgang durch eine verstärkte ISGylierung und einer simultanen Induktion des E2-Enzyms UBE2L6 begleitet. Tatsächlich zeigten sich A.BY/SnJ DC als weitgehend unfähig, durch Kreuzpräsentation von exogen zugeführtem Ovalbumin CD8<sup>+</sup>-T-Zellen transgener OT-I-Mäuse zu aktivieren, während dies den C57BL/6 DC gut möglich war.

Weiterhin wurde das Auftreten von Aggregaten polyubiquitinylierter Proteine, sog. DALIS (dendritic cell aggresome-like structures), untersucht. DALIS stellen in DC und Makrophagen einen während der Reifungen auftretenden Speicher von poly-ubiquitinylierten DRiPs (defective ribosomal products) und damit eine potentielle Quelle für MHC-I restringierte Antigene dar. Während C57BL/6 diese Strukturen nach 48 h p.i. weitgehend eliminiert hatten, persistierten die DALIS bei A.BY/SnJ. Die Identifizierung des Virusproteins VP1 als Bestandteil der persistierenden DALIS in A.BY/SnJ DC suggeriert eine limitierte Antigenquelle für die virusspezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort.

Zusammenfassend stellen sich in permissiven A.BY/SnJ Mäusen, die im Verlauf eine chronische CVB3-Infektion zeigen, bereits bei der Initiierung der adaptiven Immunantwort diverse Defizite im Sinne einer DC-Dysfunktion dar. Ähnliche Defekte in Maturierung und Aktivierung finden sich analog bei anderen persistierenden Virusinfektionen, so dass hier der Zusammenhang zwischen fehlerhafter DC-Funktion und scheiternder CVB3-Clearance nahe liegt.

## 6. Abstract

Murine models of CVB3-induced myocarditis mimic divergent courses of human disease with host-specific outcomes ranging from complete recovery in resistant mice (C57BL/6) to chronic disease and dilated cardiomyopathy in the susceptible host (A.BY/SnJ). Dendritic cells are crucial in the initiation of the immune response. Upon exposure to antigens, several phenotypical changes are induced that eventually support T-cell activation. In particular the processing and presentation of MHC-I ligands to CD8<sup>+</sup>-T cells is largely dependent on the ubiquitin-proteasome system (UPS). The aim of this study was to elucidate the function of dendritic cells and especially the remodeling of the UPS in the early stage of infection as a potential contributing factor to the different outcomes in CVB3 myocarditis.

In DC from C57BL/6 mice maturation and activation occurred in a well-coordinated manner, which was demonstrated by an increased expression of co-stimulatory molecules and the migration marker CCR7 as well as by an induction of numerous cytokines peaking at 36 h p.i with CVB3. In striking contrast, DC maturation / activation in A.BY/SnJ mice was tremendously impaired in *in vivo* CVB3 infection. Additionally, the ability to cross-present exogenous antigens was found to be severely restrained in this host, which was reflected by the inability to induce the activation and proliferation of antigen-specific cytotoxic T cells.

Investigation of proteotoxic stress in CVB3 infection revealed accumulation of polyubiquitinated proteins, which are referred to DALIS (dendritic cell aggresome-like inducible structures) in DC, in both C57BL/6 and A.BY/SnJ mice. DALIS are known as storage of DRiPs (defective ribosomal products) and therefore being discussed to function as a reservoir for MHC class I antigens before processing and presentation. Whereas C57BL/6 mice degraded these DALIS within the maturation process, these aggregates persisted in DC from A.BY/SnJ, thus potentially restricting the source of MHC-I ligands. Moreover, the CVB3 protein VP1 was trapped in persistent DALIS in A.BY/SnJ DC, indicating a limiting factor for CVB3 specific antigen supply.

In conclusion, the here shown results revealed tremendous defects in dendritic cell function in A.BY/SnJ mice in CVB3 infection. Since DC maturation defects were observed in other persisting viral infections like HCV or HIV, restriction of appropriate DC maturation and antigen processing in A.BY/SnJ may be involved in the development of viral persistence and chronic myocarditis in susceptible hosts.



## 7. Literaturverzeichnis

- Adams, D. H. and A. R. Lloyd (1997). "Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines." Lancet **349**(9050): 490-5.
- Ardavin, C. (2003). "Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells." Nat Rev Immunol **3**(7): 582-90.
- Aretz, H. T. (1987). "Myocarditis: the Dallas criteria." Hum Pathol **18**(6): 619-24.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, *et al.* (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Bartee, E., M. R. Mohamed and G. McFadden (2008). "Tumor necrosis factor and interferon: cytokines in harmony." Curr Opin Microbiol **11**(4): 378-83.
- Behrens, G., M. Li, C. M. Smith, *et al.* (2004). "Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity." Immunol Cell Biol **82**(1): 84-90.
- Benaroudj, N., P. Zwickl, E. Seemuller, W. Baumeister and A. L. Goldberg (2003). "ATP hydrolysis by the proteasome regulatory complex PAN serves multiple functions in protein degradation." Mol Cell **11**(1): 69-78.
- Bielecka-Dabrowa, A., M. Wierzbicka, M. Dabrowa and A. Goch (2008). "New methods in laboratory diagnostics of dilated cardiomyopathy." Cardiol J **15**(4): 388-95.
- Caforio, A. L., B. Bauce, G. M. Boffa, *et al.* (1997). "Autoimmunity in myocarditis and dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibody frequency and clinical correlates in a patient series from Italy." G Ital Cardiol **27**(2): 106-12.
- Castellano, G., F. Affuso, P. Di Conza and S. Fazio (2008). "Myocarditis and dilated cardiomyopathy: possible connections and treatments." J Cardiovasc Med (Hagerstown) **9**(7): 666-71.
- Castellino, F. and R. N. Germain (1995). "Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments." Immunity **2**(1): 73-88.
- Caux, C., S. Ait-Yahia, K. Chemin, *et al.* (2000). "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines." Springer Semin Immunopathol **22**(4): 345-69.
- Cella, M., F. Sallusto and A. Lanzavecchia (1997). "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." Curr Opin Immunol **9**(1): 10-6.
- Cerovic, V., V. McDonald, M. A. Nassar, S. M. Paulin, G. G. Macpherson and S. W. Milling (2009). "New insights into the roles of dendritic cells in intestinal immunity and tolerance." Int Rev Cell Mol Biol **272**: 33-105.
- Chen, Z. J. and L. J. Sun (2009). "Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling." Mol Cell **33**(3): 275-86.
- Chow, L. H., C. J. Gauntt and B. M. McManus (1991). "Differential effects of myocarditic variants of Coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage." Lab Invest **64**(1): 55-64.

- Colonna, M., G. Trinchieri and Y. J. Liu (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-26.
- Coyne, C. B. and J. M. Bergelson (2006). "Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions." Cell **124**(1): 119-31.
- D'Amico, A. and L. Wu (2003). "The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3." J Exp Med **198**(2): 293-303.
- Dalod, M., T. Hamilton, R. Salomon, *et al.* (2003). "Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta." J Exp Med **197**(7): 885-98.
- De Scheerder, I. K., M. De Buyzere, J. Delanghe, A. Maas, D. L. Clement and R. Wieme (1991). "Humoral immune response against contractile proteins (actin and myosin) during cardiovascular disease." Eur Heart J **12 Suppl D**: 88-94.
- de Scheerder, I. K., M. L. de Buyzere, J. R. Delanghe, D. L. Clement and R. J. Wieme (1989). "Anti-myosin humoral immune response following cardiac injury." Autoimmunity **4**(1-2): 51-8.
- De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, *et al.* (1996). "Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo." J Exp Med **184**(4): 1413-24.
- Dorner, A., K. Schulze, U. Rauch and H. P. Schultheiss (1997). "Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: pathophysiological alterations in expression and function." Mol Cell Biochem **174**(1-2): 261-9.
- Dubiel, W., G. Pratt, K. Ferrell and M. Rechsteiner (1992). "Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease." J Biol Chem **267**(31): 22369-77.
- Dunn, J. J., N. M. Chapman, S. Tracy and J. R. Romero (2000). "Genomic determinants of cardiovirulence in coxsackievirus B3 clinical isolates: localization to the 5' nontranslated region." J Virol **74**(10): 4787-94.
- Ebstein, F., N. Lange, S. Urban, U. Seifert, E. Kruger and P. M. Kloetzel (2009). "Maturation of human dendritic cells is accompanied by functional remodelling of the ubiquitin-proteasome system." Int J Biochem Cell Biol **41**(5): 1205-15.
- Esfandiarei, M. and B. M. McManus (2008). "Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis." Annu Rev Pathol **3**: 127-55.
- Felker, G. M., W. Hu, J. M. Hare, R. H. Hruban, K. L. Baughman and E. K. Kasper (1999). "The spectrum of dilated cardiomyopathy. The Johns Hopkins experience with 1,278 patients." Medicine (Baltimore) **78**(4): 270-83.
- Fernandez-Sesma, A., S. Marukian, B. J. Ebersole, *et al.* (2006). "Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein." J Virol **80**(13): 6295-304.
- Ferrell, K., C. R. Wilkinson, W. Dubiel and C. Gordon (2000). "Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem." Trends Biochem Sci **25**(2): 83-8.
- Gabriele, L. and K. Ozato (2007). "The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function." Cytokine Growth Factor Rev **18**(5-6): 503-10.



- Garcia-Sastre, A., A. Egorov, D. Matassov, *et al.* (1998). "Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems." *Virology* **252**(2): 324-30.
- Gauntt, C. J., S. M. Tracy, N. Chapman, *et al.* (1995). "Coxsackievirus-induced chronic myocarditis in murine models." *Eur Heart J* **16 Suppl O**: 56-8.
- Gilliet, M., W. Cao and Y. J. Liu (2008). "Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases." *Nat Rev Immunol* **8**(8): 594-606.
- Giroux, M., M. Schmidt and A. Descoteaux (2003). "IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C-alpha." *J Immunol* **171**(8): 4187-94.
- Gitlin, L., W. Barchet, S. Gilfillan, *et al.* (2006). "Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22): 8459-64.
- Granelli-Piperno, A., A. Golebiowska, C. Trumpfheller, F. P. Siegal and R. M. Steinman (2004). "HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20): 7669-74.
- Groettrup, M., T. Ruppert, L. Kuehn, *et al.* (1995). "The interferon-gamma-inducible 11 S regulator (PA28) and the LMP2/LMP7 subunits govern the peptide production by the 20 S proteasome in vitro." *J Biol Chem* **270**(40): 23808-15.
- Groll, M., M. Bajorek, A. Kohler, *et al.* (2000). "A gated channel into the proteasome core particle." *Nat Struct Biol* **7**(11): 1062-7.
- Gupta, S., D. W. Markham, M. H. Drazner and P. P. Mammen (2008). "Fulminant myocarditis." *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **5**(11): 693-706.
- Harty, R. N., P. M. Pitha and A. Okumura (2009). "Antiviral Activity of Innate Immune Protein ISG15." *J Innate Immun* **1**(5): 397-404.
- Harvala, H., H. Kalimo, J. Bergelson, G. Stanway and T. Hyypia (2005). "Tissue tropism of recombinant coxsackieviruses in an adult mouse model." *J Gen Virol* **86**(Pt 7): 1897-907.
- Harvala, H., H. Kalimo, L. Dahllund, *et al.* (2002). "Mapping of tissue tropism determinants in coxsackievirus genomes." *J Gen Virol* **83**(Pt 7): 1697-706.
- Heim, A., S. Zeuke, S. Weiss, W. Ruschewski and I. M. Grumbach (2000). "Transient induction of cytokine production in human myocardial fibroblasts by coxsackievirus B3." *Circ Res* **86**(7): 753-9.
- Hendil, K. B., S. Khan and K. Tanaka (1998). "Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes." *Biochem J* **332** ( Pt 3): 749-54.
- Henke, A., S. Huber, A. Stelzner and J. L. Whitton (1995). "The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis." *J Virol* **69**(11): 6720-8.
- Henke, A., C. Mohr, H. Sprenger, *et al.* (1992). "Coxsackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 in human monocytes." *J Immunol* **148**(7): 2270-7.
- Herskowitz, A., S. Campbell, J. Deckers, *et al.* (1993). "Demographic features and prevalence of idiopathic myocarditis in patients undergoing endomyocardial biopsy." *Am J Cardiol* **71**(11): 982-6.

- Herter, S., P. Osterloh, N. Hilf, *et al.* (2005). "Dendritic cell aggresome-like-induced structure formation and delayed antigen presentation coincide in influenza virus-infected dendritic cells." J Immunol **175**(2): 891-8.
- Herzum, M., V. Ruppert, B. Kuytz, H. Jomaa, I. Nakamura and B. Maisch (1994). "Coxsackievirus B3 infection leads to cell death of cardiac myocytes." J Mol Cell Cardiol **26**(7): 907-13.
- Hjerpe, R. and M. S. Rodriguez (2008). "Efficient approaches for characterizing ubiquitinated proteins." Biochem Soc Trans **36**(Pt 5): 823-7.
- Huber, S. A. and M. W. Cunningham (1996). "Streptococcal M protein peptide with similarity to myosin induces CD4+ T cell-dependent myocarditis in MRL/++ mice and induces partial tolerance against coxsackieviral myocarditis." J Immunol **156**(9): 3528-34.
- Hunt, S. A., W. T. Abraham, M. H. Chin, *et al.* (2005). "ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society." Circulation **112**(12): e154-235.
- Izikson, L., R. S. Klein, A. D. Luster and H. L. Weiner (2002). "Targeting monocyte recruitment in CNS autoimmune disease." Clin Immunol **103**(2): 125-31.
- Jaehn, P. S., K. S. Zaenker, J. Schmitz and A. Dzionek (2008). "Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon." Eur J Immunol **38**(7): 1822-32.
- Jäkel, S., U. Kuckelkorn, G. Szalay, *et al.* (2009). "Differential interferon responses enhance viral epitope generation by myocardial immunoproteasomes in murine enterovirus myocarditis." Am J Pathol **175**(2): 510-8.
- Joachims, M., P. C. Van Breugel and R. E. Lloyd (1999). "Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro." J Virol **73**(1): 718-27.
- Jones, S. A. (2005). "Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6." J Immunol **175**(6): 3463-8.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, K. Steinbrink and A. H. Enk (2001). "Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells." Trends Immunol **22**(7): 394-400.
- Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." Nat Rev Immunol **3**(12): 984-93.
- Kawai, T. and S. Akira (2008). "Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling." Ann N Y Acad Sci **1143**: 1-20.
- Khader, S. A., S. Partida-Sanchez, G. Bell, *et al.* (2006). "Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection." J Exp Med **203**(7): 1805-15.
- Kim, K. S., G. Hufnagel, N. M. Chapman and S. Tracy (2001). "The group B coxsackieviruses and myocarditis." Rev Med Virol **11**(6): 355-68.

- Klingel, K., C. Hohenadl, A. Canu, *et al.* (1992). "Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 314-8.
- Klingel, K., M. Sauter, C. T. Bock, G. Szalay, J. J. Schnorr and R. Kandolf (2004). "Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy." Med Microbiol Immunol **193**(2-3): 101-7.
- Kloetzel, P. M. (2001). "Antigen processing by the proteasome." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 179-87.
- Kloetzel, P. M. (2004). "The proteasome and MHC class I antigen processing." Biochim Biophys Acta **1695**(1-3): 225-33.
- Kloetzel, P. M. and F. Ossendorp (2004). "Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation." Curr Opin Immunol **16**(1): 76-81.
- Kovacsovics-Bankowski, M. and K. L. Rock (1995). "A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules." Science **267**(5195): 243-6.
- Kuhl, U., M. Pauschinger, M. Noutsias, *et al.* (2005). "High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction." Circulation **111**(7): 887-93.
- Lai, C., J. J. Struckhoff, J. Schneider, *et al.* (2009). "Mice lacking the ISG15 E1 enzyme UbE1L demonstrate increased susceptibility to both mouse-adapted and non-mouse-adapted influenza B virus infection." J Virol **83**(2): 1147-51.
- Lanzavecchia, A. (1996). "Mechanisms of antigen uptake for presentation." Curr Opin Immunol **8**(3): 348-54.
- Lelouard, H., E. Gatti, F. Cappello, O. Gresser, V. Camosseto and P. Pierre (2002). "Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation." Nature **417**(6885): 177-82.
- Levings, M. K., R. Bacchetta, U. Schulz and M. G. Roncarolo (2002). "The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells." Int Arch Allergy Immunol **129**(4): 263-76.
- Lieberman, E. B., A. Herskowitz, N. R. Rose and K. L. Baughman (1993). "A clinicopathologic description of myocarditis." Clin Immunol Immunopathol **68**(2): 191-6.
- Liu, Y. C., J. Penninger and M. Karin (2005). "Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification." Nat Rev Immunol **5**(12): 941-52.
- Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." Annu Rev Immunol **23**: 275-306.
- Luther, S. A. and J. G. Cyster (2001). "Chemokines as regulators of T cell differentiation." Nat Immunol **2**(2): 102-7.
- Macagno, A., M. Gilliet, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, F. O. Nestle and M. Groettrup (1999). "Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation." Eur J Immunol **29**(12): 4037-42.
- Magnani, J. W. and G. W. Dec (2006). "Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment." Circulation **113**(6): 876-90.

- Maisch, B., I. Portig, A. Ristic, G. Hufnagel and S. Pankuweit (2000). "Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report." Herz **25**(3): 200-9.
- Manz, M. G., D. Traver, K. Akashi, *et al.* (2001). "Dendritic cell development from common myeloid progenitors." Ann N Y Acad Sci **938**: 167-73; discussion 173-4.
- McManus, B. M., L. H. Chow, J. E. Wilson, *et al.* (1993). "Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis." Clin Immunol Immunopathol **68**(2): 159-69.
- Morawetz, R. A., N. A. Giese, L. Gabriele, *et al.* (1998). "Relationship of cytokines and cytokine signaling to immunodeficiency disorders in the mouse." Braz J Med Biol Res **31**(1): 61-7.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Norbury, C. C., B. J. Chambers, A. R. Prescott, H. G. Ljunggren and C. Watts (1997). "Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells." Eur J Immunol **27**(1): 280-8.
- Novoa, I. and L. Carrasco (1999). "Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4G by exogenously added hybrid proteins containing poliovirus 2Apro in HeLa cells: effects on gene expression." Mol Cell Biol **19**(4): 2445-54.
- O'Beirne, J., J. Mitchell, F. Farzaneh and P. M. Harrison (2009). "Inhibition of major histocompatibility complex Class I antigen presentation by hepatitis C virus core protein in myeloid dendritic cells." Virology **389**(1-2): 1-7.
- Ossendorp, F., N. Fu, M. Camps, *et al.* (2005). "Differential expression regulation of the alpha and beta subunits of the PA28 proteasome activator in mature dendritic cells." J Immunol **174**(12): 7815-22.
- Pamer, E. and P. Cresswell (1998). "Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing." Annu Rev Immunol **16**: 323-58.
- Pathak, S. K., R. C. Kukreja and M. Hess (1996). "Molecular Pathology of Dilated Cardiomyopathies." Curr Probl Cardiol **21**(2): 99-144.
- Pauschinger, M., N. E. Bowles, F. J. Fuentes-Garcia, *et al.* (1999). "Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction." Circulation **99**(10): 1348-54.
- Phipps-Yonas, H., J. Seto, S. C. Sealfon, T. M. Moran and A. Fernandez-Sesma (2008). "Interferon-beta pretreatment of conventional and plasmacytoid human dendritic cells enhances their activation by influenza virus." PLoS Pathog **4**(10): e1000193.
- Rabausch-Starz, I., A. Schwaiger, K. Grunewald, H. K. Muller-Hermelink and N. Neu (1994). "Persistence of virus and viral genome in myocardium after coxsackievirus B3-induced murine myocarditis." Clin Exp Immunol **96**(1): 69-74.
- Rabin, E. R. and J. L. Melnick (1964). "Experimental Acute Myocarditis." Prog Cardiovasc Dis **7**: 65-72.
- Reis e Sousa, C. (2006). "Dendritic cells in a mature age." Nat Rev Immunol **6**(6): 476-83.

- Reis e Sousa, C. and R. N. Germain (1995). "Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis." J Exp Med **182**(3): 841-51.
- Richardson, P., W. McKenna, M. Bristow, *et al.* (1996). "Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies." Circulation **93**(5): 841-2.
- Robinson, S. P., S. Patterson, N. English, D. Davies, S. C. Knight and C. D. Reid (1999). "Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells." Eur J Immunol **29**(9): 2769-78.
- Roncarolo, M. G., M. K. Levings and C. Traversari (2001). "Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): F5-9.
- Schuurhuis, D. H., N. Fu, F. Ossendorp and C. J. Melief (2006). "Ins and outs of dendritic cells." Int Arch Allergy Immunol **140**(1): 53-72.
- Schwimmbeck, P. L., C. Badorff, H. P. Schultheiss and B. E. Strauer (1994). "Transfer of human myocarditis into severe combined immunodeficiency mice." Circ Res **75**(1): 156-64.
- Sean, P. and B. L. Semler (2008). "Coxsackievirus B RNA replication: lessons from poliovirus." Curr Top Microbiol Immunol **323**: 89-121.
- Selinka, H. C., A. Wolde, M. Sauter, R. Kandolf and K. Klingel (2004). "Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism." Med Microbiol Immunol **193**(2-3): 127-31.
- Sevilla, N., D. B. McGavern, C. Teng, S. Kunz and M. B. Oldstone (2004). "Viral targeting of hematopoietic progenitors and inhibition of DC maturation as a dual strategy for immune subversion." J Clin Invest **113**(5): 737-45.
- Shikhman, A. R., N. S. Greenspan and M. W. Cunningham (1993). "A subset of mouse monoclonal antibodies cross-reactive with cytoskeletal proteins and group A streptococcal M proteins recognizes N-acetyl-beta-D-glucosamine." J Immunol **151**(7): 3902-13.
- Si, X., G. Gao, J. Wong, Y. Wang, J. Zhang and H. Luo (2008). "Ubiquitination is required for effective replication of coxsackievirus B3." PLoS One **3**(7): e2585.
- Sijts, A., Y. Sun, K. Janek, *et al.* (2002). "The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing." Mol Immunol **39**(3-4): 165-9.
- Smith, D. M., G. Kafri, Y. Cheng, D. Ng, T. Walz and A. L. Goldberg (2005). "ATP binding to PAN or the 26S ATPases causes association with the 20S proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins." Mol Cell **20**(5): 687-98.
- Staub, O. (2004). "Ubiquitylation and isgylation: overlapping enzymatic cascades do the job." Sci STKE **2004**(245): pe43.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1974). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro." J Exp Med **139**(2): 380-97.
- Strehl, B., U. Seifert, E. Kruger, S. Heink, U. Kuckelkorn and P. M. Kloetzel (2005). "Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing." Immunol Rev **207**: 19-30.

- Su, Z. Z., D. Sarkar, L. Emdad, P. M. Barral and P. B. Fisher (2007). "Central role of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in controlling retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) expression." J Cell Physiol **213**(2): 502-10.
- Suss, G. and K. Shortman (1996). "A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis." J Exp Med **183**(4): 1789-96.
- Takata, S., H. Nakamura, S. Umemoto, *et al.* (2004). "Identification of autoantibodies with the corresponding antigen for repetitive coxsackievirus infection-induced cardiomyopathy." Circ J **68**(7): 677-82.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol **17**(1): 1-14.
- Takeuchi, T., S. Iwahara, Y. Saeki, H. Sasajima and H. Yokosawa (2005). "Link between the ubiquitin conjugation system and the ISG15 conjugation system: ISG15 conjugation to the UbcH6 ubiquitin E2 enzyme." J Biochem **138**(6): 711-9.
- Tam, P. E. (2006). "Coxsackievirus myocarditis: interplay between virus and host in the pathogenesis of heart disease." Viral Immunol **19**(2): 133-46.
- Tanaka, K. (2009). "The proteasome: overview of structure and functions." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **85**(1): 12-36.
- Vabulas, R. M. (2007). "Proteasome function and protein biosynthesis." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **10**(1): 24-31.
- van der Poll, T., C. V. Keogh, X. Guirao, W. A. Buurman, M. Kopf and S. F. Lowry (1997). "Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia." J Infect Dis **176**(2): 439-44.
- van Kuppeveld, F. J., J. G. Hoenderop, R. L. Smeets, *et al.* (1997). "Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release." EMBO J **16**(12): 3519-32.
- Villadangos, J. A. and L. Young (2008). "Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells." Immunity **29**(3): 352-61.
- Voigt, A., S. Jakel, K. Textoris-Taube, *et al.* (2010). "Generation of in silico predicted coxsackievirus B3-derived MHC class I epitopes by proteasomes." Amino Acids **39**(1): 243-55.
- Wang, J. P., A. Cerny, D. R. Asher, E. A. Kurt-Jones, R. T. Bronson and R. W. Finberg (2010). "MDA5 and MAVS mediate type I interferon responses to coxsackie B virus." J Virol **84**(1): 254-60.
- Weinzierl, A. O., G. Szalay, H. Wolburg, *et al.* (2008). "Effective chemokine secretion by dendritic cells and expansion of cross-presenting CD4-/CD8+ dendritic cells define a protective phenotype in the mouse model of coxsackievirus myocarditis." J Virol **82**(16): 8149-60.
- Wessely, R., K. Klingel, L. F. Santana, *et al.* (1998). "Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy." J Clin Invest **102**(7): 1444-53.
- Whitby, F. G., E. I. Masters, L. Kramer, *et al.* (2000). "Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators." Nature **408**(6808): 115-20.

- Williams, B. R. (1999). "PKR; a sentinel kinase for cellular stress." Oncogene **18**(45): 6112-20.
- Wolff, P. G., U. Kuhl and H. P. Schultheiss (1989). "Laminin distribution and autoantibodies to laminin in dilated cardiomyopathy and myocarditis." Am Heart J **117**(6): 1303-9.
- Woodruff, J. F. and J. J. Woodruff (1974). "Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackie virus B3 heart disease." J Immunol **113**(6): 1726-34.
- Wu, L., A. D'Amico, H. Hochrein, M. O'Keefe, K. Shortman and K. Lucas (2001). "Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors." Blood **98**(12): 3376-82.
- Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, *et al.* (2002). "Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling." J Immunol **169**(12): 6668-72.
- Zhao, C., S. L. Beaudenon, M. L. Kelley, *et al.* (2004). "The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7578-82.
- Zimmermann, M., C. Flechsig, N. La Monica, M. Tripodi, G. Adler and N. Dikopoulos (2008). "Hepatitis C virus core protein impairs in vitro priming of specific T cell responses by dendritic cells and hepatocytes." J Hepatol **48**(1): 51-60.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

---

Abb.	Abbildung
APC	antigen presenting cell
cDNA	complementary DANN
CPE	zytopathischer Effekt
FACS	fluorescence activated cell sorting
HeLa-Zellen	humane Epithelzelllinie eine Cervixkarzinoms, entnommen 1951 bei Henrietta Lacks
MACS	magnetic cell separation
tj	tight junctions
WB	Western Blot
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BMDC	bone marrowed derived dendritic cell
bp	Basenpaar
BB	Binding Buffer
CAR	Coxsackie- Adenovirus-Rezeptor
CARD	Caspase recruitment domain
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyluorescein succinimidyl ester
CLIP	class-II-associated invariant chain peptide
CTL	cytotoxic T-lymphocytes
CVB3	Coxsackievirus B3
DAF	decay-accelerating factor
DALIS	dendritic cell aggresome-like induced structures
DC	dendritic cell
DCM	dilated cardiomyopathy
DEPC	Diethylenepyrocarbonat
DNA	desoxy ribonucleic acid
dNTP	desoxy Nukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol

---



## Abkürzungsverzeichnis

---

DUB	deubiquitinating enzyme
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EMCV	Encephalomyocarditis virus
et al	et alii/aliae/alia
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC/SSC	forward scatter/ side scatter
fw/rev	forward/reverse
g/kg KG	Gramm pro Kilogramm Körpergewicht
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	horseradish peroxidase
IFN	Interferon
I $\kappa$ B	NF $\kappa$ B-Inhibitor
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
ISFC	International Society and Federation of Cardiology Task Force
ISG	interferon inducible gene
kDa	Kilodalton
LMP	low molecular weight protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAP-Kinase	mitogen-activated protein-kinase
Mda	melanoma differentiation-associated gene
MECL-1	multicatalytic endopeptidase complex
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIIC	MHC II-enriched compartment
MFI	mean fluorescence intensity
MMLV	moloney murine leukemia virus
MOI	multiplicity of infection
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
p(I:C)	polyinosinic:polycytidylic acid
PA	Proteasomaktivator
PAG(E)	Polyacrylamidgel (elektrophorese)
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PB	Pacific Blue
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PFU	plaque forming units
PI	Propidiumiodid
PRR	pathogen recognition receptor
RIG	retinoic acid inducible gene
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulphat
ss	single strand
Tab.	Tabelle
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
ÜN	über Nacht
UR	Upper right (oberer rechter Quadrant im FACS-Dotplot)
USP	Ubiquitin spezifische Protease
UV	ultraviolett

---

## 9. Erklärung

„Ich, Anna Rahnefeld, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung dendritischer Zellen in der frühen Phase der Enterovirusmyokarditis“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## 10. Danksagung

Prof. P.-M. Kloetzel danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit als auch für die Übernahme des Erstgutachters. Darüber hinaus möchte ich mich für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit als auch für die vielen hilfreichen Diskussion bedanken.

Ich bedanke mich bei Prof. Stangl für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe des kardiologischen Forschungslabors der Klinik für Kardiologie und Angiologie der Charité durchführen zu können.

Ausgesprochen großer Dank gilt aber vor allem Dr. Antje Voigt für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Ich danke ihr von ganzem Herzen für die zu jeder Tages- und Nachtzeit bestehende Hilfsbereitschaft, ihre vielen Ideen, ihre Geduld, ihre Motivation und motivierende Art als auch für das Vertrauen, das sie in mich und meine Fähigkeiten gesetzt hat. So wurde die Zeit meiner Promotion zu einer ausgesprochen lehrreichen und bereichernden Phase meines Lebens, die ich nicht missen möchte.

Weiterhin bedanke ich mich sehr bei der gesamten Arbeitsgruppe für ihre stete Hilfsbereitschaft und die nette Arbeitsatmosphäre. Im Besonderen möchte ich Elisa Opitz danken, auch gilt mein Dank Nadine Albrecht, Kornelia Buttke, Angela Zepp, Grit Hoyer und zahlreichen anderen, die mir auf diesem Weg geholfen haben.

Großer Dank kommt auch Dr. Armin Rehm und Kerstin Gerlach für die Hilfe bei der Etablierung der BMDC-Kulturen und Antigenpräsentationsassays sowie die vielen inhaltlichen Anregungen zu.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung während meines Studiums. Ich danke dir, Thomas, für deine Geduld und deinen Rückhalt.

## **11. Lebenslauf**

*Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.*

## 12. Publikationen

- Rahnefeld A, Ebstein F, Albrecht N, Opitz E, Kuckelkorn U, Stangl K, Rehm A, Kloetzel P.-M., Voigt A: Antigen Presentation Capacity of Dendritic Cells is Impaired in Ongoing Enterovirus-Myocarditis. Eur J Immunol. 2011 Sep;41(9):2774-81. doi: 10.1002/eji.201041039. Epub 2011 Jul 29.
- Opitz E, Klingel K, Koch A, Schmidt F, Rahnefeld A, Völker U, Kuckelkorn U, Krüger E, Stangl K, Kloetzel P.-M., Voigt A: Impairment of immunoproteasome function by  $\beta 5i$ /LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis. PLoS Pathog. 2011 Sep;7(9):e1002233. Epub 2011 Sep 1

### Posterbeiträge:

- Rahnefeld A, Ebstein F, Albrecht N, Opitz E, Kuckelkorn U, Stangl K, Kloetzel P.-M., Voigt A: „Characterisation of Dendritic Cells in Murine Enterovirus-Myocarditis“ Internationales Symposium SFB TR19 Berlin 2011
- Opitz E, Klingel K, Koch A, Schmidt F, Rahnefeld A, Völker U, Kuckelkorn U, Krüger E, Stangl K, Kloetzel P.-M., Voigt A: “Impairment of immunoproteasome function by  $\beta 5i$ /LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis” Internationales Symposium SFB TR19 Berlin 2011
- Rahnefeld A, Ebstein F, Opitz E, Kuckelkorn U, Baumann G, Kloetzel P.-M., Stangl K, Voigt A: „Impairment of the Ubiquitin-Proteasome-System is crucially involved in Dendritic Cell Function in the Murine Model of Enterovirus Myocarditis” Deutsche Gesellschaft für Kardiologie 76. Jahrestagung 2010, Mannheim
- Ebstein F, Rahnefeld A, Voigt A, Urban S, Seifert U, Dahmann B, and Kloetzel P.-M.: „PA28 allows the degradation of ubiquitin aggregates in maturing dendritic cells through increased formation of PA28-20S-19S hybrid proteasomes.” 2nd European Congress of Immunology ECI 2009

### Vorträge:

- Rahnefeld A: “Differential DC activation in a murine model of enterovirus myocarditis” ESC - European Students' Conference 2009