

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionelle Bedeutung und Immunregulation Natürlicher
Killerzellen bei der akuten und chronischen
Enterovirusmyokarditis.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katrin Göldner
aus Lauchhammer

Datum der Promotion: 09.09.2016

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	I
	Zusammenfassung (engl.)	II
	Abkürzungsverzeichnis	III
	Abbildungsverzeichnis	VI
	Tabellenverzeichnis	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Myokarditis	2
1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.2	Ätiologie	2
1.1.3	Diagnostik	3
1.1.4	Verlauf und Prognose	4
1.1.5	Dilatative Kardiomyopathie	4
1.1.6	Virusinfektion als Auslöser einer Myokarditis	5
1.2	Enteroviren	5
1.2.1	Coxsackievirus B3	6
1.2.1.1	Das Genom von CVB3	6
1.2.1.2	Replikationszyklus von CVB3	7
1.2.1.3	Pathogenese der CVB3-induzierten Myokarditis	8
1.3	Natürliche Killerzellen	9
1.3.1	NK-Zellrezeptoren	10
1.3.2	Das humane NK-Zellsystem	11
1.3.3	Das murine NK-Zellsystem	12
1.3.4	Der aktivierende Rezeptor NKG2D	12
1.3.5	Der MHC-unabhängige, aktivierende Rezeptor NKp46	14
1.4	Mausmodell der CVB3-induzierten Myokarditis	15
1.5	Ziel der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Medien und Lösungen	19
2.1.3	Kits	20

2.1.4	Enzyme	21
2.1.5	Zytokine	21
2.1.6	Viren	21
2.1.7	Geräte	21
2.1.8	Zelllinien	21
2.1.9	Software	22
2.2	Tierversuche	22
2.2.1	Versuchstiere	22
2.2.2	Genehmigung der Tierversuche	22
2.2.3	Infektion der Versuchstiere	23
2.2.4	NKG2D-Neutralisation	23
2.3	Methoden	23
2.3.1	Virologische Methoden	23
2.3.1.1	Virusvermehrung	23
2.3.1.2	Plaque Assay	23
2.3.1.3	Infektion von HL-1 Zellen	24
2.3.2	Zellbiologische Methoden	24
2.3.2.1	Gewinnung von Lymphozyten aus der Milz	24
2.3.2.2	Gewinnung von Lymphozyten aus dem Herz	25
2.3.2.3	Magnetische Zellsortierung (MACS)	25
2.3.2.4	Durchflusszytometrie	25
2.3.2.5	Färbung von Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern	26
2.3.2.6	Antikörper	26
2.3.3	Methoden zur Aktivitätsmessung von NK-Zellen	27
2.3.3.1	Degranulation durch Stimulation mit NK-zellsensitiven Zielzellen	27
2.3.3.2	IFN- γ Sekretion durch Stimulation mit anti-NKG2D Antikörpern	28
2.3.4	Histologische Methoden	29
2.3.4.1	Anfertigen von Kryo- und Paraffinschnitten	29
2.3.4.2	Hämatoxilin-Eosin-Färbung	30
2.3.4.3	<i>In-situ</i> Hybridisierung	30
2.3.5	Molekularbiologische Methoden	31
2.3.5.1	Isolierung von RNA	31

2.3.5.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren	32
2.3.5.3	Reverse Transkription	32
2.3.5.4	<i>Real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion	33
2.3.5.4.1	<i>TaqMan Assay</i>	33
2.3.5.4.2	Durchführung der PCR	33
2.3.5.4.3	Relative Quantifizierung	34
2.3.5.4.4	Generierung eines <i>TaqMan Panels</i>	35
2.3.6	Adoptiver Transfer	35
2.3.7	Statistische Auswertung	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Differente Verteilung diverser Lymphozytenpopulationen	37
3.2	Unterschiede hinsichtlich der NK-Zelleffektorfunktionen	40
3.2.1	Degranulationskapazität gegenüber Tumorzellen	41
3.2.2	Degranulationskapazität gegenüber murinen Kardiomyozyten	41
3.3	Unterschiede im NK-Zellreifeprozess	43
3.4	Die Bedeutung des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKp46	45
3.4.1	Unterschiede in der Expressionsdichte von NKp46 auf NK-Zellen	45
3.4.2	Einfluss einer NKp46-Deletion auf den Verlauf einer CVB3 Myokarditis	46
3.5	Die Bedeutung des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKG2D	48
3.5.1	Unterschiedliche Expression von NKG2D auf NK-Zellen	48
3.5.2	Unterschiedliche Expression von NKG2D Liganden	50
3.5.3	Expressionsunterschiede von NKG2DL-induzierenden PRRs	51
3.5.4	NKG2D-Expressionsunterschiede auf NK-Zellsubpopulationen	52
3.6	NK-Zellen der C57BL/6 und A.BY/SnJ Tiere unterscheiden sich in ihren NKG2D-abhängigen Effektorfunktionen	53
3.6.1	Unterschiede im NKG2D-vermittelten zytotoxischen Potenzial	54
3.6.2	Unterschiede in der NKG2D-vermittelten IFN- γ Sekretion	55
3.6.3	Unterschiedliche Expressionsregulation der NKG2D Adaptermoleküle DAP10 and DAP12	56
3.7	NKG2D-Neutralisation resultiert in progressivem Verlauf der CVB3 Myokarditis	57

3.7.1	NKG2D-Neutralisation reduziert die Effizienz der Viruselimination	58
3.7.2	Einfluss der NKG2D-Neutralisation auf verschiedene Lymphozyten	59
3.8	Progressiver Verlauf der CVB3 Myokarditis in NKG2D ko Mäusen	61
3.8.1	Ausgeprägte inflammatorische Reaktion und erhöhte Virustiter in NKG2D ko Mäusen	61
3.8.2	Die NKG2D-Deletion beeinflusst T- und NK-Zellen	62
3.9	Adoptiver Transfer C57BL/6 NK-Zellen mildert den Verlauf der CVB3 Myokarditis in permissiven A.BY/SnJ Tieren	64
3.9.1	Histologische Analysen	64
3.9.2	Einfluss des adoptiven NK-Zelltransfers auf diverse Lymphozyten	66
4	Diskussion	67
4.1	C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse unterscheiden sich hinsichtlich ihrer CVB3-induzierten Immunantwort	67
4.2	Unterschiede in der NK-Zellaktivität zwischen resistenten und permissiven Mäusen	70
4.3	C57BL/6 Mäuse zeigen eine höhere Frequenz an reifen NK-Zellen im Vergleich zu A.BY/SnJ	71
4.4	Die verstärkte Expression des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKp46 hat keinen protektiven Effekt auf den Verlauf einer CVB3 Myokarditis	71
4.5	Der aktivierende NK-Zellrezeptor NKG2D ist von essentieller Bedeutung für eine effektive CVB3-Immunität	73
4.6	Die Neutralisation bzw. Depletion von NKG2D führt zu einem progressiven Verlauf der CVB3 Myokarditis	78
4.7	Der adoptive Transfer immunkompetenter C57BL/6 NK-Zellen in permissive A.BY/SnJ Tiere mildert den CVB3-Infektionsverlauf	80
5	Literatur	85
	Eidesstattliche Versicherung	105

Anteilerklärung	106
Lebenslauf	107
Wissenschaftliche Publikationen	109
Danksagung	111

Zusammenfassung

Die Myokarditis ist eine Sammelbezeichnung aller akuten oder chronischen entzündlichen Prozesse des Herzmuskels und wird in den meisten Fällen durch kardiotope Viren verursacht. Coxsackieviren der Gruppe B (CVB3) stellen dabei nachgewiesene Erreger einer viral initiierten Myokarditis dar. Die fundamentale Bedeutung der NK-Zellen hinsichtlich einer effizienten Immunkontrolle der CVB3 Myokarditis wurde bereits durch frühere Arbeiten belegt, welche jedoch nur wenig Information über die potentielle Rolle der NK-Zellen offenbaren. Wir stellen die Hypothese auf, dass individuell ausgeprägte NK-Zellfunktionen und ein spezifisches NK-Zellrezeptorrepertoire großen Einfluss auf den Verlauf einer CVB3-Infektion haben.

In dieser Arbeit wurden anhand eines etablierten CVB3 Mausmodells, welches humane Charakteristika bezüglich des Krankheitsverlaufs implementiert, die immunologischen Prozesse infolge einer Enterovirus-induzierten Myokarditis hinsichtlich einer NK-Zellantwort analysiert. Dieses Modell umfasst zum einen permissive A.BY/SnJ Mäuse, die infolge einer CVB3-Infektion eine chronische Myokarditis entwickeln, die mit Viruspersistenz assoziiert ist und zum anderen immunkompetente C57BL/6 Mäuse, die das Virus während der akuten Infektion vollständig aus dem Organismus eliminieren und keine Chronifizierung der Erkrankung ausbilden.

Wir konnten zeigen, dass die Resistenz gegenüber einer CVB3-induzierten chronischen Myokarditis in C57BL/6 Mäusen mit der Präsenz des aktivierenden Rezeptors NKG2D auf NK-Zellen und effizienter NKG2D-induzierter Effektorfunktionen, wie Zytotoxizität und IFN- γ Sekretion, assoziiert ist. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass resistente C57BL/6 Tiere eine größere Frequenz an reifen (CD11b^{high}) splenogenen und kardialen NK-Zellen aufweisen, während permissive A.BY/SnJ Mäuse einen unreifen NK-Zellphänotyp zeigen. Die protektive Wirkung von NKG2D gegenüber einer CVB3-induzierten Myokarditis konnte durch die *in vivo* Neutralisation bzw. NKG2D Depletion bestätigt werden. Schließlich wurde, durch einen adoptiven Transfer immunkompetenter C57BL/6 NK-Zellen in suszeptible A.BY/SnJ Mäuse, der schützende Einfluss dieser Lymphozytenpopulation gegenüber einer CVB3-induzierten Myokarditis bewiesen.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass eine frühe kardiale Infiltration reifer NK-Zellen und insbesondere die Funktionalität des aktivierenden Rezeptors NKG2D eine fundamentale Rolle in der Immunkontrolle einer CVB3 Myokarditis spielen.

Abstract

Myocarditis is a collective term for all kinds of acute and chronic inflammations of the heart and is in most cases induced by cardiotropic viruses. Group B Coxsackieviruses (CVB3) are well known to trigger a virally caused myocarditis. The functional involvement of NK cells in this disease has been already described more than a decade ago. However, limited information about the functional involvement of NK cells is available. We hypothesized that the individual NK cell function as well as their receptor repertoire determines the outcome following CVB3 infection.

To elucidate susceptibility factors and especially the role of NK cells in the different forms of disease progression in viral myocarditis we used an established mouse model of CVB3 myocarditis mimicking the human disease progress. In this model immunocompetent C57BL/6 mice develop acute myocarditis followed by complete elimination of the virus. In contrast, susceptible A.BY/SnJ mice develop following an acute infection a chronic myocarditis with virus persistence.

We were able to prove that the resistance to CVB3 induced chronic myocarditis in C57BL/6 mice is associated with the presence of activating NK cell receptor NKG2D and efficient NKG2D functions like cytotoxicity and IFN- γ secretion. The examination of the maturation status of NK cells revealed an immature CD11b^{low} phenotype in A.BY/SnJ mice whereas the mature CD11b^{high} NK cells were at higher amount in C57BL/6. Furthermore the protective effect of NKG2D against a CVB3 induced myocarditis was proven by an in vivo neutralisation respectively depletion of NKG2D. Finally, in an adoptive transfer system naive NK cells from immunocompetent C57BL/6 mice had the potential to protect A.BY/SnJ mice from progressive course of a CVB3 infection.

Our results indicate an early infiltration of mature NK cells in association of potent activation of cytolytical functions by NKG2D in resistant C57BL/6 mice after CVB3 infection leading to an effective viral clearance compared to susceptible A.BY/SnJ mice emphasizing the functional importance of NK cells in this infection model.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
ATR-K	ATR Kinase
AV-Blockierung	atrioventrikulärer Block
BFA	Brefeldin A
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CTL	zytotoxische T-Zelle
CVB3	Coxsackievirus B3
d	Tag
DAP10	DNAX-aktivierendes Protein von 10 kD
DAP12	DNAX-aktivierendes Protein von 12 kD
DC	Dendritische Zelle
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DCMi	inflammatorische dilatative Kardiomyopathie
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOTAP	<i>N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride</i>
DP	doppelt positiv
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FasR	Fas-Rezeptor
FasL	Fas-Ligand
FCS	fötales Kälberserum
Gbr2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
HCV	Hepatitis-C-Virus
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase
IFN	Interferon

IFNGR	Interferon- γ Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
inf.	infiziert
ip.	intraperitoneal
IRES	interne Ribosomen-Eintrittsstelle
ISH	<i>in-situ</i> Hybridisierung
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
iv.	intravenös
kb	Kilobasen
KIR	<i>Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor</i>
ko	<i>knockout</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAP-K	MAP-Kinase
MCMV	murines Zytomegalievirus
MDA5	Melanom-Differenzierungsantigen 5
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIC	MHC-I ähnliche Proteine
MLV	Moloney Leukämia Virus
mRNA	messenger RNA
MULT	<i>murine UL16-binding protein like transcript 1</i>
NCR	<i>natural cytotoxicity receptors</i>
NKC	NK-Genkomplex
NKG2D	<i>Natural Killer Group 2 Member D</i>
NKG2DL	NKG2D-Ligand
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ORF	<i>open reading frame</i>
PI3K	Phosphatidylinositol (PI)-3-Kinase
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion

pfu	<i>plaque forming units</i>
p.i.	post infectionem
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
RAE	<i>retinoic acid early inducible gene</i>
RIG-1	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
TCR	T-Zellrezeptor
TH-Zelle	T-Helferzelle
TIR	Toll/interleukin-1 Rezeptor
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIF	<i>TIR Domain-Containing Adaptor Inducing Interferon</i>
UTR	untranslatierte Region
VP	Virusprotein
VPg	<i>viral protein genome-linked 3B</i>
wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Organisation des CVB3 Genoms und Struktur des Viruspartikels.	6
Abbildung 2:	Replikationszyklus von CVB3.	7
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der <i>Missing Self Theorie</i> .	11
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des aktivierenden Rezeptors NKG2D.	13
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des aktivierenden Rezeptors NKp46 (NCR1).	15
Abbildung 6:	Mausmodell der CVB3-induzierten Myokarditis.	17
Abbildung 7:	Amplifikationsbedingungen der <i>real-time</i> PCR.	34
Abbildung 8A:	Splenogene und kardiale Infiltration von T-Lymphozyten in C57BL/6 (●) und A.BY/SnJ (□) Tieren im Verlauf einer CVB3-Infektion.	38
Abbildung 8B:	Splenogene und kardiale Infiltration von DCs in C57BL/6 (●) und A.BY/SnJ (□) Tieren im Verlauf einer CVB3-Infektion.	39
Abbildung 8C:	Splenogene und kardiale Infiltration von NK-Zellen in C57BL/6 (●) und A.BY/SnJ (□) Tieren im Verlauf einer CVB3-Infektion.	40
Abbildung 9:	Splenogene NK-Zellen resistenter C57BL/6 (●) Tiere zeigen eine höhere Degranulationskapazität gegenüber der Zelllinie YAC-1 als NK-Zellen der A.BY/SnJ (□) Tiere.	41
Abbildung 10:	Splenogene NK-Zellen resistenter C57BL/6 (●) Tiere zeigen eine höhere Degranulationskapazität gegenüber naiven und CVB3-inf. Kardiomyozyten als NK-Zellen der A.BY/SnJ (□) Tiere.	42
Abbildung 11:	Exemplarische Darstellung der einzelnen Reifestadien im Differenzierungsprozess der NK-Zellen von C57BL/6 und A.BY/SnJ Tieren.	43
Abbildung 12:	C57BL/6 (●) Tiere zeigen einen reifen NK-Zellphänotyp, während in A.BY/SnJ (□) Mäusen unreife NK-Zellreifestadien dominieren.	44
Abbildung 13:	A.BY/SnJ (□) Tiere zeigen eine höhere Expressionsdichte des aktivierenden Rezeptors NKp46 auf der NK-Zellmembran als C57BL/6 (●) Mäuse.	45

-
- Abbildung 14: Die Deletion des NKp46 Rezeptors in NCR1^{gfp/gfp} Mäusen führt infolge einer Infektion mit CVB3 zu einer verstärkten Infiltration von mononukleären Zellen in das Herzgewebe. 47
- Abbildung 15: Eine CVB3-Infektion resultiert in einer zeitlich begrenzten geringgradigen Infiltration (Tag 4p.i. und 8p.i.) von mononukleären Zellen in das Herzgewebe von C57BL/6 Mäusen. 47
- Abbildung 16: Die Deletion des NKp46 Rezeptors in den NCR1^{gfp/gfp} Mäusen führt zu einer erhöhten Replikation von CVB3 Viren im Myokard von NCR1^{gfp/gfp} Mäusen. 48
- Abbildung 17: Das Expressionsniveau des aktivierenden Rezeptors NKG2D als auch die Infiltration splenogener NKG2D⁺ NK-Zellen ist in C57BL/6 (●) Tieren signifikant höher als im A.BY/SnJ (□) Stamm. 49
- Abbildung 18: C57BL/6 (●) Tiere zeigen nach CVB3-Inokulation eine signifikant höhere Induktion der NKG2DL RAE-1δ und MULT1 auf CD11c⁺ DCs im Vergleich zu A.BY/SnJ (□) Mäusen. 50
- Abbildung 19: Die PRRs TLR3, MDA5 und RIG-I sind im Myokard von C57BL/6 Tieren nach CVB3-Infektion induziert. 51
- Abbildung 20: Analyse der Expression von NKG2D auf NK-Zellsubpopulationen aus C57BL/6 (●) und A.BY/SnJ (□) Tieren im Verlauf einer CVB3-Infektion. 53
- Abbildung 21: NK-Zellen der C57BL/6 (●) Mäuse zeigen eine signifikant größere NKG2D-induzierte Degranulationskapazität im Vergleich zu A.BY/SnJ (□) Tieren. 55
- Abbildung 22: Die NKG2D-induzierte IFN-γ Sekretion in NK-Zellen ist in resistenten C57BL/6 (●) Mäusen signifikant höher als in A.BY/SnJ (□). 56
- Abbildung 23: Expressionsunterschiede innerhalb der NKG2D Adapterproteine DAP10 und DAP12 im Verlauf einer CVB3-Infektion im Myokard von C57BL/6 und A.BY/SnJ Tieren. 57
- Abbildung 24: Die Neutralisation von NKG2D *in vivo* verstärkt die CVB3-induzierte Myokarditis. 58

Abbildung 25A:	Die NKG2D-Neutralisation führt hinsichtlich der mDC- und T-Zellsubpopulationen zu einem permissiven Phänotyp ähnlich dem der A.BY/SnJ Tiere.	59
Abbildung 25B:	Die NKG2D-Neutralisation führt hinsichtlich der NK-Zelldifferenzierungsstadien zu einem permissiven Phänotyp ähnlich dem der A.BY/SnJ Tiere.	60
Abbildung 26:	CVB3-infizierte NKG2D ko Tiere zeigen eine verstärkte myokardiale Inflammation und eine erhöhte Virusreplikation.	61
Abbildung 27:	CVB3-infizierte NKG2D ko Tiere zeigen eine massive myokardiale Infiltration von Entzündungszellen im Vergleich zu C57BL/6 wt Mäusen.	62
Abbildung 28:	Einfluss einer NKG2D-Deletion auf verschiedene Lymphozytenpopulationen im Verlauf einer CVB3-Infektion.	63
Abbildung 29:	Immunkompetente C57BL/6 NK-Zellen haben protektiven Einfluss auf den Verlauf einer CVB3 Myokarditis in permissiven A.BY/SnJ Tieren.	65
Abbildung 30:	Der adoptive Transfer immunkompetenter C57BL/6 NK-Zellen resultiert in CVB3-permissiven A.BY/SnJ Mäusen in einer Verschiebung der CTL- und CD8 ⁺ DC-Immunantwort in Richtung des resistenten C57BL/6 Phänotyps.	66
Abbildung 31:	Eine CVB3-Infektion führt in der Kardiomyozytenzelllinie HL-1 zur Induktion von NKG2DL.	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	In den Analysen verwendete Antikörper.	27
Tabelle 2:	Etablierte <i>TaqMan-Panels</i> für die <i>real-time</i> PCR.	35

1 Einleitung

Der Begriff Myokarditis findet sich bereits Anfang des 19. Jahrhunderts in der medizinischen Literatur. Damals wurden unter diesem Begriff Erkrankungen des Herzens, die nicht mit einer Veränderung der Herzklappen einhergingen sowie Entzündungen des Brustkorbs zusammengefasst (1). Dazu zählte unter anderem eine Myokarditis sowie eine Perikarditis, Pneumonie, Pleuritis und vermutlich auch das akute Koronarsyndrom. 1806 beschrieb Corvisart eine kardiale entzündliche Erkrankung, die zu progressiver Verschlechterung der Herzfunktion führen konnte, und fand erste Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen chronischer Herzerkrankung und Infektion (2). Sobernheim benutzte die Bezeichnung Myokarditis erstmalig 1837 ausschließlich für Entzündungen des Myokards (3).

Ein Großteil der Myokarditiden wird durch kardiotope Viren, wie beispielsweise das Coxsackievirus der Gruppe B (CVB3), verursacht. Klinisch verlaufen virale Herzmuskelentzündungen meist inapparent. Symptomatische Formen reichen von grippeartigen Krankheitsbildern mit Lymphadenitis und Myalgien bis zum plötzlichen Herztod bei fulminanter Myokarditis oder ventrikulärer Arrhythmie. In der Aufklärung immunologisch protektiver Mechanismen der Myokarditis haben sich in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Fortschritte ergeben. Bereits im Jahr 1986 konnten durch Godeny et al. eine essentielle Beteiligung von NK-Zellen an der Immunantwort einer CVB3-induzierten Myokarditis nachgewiesen werden (4). NK-zelldepletierte Mäuse zeigten nach CVB3-Infektion einen progressiveren Verlauf der Erkrankung, gekennzeichnet durch hohe Virustiter und umfangreiche kardiale Nekrosen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (wt). Über die zugrundeliegenden Mechanismen der protektiven Wirkung dieser Lymphozyten auf eine CVB3 Elimination und Infektionseindämmung ist bisher wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit soll im Besonderen die Rolle der NK-Zellen in immunologischen Prozessen infolge einer CVB3 Myokarditis am Tiermodell im Detail analysiert werden.

1.1 Myokarditis

Als Myokarditis werden alle akuten oder chronischen entzündlichen Prozesse des Herzmuskels bezeichnet. Sie ist gekennzeichnet durch Nekrose der Myozyten und vermehrte Infiltration von Entzündungszellen. Obwohl eine Myokarditis in vielen Fällen symptomlos verläuft, kann sie doch zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen und zum plötzlichen Herztod führen (5). Die Entstehung einer Myokarditis kann verschiedene Ursachen haben. Man unterscheidet zwischen einer toxischen, autoimmunen und einer infektiösen Form. Eine toxische Myokarditis kann beispielsweise durch übermäßigen Alkoholkonsum, Schwermetalle, Medikamente wie Chemotherapeutika und Antipsychotika, sowie durch Barbiturate ausgelöst werden. Bei einigen Autoimmunerkrankungen wie der Sarkoidose, dem systemischen Lupus erythematodes und der Sklerodermie kann das Myokard betroffen sein. Die häufigsten Ursachen einer Myokarditis sind jedoch infektiöse Agenzien. In Europa und der USA sind in 50% der Fälle Enteroviren, insbesondere Coxsackieviren B1-B5 beteiligt. Aber auch Parvovirus B19, Adenoviren, Inflenzaviren und Mumpsviren konnten aus dem Myokard isoliert werden (6-8).

1.1.1 Epidemiologie

Die Epidemiologie der Myokarditis in der Bevölkerung ist aufgrund der variablen Symptomatik und der erschwerten Diagnosestellung weitgehend unbekannt. Schätzungen zu folge beträgt die Inzidenz in den USA 1-10/100.000 Einwohner pro Jahr. Weiterhin wird angenommen, dass 1-5% aller viralen Infektionen mit einer myokardialen Beteiligung einhergeht. Eine über 12.000 Routineautopsien umfassende schwedische Studie zeigte, dass in 1% der Fälle die histologische Diagnose einer Myokarditis gemäß Dallas-Kriterien (histopathologische Diagnoserichtlinien der Myokarditis (9)) gestellt werden konnte (10). In Japan ließ sich, in einer Serie von 380.000 Autopsien, eine Myokarditis nur in 0,1% der Fälle histologisch nachweisen (11).

1.1.2 Ätiologie

Ätiologisch ist die Myokarditis als Sammelbezeichnung für entzündlich myokardiale Erkrankungen verschiedener Ursachen zu verstehen (12). In den industrialisierten

Ländern werden hauptsächlich Virusinfektionen für die Entstehung einer Myokarditis verantwortlich gemacht. Häufigste kardiotope Viren sind dabei Enteroviren, insbesondere Coxsackieviren der Gruppe B (13) aber auch Adenoviren (7), Coxsackieviren der Gruppe A, Hepatitis-C-Viren (14) Influenzaviren und Parvovirus B19 (8) konnten nachgewiesen werden. Seltener sind Medikamente, Chemikalien oder Systemerkrankungen Ursache einer Myokarditis. Betrachtet man die Myokarditisätiologie weltweit, so wird die in Mittel- und Südamerika, durch das Protozoon *Trypanosoma cruzi* hervorgerufene Chagas-Krankheit, als häufigste Ursache einer Myokarditis angesehen (15). Abgesehen von dieser Serie identifizierbarer Agenzien wird eine Myokarditis in 50% der weltweiten Fälle als ideopathisch zu klassifizieren sein, obwohl auch hier virale Ursachen vermutet werden, jedoch nicht nachgewiesen werden können (16).

1.1.3 Diagnostik

Die Diagnose einer Myokarditis wird in erster Linie über Anamnese, klinische Untersuchung und Echokardiographie bzw. Elektrokardiogramm (EKG) gestellt. Dabei sind die Veränderungen im EKG oft unspezifisch. Neben Sinustachykardie, als Ausdruck der Entzündungsreaktion bzw. der Herzinsuffizienz, und AV-Blockierungen können auch Endstreckenveränderungen mit infarktähnlicher Präsentation auftreten. Seltener sind tachykarde oder brachykarde Rhythmusstörungen zu finden. Labordiagnostisch können serologische Entzündungsparameter wie Leukozyten, C-reaktives Protein und Blutsenkungsgeschwindigkeit erhöht sein. Serologische Antikörper-Titer-Bestimmungen auf Viren finden nur in einigen Fällen Anwendung, da sie oft unspezifisch, selten aussagekräftig und kostenintensiv sind.

In Röntgenuntersuchungen können Zeichen einer links- oder biventrikulären Dilatation und Stauungszeichen festgestellt werden. Über die Koronarangiographie lässt sich eine stenosierende koronare Herzerkrankung ausschließen. Eine sichere Diagnose der Myokarditis kann jedoch nur durch eine Endomyokardbiopsie gestellt werden. Die Entnahme myokardialer Biopsien und anschließender Auswertung wurde bereits 1956 durch Sutton *et al.* durchgeführt. Dabei wurde Gewebe mit einer Nadel durch einen transthorakalen Zugang entnommen (17). Die heute meist angewandte Methode ist die Entnahme aus dem rechten Ventrikel im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung oder durch einen Zugang über die *Vena Jugularis interna* (18). Die entnommenen

Gewebeproben werden anschließend einer histologischen, immunhistologischen und molekularbiologischen Analyse unterzogen und komplettieren so die myokardiale Diagnostik. Durch Slot-Blot-Technik (19), *in-situ*-Hybridisierung (20) und PCR (21) ist der Virusnachweis im Myokardgewebe möglich. Durch die Verwendung von Antikörpern gegen diverse Antigene der am Entzündungsprozess beteiligten Zellen (z.B. Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen) können diese identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden (22). Zudem kann eine erhöhte Expression zellunabhängiger Immunmarker wie Adhäsionsmoleküle des Gefäßendothels und von Histokompatibilitätsantigenen nachgewiesen werden und zu diagnostischen Zwecken herangezogen werden.

1.1.4 Verlauf und Prognose

Die Hälfte bis zwei Drittel der Myokarditiden verlaufen gutartig und heilen ohne Residuen spontan aus (23). Selten kommt es zu einem fulminanten Verlauf mit akuten Herzrhythmusstörungen, Überleitungsstörungen oder Pumpversagen des linken Ventrikels (24). Myokarditiden, die sich als akutes Koronarsyndrom darstellen haben eine günstige Prognose während Erstmanifestationen, die als Synkope, mit Zeichen einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz oder mit einer deutlich eingeschränkten linksventrikulären Funktion einhergehen, einen ungünstigen Verlauf hinsichtlich der Mortalität nehmen. Der Übergang einer akuten Myokarditis in eine chronische Verlaufsform mit Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) wird vermutet, konnte bisher aber noch nicht bewiesen werden. Obgleich in Studien am Tiermodell die Entwicklung einer akuten Myokarditis in eine DCM gezeigt werden konnte (25).

1.1.5 Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie ist gekennzeichnet durch eine starke, pathogene Erweiterung, zunächst des linken Ventrikels, im Endstadium auch aller Herzhöhlen. Infolge kommt es zu systolischen Funktionseinschränkungen oft kombiniert mit asynchronem Kontraktionsablauf der Kammer. Die DCM ist neben der koronaren Herzerkrankung die bedeutendste Indikation für Herztransplantationen (26). Sie ist mit einer jährlichen Inzidenz von 5-10/100.000 Einwohnern und einer Prävalenz von 36 Fällen pro 100.000 Einwohner die häufigste Form unter den Kardiomyopathien (27). Ätiologisch sind ca. 50% der Erkrankungen auf eine idiopathische DCM zurückzuführen.

Die anderen 50% verteilen sich auf ein weites Spektrum unterschiedlicher Ursachen wie autoimmunologische Vorgänge, Gendefekte, toxische Indikation oder infektiöse Agenzien. In den industrialisierten Ländern wird eine virusinduzierte chronische intramyokardiale Entzündung, insbesondere mit Enteroviren der Coxsackievirus B-Gruppe als wesentlicher Auslöser angesehen (5, 25).

1.1.6 Virusinfektion als Auslöser einer Myokarditis

Viren sind mit 50% die häufigste Ursache einer infektiösen Herzmuskelentzündung, wobei kardiotope Viren wie Enteroviren (z.B. Coxsackievirus, Parvovirus B19), Adenoviren und Herpesviren als ursächlich diskutiert werden (7, 8). Virusinduzierte Myokarditiden manifestieren sich entweder durch direkte virusbedingte Schädigung des Herzmuskels oder durch Kreuzantigenität, wobei es zu einer Kreuzreaktion des Immunsystems zwischen viralen Strukturen und Herzmuskelzellen kommt (28).

Einer initialen Virusinfektion folgt eine antivirale Immunantwort mit dem Ziel einer effizienten Viruseliminierung. Ein ineffizientes Virusclearing kann dabei zu Viruspersistenz und einer sich daraus ableitenden chronischen Entzündung führen (29). Durch die anhaltende virusbedingte Schädigung der Kardiomyozyten kommt es im Verlauf zu einer progredienten Verschlechterung der Herzfunktion, welche in einer Herzinsuffizienz resultieren kann.

1.2 Enteroviren

Enteroviren gehören neben Hepatoviren, Cardioviren, Rhinoviren und Aphtoviren zur Familie der Picornaviridae. Der Name *Picorn* ist eine Abkürzung und verweist auf zwei molekulare Eigenschaften der Virusfamilie: die geringe Größe der Viren (pico, 22-30nm) und die Art der Nukleinsäuren des Virusgenoms (RNA) (30). Sie bilden unbehüllte ikosaedrische Partikel, die sich aus zwölf Pentameren zusammensetzen. Ein Pentamer besteht wiederum jeweils aus fünf Untereinheiten (Protomeren), die durch 4 Virusproteine (VP1–VP4) gebildet werden. Während die Strukturproteine VP1-VP3 an der Oberfläche des Kapsids lokalisiert sind, befindet sich VP4 an der Innenseite der Partikel und ist über positiv-geladene Aminosäurereste mit dem RNA-Genom assoziiert (31).

1.2.1 Coxsackievirus B3

Das Coxsackievirus B3 gehört neben Polioviren und Echoviren, zum Genus der Enteroviren. Es handelt sich dabei um kleine unbehüllte Viren mit einem Einzel-Strang-RNA-Genom von positiver Polarität, d.h. es entspricht der messenger RNA (mRNA) und kann direkt translatiert werden. CVB3 ist ein säurestabiles Virus, dessen natürlicher Wirt der Mensch ist. Eine Übertragung auf andere Spezies ist möglich. Die Infektion erfolgt fäkal–oral oder per Tröpfcheninfektion. Der Krankheitsverlauf bei Maus und Mensch ist nahezu identisch (32).

1.2.1.1 Das Genom von CVB3

Das einzelsträngige Genom von CVB3 hat eine Größe von 7,4 kb und besteht aus einem einzelnen offenen Leserahmen (ORF) (33), welcher am 3`- und am 5`- Terminus von untranslatierten Regionen (UTR) begrenzt wird. Im aminoterminalen Bereich befinden sich die Sequenzen der viralen Kapsidproteine (VP1-VP4), in den carboxyterminal orientierten Regionen die der Nichtstrukturproteine (2A-3D). Das 5`-Ende des CVB3-Genoms ist kovalent mit einem kurzen viruskodierten VPg (*viral protein genome-linked 3B*) verknüpft, während das 3`-Ende polyadenyliert vorliegt. Zusätzlich verfügt CVB3 über eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) am 5`-Ende. Diese erlaubt die Bindung von zellulären Ribosomen zur Translations-Initiation unabhängig von einer, für eukaryotische mRNA typischen, 5' *Cap*-Struktur. Das Genom kodiert ein Polyprotein, welches über verschiedene Zwischenstufen proteolytisch in 11 Einzelproteine gespalten wird (34).

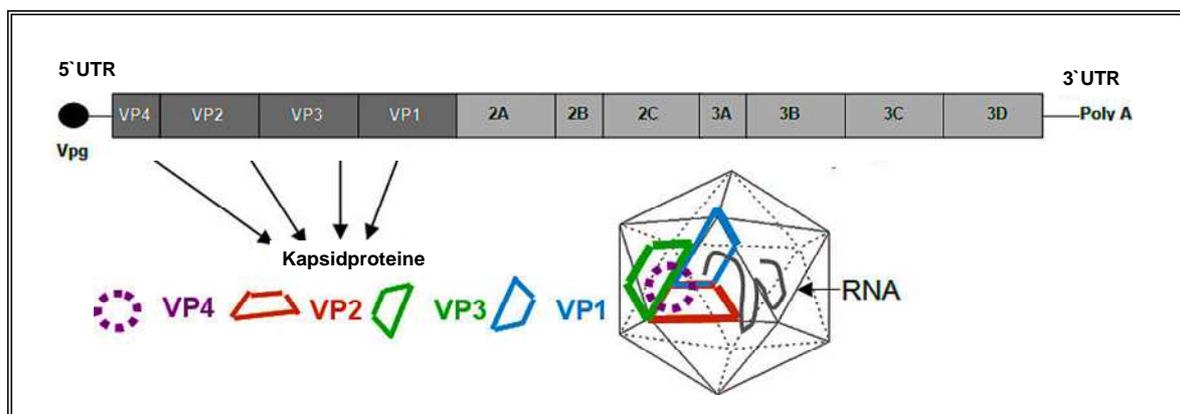


Abbildung 1: Organisation des CVB3-Genoms und Struktur des Viruspartikels (modifiziert nach Hober, 2013 (34)).

1.2.1.2 Replikationszyklus von CVB3

Die Infektion permissiver Zellen durch CVB3 beginnt mit der Adsorption des Virus an den zellulären Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) und der dadurch initiierten Endozytose des Partikels in das Zellinnere (35). Im anschließenden Prozess des *Uncoatings* wird, durch eine membranständige ATP-abhängige Ionenpumpe, die Ansäuerung des Vesikelinneren bewirkt. Dieser Vorgang führt zur Umlagerung der Kapsidstruktur und der Freisetzung des viralen Genoms in das Zytoplasma der Wirtszelle. Aufgrund der positiven Orientierung des Einzelstrang-RNA-Genoms kann dieses direkt intrazytoplasmatisch, unter Verwendung der zellulären Translationsmaschinerie, in ein Vorläuferprotein übersetzt werden. Dieses Polyprotein wird noch während der Translation durch Aktivität der virusspezifischen Proteasen 2A und 3C/3CD in die einzelnen Struktur- und Nichtstrukturproteine gespalten. Dabei entstehen auch, die für die Genomreplikation notwendige, RNA-abhängige RNA Polymerase 3D sowie das VPg, welches als Protein-Primer für die Initiation der RNA-Synthese fungiert. Die Polymerase schreibt das Positivstranggenom in einen komplementären Negativstrang um, welcher als Matrize für neue positive RNA-Genomstränge dient. Die synthetisierten viralen Proteine und Genome lagern sich an intrazellulären Membrankompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum (ER) durch spontane Aggregation (*self-assembly*) zu infektiösen Virionen zusammen. Die Freisetzung der Viruspartikel erfolgt aufgrund einer Änderung der Membranpermeabilität im Zuge der infektionsbedingten Lyse der Wirtszelle (34).

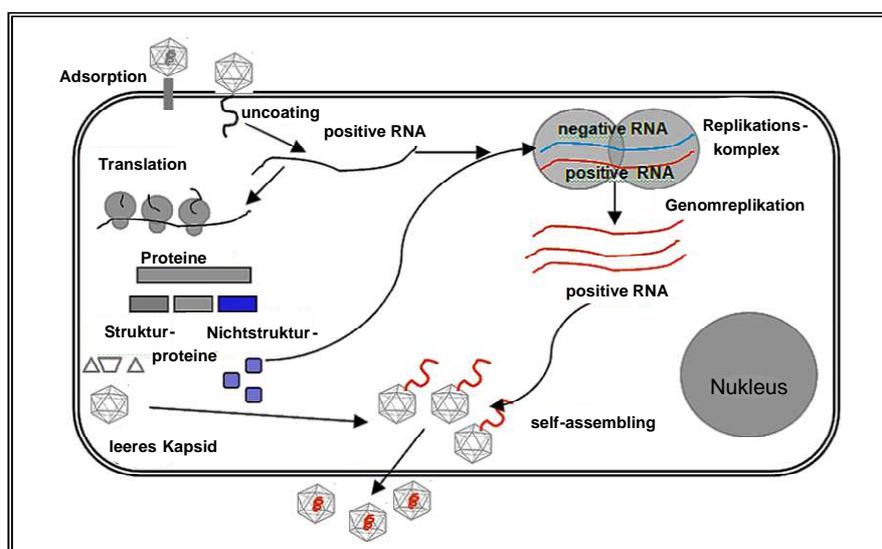


Abbildung 2: Replikationszyklus von CVB3 (modifiziert nach Hober, 2013 (34)).

1.2.1.3 Pathogenese der CVB3-induzierten Myokarditis

Während eine CVB3 Myokarditis bei der Mehrzahl der Patienten ohne klinisch relevante Folgen ausheilt, manifestieren 21% der Patienten innerhalb von 33 Monaten eine DCM (23). Die Mechanismen, die der Entwicklung einer DCM aus einer Virusmyokarditis zugrunde liegen sind weitestgehend unbekannt. Nach heutigem Erkenntnisstand wird, in Bezug auf eine viral induzierte DCM, davon ausgegangen, dass eine initial starke zelluläre Immunantwort im Rahmen einer akuten Myokarditis zur schnellen Viruselimination und Ausheilung führt, während eine verlängerte oder abgeschwächte Immunantwort in einer Erregerpersistenz mit Chronifizierung der Entzündung resultiert. Neben direkt virustoxischen Effekten kann sich sekundär durch humorale und zelluläre Immunmechanismen eine zusätzliche Chronifizierung der antikardialen Immunantwort mit Entwicklung einer Autoimmunität herausbilden (36, 37). Es manifestiert sich eine chronische Herzinsuffizienz.

Eine Infektion mit CVB3 führt zunächst zu einer lokalen Ansiedlung und Vermehrung in den Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Organen des Oropharynx und des Gastrointestinal-Trakts. Von hier aus erfolgen eine hämatogene Ausbreitung mit ausgeprägter Virämie und schließlich die sekundäre Ansiedlung der Viruspartikel in den Zielorganen wie dem Pankreas (38) und insbesondere dem Herz (39).

Experimentell verläuft eine virale Myokarditis in drei Phasen: 1 akute Phase, 2 inflammatorische/ subakute Phase, 3 chronische Phase (24, 36). In der akuten Phase der Infektion tritt die direkt zellzerstörende Wirkung des Virus` in den Vordergrund. Die intrazelluläre Virusvermehrung führt zu morphologischen Veränderungen der Wirtszelle und schließlich zur infektionsbedingten Lyse dieser (40). Zusätzlich trägt die direkte proteolytische Interaktion viruseigener Proteasen mit Wirtsproteinen z.B. der Proteinbiosynthese (41) oder des Zytoskeletts (42) zur Zytopathogenität des Virus` bei. Im Anschluss an das akute Stadium der Infektion folgt die inflammatorische Phase, die mit einer starken Aktivität des Immunsystems einhergeht. Die Immunabwehr erfolgt zunächst durch die angeborene Immunantwort, in deren Folge es zu einer infektionsbedingten Inflammationsreaktion mit starker Gewebsinfiltration durch reaktive Entzündungszellen, wie Makrophagen und Natürliche Killerzellen (NK) kommt (43). Zusätzlich werden proinflammatorische Enzyme wie Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 2 (IL-2), Interferon γ (IFN- γ) Tumornekrosefaktor α (TNF- α) sowie Perforin und Granulysin ausgeschüttet (39). Aufbauend auf diese ersten Abwehrmechanismen der angeborenen

Immunität folgt eine zweite spezifisch adaptive Immunreaktion durch T-Helfer (TH) Lymphozyten und zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) (37, 44). Schließlich führen anhaltende inflammatorische Prozesse, in Verbindung mit negativen inotropen Effekten durch Zytokine wie TNF- α und IL-1 (45) und die Zerstörung der extrazellulären Matrix (46) sowie T-Zellvermittelte kontraproduktive Immunreaktionen (44, 47) zu einer fulminanten Myokardzerstörung. In dieser Phase findet man im Herzmuskel diffus verteilte Läsionen von Immunzellinfiltraten. Durch die zunehmende positive Wirkung der adaptiven Immunantwort kann in vielen Fällen das Virus eliminiert und so die Infektion eingedämmt und eine vollständige Rekonvaleszenz hervorgerufen werden (48). In einigen Fällen gelingt die Viruseliminierung, aus bisher noch ungeklärter Ursache nicht vollständig, es kommt zu Viruspersistenz mit Entwicklung einer chronisch entzündlichen Myokarditis (chronische Phase) (49). Die anhaltende intrakardiale Inflammation verbunden mit einer progredienten Fibrose kann zur Dilatation und Funktionseinschränkung des linken Ventrikels mit Ausbildung einer inflammatorischen dilatativen Myokarditis (DCMi) führen.

1.3 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK) sind der angeborenen Immunantwort zuzuordnen und wurden erstmals 1975 in Mäusen beschrieben (50). Sie bilden einen Anteil von ca. 10 – 15% der im peripheren humanen Blut zirkulierenden mononukleären Zellen (51) und sind wichtige Komponenten der Immunkontrolle entarteter Zellen. NK-Zellen sezernieren große Mengen proinflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α , und sind in der Lage abnorme Zellen ohne vorherige Sensibilisierung zu lokalisieren und zu eliminieren.

Im humanen System werden NK-Zellen durch die Expression der Rezeptoren CD56 und CD16 bei gleichzeitiger Abwesenheit des CD3 T-Zellrezeptors charakterisiert (52). Murine NK-Zellen exprimieren neben CD122, NK1.1 und DX5 den NK-zellspezifischen Rezeptor Nkp46 (51, 53). Die NK-zellinduzierte Lyse von Zielzellen basiert auf zwei verschiedenen Mechanismen; zum einen durch direkte zytotoxische Aktivität über die Sekretion von zytolytischen Proteinen, wie Perforin und Granzym B (54), und zum anderen über einen nicht sekretorischen, indirekten Signalweg durch Interaktion zwischen dem Fas-Ligand (FasL) auf NK-Zellen und dem Fas-Rezeptor (Fas) auf Zielzellen (55). Des Weiteren spielen NK-Zellen eine bedeutende Rolle bei der

Regulation des Immunsystems im frühen Stadium der Immunabwehr. Sie bilden die erste Verteidigungslinie bei der Abwehr von intrazellulären Pathogenen und der Kontrolle von Tumorzellen (50, 56). Die Bedeutung Natürlicher Killerzellen für eine effektive CVB3-spezifische Immunantwort konnte bereits in NK-zelldepletierten Mausmodellen gezeigt werden (4, 57). Infolge einer CVB3-Inokulation zeigten diese Tiere einen erhöhten Virustiter im Myokard sowie einen progredienten Verlauf der Infektion. Die Aktivierung der NK-Zellen unterliegt dabei einer Regulation durch inhibitorische als auch aktivierende Rezeptoren (58).

1.3.1 NK-Zellrezeptoren

NK-Zellen exprimieren eine Vielzahl inhibierender und aktivierender Rezeptoren, welche überwiegend autologe HLA-Klasse I Moleküle erkennen und binden. Man unterscheidet zwei große MHC-reaktive NK-Zellrezeptorfamilien: die Immunglobulin-ähnlichen (Ig-ähnliche) und die C-Typ-Lektin-ähnlichen (59, 60). Unter die Ig-Superfamilie fallen die *killer cell immunoglobuline-like receptors* (KIR), welche ausschließlich im humanen System exprimiert werden (Chromosom 19) (61). Zur C-Typ-Lektinfamilie gehören die CD94/NKG2 Rezeptoren und die Ly49 Rezeptorfamilie, wobei letztere ausschließlich im murinen System nachgewiesen wurden (Chromosom 6) (62). Ly49- und KIR-Rezeptoren stellen trotz ihres unterschiedlichen strukturellen Aufbaus funktionelle Homologe dar. In beiden Familien gibt es sowohl inhibierende als auch aktivierende Rezeptoren. Die Inhibition wird dabei über *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs* (ITIM) im intrazellulären Anteil der Rezeptoren vermittelt (63) während die aktivierenden Rezeptoren über die Assoziation mit DAP12 das entsprechende aktivierende Motiv (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM) erhalten (64).

Die Regulation der NK-Zelle erfolgt durch ein präzise abgestimmtes Gleichgewicht zwischen Signalen der aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren (65). Dominiert dabei das inhibitorische Signal über dem aktivierenden bleibt die NK-Zellaktivierung blockiert. Existiert jedoch kein entsprechender Ligand für inhibierende Rezeptoren oder überwiegen Liganden für aktivierende Rezeptoren, wird die NK-Zelle in ihren Effektorfunktionen aktiviert. NK-Zellen sind im Gegensatz zu B- und T-Zellen sofort aktivierbare Effektoren und können nur durch permanente inhibitorische Signale in ihrer Aktivität gehindert werden. Auf gesunden Zellen dominieren inhibitorische Signale und

die NK-Zelle bleibt inaktiv. Im Falle von abnormen Zellen bei malignen Tumoren (66) oder Virusinfektion (67) fehlen entsprechende inhibierende Liganden (MHC-Moleküle) auf körpereigenen Zellen, sodass aktivierende Signale überwiegen und die Lyse der Zelle eingeleitet wird (*Missing Self Hypothese*) (68). Viele Viren sind in der Lage, im Zuge des molekularen Mimikry, die Antigenpräsentation durch Akkumulation von MHC-I Molekülen zu verhindern. Sie können so der Registrierung durch T-Zellen, die zur Aktivierung auf die Präsentation von Antigenen durch MHC-Rezeptoren angewiesen sind, entkommen, nicht aber der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen.

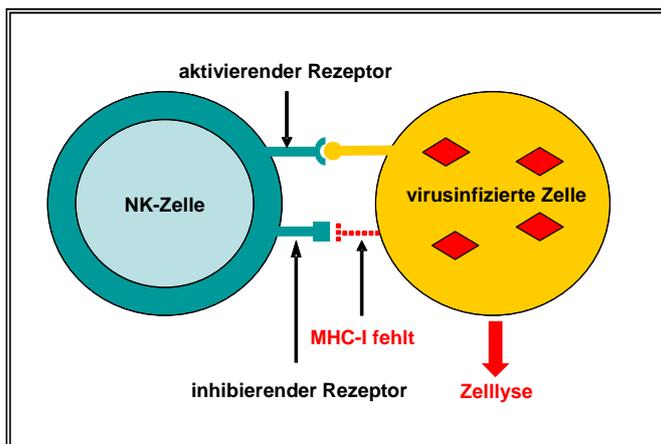


Abbildung 3: Schematische Darstellung der *Missing Self Theorie*.

(Modifiziert nach wikipedia.org.) Die Regulation der NK-Zelle beruht auf einem Gleichgewicht aktivierender und inhibierender Rezeptoren. Die Abwesenheit inhibierender Signale aufgrund fehlender Präsentation körpereigener Moleküle führt zur Aktivierung der NK-Zelle.

1.3.2 Das humane NK-Zellsystem

Im humanen System zählen die HLA-abhängigen KIRs zu den wichtigsten Rezeptoren auf NK-Zellen. KIR Rezeptoren und HLA Antigene (*Human Leucocyte Antigen*) sind jeweils sehr polymorph und werden unabhängig voneinander auf unterschiedlichen Chromosomen (KIR: Chromosom 19, HLA: Chromosom 6 und 15) kodiert (61, 69). Die Klassifikation der KIR Rezeptoren erfolgt aufgrund der Anzahl an extrazellulären Immunglobulin-domänen (2D oder 3D) und das Vorhandensein langer (L) oder kurzer (S) zytoplasmatischer Domänen. KIR-Rezeptoren mit einer langen zytoplasmatischen Domäne übermitteln inhibitorische Signale, während KIR-Proteine mit kurzer zytoplasmatischer Domäne eine aktivierende Funktion haben.

In jüngster Zeit wurde die Relevanz der KIR Rezeptoren für viele klinische Phänomene untersucht. Einzelne Arbeiten belegen, dass der definierte KIR Genotyp eines Patienten mit dem Verlauf einer Viruserkrankung assoziiert werden konnte. So wurde gezeigt, dass bei einer Hepatitis C (HCV) Infektion das Vorhandensein des inhibitorischen

Rezeptors KIR2DL3 und des korrespondierenden HLA Liganden (HLA-C1) im Genotyp die Viruselimination positiv beeinflussen kann (70). In zwei weiteren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass der aktivierende Rezeptor KIR3DS1 und sein korrespondierender Ligand HLA-Bw4 zu einem verzögerten Verlauf einer AIDS-Erkrankung führt. Hingegen resultiert die Abwesenheit des Liganden HLA-Bw4 im Genotyp in einer rapiden Verschlechterung des Krankheitsverlaufs (71).

1.3.3 Das murine NK-Zellsystem

Im murinen System gehören die Rezeptoren der C-Typ Lektin-Familie Ly49 und CD94/NKG2 zu den wichtigsten NK-Zell-Rezeptoren. Ähnlich dem humanen System existieren neben inhibitorischen Rezeptoren eine Reihe von aktivierenden Rezeptoren. Die NK-Zellrezeptoren der Ly49 Familie werden auf dem NK-Genkomplex (NKC) auf Chromosom 6 kodiert (62). Sie treten als kovalent gebundene Homodimere auf der Zelloberfläche von NK-Zellen auf und erkennen Antigene der MHC-Klasse I Moleküle (62, 72). Bisher sind 17 Ly49 Rezeptoren beschrieben (Ly49 A-P, W) (73, 74). Die murine NK-Zelle trägt meist 2 – 3 verschiedene Ly49 Rezeptoren auf der Oberfläche (75). Die Verteilung erfolgt, unabhängig vom Vorhandensein eines Liganden, zufällig und monoallelisch (76). Zusätzlich kann die murine NK-Zelle CD94-NKG2 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese Rezeptorfamilie umfasst 7 Mitglieder NKG2A, B, C, D, E, F, H und wird ebenfalls auf dem NKC auf Chromosom 6 kodiert. Es handelt sich um Transmembran-verankerte Typ II Glykoproteine, welche in den meisten Fällen dimerisiert mit CD94 vorliegen (77).

1.3.4 Der aktivierende Rezeptor NKG2D

Aus der Gruppe der CD94/NKG2 Rezeptoren stellt das NKG2D (*Natural Killer Group 2 Member D*) den am besten charakterisierten NK-Zellrezeptor dar (77). In Mäusen und im Menschen wird NKG2D auf NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und Subpopulationen von Natürlichen Killer T-Zellen (NKT) exprimiert. Im Gegensatz zu humanen CD8⁺ T-Zellen, welche NKG2D konstitutiv exprimieren, konnte murines NKG2D nur auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (78). NKG2D wird strukturell als homodimeres Typ II Transmembranprotein exprimiert, welches keine Dimerisierung mit CD94 eingeht. Die Ausbildung eines stabilen Immunrezeptorkomplexes und die Aktivierung der Signaltransduktion ist ausschließlich durch Assoziation über Disulfidbrücken mit den

Adapterproteinen DAP10 (DNAX-aktivierendes Protein von 10 kD) und DAP12 möglich (79). Während das humane NKG2D lediglich in einer Variante, die mit einem DAP10-Dimer assoziiert ist, vorliegt werden im murinen System zwei unterschiedliche Isoformen des NKG2D durch alternatives Spleißen synthetisiert. Die lange Variante NKG2D-Long kommt hauptsächlich auf ruhenden NK-Zellen vor und wird durch Bindung von DAP10 gebildet, während die kurze Form NKG2D-Short sowohl mit DAP10 als auch mit DAP12 interagiert und bei Aktivierung induzierbar ist (80). Während DAP10 kostimulatorisch wirkt ist DAP12 in der Lage NK-Zellen direkt zu aktivieren. DAP10 enthält ein Tyr-x-x-Met (YxxM) Motiv und bindet nach Phosphorylierung dieses an Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) und die p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol (PI)-3-Kinase (PI3K), welche über den MAP-Kinaseweg ein aktivierendes Signal vermittelt (81). Das ITAM-haltige DAP12 Protein hingegen aktiviert in NK-Zellen die Tyrosinkinase Syk und ZAP70, die, durch Phosphorylierung verschiedener Moleküle, die Signaltransduktion in Gang setzen (64).

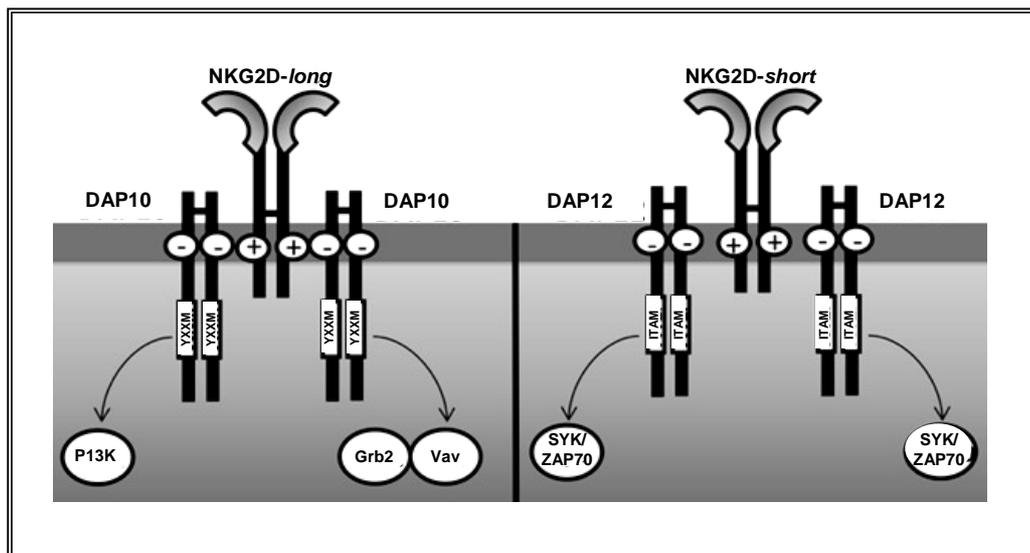


Abbildung 4: Schematische Darstellung des aktivierenden Rezeptors NKG2D (modifiziert nach Spear (86)). Murine und humane NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und NKT-Zellen exprimieren die lange mit DAP10 assoziierte Form des NKG2D. Murine NK-Zellen exprimieren auch die kurze Isoform, die sowohl mit DAP10 als auch mit DAP12 assoziiert sein kann.

Bisher konnten diverse Liganden für NKG2D (NKG2DL) mit ähnlichen Funktionen in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden. In der Maus wurden die zur RAET-1 Familie gehörenden *retinoic acid earlyinducible genes* (RAE-1 α - ϵ) (82), die Liganden H60 a, b, c (83) und das kürzlich entdeckte murine UL-16 bindende *protein-like-*

transcript 1 (MULT1) identifiziert (84). Im humanen System sind zwei Ligandenfamilien bekannt. Die MHC-I ähnlichen Proteine A (MICA) und B (MICB) sowie die UL-16 bindenden Proteine 1-6 (ULBP1-6). Alle sechs Mitglieder der ULBP Familie werden offiziell als RAET-1 Gene bezeichnet und sind Orthologe der murinen RAE-1 Gene (85). Obwohl diese Liganden entfernte HLA-I Homologe sind spielen sie keine Rolle in der Antigenpräsentation (86). Über die Transkriptionsregulation der NKG2DL ist bisher wenig bekannt. Jedoch sind einige, wie auch die oben benannten, als Antwort auf zellulären Stress wie DNA-Schädigung, Tumore oder Infektionen (87-89) induzierbar. Diese stressbedingte, Antigenpräsentation-unabhängige Regulation von NKG2DL hat einen besonderen Stellenwert in der Immunkontrolle viraler Infektionen.

1.3.5 Der MHC-unabhängige, aktivierende Rezeptor NKp46

Neben den bisher beschriebenen MHC-I-reaktiven NK-Zellrezeptoren konnten durch Moretta *et al.* drei weitere Rezeptorproteine identifiziert werden (90). NKp30, NKp44 und NKp46 werden allgemein in der Gruppe der NCRs (*natural cytotoxicity receptors*) zusammengefasst. NKp30 und NKp46 werden auf allen NK-Zellen exprimiert während NKp44 nur auf aktivierten NK-Zellen nachweisbar ist. Dabei korreliert die Expressionsdichte mit dem zytotoxischen Potenzial der NK-Zelle (91). Bisher konnten im murinen System die Homologe zu NKp30 und NKp46 identifiziert werden. Während NKp30 (NCR3) in den meisten Mausstämmen nur als Pseudogen existiert wird das Homolog zu NKp46 (NCR1) in Mäusen exprimiert und seine zytotoxische Aktivität ist nachweisbar (92). Strukturell ist NKp46 evolutionär konserviert und besteht aus zwei C2-Typ-Immunglobulin ähnlichen Domänen, einer Transmembranregion und einer kleinen intrazellulären Domäne. Er bindet über Salzbrücken an zwei Moleküle dem CD3 ζ und dem Fc γ -Rezeptor, welche über eine intrazelluläre Region mit einem ITAM Motiv verfügen. Die Aktivierung erfolgt über die Tyrosinkinaseaktivität von Syk (54, 93). Die zellulären Liganden der NCRs sind noch weitestgehend unbekannt. Jedoch weiß man heute, dass virales Hämagglutinin als funktionelle Bindungsstelle für NKp46 fungiert und zytotoxische Aktivität in NK-Zellen induziert (94). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Membranexpression von NCR1 mit progredienten Verläufen von Tumorwachstum (95) und bakteriellen Infektionen (96) einhergeht sowie die Entstehung von Diabetes Typ 1 (97) negativ beeinflusst.

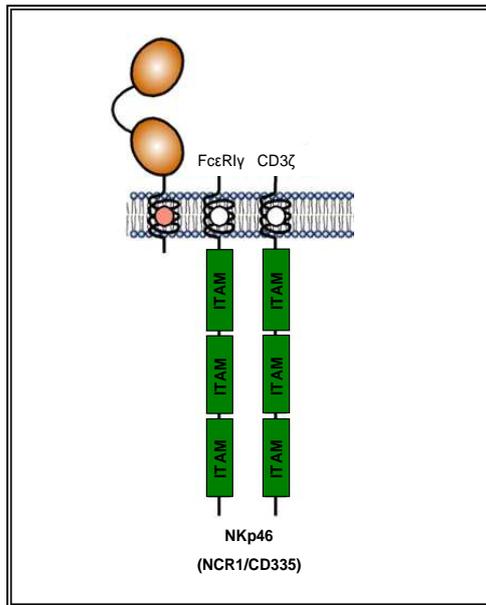


Abbildung 5: Schematische Darstellung des aktivierenden Rezeptors NKp46 (NCR1) (modifiziert nach Hudspeth (98)). Strukturell ist NKp46 aus zwei C2-Typ-Immunglobulin ähnlichen Domänen, einer Transmembranregion und einer kleinen intrazellulären Domäne aufgebaut. Er bindet über Salzbrücken an zwei Moleküle dem CD3 ζ und dem Fc γ -Rezeptor, welche über ein ITAM Motiv der intrazelluläre Region eine Signaltransduktion initiieren.

1.4 Mausmodell der CVB3-induzierten Myokarditis

Studien mit immundefizienten Mäusen haben gezeigt, dass die Pathogenese einer CVB3 Myokarditis von der Virusspezifität und von der individuellen immunologischen Konstitution abhängt (99-101). Mit der Etablierung von Tiermodellen der Enterovirus-induzierten Myokarditis konnten wichtige Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese der chronischen Herzerkrankung gewonnen werden (102). Interessant ist dabei, dass parallel zur humanen DCM männliche CVB3-infizierte Mäuse eine schwerer verlaufende akute Myokarditis ausbilden als weibliche Tiere (103). In diversen Studien mit Mäusen konnten verschiedene immunologische Defekte, die mit einer Minderung der Viruselimination einhergehen und zur Etablierung einer Myokarditis führen, detektiert werden. Unter anderem zeigen die Mausstämme A.CA/SNJ (H-2^r), A.BY/SnJ (H-2^b), SWR/J (H-2^q) (102) eine Disposition zur Entwicklung einer chronischen Herzerkrankung infolge einer CVB3-Infektion, die mit Viruspersistenz und chronischer Entzündung im Myokard einhergeht. Im Gegensatz dazu sind DBA/I (H-2^q), C57BL/6 (H-2^b) (104), und B10.A (H-2^k) (105) resistente Stämme, die über immunologische Strategien verfügen das Virus während des akuten Stadiums der Erkrankung zu eliminieren. Woodruff et al. zeigten bereits 1974 eine Beteiligung der T-Zellen an CVB3-induzierten immunologischen Prozessen (106). Weitere Studien an Mäusen haben gezeigt, dass eine experimentell induzierte Autoimmunmyokarditis immunologisch zu einer Differenzierung der CD4⁺ T-Zellantwort in eine IL-2 und IFN- γ produzierende T-Helfer 1 (TH1) und eine IL-4, IL-10 und IL-13 produzierende TH2 Antwort führt. Dabei

beeinflusst die Balance der TH-induzierten Zytokine die Suszeptibilität gegenüber CVB3 und den Verlauf der Myokarditis (107). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass eine starke Beteiligung der Th1 Immunantwort mit der Schwere des Krankheitsverlaufs korreliert, welcher durch zunehmende Zerstörung des Myokardgewebes gekennzeichnet ist. Die negative Wirkung einer inflammatorischen Th1 Antwort auf die virale Myokarditispathogenese wird durch Studien, in denen durch Modulation und Inhibition dieser Immunkomponenten eine reduzierte myokardiale Gewebeerstörung nachgewiesen werden konnte, belegt (108). Des Weiteren hat eine Inhibition von CD40 (kostimulatorisches Protein zur Aktivierung von T-Zellen) protektive Wirkung auf die Virusmyokarditis induzierte Pathogenese und führt zur Verschiebung der TH1/TH2 Antwort in Richtung TH2 (109). Paradoxe Weise verläuft die CVB3-Infektion TH2 dominanter BALB/c Mäuse schwerer als in TH1 dominanten C57BL/6 Tieren (104). Diese Erkenntnis suggeriert, dass eine T-Zellantwort bei der Immunabwehr einer CVB3-induzierten Myokarditis lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Neben T-Zellen konnten auch Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) im Myokard CVB3-infizierter Mäuse detektiert werden (6, 110). Type II Makrophagen konnten in Verbindung mit dem der akuten Myokarditis folgendem Stadium der kardialen Rekonvaleszenz gebracht werden (111). DCs von infizierten suszeptiblen Mäusen produzieren geringere Mengen an Zytokinen und Chemokinen mit kardioprotektiver Wirkung als resistente Tiere. Ein weiterer wichtiger Faktor der antiviralen Immunantwort stellt das proinflammatorische Zytokin IFN- γ dar. CVB3-Infektionen in IFN- γ defizienten Mäusen resultieren in einem progressiven Verlauf der Erkrankung und erhöhter Virusreplikation im Herzmuskel (112). Bisher sind wenige Details einer NK-zellspezifischen Immunantwort infolge einer Infektion mit CVB3 bekannt. Aus Analysen mit NK-zelldefizienten Mäusen geht hervor, dass NK-Zellen in der Immunkontrolle enteroviralinduzierter Myokarditiden von großer Bedeutung sind. Es konnte gezeigt werden, dass eine NK-Zelldepletion in CVB3-inokulierten Mäusen in einem erhöhten Virustiter und zunehmender Myozytendegeneration resultiert (4). Zudem konnte demonstriert werden, dass murine NK-Zellen die CVB3-Replikation limitieren können (113). Um die NK-zellbasierten immunologischen Mechanismen, die mit dem Verlauf der CVB3-induzierten Myokarditis und insbesondere der Chronifizierung einhergehen, im Detail untersuchen zu können wurde ein Mausmodell, welches ähnliche Charakteristika der Erkrankung zeigt wie sie im menschlichen Organismus auftreten, etabliert.

Nach intraperitonealer (i.p.) Infektion mit CVB3 entwickeln alle bislang untersuchten Inzuchtstämme unabhängig vom Mausstamm innerhalb von 4-5 Tagen eine akute Myokarditis (39). Bereits 3 Tage post infectionem (p.i.) kann man einzelne infizierte Myozyten mit zufälliger Verteilung im rechten und linken Ventrikel nachweisen. Durch hämatogene Ausbreitung im Rahmen der Virämie gelangt das Virus in verschiedene Organe und insbesondere ins Myokard. Der Übergang in die akute Phase ist fließend und erreicht am Tag 7-9 p.i. der Infektion ihren Höhepunkt. Sie geht mit der Einwanderung mononukleärer Entzündungszellen ins Myokard, welche sich hauptsächlich aus Makrophagen und NK-Zellen zusammensetzen, und einer durch virusinduzierten Myozytolyse verursachten Schädigung des Myokards, einher (114, 115). Im weiteren Verlauf der CVB3-Infektion verringert sich die Zahl der infizierten Myozyten deutlich und es kann eine Ausheilung der Erkrankung erfolgen. In Abhängigkeit des genetischen Hintergrunds der Inzuchtstämme kann es im Anschluss an die akute Phase der CVB3 Myokarditis zur Entwicklung einer chronischen Herzerkrankung mit einzelnen infizierten Myozyten innerhalb von Myokardläsionen kommen. Während der chronischen Phase, die sich an Tag 28-40 p.i. etabliert, sind vor allem autoimmunologische Prozesse für die anhaltende Myokardschädigung verantwortlich (116). Die chronische Entzündungsreaktion im Herzmuskel wird im weiteren Verlauf durch Viruspersistenz induziert und aufrecht erhalten (114).

In dem der Analysen zugrundeliegenden Mausmodell wurden zwei haploidente Mausstämme, die sich permissiv bzw. resistent gegenüber CVB3 verhalten, infiziert und die NK-Zellinduzierten Prozesse analysiert. Dabei entwickelt der Mausstamm A.BY/SnJ (H-2^b) eine chronische Myokarditis, die mit Viruspersistenz assoziiert ist, während C57BL/6 (H-2^b) Mäuse in der Lage sind, das Virus während der akuten Infektion vollständig aus dem Organismus zu eliminieren und keine Chronifizierung der Erkrankung ausbilden.

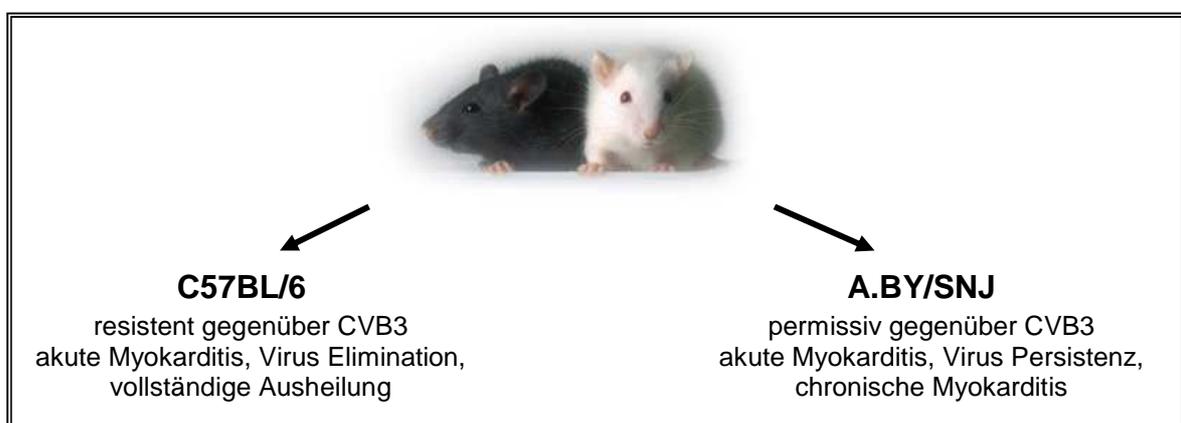


Abbildung 6: Mausmodell der CVB3-induzierten Myokarditis.

1.5 Ziel der Arbeit

Die Beobachtung, dass sich permissive (A.BY/SnJ) und resistente (C57BL/6) Mausstämmen immungenetisch hinsichtlich ihres jeweiligen Repertoires von Rezeptoren auf NK-Zellen unterscheiden und eine geringe NK-Zelleffektorfunktion mit einem permissiven Phänotyp korreliert, führt zu der Arbeitshypothese, dass eine effiziente NK-Zellantwort in Abhängigkeit des entsprechenden NK-Zellrezeptorrepertoires wesentlich zur Eliminierung von CVB3 beiträgt und somit maßgeblich die Ausbildung einer chronischen Verlaufsform der CVB3 Myokarditis beeinflusst. In den experimentellen Ansätzen soll daher anhand von *ex vivo* und *in vitro* Analysen zunächst die phänotypische Charakterisierung von infiltrierenden Lymphozyten und insbesondere von NK-Zellen nach CVB3-Inokulation vergleichend zwischen beiden Mausstämmen erfolgen. Ferner soll neben der funktionellen Analyse von NK-Zellen Unterschiede zwischen permissiven A.BY/SnJ und resistenten C57BL/6 Tieren hinsichtlich ihres NK-Zellrezeptorrepertoires herausgearbeitet werden. In weiterführenden Experimenten soll überprüft werden, ob ein adoptiver Transfer resistenter C57BL/6 NK-Zellen den Verlauf einer CVB3-induzierten Myokarditis in A.BY/SnJ Tieren mildern kann. In dieser Arbeit sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welche Aussagen lassen sich für resistente C57BL/6 und permissive A.BY/SnJ Mäuse hinsichtlich ihres immunologischen Phänotyps treffen?
2. Wie unterscheiden sich resistente C57BL/6 und permissive A.BY/SnJ Mäuse hinsichtlich ihrer CVB3-induzierten T-Zell-, DC- und insbesondere ihrer NK-Zellantwort?
2. Welche Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen lassen sich bezüglich der Effektorfunktionen der NK-Zellen feststellen?
3. Gibt es innerhalb des CVB3 Myokarditis-Mausmodells Varianzen im Hinblick auf NK-Zellreifstadien?
4. Welche NK-zellspezifischen Rezeptoren könnten protektiven Einfluss auf die CVB3 Pathogenese ausüben?
5. Lässt sich die schützende Wirkung protektiver NK-Zellrezeptoren durch Neutralisation bzw. Depletion dieser *in vivo* bestätigen?
6. Ist es möglich den Verlauf einer CVB3-induzierten Myokarditis in permissiven A.BY/SnJ Tieren durch einen adoptiver Transfer resistenter C57BL/6 NK-Zellen zu mildern?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose Seaplaque	Biozym, Hessisch Oldendorf (Deutschland)
Brefeldin A (BFA)	1000x, eBioscience, Frankfurt (Deutschland)
dNTPs	Promega, Mannheim (Deutschland)
EDTA	Sigma Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Eosin G	Sigma Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Extran MA 01-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Ficoll-Histopaque	Sigma Aldrich, Steinheim (Deutschland)
Formalin	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Hämatoxinilin	Thermo Scientific, Waltham (USA)
HBSS	10x Gibco BRL, Eggenstein (Deutschland)
Kristallviolett	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Paraffin	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
PBS 1x	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Penicillin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Silan	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
TaqMan Mastermix	Applied Biosystems, Weiterstadt (Deutschland)
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)

2.1.2 Medien und Lösungen

Claycomb-Medium	Sigma Aldrich, Steinheim (Deutschland)
DMEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
RPMI	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)
Fötales Kälberserum, FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching (Österreich)

RPMIcompl.	(Komplettmedium für murine Zellen) 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100µg Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 0,05mM β-Mercaptoethanol
DMEMcompl.	(Komplettmedium für murine Zellen) 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 1mM Hepes
Plaqueassay-Medium	Mischung 1:1 aus Lösung A und B Lösung A (37°C): 2xDMEM, 10% FCS Lösung B (55°C): 2% Seaplaque-Agarose 30mM MgCl ₂
Kristallviolettlösung	5g Kristallviolett in 100ml 37% Formalin und 200ml 100% Ethanol gelöst 700ml bidestilliertes Wasser 35ml 2M Tris-Base 10g CaCl ₂ Ad 2000ml bidestilliertes Wasser
SSC 20x (<i>in situ</i> Hybridisierung)	3M NaCl 0,35M tri-Natriumcitrat
Hybridisierungslösung (<i>in situ</i> Hybridisierung)	3x10 ⁵ cpm/Gewebeschnitt ³⁵ S-markierte CVB3-RNA Sonde 3x10 ⁵ cpm/Gewebeschnitt ³⁵ S-markierte Kontroll-RNA- Sonde 50% deionisiertes Formamid 10mM Tris-HCl, pH 7,4; 1mM EDTA, pH 7,2 200µg sonifizierte Salmon Sperm DNA/ml 100µg t-RNA (Kaninchenleber)/ml
FACS-Puffer	1x PBS, 1% FCS
MACS-Puffer	1x PBS, 2mM EDTA, 0,5% FCS

2.1.3 Kits

Absolutely RNA Miniprep Kit	Stratagene, La Jolla (USA)
NK-Zellisoliations Kit, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Deutschland)

2.1.4 Enzyme

Kollagenase II	Thermo Scientific, Waltham (USA)
DNase	Stratagene, La Jolla (USA)
Proteinase K	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)
Reverse Transkriptase	Qiagen, Venlo (Niederlande)
RNase A	Roche, Mannheim (Deutschland)
TaqMan Polymerase Gold	Applied Biosystems, Weiterstadt (Deutschland)

2.1.5 Zytokine

murines IL-2	1000x, eBioscience, Frankfurt (Deutschland)
--------------	---

2.1.6 Viren

cDNA generiertes CVB3 (Nancy Strain)	Kandolf, Universitätsklinikum Tübingen (Deutschland) Institut für Pathologie
---	---

2.1.7 Geräte

DNA Thermozykler	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	BD Bioscience, Heidelberg (Deutschland)
Inkubator	Heraeus, Hanau (Deutschland)
Mixer Mill	Retsch GmbH, Haan (Deutschland)
NanoDrop ND 1000	Peqlab, Erlangen (Deutschland)
7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Weiterstadt (Deutschland)

2.1.8 Zelllinien

YAC-1	murine Lymphomzelllinie, die durch Inokulation des Moloney Leukämia Virus (MLV) in neugeborene A/Sn Mäusen induziert wurde. (Referenz: Kiessling 1975 (50))
RMA-S	TAP2-defiziente Variante der murinen T-Zelllymphomzelllinie RMA (Referenz: Kärre et al. 1986 (117))
RMA-H60	stabil H60 transfizierte Variante der murinen T-Zelllymphomzelllinie RMA (Diefenbach et al. 2001 (118))

HL-1 kardiale Muskel-Zelllinie HL-1 (heart-like)
(Claycomb et al. (119))

2.1.9 Software

7500 System

Sequence Detection SW 1.3 Applied Biosystems, Weiterstadt (Deutschland)

BD CellQuest Pro Software BD, San Jose (USA)

FlowJo TreeStar, Inc., San Carlos (USA)

GraphPad Prism GraphPad software Inc., La Jolla (USA)

2.2 Tierversuche

2.2.1 Versuchstiere

Der Versuchstierstamm A.BY/SnJ (H-2^b) wurde von der Firma *Jackson Laboratories* (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Der Stamm C57BL/6 (H-2^b) stammt von *Charles River* (Sulzfeld, Deutschland). Die NCR1^{GFP/GFP} Maus (C57BL/6 Hintergrund) wurde von Prof. Ofer Mandelboim generiert und uns für die eigene Zucht zur Verfügung gestellt. Sie ist durch die Deletion des NKp46 Rezeptors bei gleichzeitiger Implementation einer GFP-Kassette gekennzeichnet (120). Die NKG2D ko Maus geht, durch Deletion des aktivierenden Rezeptors NKG2D, aus Tieren des C57BL/6 Stammes hervor (125). Alle Versuche wurden an männlichen Inzuchtmäusen im Alter von 4-5 Wochen durchgeführt. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte artgerecht unter einem 12-stündigen Licht-/ Dunkelrhythmus im Tierstall des Institutes für Molekulare Pathologie der Universität Tübingen. Die Tiere wurden in Gruppen zu 4-8 Tieren auf Weichholzgranulat gehalten. Sie erhielten pelletiertes Futter und Wasser *ad libitum*. Die Käfige wurden zweimal in der Woche gewechselt und bei 121°C autoklaviert.

2.2.2 Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche wurden gemäß den Bestimmungen des Tierversuchsantrags PA2/10 durchgeführt, welcher von der zuständigen Behörde, dem Regierungspräsidium Tübingen, nach den Bestimmungen über den Vollzug des Tierschutzgesetzes genehmigt wurde. Alle tierexperimentellen Versuche wurden nur von entsprechend autorisierten Personen durchgeführt.

2.2.3 Infektion der Versuchstiere

Die Infektion erfolgte an 4-5 Wochen alten, männlichen Tieren durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von 1×10^5 pfu (*plaque forming units*) CVB3 (*Nancy strain*) in 200µl PBS pro Maus. Den Kontrolltieren wurden 200µl PBS i.p. injiziert. Die Tötung der Tiere erfolgte durch CO₂-Gas.

2.2.4 NKG2D-Neutralisation

Für die NKG2D-Neutralisation wurde C57BL/6 (H-2^b) Tieren 200µg eines monoklonalen anti-mouse NKG2D (C7) Antikörpers (eBioscience; Frankfurt, Deutschland) i.p. am Tag -1, Tag 3p.i. und Tag 5p.i. injiziert. Als Negativkontrolle erhielten C57BL/6 Mäuse 200µg *Armenian* Hamster IgG unter gleichen Bedingungen.

2.3 Methoden

2.3.1 Virologische Methoden

2.3.1.1 Virusvermehrung

Konfluente Verozellkulturen wurden mit einer plaquebildenden Einheit einer cDNA generierten und 3x herzpassagierten CVB3 Variante pro Zelle inokuliert. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken wurde der Überstand abgenommen, durch DMEMcompl. ersetzt und die Kultur bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24h zeigten 90% der Zellen einen zytopathogenen Effekt. In diesem Infektionsstadium wurden die virushaltigen Kulturen bei -20°C eingefroren und nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen bei 3000rpm für 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde portioniert und bei -20°C gelagert.

2.3.1.2 Plaque Assay

Zur Quantifizierung der Infektiosität einer Virussuspension wurde der Plaque-Assay verwendet. Dieser basiert auf der durch den zytopathogenen Effekt verursachten Lyse virusinfizierter Zellen und deren unmittelbarer Nachbarzellen. Das Virus breitet sich infolge kreisförmig aus und es entsteht in einem konfluenten Zellrasen ein sogenannter Lysishof (Plaque). Durch Überschichtung des Zellrasens mit Agarose und der Färbung mit Kristallviolett werden die Plaques als leere, nicht gefärbte Stellen sichtbar. Die

Konzentration an infektiösen Viruspartikeln kann dann durch die Anzahl der Plaques in Korrelation mit dem eingesetzten Volumen ermittelt werden.

Es wurde in 60mm Petrischalen ein konfluenten Verozellmonolayer angelegt. Dieser wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500µl einer zuvor angefertigten Virusverdünnung (10^{-1} – 10^{-9} in DMEM) überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken wurde der Überstand abgenommen und die Kultur mit 5ml Plaqueassay-Medium (2x DMEM, 10% FCS, 2% Seaplaue-Agarose, 30mM $MgCl_2$) überschichtet. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 48h bei 37°C, 5% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen durch 5%ige Trichloressigsäure fixiert, anschließend das Plaqueassay-Medium entfernt und die Plaques durch Färbung mit Kristallviolett-Lösung sichtbar gemacht. In jeder Verdünnungsstufe wurde die Plaqueanzahl ermittelt und im Zusammenhang mit dem eingesetzten Volumen der Virustiter als Plaque bildende Einheit/ml errechnet. Als Kontrollen dienten Petrischalen mit ausschließlich 5ml DMEM (Negativkontrolle) und einem Virusstock mit bekanntem Virustiter als Positivkontrolle.

2.3.1.3 Infektion von HL-1 Zellen

Ein konfluenten Monolayer von HL-1 Zellen wurde mit 5 pfu/Zelle des gereinigten CVB3 in serumfreiem Claycomb-Medium infiziert. Als Negativkontrolle wurden HL-1 Zellen mit inaktiviertem CVB3 (Bestrahlung UV-Licht) parallel infiziert. Nach 1h Inkubation bei 37°C, 5% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frisches Medium aufgenommen. Der Infektionserfolg wurde mithilfe des Plaque Assays überprüft.

2.3.2 Zellbiologische Methoden

2.3.2.1 Gewinnung von Lymphozyten aus der Milz

Die entnommene Milz wurde zunächst unter Verwendung von 5ml RPMIcompl. mithilfe eines Spritzenstempels durch ein steriles 100µm Nylonnetz gepresst. Die homogenisierte Suspension wurde zentrifugiert (5min, 4°C, 1200rpm) und in 7ml RPMIcompl. resuspendiert. Die Extraktion der Lymphozyten erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation, ein physikalisches Trennverfahren auf Basis der Sedimentationsgeschwindigkeit von Partikeln in einem Dichtegradienten. Dazu wurden

3ml Ficoll-Histopaque mit 7ml Zellsuspension überschichtet und für 30min bei 18°C und 800g unter deaktivierter Bremse zentrifugiert. Die mit mononukleären Zellen angereicherte Interphase wurde isoliert, in RPMIcompl. gewaschen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.3.2.2 Gewinnung von Lymphozyten aus dem Herz

Die Herzen wurden entnommen, zerkleinert und für den Abbau intrazellulärer Matrix in 6ml warmen 1xHBSS, 1mg Kollagenase II und 0,75µg DNase überführt und für 1h bei 37°C inkubiert. Der Kollagenaseverdau wurde anschließend mit RPMIcompl. gestoppt und die verdaute Zellsuspension über ein 40µm Zellsieb filtriert. Nach Zentrifugation für 4min bei 1400rpm und 4°C wurde das Zellpellet in 7ml RPMIcompl. resuspendiert und die Lymphozyten über Dichtegradientenzentrifugation isoliert (siehe 2.3.2.1).

2.3.2.3 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Die Magnetische Zellsortierung (*Magnetic Activated Cell Sorting* MACS) basiert auf der Markierung von definierten Zellen in einer Zellsuspension durch Antikörper, die an supermagnetische Mikropartikel (Microbeads) gekoppelt vorliegen. Diese Partikel sind etwa 50nm groß und ermöglichen die Zurückhaltung der markierten Zellen beim Durchfluss durch ein Magnetfeld, während unmarkierte Zellen aufgefangen werden können. Entfernt man das Magnetfeld, können auch die markierten Zellen ausgespült werden. Dabei wird zwischen positiver (Zielzellen sind markiert und werden zurückgehalten) und negativer Selektion (Zielzellen sind unmarkiert und fließen hindurch) unterschieden. Die Sortierung von murinen NK-Zellen erfolgte durch negative Selektion und wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alle dabei verwendeten Lösungen und Utensilien wurden von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) bezogen. Anschließend wurde die Reinheit der isolierten NK-Zellen per FACS ermittelt. In der Regel wurden Reinheiten zwischen 83 – 94% erreicht.

2.3.2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Dabei wird das Prinzip der gleichzeitigen Messung

verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften auf Zellebene verfolgt. Unter Lichtstreuung versteht man den physikalischen Prozess der Wechselwirkung zwischen einem Partikel (Zelle) und dem einfallendem Lichtstrahl. Zelleigenschaften wie Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile beeinflussen die Lichtstreuung. Dabei wird das Licht nicht gleichmäßig in alle Richtungen gestreut, sondern der größte Teil in Vorwärtsrichtung, d. h. entlang des einfallenden Lichtstrahls, Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FCS). Es stellt in erster Linie ein Maß für die Zellgröße dar. Die Intensität des im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreuten Lichts hängt hauptsächlich von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge an Vesikeln in einer Zelle ab und wird als Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC) bezeichnet.

In der Durchflusszytometrie können zugleich mit dem gestreuten Licht Fluoreszenzfarben gemessen werden. Unter Fluoreszenz versteht man die Lichtemission eines Stoffes, die durch Bestrahlung mit einem Laser ausgelöst wird. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie, wobei Elektronen auf höhere Energieniveaus gehoben werden. Beim Rücksprung auf das Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Man verwendet Fluoreszenzfarbstoffe, die direkt an bestimmte Bestandteile der Zelle binden oder die Färbung erfolgt indirekt über die Kopplung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Durch Einsatz von verschiedenfarbigen Lasern und vor allem Filtern kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden.

2.3.2.5 Färbung von Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Die isolierten Lymphozyten wurden auf eine Anzahl von 5×10^5 Zellen pro Färbeansatz eingestellt und in FACS-Puffer aufgenommen. Die Färbung erfolgte mit einer zuvor austitrierten Menge an Antikörpern in einem Volumen von 100 μ l für 30min bei 4°C in Dunkelheit. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Proben im FACS Calibur (BD) mit 1×10^5 *total events* gemessen.

2.3.2.6 Antikörper

Antikörper	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
CD3 ϵ	145-2C11	Armenian Hamster IgG	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)
CD8 α	53-6.7	Rat IgG2a, κ	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)

Antikörper	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
CD8 β	eBioH35-17.2	Rat IgG2b, κ	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)
CD4	GK1.5	Rat IgG2b	Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach (Deutschland)
CD11c	N418	Armenian Hamster IgG	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)
PDCA1	JF05-1C2.4.1	Rat IgG2b	Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach (Deutschland)
NKp46	29A1.4	Rat IgG2a, κ	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)
NK1.1	PK136	Mouse IgG2a, κ	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)
CD107a	eBio1D4B	Rat IgG2a, κ	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)
NKG2D	CX5	Rat IgG1, κ	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)
NKG2D	A10	Armenian Hamster IgG	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)
NKG2D	C7	Armenian Hamster IgG	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)
CD11b	M1/70	Rat IgG2b, κ	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)
CD27	LG7F9	Armenian Hamster IgG	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)
IFN- γ	AN18.17.24	Rat IgG1	Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach (Deutschland)
CD16/CD32	2.4G2	IgG2a, λ	eBioscience; Frankfurt (Deutschland)

Tabelle 1: In den Analysen verwendete Antikörper.

2.3.3 Methoden zur Aktivitätsmessung von NK-Zellen

2.3.3.1 Degranulation durch Stimulation mit NK-zellsensitiven Zielzellen

Die Degranulationskapazität von NK-Zellen wurde über den Nachweis der CD107a Oberflächenmobilisierung untersucht. CD107a (LAMP-1) ist ein Membranprotein, welches in der Membran intrazellulärer zytotoxischer Granula von NK-Zellen exprimiert wird. Erhalten NK-Zellen einen positiven Stimulus (von Zielzellen oder plattengebundenen Antikörpern) kommt es zu einer Ausschüttung der zytotoxischen Granula durch Verschmelzung dieser mit der Plasmamembran. Dabei gelangen die CD107a Moleküle aus den intrazellulären Granula an die Zelloberfläche und können dort durch einen fluoreszenzmarkierten Antikörper markiert und quantifiziert werden. Durch Zugabe dieses Antikörpers, während der Koinkubation von Effektor- und Zielzelle, werden alle innerhalb des Stimulationszeitraums auf die Oberfläche gelangten Moleküle markiert. Die resultierende Fluoreszenzintensität der degranulierenden Zellen ist somit proportional zum Ausmaß der Degranulation. Um den Abbau von CD107a

durch Internalisierung mittels Endozytose zu verhindern, wird während der Koinkubation von NK-Zellen und Zielzellen Brefeldin A hinzugefügt, welches den Transport von Proteinen zwischen Golgi-Apparat und ER inhibiert. Als Zielzellen (Z) im Degranulationsassay wurden die Tumorzelllinien YAC-1, RMA-S und RMA-H60 verwendet. Jede dieser drei Zelllinien zeichnet sich aufgrund verschiedener Oberflächenmarker als NK-Zellaktivator aus.

Splenogene NK-Zellen wurden durch MACS-Separation (2.3.2.3) isoliert und in 48 well Platten 12h in RPMIcompl. mit 500 U/ml mL-2 bei 37°C vorstimuliert. Anschließend wurden die NK-Zellen (Effektorzellen E) mit verschiedenen Zielzellen im Verhältnis 1:10 (Z:E) koinkubiert. Dazu wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 200µl unter Zugabe von 2.5 µg/ml fluoreszenzmarkierten CD107a Antikörper in eine 96-Loch-U-Boden Platte in RPMIcompl. ausgesät. Zur Quantifizierung der spontanen Degranulation wurde ein Negativkontrollansatz ohne Zielzellen mitgeführt. Nach 1h Inkubation bei 37°C wurde zu jedem Ansatz 1xBrefeldin A (BFA, 1000x, eBioscience, Frankfurt) dazugegeben. Nach weiteren 3h Inkubation bei 37°C folgte eine Antikörperfärbung hinsichtlich des NK-Zellmarkers NKp46 und die durchflusszytometrische Bestimmung der Degranulationskapazität anhand der Mobilisierung von CD107a.

2.3.3.2 IFN- γ Sekretion durch Stimulation mit anti-NKG2D Antikörpern

NK-Zellen können durch Bindung von Antikörpern an spezifische aktivierende Oberflächenrezeptoren stimuliert werden. Da für eine erfolgreiche Stimulation der Rezeptoren eine räumliche Quervernetzung stattfinden muss, wurden die Antikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Dazu wurden die Kulturplatten, zur besseren Haftung der Antikörper, mit 1mg/ml *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium chloride (DOTAP, Sigma Aldrich, Steinheim) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 10min bei 22°C wurden die Platten mit PBS gewaschen und anschließend mit anti-NKG2D (Klon A10, eBioscience, Frankfurt) in einer Konzentration von 0,1M für 16h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Kulturplatten nochmals mit PBS gewaschen und standen dem Experiment zur Verfügung. Zur Blockierung der FC-Rezeptorabhängigen Aktivierung von NK-Zellen, erfolgte eine 30 minütige Vorinkubation dieser mit anti-CD16/32 (10µg/ml, eBioscience, Frankfurt). Die NK-Zellen wurden dann in RPMIcompl. unter Zugabe von 500U/ml rekombinantem mL-2 und 1x BFA auf eine

Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt und für 18-24h bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit in den zuvor vorbereiteten NKG2D-beschichteten Mikrotiterplatten kultiviert. Der prozentuale Anteil des, durch NK-Zellen gebildeten IFN- γ , wurde durch intrazelluläre Färbung im Durchflusszytometer bestimmt. Dazu wurden stimulierte NK-Zellen mit 2% Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert und anschließend eine Oberflächenfärbung hinsichtlich des NK-Zellmarkers NKp46 durchgeführt. Die Permeabilisierung der NK-Zellmembran wurde durch eine Behandlung mit 0,2% Saponin (Sigma Aldrich, Steinheim) realisiert, sodass dann die intrazelluläre Färbung mit 0,15 μ g des IFN- γ Antikörpers und die durchflusszytometrische Quantifizierung dieses Zytokins erfolgen konnte.

2.3.4 Histologische Methoden

Sämtliche histologischen Methoden, inklusive der Anfertigung von Schnitten, wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Karin Klingel vom Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.

2.3.4.1 Anfertigen von Kryo- und Paraffinschnitten

Alle verwendeten Gewebeschnitte wurden auf zuvor silanisierte Objektträger aufgebracht. Dazu wurden Objektträger 24h in wässriger Extran MA 01-Lösung inkubiert, gewaschen, in autoklaviertes bidestilliertes Wasser getaucht und anschließend für 8h bei 180°C gebacken. Für die Silanisierung wurden die erkalteten Objektträger 10sec in 2%ige, wässrige 3-Aminpropyltriethoxysilanlösung gegeben, das überschüssige Silan durch Waschen mit Aceton entfernt und die Träger bei 40°C getrocknet. Mit einem Gefriermikrotom wurden bei -18°C ca. 6 μ m dicke Gewebeschnitte von naiven und infizierten murinen Herzen angefertigt. Nach einer Trocknungszeit von 1h konnten die Schnitte mit 4°C kaltem Aceton fixiert und bei -20°C gelagert werden.

Für die Paraffinschnitte wurden Herzen naiver und infizierter Mäuse über einen Zeitraum von 12h in 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert, in Paraffin eingebettet und ca. 5 μ m dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden dann 24h bei 37°C getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.3.4.2 Hämatoxin-Eosin-Färbung

Die Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. 2min destilliertes Wasser
2. 4min Hämatoxinlösung
3. 10sec destilliertes Wasser
4. 4min fließendes Leitungswasser
5. 10sec destilliertes Wasser
6. 30sec 1%ige, wässrige Eosin G-Lösung
7. 3x 15sec destilliertes Wasser
8. 2x 15sec 70% Ethanol
9. 2x 15sec 90% Ethanol
10. 2x 15sec 100% Ethanol
11. 3x 5min Xylol
12. Eindeckeln mit Entellan

2.3.4.3 *In-situ* Hybridisierung

Die Detektion genomischer RNA des replizierenden CVB3 im murinen Myokard erfolgte durch ³⁵S-markierte RNA-Sonden, die durch *in vitro* Transkription des Plasmids pCVB3-R1 synthetisiert wurden. Es handelt sich um eine CVB3 RNA-Sonde zum Nachweis von CVB3-Plusstrang-RNA, die durch 250 μ Ci ³⁵S-UTP mit einer Aktivität von 1300 Ci/mmol radioaktiv markiert wurde. Für die *in situ* Hybridisierung wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert und rehydriert. In einem 3-teiligen Prozess, welcher die Permeabilisierung der Gewebeschnitte, die eigentliche Hybridisierung und die Posthybridisierung mit anschließender Autoradiographie umfasste, erfolgte dann die Herstellung und der Nachweis der ³⁵S-markierten RNA-RNA-Hybride. Zunächst wurden die Gewebeschnitte einer enzymatischen und chemischen Denaturierung, unter Verwendung des folgenden Protokolls, unterzogen:

1. 20sec autoklaviertes, bidestilliertes H₂O
2. 20min 0,2N Salzsäure
3. 20sec autoklaviertes, bidestilliertes H₂O
4. 30min 2x SSC bei 70°C
5. 20sec autoklaviertes, bidestilliertes H₂O
6. 15min Proteinase K Verdau mit 1 μ g/ml Proteinase K bei 37°C

7. 20sec autoklaviertes, bidestilliertes H₂O
8. 20sec autoklaviertes, bidestilliertes H₂O
9. 3min 70% Ethanol
10. 3min 70% Ethanol
11. 5min 100% Ethanol
12. 30min Trocknung bei 37°C

Die eigentliche Hybridisierung erfolgte dann durch Zugabe von 14µl Hybridisierungslösung auf die zuvor permeabilisierten Gewebeschnitte. Anschließend wurden diese mit einem Deckgläschen und Fixogum abgedichtet und 18h bei 42°C in Dunkelheit inkubiert. Für die folgende Posthybridisierung wurden die Deckgläschen entfernt und überschüssige Hybridisierungslösung durch Waschen beseitigt.

Der Posthybridisierung lag folgendes Protokoll zu Grunde:

1. 10min 2xSSC
2. 10min 2xSSC
3. 30min 2xSSC/ 50% Formamid, 42°C
4. 30min RNase-Verdau, 20µg/ml RNase A, 37°C
5. 30min 0,5M NaCl, 10mM Tris/HCl pH 8
6. 30min 2xSSC/ 50% Formamid, 50°C
7. 60min 2xSSC, 55°C
8. 3min 70% Ethanol
9. 3min 100% Ethanol

Der Nachweis der ³⁵S-markierten RNA-Sonde wurde mithilfe der Autoradiographie realisiert.

2.3.5 Molekularbiologische Methoden

2.3.5.1 Isolierung von RNA

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem „Absolutely RNA Microprep Kit“ der Firma Stratagene (La Jolla) nach Herstellerangaben. Sie basiert auf der Bindung von RNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silicagel-Säule. Die Organproben wurden mithilfe von je 3 Metallkugeln (Tungston Carbide Beads, 3mm, Qiagen, Venlo) im Mixermill bei einer Frequenz von 30/sec für 3min homogenisiert. Anschließend wurden in der Probe vorhandene RNasen mit Lysispuffer (Guanidinisothiocyanat) unter denaturierenden Bedingungen lysiert und die Disulfidbrücken der Tertiärstruktur der RNasen durch β-

Mercaptoethanol (0,1M) reduziert. Alle weiteren Schritte wurden streng nach Herstellerprotokoll durchgeführt und die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

2.3.5.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) unter Verwendung des NanoDrop ND-1000 Spektrophotometers (Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260nm liegt, entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von $40\mu\text{g/ml}$. Die Reinheit der Nukleinsäuren kann über den Quotienten von 260nm zu 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt werden. Liegt dieser bei einem Wert von mehr als 1,8 gilt die RNA-Lösung als rein.

2.3.5.3 Reverse Transkription

In der reversen Transkription wird mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in Gegenwart von Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs) in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben. Zunächst wurde zur Auflösung von Sekundärstrukturen eine 10minütige Inkubation bei 75°C durchgeführt. Als Primer für die Reverse Transkriptase wurden dem Ansatz Oligo-dT-Primer aus 16 – 20 Thymidinen, die an das Poly-A-Ende der mRNAs binden, zugegeben. Ein zusätzlicher DNase Verdau sorgte für den Abbau verunreinigender genomischer DNA. Der Ansatz für die cDNA Synthese setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Reaktionspuffer	8,0 μl
dNTPs (2,5mM)	4,0 μl
DNase (2U/ μl)	2,0 μl
RNase-Inhibitor (40U/ μl)	0,5 μl

Zu jedem Probenansatz wurden bis zu $2\mu\text{g}$ RNA hinzugefügt und das Reaktionsvolumen mit bidestiliertem H_2O auf $18\mu\text{l}$ aufgefüllt. Die Reverse Transkription erfolgte dann bei 42°C über einen Zeitraum von 1h. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch 5minütiges Erhitzen auf 95°C inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.5.4 **Real-time Polymerase-Kettenreaktion**

Mit der *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (*real-time* PCR) ist es möglich, die Amplifikation diverser PCR-Produkte mithilfe von Fluoreszenzmessungen während eines PCR-Zyklus in Echtzeit (*real-time*) zu erfassen. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die Quantifizierung erfolgt anschließend in der exponentiellen Phase der PCR, da nur während dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen herrschen.

2.3.5.4.1 **TaqMan-Assay**

Der *TaqMan*-Assay stellt eine Form der *real-time* PCR dar, die zur Erhöhung der Spezifität einer quantitativen PCR entwickelt wurde. Dabei wird, zusätzlich zu zwei spezifischen Oligonukleotid-Primern, ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid, welches zwischen beiden Primern lokalisiert ist, verwendet. Diese sogenannte *TaqMan*-Sonde ist am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (FAM, Emission bei 518nm) und am 3'-Ende mit Rhodamin als Quencher (Tamra, Emission bei 582nm), der mit einem Phosphatrest blockiert ist, markiert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der 5'-3' Exonukleaseaktivität einer *TaqMan*-Polymerase, wobei dieser Prozess in der Fragmentierung der an den Matrizenstrang hybridisierten Sonde resultiert. In dessen Folge kommt es zur räumlichen Trennung des Reporters vom Quencher, sodass die Reporterfluoreszenz freigesetzt wird. Aufgrund der Hydrolyse ausschließlich gebundener Sonden, steigt mit jedem Zyklus die Fluoreszenz proportional zur Akkumulation des PCR-Produktes.

2.3.5.4.2 **Durchführung der *real-time* PCR**

Für die Durchführung der *real-time* PCR wurde folgender Mix hergestellt:

<i>TaqMan</i> Mastermix	6,25 µl
Primermix (<i>forward</i> , <i>reverse</i>)	3,00µl
Sonde	0,50µl
bidestilliertes H ₂ O	<u>2,25µl</u>
	12,5µl + 1,0µl cDNA

Im *TaqMan* Mastermix (Applied Biosystems, Weiterstadt) enthalten sind die AmpliTaq

Gold DNA Polymerase, dNTPs, dUTPs, MgCl₂ (5mM Endkonzentration), ROX (passiver Reverenzfarbstoff) und eine Uracil-N-Glykosylase. Letztere verhindert eventuelle Kontaminationen durch bereits amplifizierte Produkte. Die *real-time* PCR lief unter folgenden Amplifikationsbedingungen in Doppelansätzen ab:

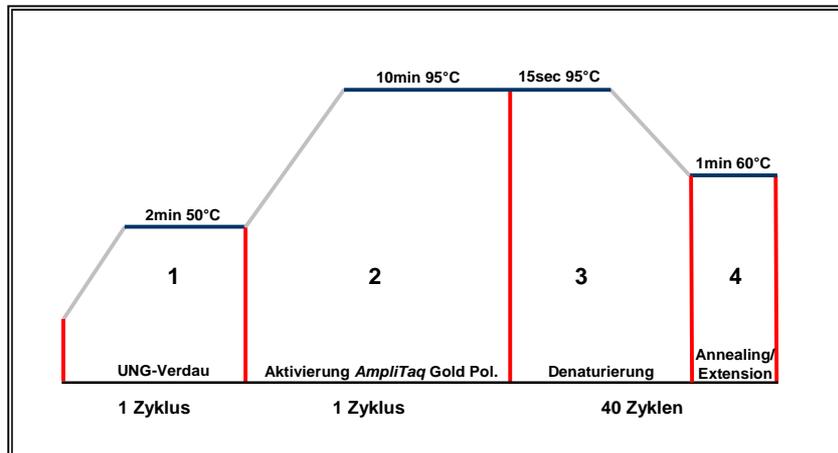


Abbildung 7: Amplifikationsbedingungen der *real-time* PCR. Zunächst erfolgte ein UNG-Verdau bei 50°C. Anschließend kam es während einer 10minütigen Inkubationszeit bei 95°C zur Aktivierung der *AmpliTaq* Gold Polymerase und schließlich in einem 40 zyklischen Syntheseprozess zur Bildung der PCR-Produkte.

Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase (HPRT) parallel amplifiziert. Als Kontrolle auf Kontaminationen mit genomischer DNA dienten Doppelansätze ohne cDNA. Die *real-time* PCR wurde in *optical caps* (Applied Biosystems, Weiterstadt) in einem *GeneAmp 5700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Weiterstadt) ausgeführt.

2.3.5.4.3 Relative Quantifizierung

Zur relativen Quantifizierung der Expression eines unbekanntes Gens wurde in jedem Zyklus ein Referenzgen parallel zum Zielgen amplifiziert. Referenzgene treten unreguliert und konstitutiv exprimiert in jeder Zelle auf und ermöglichen, durch einen Mengenvergleich, Aussagen über die Expressionsregulation hinsichtlich des unbekanntes Gens. Die Quantifizierung erfolgt auf Basis des C_T Wertes, welcher den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, beschreibt. Die Normierung eines Gens anhand eines Referenzgens wird durch die unten aufgeführte Gleichung beschrieben.

$$\Delta C_T = MW C_T (\text{Zielsequenz}) - MW C_T (\text{Referenzgen})$$

$$\text{Ergebnis} = 2^{-\Delta C_T}$$

2.3.5.4.4 Die Generierung eines *TaqMan*-Panels

Die Zielgen-Sequenzen wurden der Genom-Datenbank von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) entnommen und das *TaqMan*-Panel mit der Primer-Software OLIGO erstellt. Dabei wurden die Sequenzen so gewählt, dass die *TaqMan*-Sonde bestenfalls eine Exon-Exon-Grenze überlappt, um die Amplifikation eventueller Verunreinigungen durch genomische DNA auszuschließen. Die *TaqMan*-Panels für RIG-1 (Mm00554529_m1), MDA5 (Mm00459183_m1) und TLR3 (Mm01207403_m1) wurden als *Assay on Demand* von der Firma Applied Biosystems erworben.

Gene	Primersequenzen	
HPRT	Forward primer Reverse primer Sonde	5' atc att atg ccg agg att tgg aa 3' 5' ttg agc aca cag agg gcc a 3' 5' tgg aca gga ctg aaa gac ttg ctc gag atg 3'
NKp46	Forward primer Reverse primer Sonde	5' tct ggt caa agt cga gca ac 3' 5' acc tca ggc tgt gga taa ac 3' 5' aaa ctg gta gta act ggt ctg tat ga 3'
DAP10	Forward primer Reverse primer Sonde	5' aag tca gac atc ggc agg tt 3' 5' gtg aca tga ccg cat ctg c 3' 5' ccg gat gtg gga ctc tgt ctc tg 3'
DAP12	Forward primer Reverse primer Sonde	5' gta cag gcc caga gt gac a 3' 5' tca gca gag tca aca cca ag 3' 5' ctg ttc ttc cgt gag ccc tgg tgt 3'

Tabelle 2: Etablierte *TaqMan*-Panels für die *real-time* PCR. a: Adenin; c: Cytosin; g: Guanin; t: Thymin.

2.3.6 Adoptiver Transfer

In einem adoptiven Transfermodell wurden gereinigte NK-Zellen resistenter C57BL/6 Tiere auf permissive A.BY/SnJ Mäuse übertragen und deren Einfluss auf den Verlauf einer CVB3-induzierten Myokarditis untersucht. In einem ersten Versuchsaufbau wurden aus naiven C57BL/6 Tieren generierte NK-Zellen in A.BY/SnJ transferiert und diese nach 24h mit CVB3-inokuliert. Dazu wurden splenogene NK-Zellen durch MACS-

Separation isoliert und mit sterilem PBS auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/100 μ l eingestellt. Anschließend erfolgte der Transfer von 2×10^6 NK-Zellen in 100 μ l PBS über intravenöse Injektion (i.v.) in die Schwanzvene von A.BY/SnJ Mäusen. Nach 24h wurden die transferierten Tiere mit 1×10^5 pfu CVB3-infiziert.

In einem zweiten, therapeutischen Versuchsansatz wurde die Infektion (1×10^5 pfu CVB3) der transferierten A.BY/SnJ Tiere zwei Tage nach dem Transfer gereinigter splenogener C57BL/6 NK-Zellen vorgenommen. Die Analyse der Versuchstiere hinsichtlich pathogener myokardialer Morphologieveränderungen fand acht Tage nach der Infektion mithilfe Immunhistologischer Färbungen statt. Zusätzlich wurde die CVB3 RNA-Replikationsrate im Herzmuskel durch *in situ* Hybridisierung bestimmt und die Infiltration diverser Lymphozytenpopulationen untersucht.

2.3.7 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 5 für Windows (GraphPad software Inc., La Jolla, USA) erstellt. Für den Vergleich zweier Gruppen zum gleichen Zeitpunkt wurde der *unpaired* t-Test angewandt. Die Zeitkinetiken der einzelnen Mausstämme erfolgte über eine Varianzanalyse (*one-way* ANOVA). P-Werte kleiner oder gleich 0,05 wurden als statistisch unterschiedlich betrachtet.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz von NK-Zellen, als wichtige Immunträger der angeborenen Immunität, in Bezug auf die natürliche Resistenz gegenüber einer chronisch verlaufenden Enterovirus-induzierten Myokarditis analysiert. Ein etabliertes CVB3 Myokarditismodell sollte Aufklärung über die Mechanismen einer effektiven Immunantwort infolge einer CVB3-induzierten Herzmuskelentzündung bringen. Innerhalb dieses Myokarditismodells wurden immunologische Prozesse in Tieren des resistenten C57BL/6 Stammes, der im Zuge einer CVB3-Infektion eine akute Myokarditis ohne Übergang in eine chronische Phase entwickelt, und permissive A.BY/SnJ Tiere, die sowohl eine akute als auch eine chronische Entzündung ausbilden, gegenübergestellt und vergleichend analysiert.

3.1 Differentielle Verteilung diverser Lymphozytenpopulationen

Zunächst erfolgte eine vergleichende kinetische und phänotypische Charakterisierung verschiedener Lymphozytensubpopulationen innerhalb beider Mausstämme. Dazu wurden NK- und T-Zellpopulationen sowie DCs an zuvor definierten Zeitpunkten der CVB3-Infektion durchflusszytometrisch charakterisiert. Durch eine Kennzeichnung zellspezifischer Oberflächenmarker mit Hilfe fluoreszenzmarkierter, monoklonaler Antikörper konnte die Infiltration verschiedener Immunozyten in die Milz und das Myokard beider Mausstämme im Durchflusszytometer bestimmt und verglichen werden. Dabei erfolgten die Messungen jeweils innerhalb der frühen (Tag 3p.i.), der akuten (Tag 8p.i.) sowie in der späten oder chronischen Phase (Tag 28p.i.) der CVB3 Myokarditis. Um gezielte Aussagen über den Einfluss einer enteroviralen Infektion auf das Verhalten der einzelnen Lymphozytenpopulationen treffen zu können, wurden nicht-infizierte C57BL/6 und A.BY/SnJ Tiere (naiv) in die Analyse einbezogen. Die Ergebnisse dieser experimentellen Untersuchungen sind in den Abbildungen 8 A-C zusammengefasst. Betrachtet man beide Mausstämme hinsichtlich ihrer Verteilung an T-Zellen (CD3⁺), so konnte gezeigt werden, dass naive A.BY/SnJ Tiere in der Milz, nicht nur eine signifikant höhere Anzahl an CD3⁺ T-Zellen, sondern auch eine größere Frequenz an CD4⁺ T-Zellen (67,95% ± 2,39% vs. 32,68% ± 3,32%, p<0,001) aufweisen als resistente C57BL/6 Mäuse. Im Gegensatz dazu hatten Tiere des Stammes C57BL/6

einen signifikant höheren Anteil an zytotoxischen T-Zellen ($CD3^+ CD8^+$) ($35,06\% \pm 3,43\%$ vs. $15,48\% \pm 1,72\%$, $p < 0,001$). Die Inokulation mit CVB3 hatte in beiden Mausstämmen eine splenogene Infiltration von $CD3^+$ T-Zellen zur Folge, die im akuten Stadium, am Tag 8p.i. ihr Maximum erreichte. Die Einwanderung von $CD3^+$ T-Lymphozyten ins Myokardgewebe infizierter Tiere verhielt sich ähnlich dem Verlauf in der Milz. Zudem konnte ausschließlich in CVB3-suszeptiblen Mäusen des A.BY/SnJ Stammes eine anhaltende Präsenz der $CD3^+$ T-Zellen im Myokard, während der chronischen Phase (Tag 28p.i.) der Enterovirus-induzierten Herzmuskelentzündung, nachgewiesen werden. Weiterhin wurde auch im Herzmuskel beider Mausstämmen, die in der Milz auftretende, typische Verteilung der T-Lymphozyten vom Helfertyp und der zytotoxischen T-Zellen detektiert (Abbildung 8A).

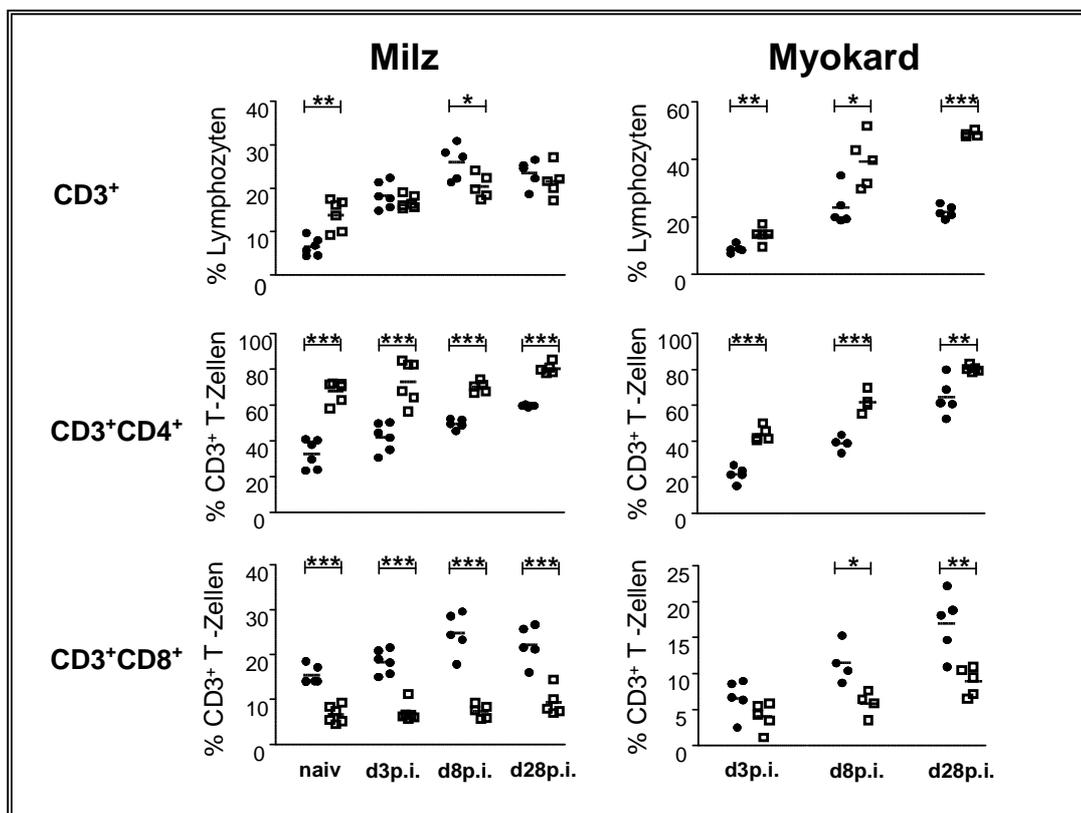


Abbildung 8A: Splenogene und kardiale Infiltration von T-Lymphozyten in C57BL/6 (●) und A.BY/SnJ (□) Tieren im Verlauf einer CVB3-Infektion. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Messung der $CD3^+$ T-Zellsubpopulationen in der Milz und im Myokard. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

Die durchflusszytometrische Analyse Dendritischer Zellen (DC) zeigte eine größere Infiltration myeloider DCs (mDC, $CD11c^+$) in die Milz naiver C57BL/6 Mäuse als in dieses Organ der A.BY/SnJ Tiere ($13,35\% \pm 1,73\%$ vs. $4,63\% \pm 0,67\%$, $p < 0,001$).

Jenes Verhältnis spiegelte sich in allen Phasen der Infektion sowohl im Myokard als auch in der Milz wider, obgleich in der akuten Phase der CVB3-Infektion die stammspezifischen Unterschiede im Herzmuskel nicht signifikant auftraten. Bei näherer Betrachtung der splenogenen plasmazytoiden DCs (pDC, PDCA1⁺) konnten, abgesehen vom Tag 8p.i., keine nennenswerten Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen registriert werden, während im Myokard, in der frühen und akuten Phase der CVB3 Myokarditis (Tag 3p.i., Tag 8p.i.) der signifikant erhöhte Anteil an pDCs in permissiven A.BY/SnJ Tieren kaum zu übersehen war (Tag 3p.i.: 25,72 % ± 1,13% vs. 8,60% ± 0,92%, p<0,001; Tag 8p.i.: 5,06% ± 3,43% vs. 15,48% ± 1,72%, p<0,001). Eine Inokulation beider Mausstämmen mit CVB3 resultierte in einer Zunahme der einwandernden mDCs und pDCs in die Milz und ins Herzgewebe mit einem Maximum am Tag 8p.i. (mDCs – Milz und Myokard; pDCs - Myokard) bzw. am Tag 3p.i. für splenogene pDCs (Abbildung 8B). Unsere Daten zeigen, dass A.BY/SnJ Tiere eine dominante pDC Antwort infolge einer CVB3-Infektion ausbilden, während C57BL/6 Mäuse eine stärkere mDC Immunität im Myokard entwickeln.

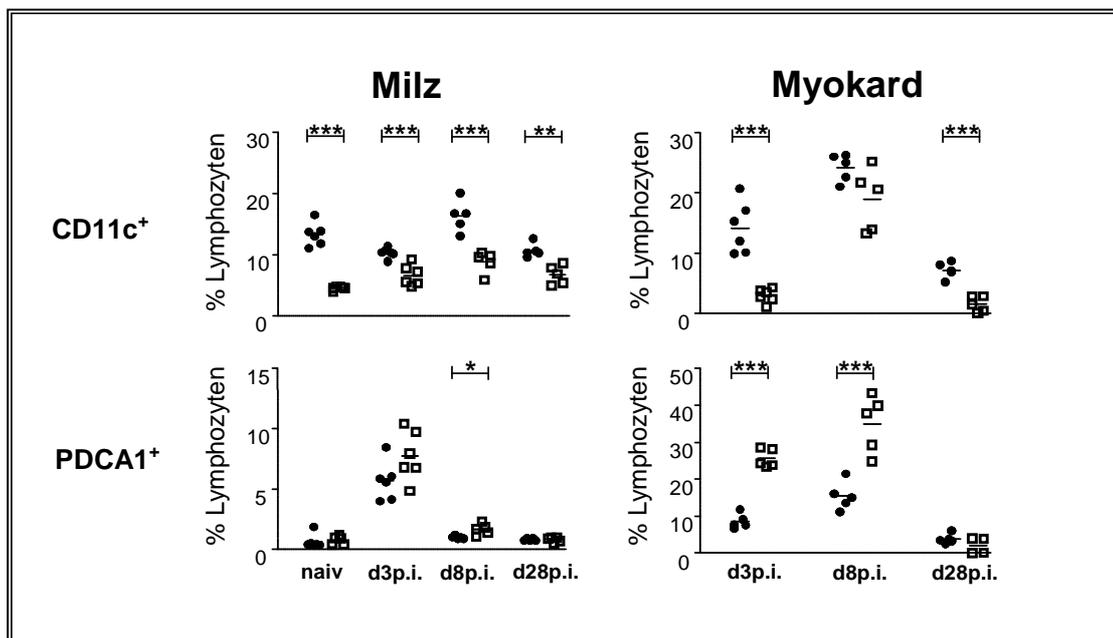


Abbildung 8B: Splenogene und kardiale Infiltration von DCs in C57BL/6 (●) und A.BY/SnJ (□) Tieren im Verlauf einer CVB3-Infektion. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Messung der CD11c⁺ (mDC) und PDCA1⁺ (pDC) Lymphozytenpopulationen in der Milz und im Myokard. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

Die Bestimmung des prozentualen Anteils infiltrierender NK-Zellen erfolgte anhand der Expression des Oberflächenrezeptors NKp46, der ausschließlich auf NK-Zellen gebildet

wird. Im gesamten Messintervall konnten sowohl in der Milz als auch im Myokard resistenter C57BL/6 Tiere weitestgehend höhere Frequenzen an NK-Zellen im Vergleich zu Mäusen des A.BY/SnJ Stammes nachgewiesen werden. Die enterovirale Infektion der Versuchstiere hatte eine Zunahme der splenogenen und kardiale NK-Zellinfiltration mit einem Maximum am Tag 8p.i. zur Folge (Abbildung 8C).

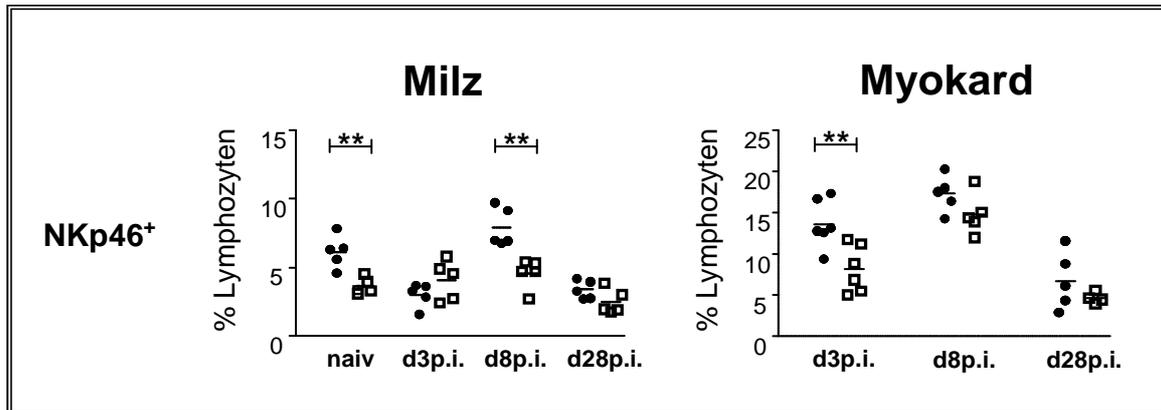


Abbildung 8C: Splenogene und kardiale Infiltration von NK-Zellen in C57BL/6 (●) und A.BY/SnJ (□) Tieren im Verlauf einer CVB3-Infektion. Dargestellt ist die durchflusszytometrische Messung der NK-Zellen (NKp46⁺) in der Milz und im Myokard. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

3.2 Unterschiede hinsichtlich der NK-Zelleffektorfunktionen

NK-Zellen, als Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität, spielen eine zentrale Rolle in der zellulären Immunabwehr. Sie bilden die erste Verteidigungslinie im Kampf gegen Infektionen und Tumoren. Neben anderen Effektorfunktionen ist ihre Zytotoxizität von großer Bedeutung für die Bekämpfung intrazellulärer Krankheitserreger. Basierend auf den vorangegangenen Daten sollte die Funktionalität der NK-Zellen mithilfe des CD107a Degranulationsassays in beiden Tierstämmen verglichen werden. Die Degranulationseffizienz der NK-Zelle kann als Maß für ihr zytotoxisches Potenzial herangezogen werden, da die zytotoxische Aktivität eine gerichtete Endozytose von zytotoxischen Granula, die lytische Proteine enthalten, voraussetzt. Der CD107a Degranulationsassay beruht auf der Messung des Membranproteins CD107a, welches durch die Degranulation der NK-Zelle von der Membran intrazellulärer zytotoxischer Granula auf die NK-Zelloberfläche gelangt und dort quantifiziert werden kann (121).

3.2.1 Degranulationskapazität gegenüber Tumorzellen

Die Degranulationskapazität splenogener NK-Zellen wurde zunächst gegenüber der NK-zellsensitiven Tumorzelllinie YAC-1 (H-2^a) bestimmt. Da NK-Zellen der angeborenen frühen Immunantwort zugeordnet werden, wurden in diesem Experiment NK-Zellen, die am 3. Tag nach CVB3-Inokulation isoliert wurden, hinsichtlich ihrer Effektorfunktion analysiert. Als Kontrolle bzw. zur Überprüfung des Einfluss` einer enteroviralen Infektion auf die Funktionalität dieser Lymphozytenpopulation, wurden parallel Untersuchungen an naiven NK-Zellen durchgeführt.

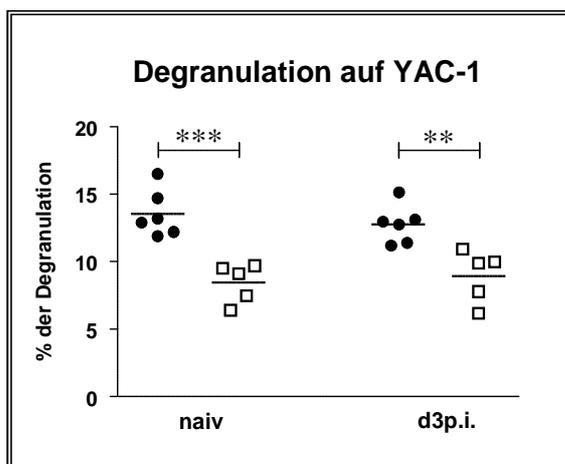


Abbildung 9: Splenogene NK-Zellen resistenter C57BL/6 (●) Tiere zeigen eine höhere Degranulationskapazität gegenüber der Zelllinie YAC-1 als NK-Zellen der A.BY/SnJ (□) Tiere.

Dargestellt ist die Degranulationskapazität von NK-Zellen, welche naiv und am Tag 3p.i. der CVB3 Infektion isoliert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte über den t-Test (*).

Die graphische Darstellung in Abbildung 9 zeigt, dass die Degranulationskapazität der an Tag 3p.i. nach CVB3-Infektion isolierten C57BL/6 NK-Zellen signifikant höher war als die der permissiven A.BY/SnJ Tiere. Interessant war dabei, dass bereits naive NK-Zellen der C57BL/6 Mäuse größeres Degranulationspotenzial zeigten als NK-Zellen des permissiven Stammes, d.h. dass resistente C57BL/6 NK-Zellen konstitutiv ein größeres zytotoxisches Potenzial aufweisen als ihre suszeptiblen Modellpartner (naiv: 13,56% ± 1,74% vs. 8,44% ± 1,44%, $p < 0,001$; Tag 3p.i.: 12,76% ± 1,42% vs. 8,94% ± 1,93%, $p < 0,01$). Innerhalb beider Mausstämme konnte jedoch keine infektionsbedingte Effizienzsteigerung dieser Effektorfunktion festgestellt werden. Die Zytotoxizität der NK-Zellen blieb zwar durch die enterovirale Inokulation unbeeinflusst, zeigte aber deutlich größeres Potenzial in resistenten C57BL/6 Tieren.

3.2.2 Degranulationskapazität gegenüber murinen Kardiomyozyten

Um NK-Zelleffektorfunktionen in einem, den *in vivo* Bedingungen physiologisch angepassten, System zu untersuchen, wurden im Degranulationsassay Zellen der Linie

HL-1 als Zielpopulation verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um murine immortalisierte Kardiomyozyten, die aus der AT-1 Zelllinie, die einem Atriumtumor einer transgenen Maus (C57BL/6J Hintergrund) entstammt, entwickelt wurde. Die HL-1 Zelllinie zeichnet sich durch diverse kardiomyozytenspezifische Charakteristika, wie kardiale morphologische, biochemische und elektrophysiologische Eigenschaften aus. Zudem ist sie gekennzeichnet durch spontane Kontraktionen, ähnlich funktionaler Herzmuskelzellen (119). Für den Degranulationsassay wurden diese Zellen mit 10 pfu/Zelle CVB3 (*Nancy strain*) infiziert und die NK-Zellaktivität beider Mausstämme gegenüber dieser Kardiomyozyten getestet.

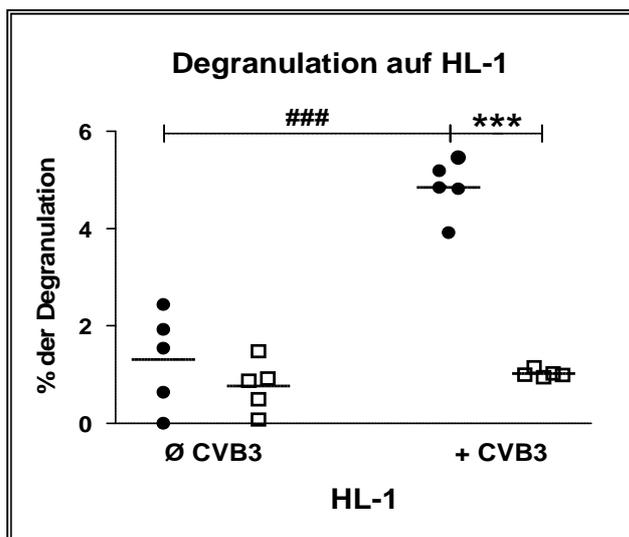


Abbildung 10: Splenogene NK-Zellen resistenter C57BL/6 (●) Tiere zeigen eine höhere Degranulationskapazität gegenüber naiven und CVB3-inf. Kardiomyozyten als NK-Zellen der A.BY/SnJ (□) Tiere.

Bestimmung der Degranulationskapazität gegenüber der Kardiomyozytenzelllinie HL-1. Die statistische Auswertung zwischen beiden Mausstämmen erfolgte mit dem t-Test (*). Die statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich naiver und infizierter HL-1 wurden mit *one-way* Anova und Tukey Post Test (#) ermittelt.

Wie in Abbildung 10 dargestellt zeigten splenogene NK-Zellen, die mit naiven Kardiomyozyten koinkubiert wurden, nur eine geringe Degranulationsaktivität, wobei keine nennenswerten funktionalen Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen auftraten. Interessanterweise war nach Inokulation der HL-1 Zellen mit CVB3 ein signifikanter Anstieg der CD107a Mobilisierung für C57BL/6 NK-Zellen nachweisbar (Ø CVB3: 1,36% ± 0,99% vs. +CVB3: 4,85% ± 0,58% $p < 0,001$). Im Gegensatz dazu konnten hinsichtlich der NK-Zellen aus permissiven A.BY/SnJ Tieren keine Effekte durch die CVB3-Infektion, in Bezug auf die Degranulationskapazität, detektiert werden. Zudem war das zytotoxische Potential resistenter C57BL/6 Tiere, gegenüber CVB3-infizierter HL-1 Zellen, signifikant größer als das der suszeptiblen A.BY/SnJ Mäuse (+CVB3: 4,85% ± 0,58% vs. 1,03% ± 0,08% $p < 0,001$). Auch in diesem Experiment konnten Aktivitätsunterschiede hinsichtlich NK-zellspezifischer Effektorfunktionen zugunsten splenogener NK-Zellen der resistenten C57BL/6 im Vergleich zu permissiven A.BY/SnJ Tieren herausgestellt werden.

3.3 Unterschiede im NK-Zellreifeprozess

Die Differenzierung von unreifen NK-Zellen erfolgt über 3 Reifestadien, die sich in der Expression von Oberflächenmolekülen, der Gewebeverteilung, der Zytokinproduktion sowie der zytotoxischen Kapazität unterscheiden. Der Grad der Reifung kann dabei durch die Expression der Oberflächenmarker CD11b und CD27 charakterisiert werden (122). Auf unreifen NK-Zellen ist die Expression von CD11b gering ($CD11b^{low}$), während reife NK-Zellen eine hohe Expressionsrate dieses Markers aufweisen ($CD11b^{high}$). Demzufolge repräsentieren $CD11b^{low} CD27^{high}$ NK-Zellen eine unreife Entwicklungsstufe, während $CD11b^{high} CD27^{high}$ (doppelt positiv, DP) und $CD11b^{high} CD27^{low}$ NK-Zellen reife Stadien darstellen. Die Differenzierung muriner NK-Zellen *in vivo* folgt dem Schema: $CD11b^{low} CD27^{high} \rightarrow DP \rightarrow CD11b^{high} CD27^{low}$, wobei die zytotoxische Kapazität und die Sekretion von Zytokinen mit dem Reifegrad zunehmen, während die Proliferationsfähigkeit abnimmt. Durch Chiossone *et al.* wurde ein weiteres Reifestadium beschrieben, das in allen lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen in sehr geringer Menge vorkommt. Diese NK-Zellen exprimieren $CD11b^{low}$ und $CD27^{low}$ und agieren vermutlich als Vorläuferzellen zur Generierung von Effektorzellen (123). Diese Differenzierung von NK-Zellen anhand verschiedener Reifestadien ist in Abbildung 11 für C57BL/6 und A.BY/SnJ Tiere exemplarisch dargestellt.

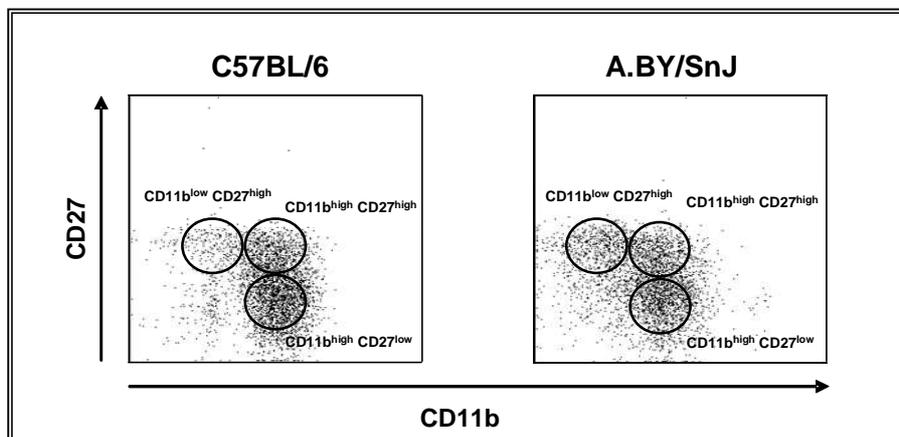


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der einzelnen Reifestadien im Differenzierungsprozess der NK-Zellen von C57BL/6 und A.BY/SnJ Tieren. Die Differenzierung muriner NK-Zellen *in vivo* folgt dem Schema: $CD11b^{low} CD27^{high} \rightarrow CD11b^{high} CD27^{high} \rightarrow CD11b^{high} CD27^{low}$ (dot blot).

In Abbildung 12 ist die Ausprägung der verschiedenen Reifestadien von splenogenen und kardialen NK-Zellen vergleichend zwischen resistenten und permissiven Mäusen dargestellt. Zudem wurde der Einfluss der CVB3-Infektion auf die verschiedenen NK-

Zellentwicklungsstufen vor Inokulation, am Tag 3p.i., Tag 8p.i. und Tag 28p.i. untersucht. Interessanterweise ist die Frequenz der unreifen $\text{NKp46}^+ \text{CD11b}^{\text{low}}$ NK-Zellen in der Milz und im Myokard der A.BY/SnJ Tiere überpräsent, während in C57BL/6 Mäusen ein signifikant höherer Anteil an reifen NK-Zellen ($\text{NKp46}^+ \text{CD11b}^{\text{high}}$) in beiden Organen nachgewiesen werden konnte. Insbesondere trat diese Diskrepanz im letzten Reifestadium ($\text{CD11b}^{\text{high}} \text{CD27}^{\text{low}}$) sehr deutlich auf. Studien haben gezeigt, dass die Funktionalität bzw. die Effektorfunktionen von NK-Zellen mit den zwei letzten Reifestadien ($\text{CD11b}^{\text{high}}$) assoziiert sind (124). Allerdings beeinflusste das Fortschreiten der CVB3-Infektion das individuelle Verteilungsmuster der einzelnen NK-Zellsubpopulationen in beiden Maustämmen in ähnlicher Art und Weise.

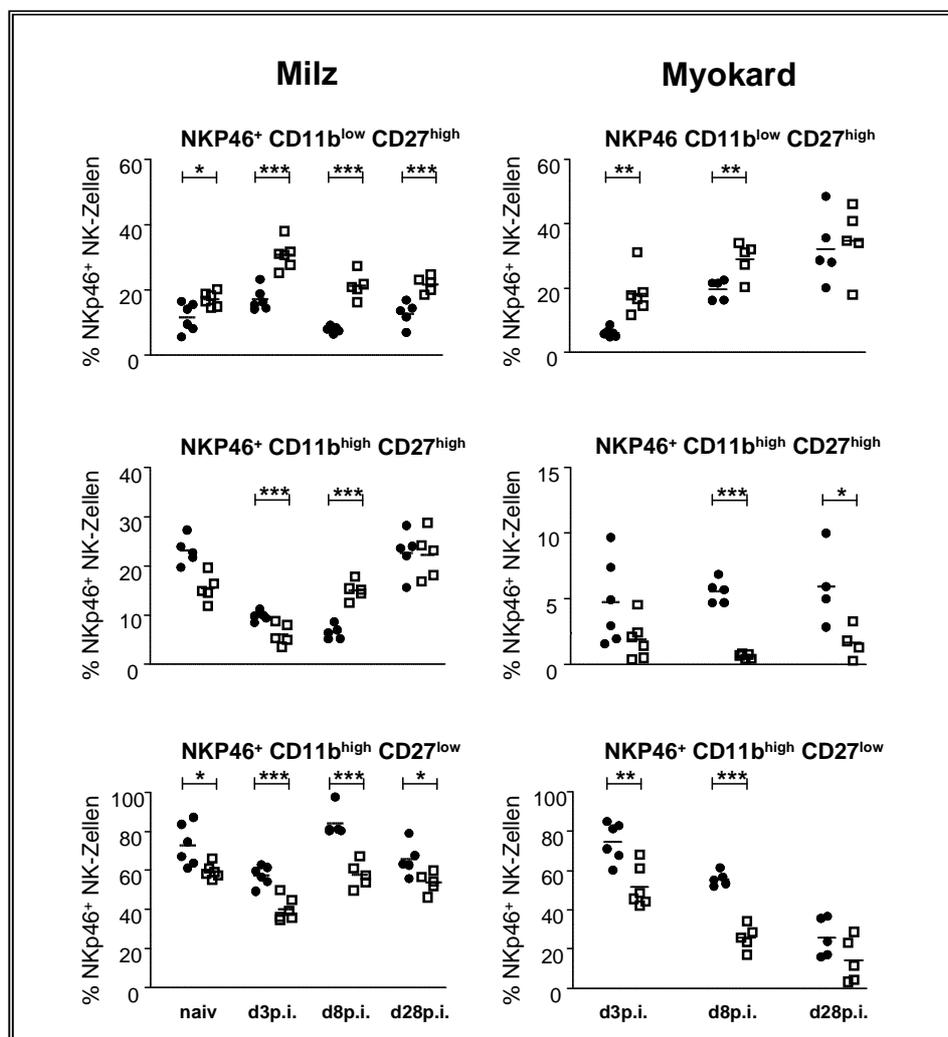


Abbildung 12: C57BL/6 (●) Tiere zeigen einen reifen NK-Zellphänotyp, während in A.BY/SnJ (□) Mäusen unreife NK-Zellreifestadien dominieren. Dargestellt ist die splenogene und kardiale Infiltration der NK-Zellentwicklungsstufen im Verlauf einer CVB3 Infektion. Die statistische Auswertung erfolgte über den t-Test (*).

3.4 Die Bedeutung des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKp46

3.4.1 Unterschiede in der Expressionsdichte des NKp46 auf NK-Zellen

Die bisher erhaltenen Resultate in Bezug auf den Differenzierungsstatus und die Effektorfunktionen der NK-Zellen beider Maustämme legten eine zugrunde liegende Varianz hinsichtlich des spezifischen NK-Zellrezeptorrepertoires nahe. Für einen dieser Rezeptoren (NKp46) konnte gezeigt werden, dass die Expressionsdichte auf der Zelloberfläche von NK-Zellen zwischen C57BL/6 und A.BY/SnJ Tieren stark variiert. Dabei war in permissiven A.BY/SnJ Mäusen eine höhere Expressionsdichte dieses Rezeptors auf NK-Zellen detektierbar. Dieser Expressionsunterschied ließ sich sowohl naiv als auch in allen Phasen der CVB3 Myokarditis nachweisen (Abbildung 13). NKp46 ist ein MHC-Klasse-I-unabhängiger aktivierender Rezeptor, der eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr viraler Erreger; wie beispielsweise Influenza, spielt (siehe 1.3.5).

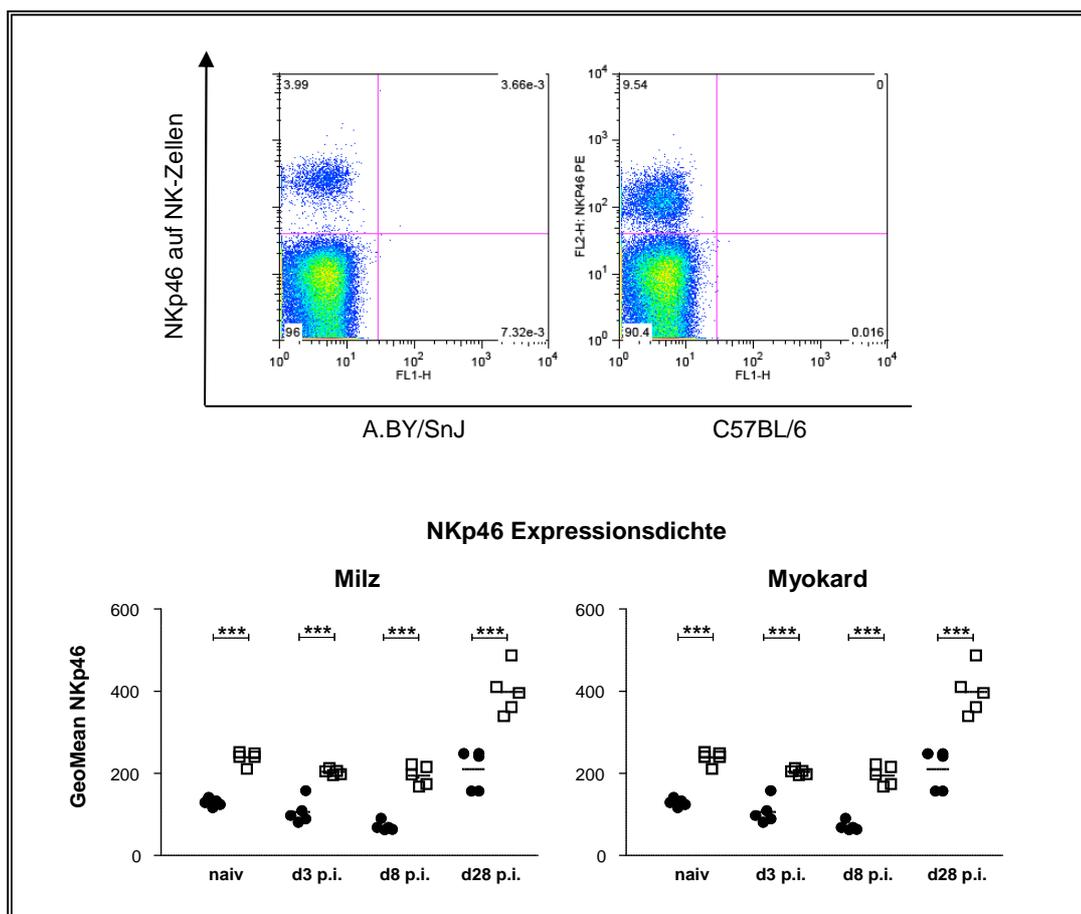


Abbildung 13: A.BY/SnJ (□) Tiere zeigen eine höhere Expressionsdichte des aktivierenden Rezeptors NKp46 auf der NK-Zellmembran als C57BL/6 (●) Mäuse. Dargestellt ist die NKp46⁺ Expression auf NK-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte über den t-Test (*).

3.4.2 Einfluss einer NKp46-Deletion auf den Verlauf einer CVB3 Myokarditis

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen wurde untersucht, welche Auswirkung eine Deletion des NKp46 Rezeptors auf den Verlauf einer CVB3-Infektion hat. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden homozygote NKp46 ko ($NCR1^{gfp/gfp}$) Tiere, die durch Deletion des NKp46 Rezeptors bei gleichzeitiger Implementation einer GFP-Kassette aus C57BL/6 Mäusen hervorgehen, in die Analysen einbezogen. Die experimentelle Untersuchung der Tiere erfolgte jeweils an Tag 0, 4p.i., 8p.i. und 28p.i. nach CVB3 Inokulation. Als Kontrolltiere dienten C57BL/6 Mäuse. Die Auswertung basierte auf der Charakterisierung myokardialer Gewebeerstörung und der Bestimmung des Grades der Entzündung durch histologische Analysen mit Hämatoxylin/Eosin oder Masson Trichrom Färbung an deparaffinierten Herzmuskelgewebeschnitten. Der Nachweis replizierender Viren wurde, wie bereits von Klingel *et al.* (114) beschrieben, durch RNA/RNA *in situ* Hybridisierung (ISH), mittels einer ^{35}S -markierten CVB3-spezifischen Sonde, an 5µm dicken Paraffinschnitten der Herzen durchgeführt.

Wie aus Abbildungen 14 und 15 hervorgeht, konnte an Tag 4p.i. eine vermehrte Infiltration von mononukleären Entzündungszellen in das Myokard CVB3-infizierter $NCR1^{gfp/gfp}$ Mäuse im Gegensatz zu Wildtyp (wt) C57BL/6 Mäusen beobachtet werden. Diese Entzündung sowie die durch Nekrose der Myozyten charakterisierte Herzschädigung erreichte ihr Maximum am Tag 8p.i.. Jedoch war am Tag 28 der CVB3-Infektion in $NCR1^{gfp/gfp}$ Mäusen keine Chronifizierung der akuten Myokarditis festzustellen. Interessanterweise konnte durch die Infektionsstudie an NKp46 ko Tieren gezeigt werden, dass im Myokard der $NCR1^{gfp/gfp}$ Mäuse am Tag 4p.i. und 8p.i. im Vergleich zu den wt C57BL/6 Kontrollmäusen eine verstärkte Virusreplikation auftrat (Abbildung 16), allerdings am Tag 28p.i. keine CVB3-RNA mehr detektierbar war (Daten nicht gezeigt). Aufgrund fehlender Viruspersistenz als auch der positiven histologischen Befunde am Tag 28p.i. ist davon auszugehen, dass die $NCR1^{gfp/gfp}$ Mäuse keine chronische Myokarditis infolge einer CVB3-Infektion entwickeln.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Deletion des aktivierenden Rezeptors NKp46 auf NK-Zellen initial zu einer verstärkten akuten Virusmyokarditis führte, aber dessen ungeachtet, CVB3 im Verlauf der Infektion eliminiert werden konnte und keine chronische Entzündung resultierte.

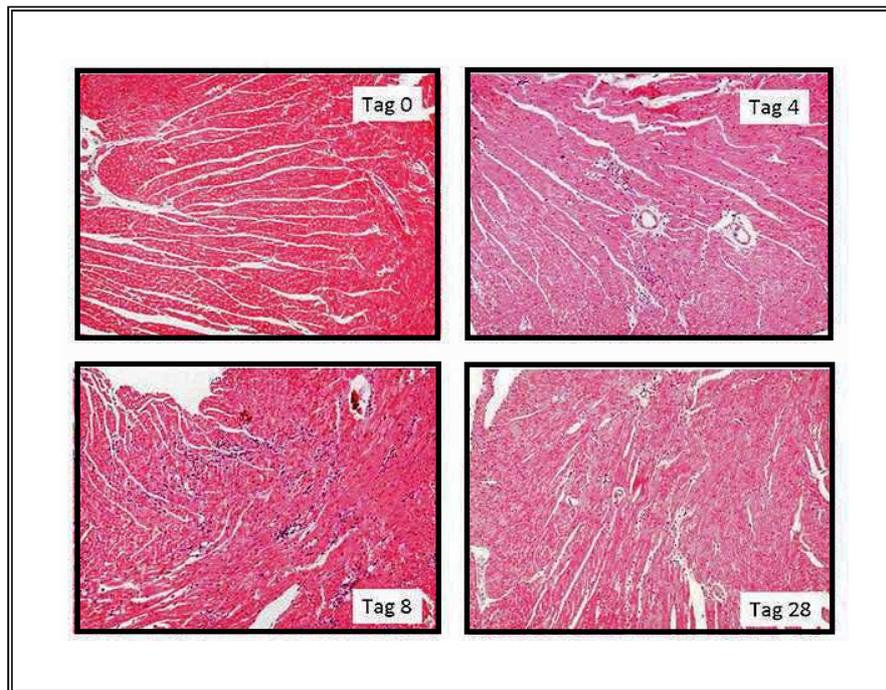


Abbildung 14: Die Deletion des NKp46 Rezeptors in $NCR1^{gfp/gfp}$ Mäusen führt infolge einer Infektion mit CVB3 zu einer verstärkten Infiltration von mononukleären Zellen in das Herzgewebe. Dargestellt sind mit Hämatoxylin/Eosin gefärbte Paraffinschnitte des Herzes von $NCR1^{gfp/gfp}$ Mäusen vor Infektion und an Tag 4p.i., 8p.i. und 28 p.i.. Vergrößerung: x100.

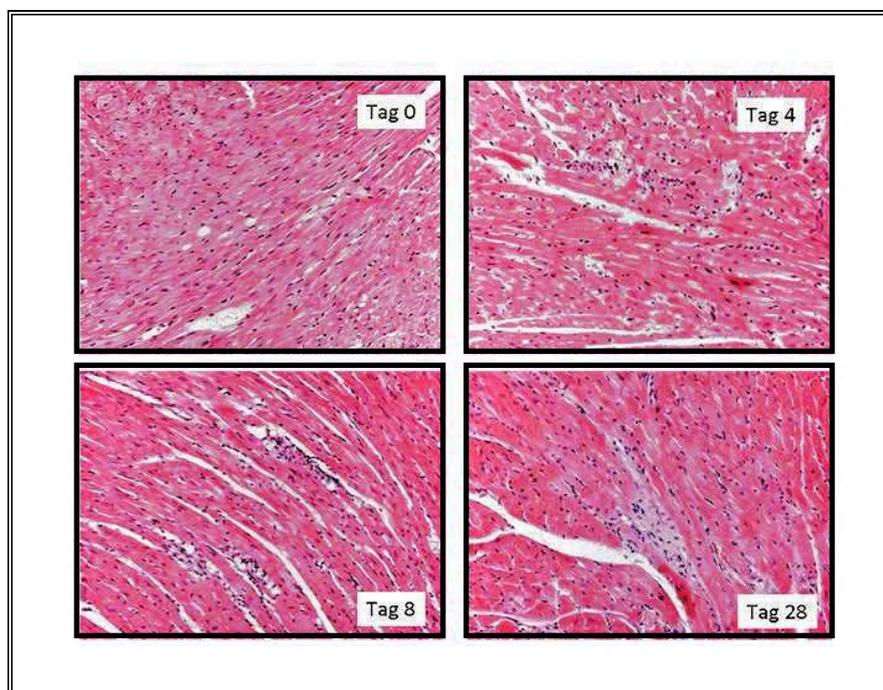


Abbildung 15: Eine CVB3-Infektion resultiert in einer zeitlich begrenzten geringgradigen Infiltration (Tag 4p.i. und 8 p.i.) von mononukleären Zellen in das Herzgewebe von C57BL/6 Mäusen. Dargestellt sind mit Hämatoxylin/Eosin gefärbte myokardiale Paraffinschnitte von C57BL/6 Mäusen vor Infektion und an Tag 4p.i., 8p.i. und 28 p.i.. Vergrößerung: x200.

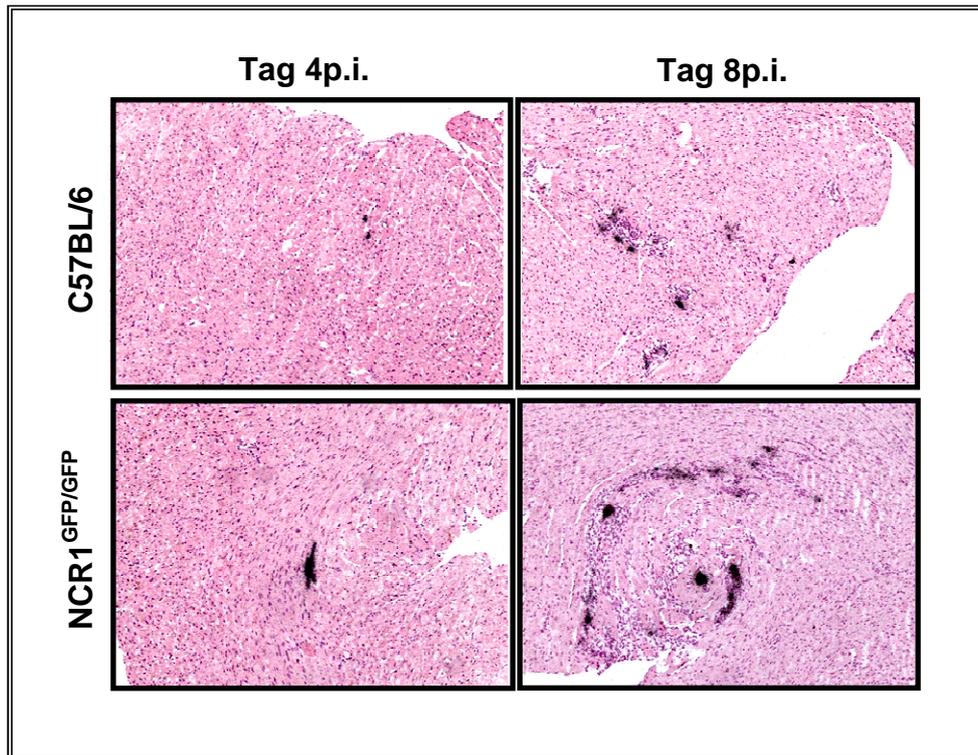


Abbildung 16: Die Deletion des NKp46 Rezeptors führt zu einer erhöhten Replikation von CVB3 Viren im Myokard von $NCR1^{gfp/gfp}$ Mäusen am d8p.i.. Das kardiale Infektionsmuster wurde mit einer CVB3 spezifischen Sonde in der *in situ Hybridisierung* visualisiert. Die Virus RNA wurde durch autoradiographische Signale (schwarze Silberkörnchen) in Herzen CVB3-infizierter $NCR1^{gfp/gfp}$ und C57BL/6 Mäuse am Tag 4p.i. und 8p.i. dargestellt. Vergrößerung: x100.

3.5 Die Bedeutung des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKG2D

3.5.1 Unterschiedliche Expression von NKG2D auf NK-Zellen

Die bisherigen Resultate bezüglich der Einflussnahme des Rezeptors NKp46 auf den Verlauf einer CVB3 Myokarditis einbeziehend, rückte ein weiterer aktivierender NK-Zellrezeptor in den Fokus der Analysen. Zafirova *et al.* konnten zeigen, dass dem aktivierenden Rezeptor NKG2D eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Entwicklung und Proliferation, Homöostase und Regulation der NK-Zellen sowie auf verschiedene Effektorfunktionen zukommt (125). Zur näheren Untersuchung dieses Rezeptors wurde zunächst dessen Expressionsprofil auf splenogenen und kardialen $NKp46^+$ NK-Zellen während einer CVB3-Infektion in beiden Mausstämmen analysiert und verglichen. Im gesamten Verlauf der viralen Infektion zeigten C57BL/6 Tiere eine signifikant höhere Anzahl an splenogenen $NKG2D^+$ NK-Zellen als permissive A.BY/SnJ Mäuse. Zu dem

konnte im späteren Verlauf der Myokarditis (Tag 8p.i. und Tag 28p.i.) auch im Myokard ein größerer prozentualer Anteil infiltrierender NKG2D⁺ NK-Zellen in resistenten Tieren gemessen werden. Hinsichtlich der Expressionsdichte dieses aktivierenden Rezeptors auf der Oberfläche jeder einzelnen NK-Zelle konnte naiv als auch im Zuge der CVB3-induzierten Virusmyokarditis ein signifikant höheres Niveau in C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu A.BY/SnJ Tieren detektiert werden, wobei im resistenten Stamm eine deutliche Expressionsinduktion am 3. Tag nach Inokulation zu verzeichnen war. Im Allgemeinen erreichten splenogene und kardiale NKG2D⁺ NK-Zellen beider Tierstämme ihr Maximum, in Bezug auf die prozentuale Anzahl als auch auf die NKG2D-Expressionsdichte, in der frühen Phase der Erkrankung (Tag 3p.i.) (Abbildung 17). Diese ermittelten Varianzen hinsichtlich der Expression des aktivierenden Rezeptors NKG2D auf NK-Zellen innerhalb beider Mausstämmen ließen erste Schlüsse bezüglich der protektiven Wirkung dieses Rezeptors auf den Krankheitsverlauf einer CVB3-induzierten Myokarditis zu.

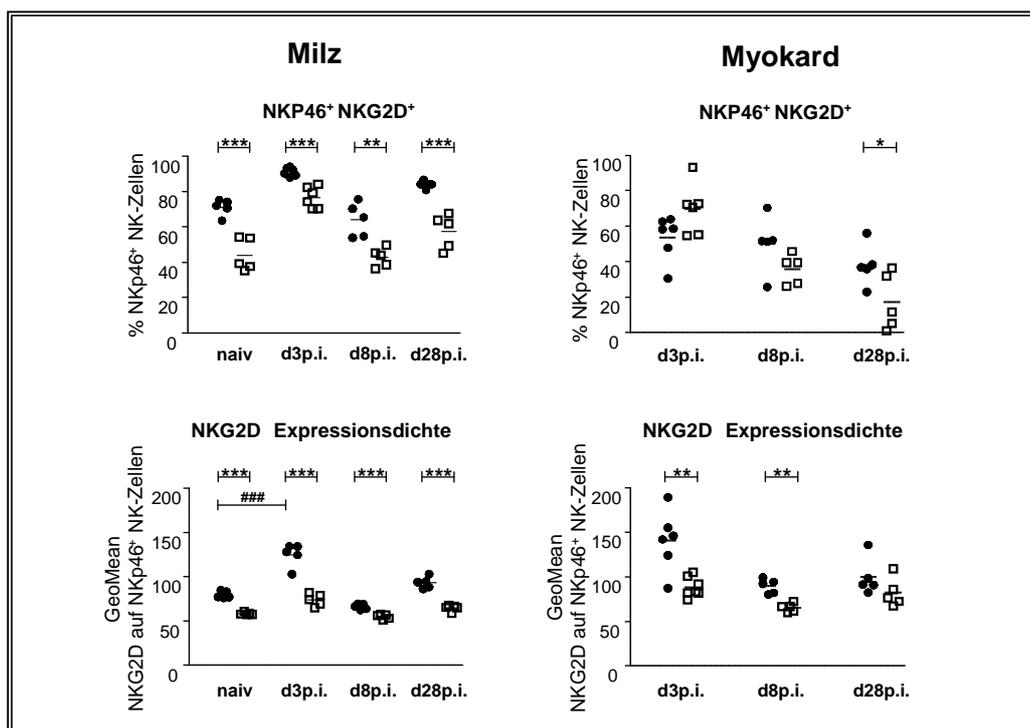


Abbildung 17: Das Expressionsniveau des aktivierenden Rezeptors NKG2D als auch die Infiltration splenogener NKG2D⁺ NK-Zellen ist in C57BL/6 (●) Tieren signifikant höher als im A.BY/SnJ (□) Stamm. Der prozentuale Anteil von Nkp46⁺ NKG2D⁺ NK-Zellen sowie das Expressionsniveau des Rezeptors NKG2D auf der NK-Zellmembran wurden im Verlauf einer CVB3-Infektion bestimmt. Die statistische Auswertung zwischen beiden Mausstämmen erfolgte mit dem t-Test (*). Die statistisch signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Infektion wurden mit *one-way* Anova und Tukey Post Test (#) ermittelt.

3.5.2 Unterschiedliche Expression von NKG2D-Liganden

Die Liganden des NKG2D Rezeptors (NKG2DL) sind überwiegend auf DCs aber auch auf diversen anderen Zellen als Antwort auf zellulären Stress, wie DNA-Schädigung, Tumore oder Infektionen induzierbar. Sie lösen durch Interaktion mit ihrem Reaktionspartner eine NKG2D-abhängige Signalkaskade aus, die in einer Aktivierung der NK-Zelle resultiert. In einem weiterführenden Experiment wurden die NKG2DL MULT1 und RAE-1 δ auf splenogenen Dendritischen Zellen (CD11c⁺) beider Mausstämme analysiert. Dabei konnte ein höherer prozentualer Anteil an CD11c⁺MULT1⁺ und CD11c⁺RAE-1 δ ⁺ Zellen in infizierten C57BL/6 Tieren im Vergleich zu A.BY/SnJ Mäusen festgestellt werden (Abbildung 18). Interessant ist zudem die unterschiedliche Regulation der NKG2DL, während in naiven Tieren beider Mausstämme die Frequenz der NKG2DL exprimierenden DCs vergleichbar war, zeigten ausschließlich resistente C57BL/6 Tiere nach einer CVB3-Inokulation eine deutliche Induktion dieser. Dieses Ergebnis unterstreicht die bedeutende Funktion des aktivierenden Rezeptors NKG2D in der effektiven Immunabwehr einer CVB3-induzierten Myokarditis.

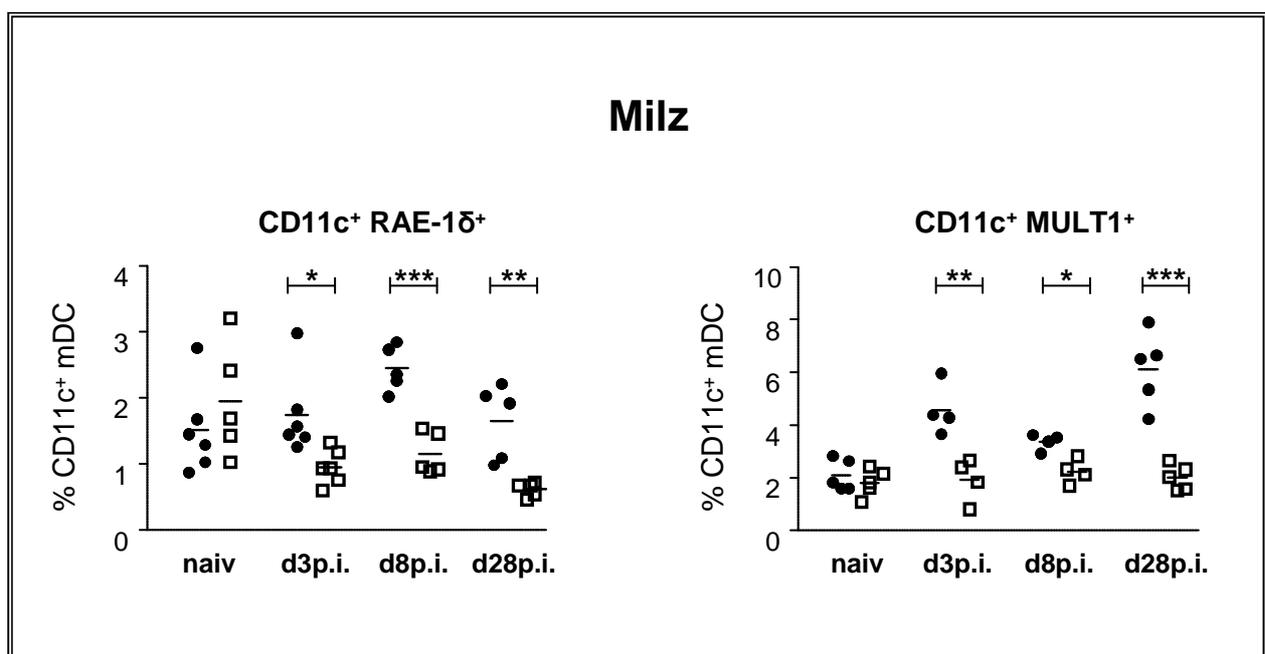


Abbildung 18: C57BL/6 (●) Tiere zeigen nach CVB3-Inokulation eine signifikant höhere Induktion der NKG2DL RAE-1 δ und MULT1 auf CD11c⁺ DCs im Vergleich zu A.BY/SnJ (□) Mäusen. Bestimmung des prozentualen Anteils der NKG2DL MULT1 und RAE-1 δ auf splenogenen DCs im naiven Stadium, am Tag 3p.i., 8p.i. und 28p.i. der CVB3-Infektion. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

3.5.3 Expressionsunterschiede von NKG2DL induzierenden PRRs

Pattern recognition receptors (PRR) spielen eine fundamentale Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Erreger sowie der Aktivierung der adaptiven Immunität. Sie vermitteln durch Registrierung Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) die Produktion immunregulatorischer Zytokine. TLR3, MDA5 und RIG-I sind PRRs, die doppelsträngige RNA (dsRNA), die im Zuge der Replikation verschiedener Viren auftritt, erkennen und die Ausschüttung antiviraler Zytokine initiieren. Während TLR3 in den Endosomen lokalisiert ist, liegen MDA5 und RIG-1 im Zytosol dendritischer Zellen. Hamerman *et al.* und Raulet *et al.* konnten zeigen, dass TLR3, MDA5 und RIG-I nach Pathogenkontakt in der Lage sind die Liganden des aktivierenden Rezeptors NKG2D zu induzieren und so zur Aktivierung von NK-Zellen in pathogenen Prozessen beitragen (126, 127).

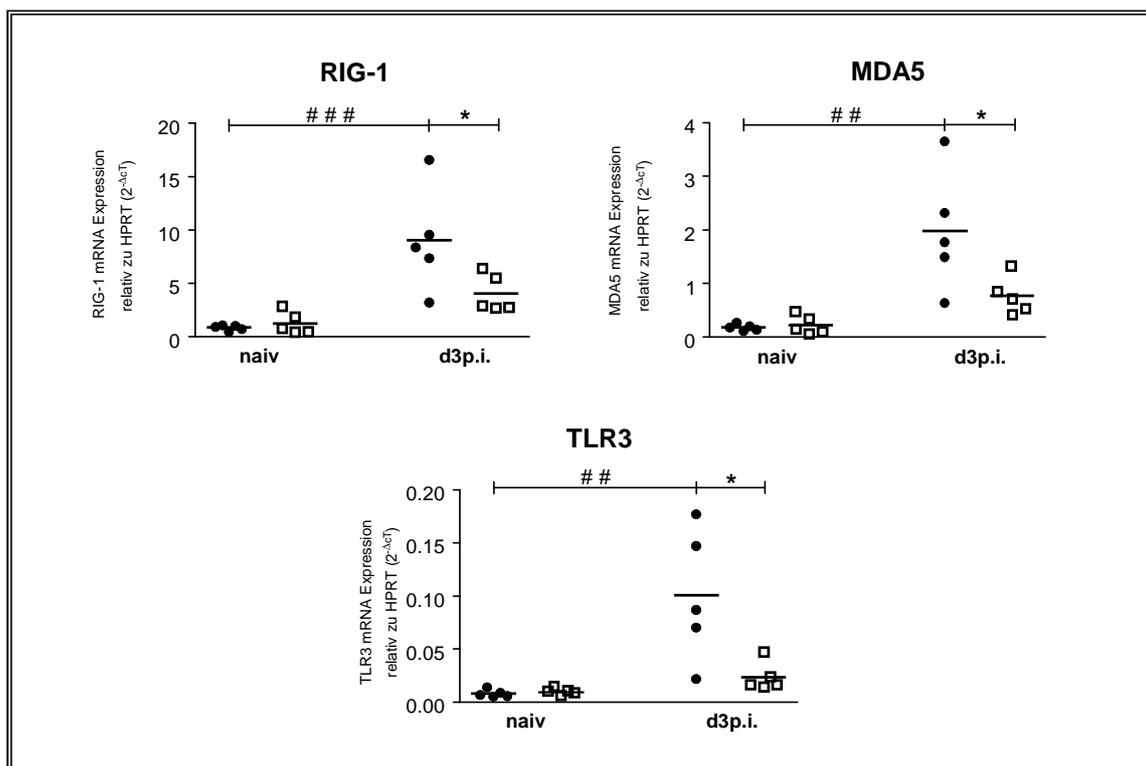


Abbildung 19: Die PRRs TLR3, MDA5 und RIG-I sind im Myokard von C57BL/6 Tieren nach CVB3-Infektion induziert. Quantifizierung der mRNA von TLR3, MDA5 und RIG-I im Myokard von C57BL/6 (●) und A.BY/SnJ (□) Mäusen im Verlauf einer CVB3-Infektion mittels *real-time* PCR. Die statistische Auswertung zwischen beiden Mausstämmen erfolgte mit dem t-Test (*). Die statistisch signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Infektion wurden mit one-way Anova und Tukey Post Test (#) ermittelt.

Die Quantifizierung der beschriebenen PRRs wurde durch Messung der mRNA mittels der *real-time* PCR realisiert. Die Mengenbestimmung wurde dabei relativ zu einem sogenannten Haushaltsgen (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, HPRT) durchgeführt d. h. es erfolgte eine Normierung oder auch ein Mengenvergleich zu einem nicht-regulierten, konstitutiv exprimierten Gen. Damit konnte gezeigt werden, dass die analysierten PRRs TLR3, MDA5 und RIG-1 in Zellen des Myokards resistenter C57BL/6 Mäuse durch die CVB3-Inokulation wesentlich stärker induzierbar waren als in A.BY/SnJ Tieren, und dass diese Induktion im resistenten Mausstamm in einer signifikant höheren Konzentration dieser Rezeptoren am Tag 3p.i. resultierte (Abbildung 19). Diese Mausstamm-spezifische Regulation der PRRs könnte ein Erklärungsmodell bezüglich der differierenden NKG2DL-Expression darstellen und somit, durch die unterschiedlich stark initiierte Stimulation von NKG2D, Einfluss auf den Verlauf einer CVB3-induzierten Myokarditis nehmen.

3.5.4 NKG2D-Expressionsunterschiede auf NK-Zellsubpopulationen

Zur weiteren Charakterisierung der Rolle des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKG2D im Verlauf einer CVB3 Myokarditis wurde dessen Expression auf den zuvor definierten NK-Zellreifestadien untersucht. Dazu wurden NK-Zellen aus der Milz und dem Myokard CVB3-infizierter C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse isoliert und durchflusszytometrisch hinsichtlich der Induktion des NKG2D Rezeptors analysiert. Damit konnte gezeigt werden, dass resistente C57BL/6 Tiere einen signifikant höheren prozentualen Anteil an splenogenen NKG2D positiven NK-Zellen aufweisen als Mäuse des permissiven A.BY/SnJ Stammes. Diese Unterschiede traten innerhalb der Milz in allen NK-Zellsubpopulationen während des gesamten Verlaufs der CVB3-Infektion auf. Zudem konnte im Herzmuskel der C57BL/6 Tiere während der akuten Phase (Tag 8p.i.) der Virusmyokarditis, binnen der NK-Zelldifferenzierungsstadien, ein signifikant höherer Prozentsatz an NKG2D exprimierenden NK-Zellen nachgewiesen werden als in A.BY/SnJ Mäusen (Abbildung 20). Diese, aus der spezifischen Charakterisierung der NKG2D Expression hervorgehenden Resultate, fundieren die Arbeitshypothese, dass eine frühe Induktion des aktivierenden Rezeptors NKG2D auf NK-Zellen positive Effekte auf eine effiziente Immunabwehr einer Enterovirus-induzierten Myokarditis unter Prävention einer Chronifizierung der Entzündung ausübt.

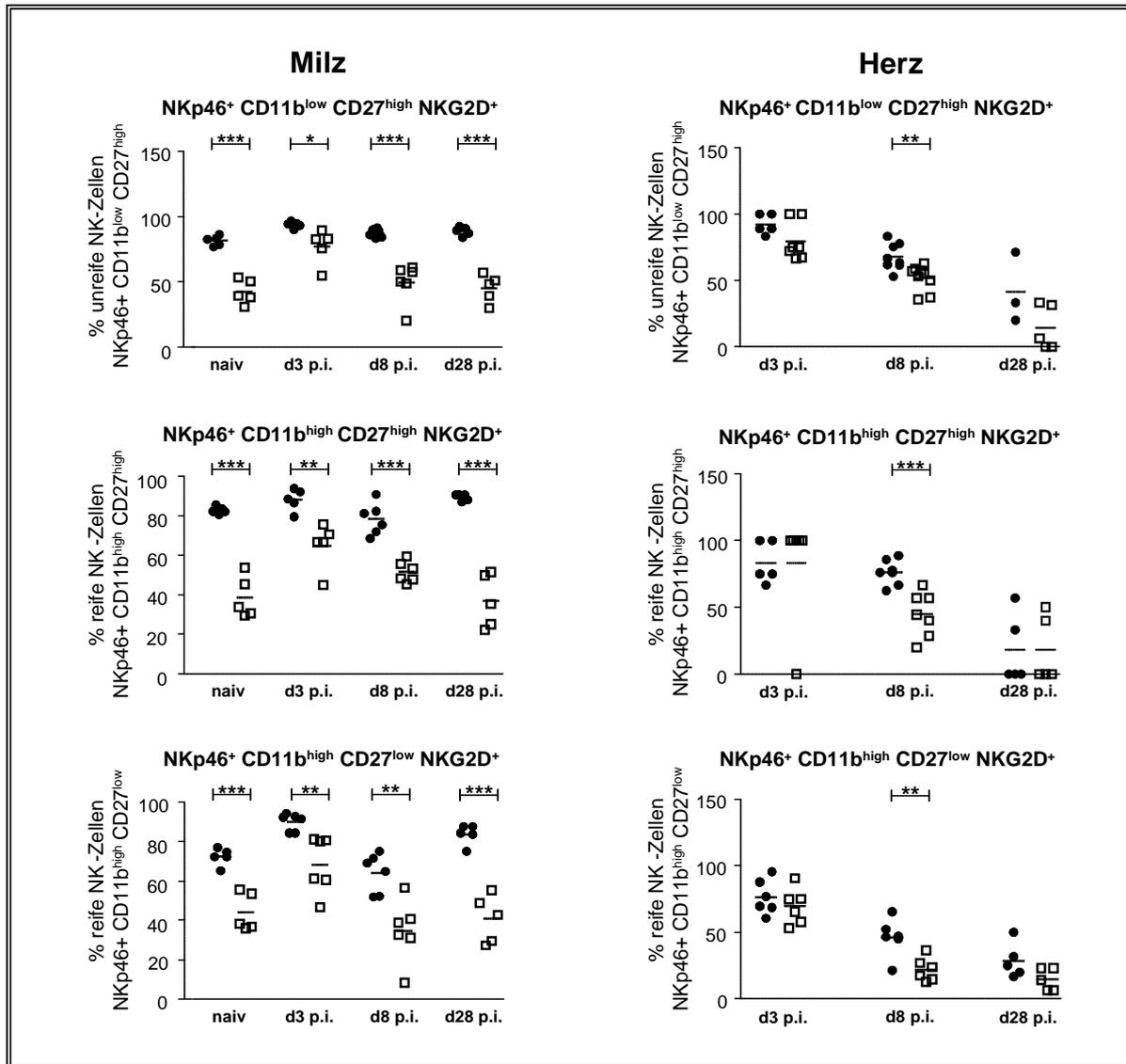


Abbildung 20: Analyse der Expression von NKG2D auf NK-Zellsubpopulationen aus C57BL/6 (●) und A.BY/SnJ (□) Tieren im Verlauf einer CVB3-Infektion. Bestimmung des prozentualen Anteils an NKG2D⁺ NK-Zellen innerhalb der Differenzierungsstadien im naiven Stadium, sowie am Tag 3p.i., 8p.i. und 28p.i. nach CVB3-Infektion. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

3.6 NK-Zellen der C57BL/6 und A.BY/SnJ Tiere unterscheiden sich in ihren NKG2D-abhängigen Effektorfunktionen

Die Zytokinproduktion und die Zytotoxizität sind zwei Haupteffektorfunktionen der NK-Zellen. Die Stimulation aktivierender Rezeptoren auf der Oberfläche der NK-Zellen führt zur Ausschüttung regulatorischer Zytokine wie IFN- γ und zur Degranulation

einschließlich der Sezernierung zytotoxischer Partikel wie Perforin und Granzym B (128).

3.6.1 Unterschiede im NKG2D-vermittelten zytotoxischen Potential

Zielzellen, die NK-Zellen in ihren Effektorfunktionen stimulieren, zeichnen sich unter anderem durch die fehlende Expression von MHC-I Rezeptoren, die Formation von NKG2D-Liganden sowie durch beide Eigenschaften gleichzeitig als NK-zellsensibel aus. Vor diesem Hintergrund wurde das durch NKG2D Liganden Interaktion induzierte Degranulationspotential der NK-Zellen beider Mausstämme nach CVB3-Infektion analysiert und verglichen. Dafür wurden splenogene NK-Zellen der C57BL/6 und A.BY/SnJ Tiere über 4h mit den Tumorzelllinien RMA-S, RMA-H60 und YAC-1 inkubiert und die Degranulation anhand der Mobilisierung von CD107a gemessen. Die Zelllinien RMA-S und RMA-H60 gehen durch Mutation bzw. Transfektion aus der NK-zellresistenten Lymphomzelllinie RMA hervor. Die RMA-S Tumorzelllinie hat einen, durch eine Mutation, nicht funktionsfähigen TAP-Transporter und ist dadurch MHC-I-inkompetent (117). Durch die fehlende Selbstausscheidung durch MHC-I wird das RMA-S-Lymphom nach der „*missing-self* Hypothese“ zu einer Zielzelle für NK-Zellen und erlaubt somit die Analyse der NKG2D-unabhängigen Degranulation. Bei der Zelllinie RMA-H60 handelt es sich um RMA-Zellen, die mit dem NKG2DL H60 stabil transfiziert wurden. Diese Zellen exprimieren H60 konstant auf ihrer Oberfläche und sind dadurch NK-zellsensitiv gegenüber einem NKG2D-abhängigen Signalweg (118). Als Kontrolle diente in diesem Experiment die Tumorzelllinie YAC-1, deren NK-Zellsensitivität auf dem Fehlen von MHC-I („*missing-self* Hypothese“) und der Expression von NKG2DL beruht.

Der CD107a Degranulationstest zeigte die größte Aktivität als Antwort auf die Tumorzelllinie YAC-1, während NK-Zellen gegenüber RMA-S Zellen nur geringe zytotoxische Effekte zeigten. Auf den NKG2D-signalabhängigen Zelllinien RMA-H60 und YAC-1 reagieren C57BL/6 NK-Zellen mit einer signifikant höheren Degranulationskapazität als NK-Zellen aus A.BY/SnJ Mäusen. Interessant war dabei, dass hinsichtlich der Zelllinie RMA-S (NKG2D-unabhängige Aktivierung) lediglich geringe Unterschiede im zytotoxischen Potenzial zwischen resistenten und permissiven Tieren zu messen waren (Abbildung 21). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die

NKG2D-abhängige Aktivierung der NK-Zellen eine bedeutende Rolle in der effizienten Abwehr einer CVB3-Infektion zu spielen scheint.

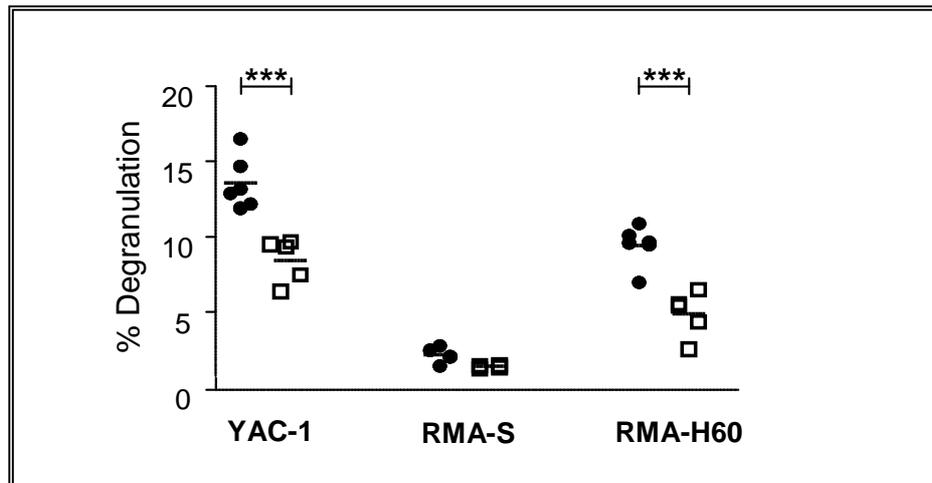


Abbildung 21: NK-Zellen der C57BL/6 (●) Mäuse zeigen eine signifikant größere NKG2D-induzierte Degranulationskapazität im Vergleich zu A.BY/SnJ (□) Tieren. Vergleichende Analyse der NKG2D-abhängigen und -unabhängigen Aktivierung des zytotoxischen Potentials splenogener NK-Zellen aus C57BL/6 (●) und A.BY/SnJ (□) Tieren. Bestimmung der Degranulationskapazität gegenüber den Zielzellen RMA-S (NKG2D-unabhängig), RMA-H60 (ausschließlich NKG2D-abhängig) und YAC-1 (unter anderem NKG2D-abhängig). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

3.6.2 Unterschiede in der NKG2D-vermittelten IFN- γ Sekretion

NK-Zellen können sowohl mit speziellen Zielzellen als auch mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenrezeptoren in ihren Effektorfunktionen stimuliert werden. Zur weiteren Analyse der NKG2D-vermittelten Aktivierung wurden splenogene NK-Zellen durch einen monoklonalen anti-NKG2D Antikörper (Klon: A10, eBioscience, Frankfurt) *in vitro* stimuliert und der Grad der NKG2D-vermittelten Aktivierung anhand der IFN- γ Sekretion bestimmt. Dazu wurde der spezifische anti-NKG2D Antikörper auf Mikrotiterplatten immobilisiert und mit splenogenen NK-Zellen der C57BL/6 und A.BY/SnJ Tiere inkubiert und schließlich die Sekretion von IFN- γ durchflusszytometrisch bestimmt. Die Auswertung der Analyse demonstrierte eine signifikant stärkere Aktivierung und höhere IFN- γ Sekretion in NK-Zellen der C57BL/6 Mäuse im Vergleich zu A.BY/SnJ Tieren (Abbildung 22). Mit diesem Resultat konnte ein weiteres Mal bewiesen werden, dass NK-Zellen des C57BL/6 Stammes in ihrer Aktivierung und in ihrem zytotoxischen Potential kompetenter sind als solche aus A.BY/SnJ Tieren und, dass dieses Phänomen auf einen NKG2D-vermittelten Signalweg zurückzuführen ist.

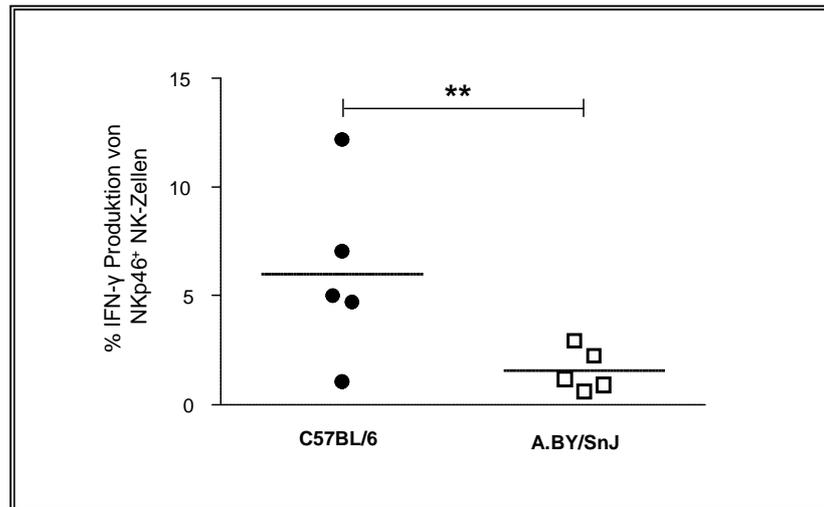


Abbildung 22: Die NKG2D-induzierte IFN- γ Sekretion in NK-Zellen ist in resistenten C57BL/6 (●) Mäusen signifikant höher als in A.BY/SnJ (□). Anti-NKG2D AK wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert und in Anwesenheit von NK-Zellen 4h bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die IFN- γ Produktion der NK-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

3.6.3 Unterschiedliche Expressionsregulation der NKG2D Adaptermoleküle DAP10 and DAP12

NKG2D wird als Homodimer in Assoziation mit zwei Adapterproteinen DAP10 und DAP12, welche wichtige Funktionen in der Signalübertragung übernehmen, auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert. Im murinen System unterscheidet man zwei Isoformen des Rezeptors. Ruhende NK-Zellen exprimieren die lange Isoform NKG2D-*Long*, welche mit DAP12 assoziiert ist, während aktivierte NK-Zellen auch die kurze Form NKG2D-*Short*, in Verbindung mit DAP10 und DAP12, bilden. DAP10 aktiviert die PI3-Kinase, die hauptsächlich Zytotoxizität und Fortleben der NK-Zelle induziert, während das ITAM-haltige DAP12 Kinasen der Src-Familie aktiviert (ZAP70 und Syk), welche die Sekretion von Zytokinen initiiert und die Zytotoxizität von NK-Zellen stimuliert (64, 80). In aktivierten NK-Zellen wird sowohl der ITAM-basierende als auch der PI3-Kinase (PI3K) Signalweg stimuliert. Um den Mechanismus des NKG2D-induzierten Signalwegs in Bezug auf eine CVB3 Myokarditis genauer zu verstehen, wurde die mRNA der Adapterproteine DAP10 und DAP12 mittels *real-time* PCR untersucht.

In unserem Mausmodell konnte eine erhöhte Expression beider Adaptermoleküle, DAP10 und DAP12, in NK-Zellen des Myokards von C57BL/6 Tieren im Vergleich zu

CVB3-sensitiven A.BY/SnJ Mäusen nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz spiegelte sich an allen gemessenen Zeitpunkten der Infektion wider und war in der frühen Phase der CVB3 Myokarditis (d3p.i.) signifikant nachweisbar. Das ermittelte Ergebnis gibt grundlegende Hinweise hinsichtlich der Hintergründe der effektiveren NKG2D-vermittelten NK-Zellaktivierung in C57BL/6 Tieren (Abbildung 23).

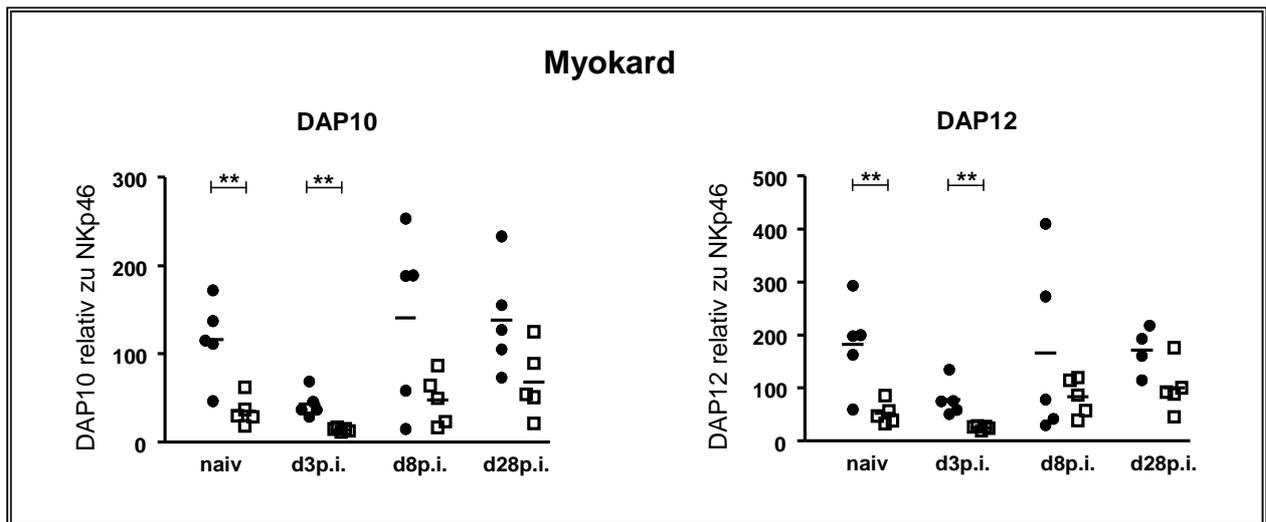


Abbildung 23: Expressionsunterschiede innerhalb der NKG2D Adapterproteine DAP10 und DAP12 im Verlauf einer CVB3-Infektion im Myokard von C57BL/6 (●) und A.BY/SnJ (□) Tieren. Dargestellt ist die Expression der DAP10 und DAP12 mRNA relativiert auf NKp46. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

3.7 NKG2D-Neutralisation resultiert in progressivem Verlauf der CVB3 Myokarditis

Im Verlauf einer CVB3-Infektion zeigen ins Myokard infiltrierende NK-Zellen der resistenten C57BL/6 Tiere neben einem prozentual erhöhten Anteil des aktivierenden Rezeptors NKG2D auch eine effizientere Aktivierung durch NKG2D-vermittelte Signaltransduktion. Diese Resultate lassen auf eine fundamentale Rolle dieses Rezeptors für eine effektive enterovirale Immunantwort schließen. Um die bisher ermittelten Daten zu fundieren, wurde in C57BL/6 Mäusen, durch Injektion eines NKG2D-depletierenden Antikörpers (Klon: C7, eBioscience, Frankfurt), die Signalübertragung und NK-Zellaktivierung durch diesen Rezeptor deaktiviert und deren Konsequenzen auf eine CVB3 Myokarditis analysiert.

3.7.1 NKG2D-Neutralisation reduziert die Effizienz der Viruselimination

Die NKG2D-neutralisierten C57BL/6 Tiere bzw. die mit einem Kontrollantikörper (Armenian Hamster IgG) behandelten Mäuse wurden mit CVB3 infiziert und anschließend in Myokardgewebeschnitten die Menge an replizierender CVB3-RNA mittels der *in situ* Hybridisierung detektiert sowie der pathogene myokardiale Verlauf der Erkrankung durch immunhistochemische Färbungen veranschaulicht. Wie in Abbildung 24 dargestellt führte die *in vivo* Neutralisation von NKG2D in C57BL/6 Tieren und anschließende CVB3-Inokulation zu einer erhöhten Viruslast innerhalb des Myokards sowie zu ausgedehnten kardialen inflammatorischen Läsionen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen, die mit dem Kontrollantikörper behandelt wurden.

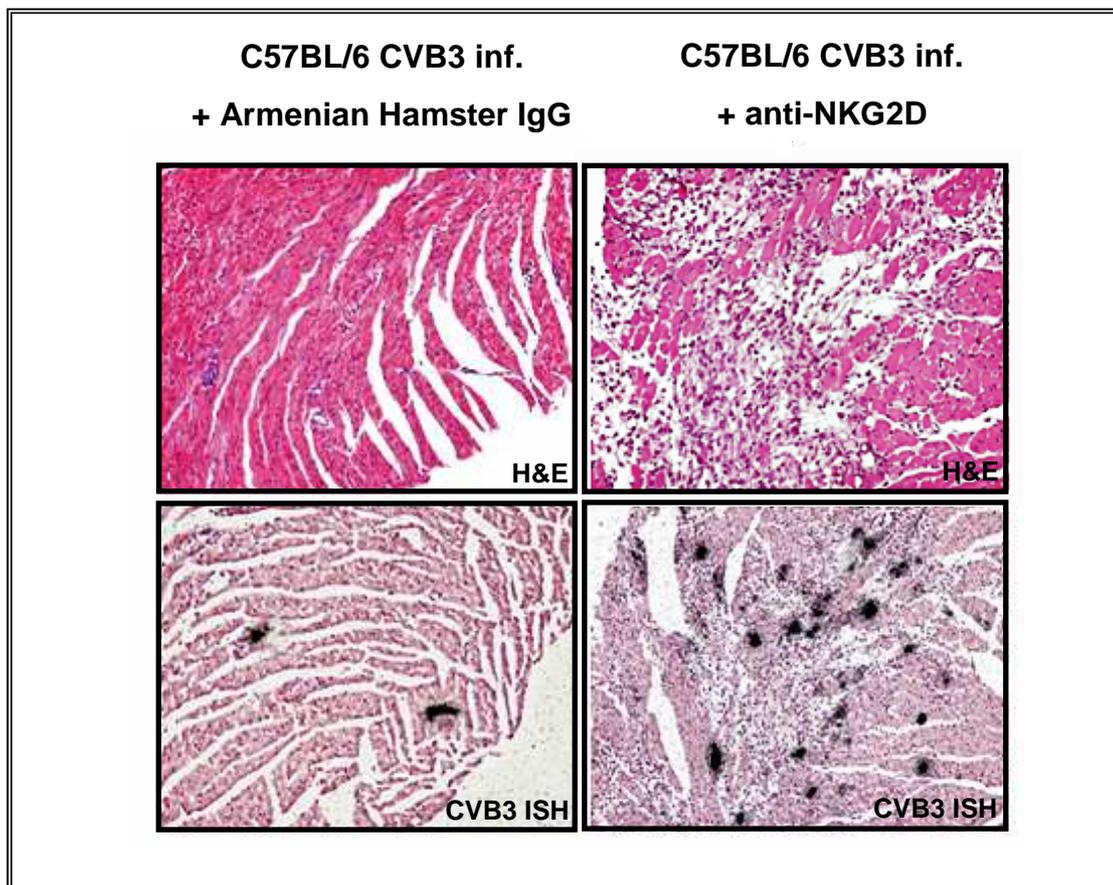


Abbildung 24: Die *in vivo* Neutralisation von NKG2D verstärkt die CVB3-induzierte Myokarditis.

Dargestellt sind Gewebeschnitte vom Myokard CVB3-infizierter C57BL/6 Tiere, die zuvor mit einem NKG2D-neutralisierenden Antikörper bzw. mit einem Kontrollantikörper (Armenien Hamster IgG) behandelt wurden. Nach einer NKG2D-Neutralisation konnten vermehrt myokardiale inflammatorische Läsionen (H&E-Färbung) sowie eine erhöhte Viruslast (*in situ* Hybridisierung ISH) nachgewiesen werden. Vergrößerung x100.

3.7.2 Einfluss der NKG2D-Neutralisation auf verschiedene Lymphozyten

Analysiert wurden die Auswirkungen der NKG2D-Neutralisation in Bezug auf die Entwicklung einer NK-Zell-, DC- und T-Zellantwort infolge der Infektion mit CVB3 (Tag 8p.i.). Dabei konnte eine signifikante Reduktion der splenogenen $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen (Tag 8p.i.: $27,78\% \pm 4,67\%$ vs. $16,03\% \pm 2,94\%$; $p < 0,01$) sowie eine Zunahme der splenogenen $CD3^+ CD4^+$ T-Zellen (Tag 8p.i.: $49,56\% \pm 2,67\%$ vs. $68,63\% \pm 4,74\%$; $p < 0,001$) nach NKG2D-Blockade im Vergleich zu Kontrolltieren gezeigt werden. Interessanterweise vollzog sich diese Verschiebung der T-Zellantwort in Richtung eines A.BY/SnJ typischen Phänotyps. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für myeloide DCs gemacht werden. Hierbei verhalten sich die Dendritischen Subpopulationen $CD11c^+ CD8^+$ und $CD11c^+ CD4^+$ DCs in der Milz äquivalent den T-Zellen. Die Frequenz der Gesamtpopulation von DCs und T-Zellen blieb durch die Neutralisation weitestgehend unbeeinflusst (Abbildung 25A).

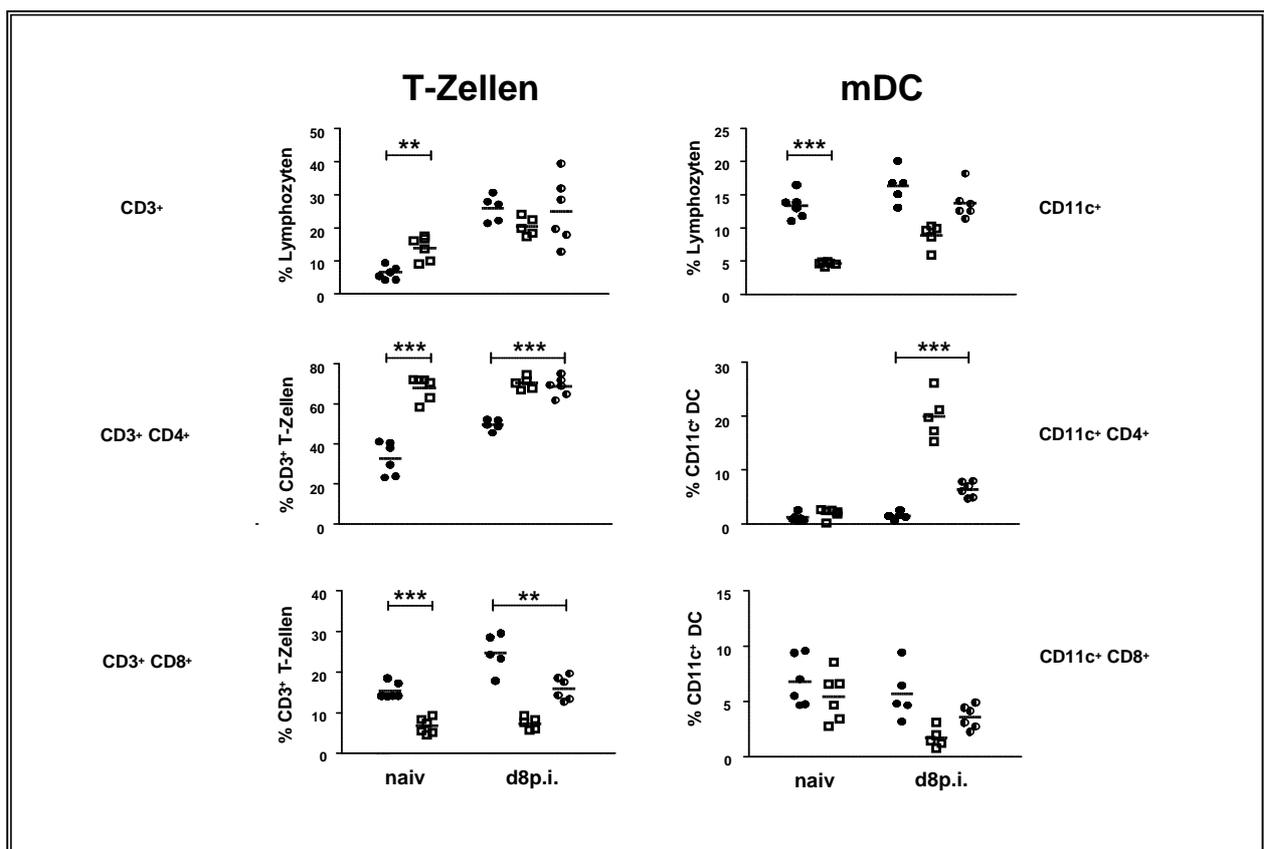


Abbildung 25A: Die NKG2D-Neutralisation führt hinsichtlich der mDC- und T-Zellsubpopulationen zu einem permissiven Phänotyp ähnlich dem der A.BY/SnJ Tiere. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an T-Zellen und mDCs in der Milz von A.BY/SnJ (□), C57BL/6 (●) und NKG2D-neutralisierten C57BL/6^{NKG2D-} (●) Tieren im naiven Stadium und am Tag 8 der CVB3-Infektion. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

Die experimentellen Untersuchungen der NK-Zellen ergaben eine durch die NKG2D-Neutralisation induzierte signifikante Reduktion splenogener NKp46⁺ NK-Zellen am 8. Infektionstag CVB3-inokulierter C57BL/6^{NKG2D}- Tiere (7,89% ± 1,26% vs. 3,76% ± 1,21%; p < 0,001). Auch innerhalb der NK-Zelldifferenzierungsstadien konnten die Auswirkungen der NKG2D-Neutralisation festgestellt werden. Bezüglich der unreifen NK-Zellen (CD11b^{low} CD27^{high}) wurde am Tag 8p.i. der CVB3-Infektion eine signifikante Zunahme dieser Population in C57BL/6^{NKG2D}- Mäusen nachgewiesen, während reife CD11b^{high} CD27^{low} NK-Zellen nach Neutralisation und CVB3-Inokulation in prozentual geringerer Frequenz die Milz infiltrierten (CD11b^{low} CD27^{high}: 7,87% ± 0,93% vs. 11,84% ± 3,40%; p < 0,05 und CD11b^{high} CD27^{low}: 84,08% ± 6,81% vs. 67,03% ± 6,85%; p < 0,01) (Abbildung 25B).

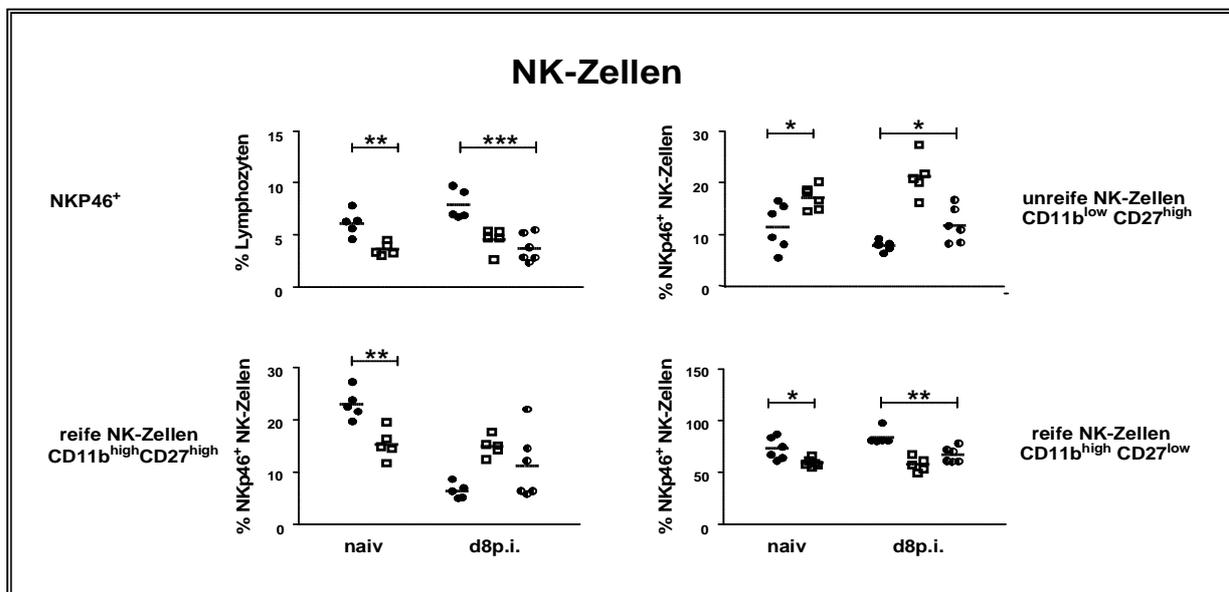


Abbildung 25B: Die NKG2D-Neutralisation führt hinsichtlich der NK-Zelldifferenzierungsstadien zu einem permissiven Phänotyp ähnlich dem der A.BY/SnJ Tiere. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an NK-Zellen, sowie deren Subpopulationen in der Milz von A.BY/SnJ (□), C57BL/6 (●) und NKG2D-neutralisierten C57BL/6^{NKG2D}- (●) Tieren im naiven Stadium und am Tag 8 der CVB3-Infektion. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

Die gezielte Neutralisation des NK-zellaktivierenden Rezeptors NKG2D erzeugte in den depletierten Tieren (C57BL/6^{NKG2D}-) einen lymphozytären Phänotyp ähnlich dem der permissiven A.BY/SnJ Mäuse (Abbildung 25B). Diese Daten suggerieren, dass der insuffizienten CVB3-Elimination und der damit einhergehenden Chronifizierung der Myokarditis in A.BY/SnJ Tieren eine gestörte NKG2D-Signaltransduktion in NK-Zellen zugrunde liegen könnte.

3.8 Progressiver Verlauf der CVB3 Myokarditis in NKG2D ko Mäusen

Die vorangegangenen Experimente haben eine essentielle Rolle von NKG2D in der effizienten Immunabwehr einer enteroviralinduzierten Myokarditis impliziert. Um diese Erkenntnisse weiter zu fundieren, wurden Mäuse (C57BL/6 Hintergrund), die sich durch eine Defizienz des NK-Zellrezeptors NKG2D auszeichnen (NKG2D^{-/-}; NKG2D *knockout* (ko)) (125), mit CVB3 infiziert und der Verlauf der Erkrankung dokumentiert.

3.8.1 Ausgeprägte inflammatorische Reaktion und erhöhte Virustiter in NKG2D ko Mäusen

Ähnlich den Ergebnissen der *in vivo* Neutralisation von NKG2D konnte auch hier ein beschleunigter und progressiver Verlauf der CVB3-induzierten Myokarditis in NKG2D ko Tieren im Vergleich zum C57BL/6 wt beobachtet werden (Abbildung 26).

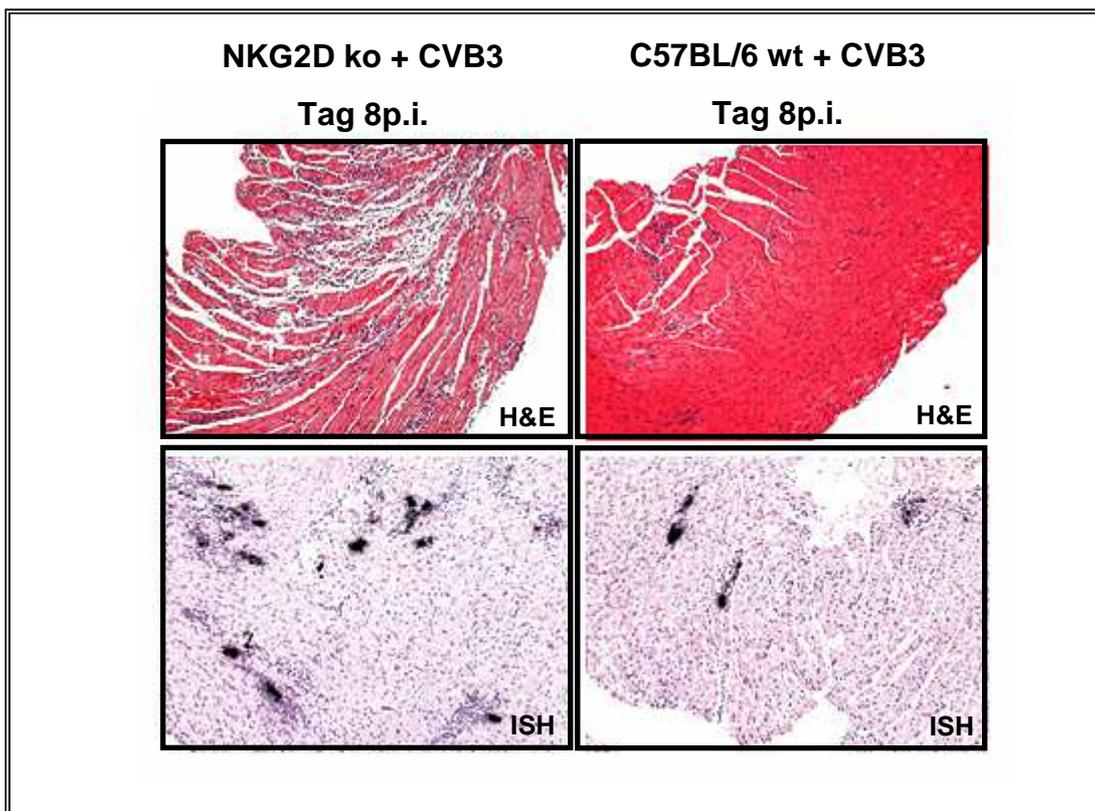


Abbildung 26: CVB3-infizierte NKG2D ko Tiere zeigen eine verstärkte myokardiale Inflammation und eine erhöhte Virusreplikation. Acht Tage nach CVB3-Infektion wurden Gewebeschnitte vom Myokard der C57BL/6 wt und NKG2D ko Tiere durch H&E Färbung und *in situ* Hybridisierung hinsichtlich des Grades der Entzündung und der Menge an replizierender CVB3-RNA analysiert (Vergrößerung x100).

Charakteristisch ist dabei eine starke Myokardzerstörung und erhöhte Virusreplikation gefolgt von einer massiven Infiltration von MAC3⁺ Makrophagen und CD3⁺ T-Zellen. Die Abbildungen 26 und 27 zeigen dies exemplarisch im akuten Stadium der Infektion (d8p.i.).

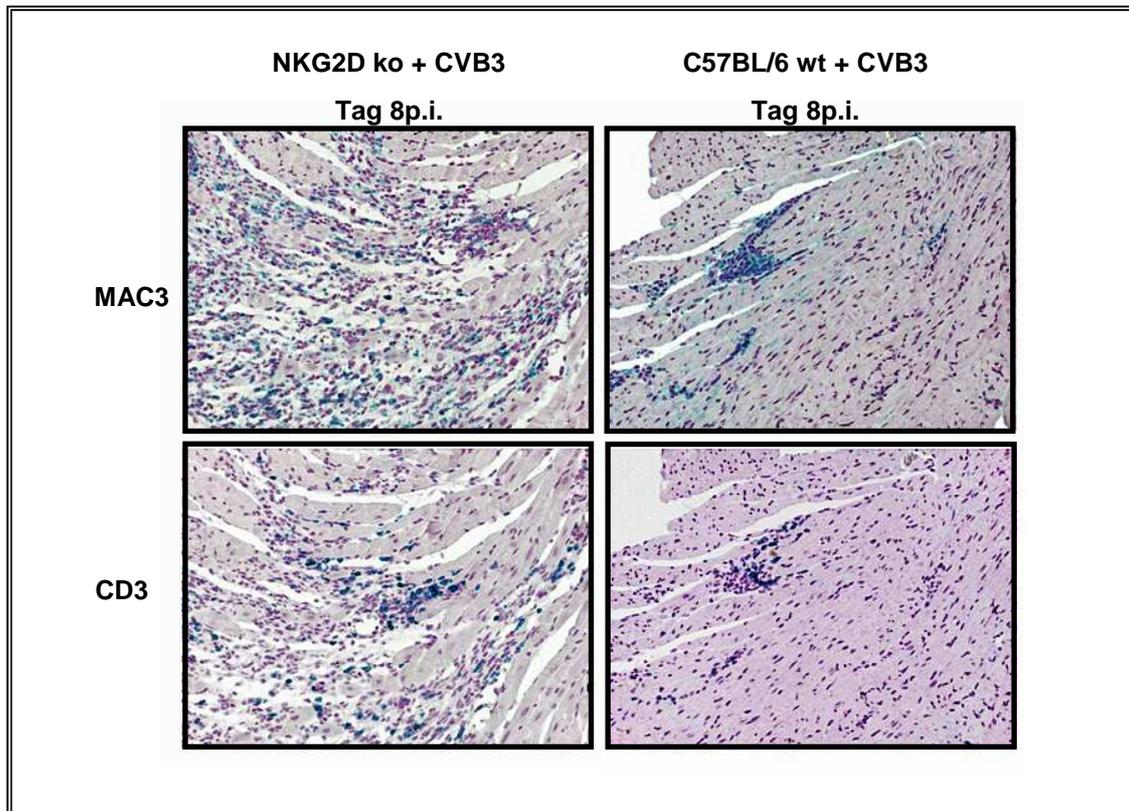


Abbildung 27: CVB3-infizierte NKG2D ko Tiere zeigen eine massive myokardiale Infiltration von Entzündungszellen im Vergleich zu C57BL/6 wt Mäusen. Acht Tage nach CVB3-Infektion wurden Gewebeschnitte vom Myokard der C57BL/6 wt und NKG2D ko Tiere angefertigt und die kardiale Infiltration von MAC3⁺ und CD3⁺ Zellen mittels H&E Färbung veranschaulicht (Vergrößerung x200).

3.8.2 Die NKG2D-Deletion beeinflusst T- und NK-Zellen

Äquivalent den Resultaten aus der NKG2D-Neutralisation konnte bereits am 3. Tag nach CVB3-Inokulation eine signifikante Abnahme der NKp46⁺ NK-Zellfrequenzen sowohl im Myokard ($13.68\% \pm 1.19\%$ vs. $6.72\% \pm 0.96\%$, $p < 0.01$) als auch in der Milz ($2.98\% \pm 0.38\%$ vs. $1.62\% \pm 0.39\%$ $p < 0.05$) von NKG2D ko Tieren im Vergleich zum C57BL/6 wt detektiert werden. Dieser Befund war über den gesamten Infektionszeitraum bis Tag 28p.i. nachweisbar und konnte für splenogene NK-Zellen bereits im naiven Zustand der Tiere festgestellt werden. Ähnliche Erkenntnisse ergaben

sich auch hinsichtlich der NK-Zelldifferenzierungsstadien, wobei reife $CD11b^{high} CD27^{low}$ NK-Zellen das Myokard (Tag 3p.i.: $74,68\% \pm 9,06\%$ vs. $40,48\% \pm 14,23\%$ $p < 0,01$) und die Milz (Tag 3p.i.: $57,40\% \pm 2,06\%$ vs. $35,50\% \pm 3,84\%$ $p < 0,001$) in reduzierter Frequenz im Vergleich zum wt infiltrieren. In Bezug auf eine antivirale T-Zellantwort konnte in CVB3-infizierten NKG2D ko Tieren eine signifikante Verminderung splenogener $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen (Tag d3p.i.: $18,42\% \pm 1,08\%$ vs. $5,63\% \pm 0,50\%$ $p < 0,001$) detektiert werden, die sich allerdings im Myokard nicht nachweisen ließ (Abbildung 28). Besonders beeindruckend ist die Feststellung, dass eine Deletion genau wie eine Neutralisation von NKG2D in einem permissiven Phänotyp mit vergleichbaren CVB3-induzierten immunologischen Prozessen wie in A.BY/SnJ Mäusen resultiert.

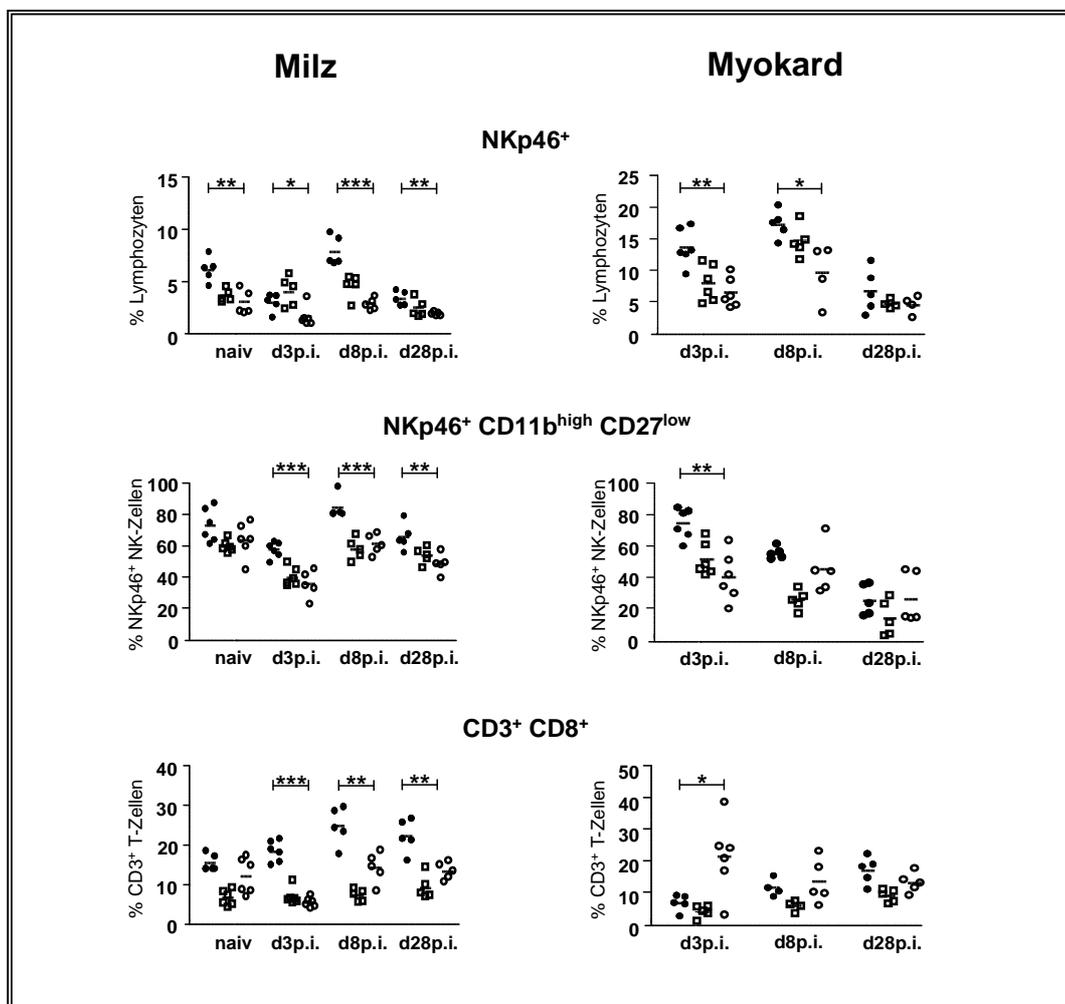


Abbildung 28: Einfluss einer NKG2D-Deletion auf verschiedene Lymphozytenpopulationen im Verlauf einer CVB3-Infektion. Dargestellt ist eine vergleichende durchflusszytometrische Analyse von splenogenen und kardialen NK- und T-Zellen CVB3-infizierter C57BL/6 (●), A.BY/SnJ (□) und NKG2D ko (○) Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

3.9 Adoptiver Transfer von C57BL/6 NK-Zellen mildert den Verlauf der CVB3 Myokarditis in permissiven A.BY/SnJ Tieren

3.9.1 Histologische Analysen

In einem adoptiven Transfermodell der MHC-Haplotyp identischen Mausstämme innerhalb des Myokarditismodells sollte die protektive Wirkung immunkompetenter C57BL/6 NK-Zellen auf den Verlauf einer enteroviralinduzierten Myokarditis bestätigt werden. Dazu wurden NK-Zellen aus der Milz resistenter C57BL/6 Tiere isoliert, anschließend gereinigt und über die Schwanzvene intravenös (i.v.) in A.BY/SnJ Tiere injiziert. Die Analyse erfolgte hinsichtlich der Fragestellung: Sind aktivierte NK-Zellen resistenter C57BL/6 Mäuse in der Lage permissive A.BY/SnJ Tiere vor einem progressiven bzw. chronischen Verlauf einer CVB3 Myokarditis zu schützen? Dazu wurden Transferexperimente mit variierenden zeitlichen Abläufen durchgeführt und der Einfluss der transferierten NK-Zellen auf die Entwicklung einer CVB3 Myokarditis in A.BY/SnJ Tieren am 8. Tag der Virusinokulation immunhistologisch untersucht. Zur Bestätigung des protektiven Potentials erfolgte der Transfer isolierter C57BL/6 NK-Zellen zunächst einen Tag vor CVB3-Infektion der A.BY/SnJ Tiere (TR, Tag -1). In einem weiterführenden Experiment wurde dann, in Herausarbeitung einer therapeutischen Anwendung, die Übertragung der C57BL/6 NK-Zellen auf permissive A.BY/SnJ Mäuse zwei Tage nach CVB3-Inokulation (TR (Therapie) Tag +2) durchgeführt. Mithilfe der *in situ* Hybridisierung und immunhistologischer Färbungen von Herzgewebeschnitten transferierter A.BY/SnJ Tiere wurden dann der Einfluss des adoptiven NK-Zelltransfers auf die Immunabwehr einer CVB3 Myokarditis analysiert.

Nach dem adoptiven Transfer immunkompetenter NK-Zellen aus CVB3-resistenten C57BL/6 Tieren waren im Myokardgewebe von A.BY/SnJ Tieren deutlich verringerte, pathomorphologische Veränderungen, beschrieben durch dezimierte Entwicklung von Myozytennekrosen und Kollagenablagerungen, im Vergleich zum A.BY/SnJ wt zu erkennen. Zusätzlich war der remittierende Verlauf der CVB3 Myokarditis durch einen reduzierten CVB3 RNA-Titer und die begrenzte kardiale Infiltration von Entzündungsmarkern wie CD3⁺ und MAC3⁺ gekennzeichnet (Abbildung 29). Der adoptive Transfer immunkompetenter C57BL/6 NK-Zellen hatte in permissiven A.BY/SnJ Tieren protektive Konsequenzen auf den myokardialen Phänotyp hinsichtlich der Virusreplikation, infektionsbedingter Myokardzerstörung und Inflammation. Er bietet

großes Potential in Bezug auf einen therapeutischen Einsatz zur Behandlung Enteroviral-induzierter Myokarditiden.

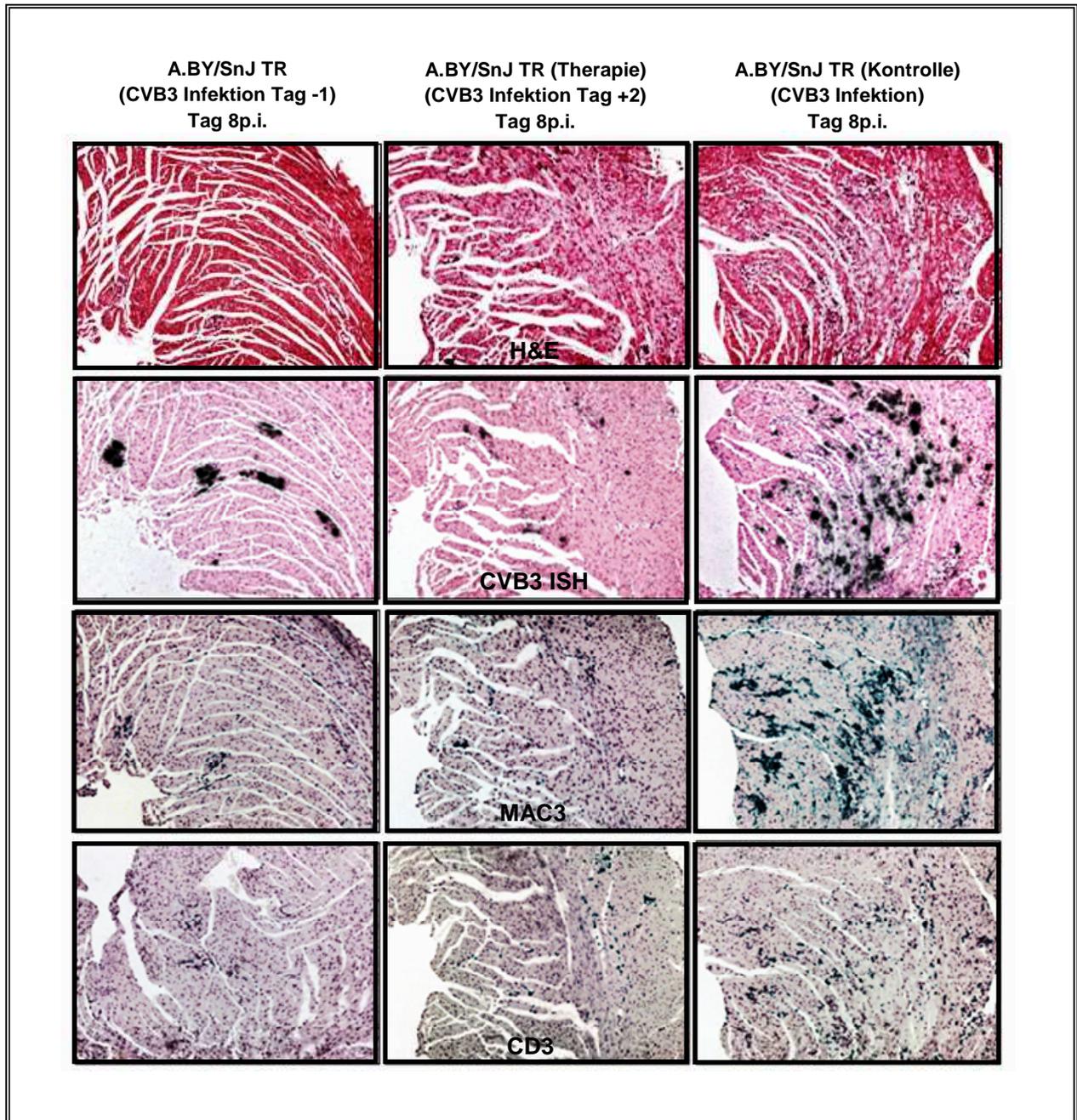


Abbildung 29: Immunkompetente C57BL/6 NK-Zellen haben protektiven Einfluss auf den Verlauf einer CVB3 Myokarditis in permissiven A.BY/SnJ Tieren. Acht Tage nach CVB3-Infektion wurden Gewebeschnitte vom Myokard der transferierten A.BY/SnJ Tiere durch H&E Färbung und *in situ* Hybridisierung hinsichtlich des Grades der Entzündung und der Menge an replizierender CVB3-RNA analysiert. Zusätzlich wurde die kardiale Infiltration von MAC3⁺ und CD3⁺ Zellen durch immunhistochemische Färbungen veranschaulicht (Vergrößerung x100).

3.9.2 Einfluss des adoptiven NK-Zelltransfers auf diverse Lymphozyten

In einer durchflusszytometrischen Analyse wurde der Einfluss des adoptiven Transfers immunkompetenter C57BL/6 NK-Zellen auf verschiedene Lymphozytenpopulationen permissiver A.BY/SnJ Mäuse untersucht. In Bezug auf die Infiltration zytotoxischer T-Zellen und CD8⁺ mDCs konnte insbesondere im therapeutischen Ansatz des adoptiven NK-Zelltransfers ein Effekt der transferierten C57BL/6 NK-Zellen festgestellt werden. Die splenogene Infiltration beider Lymphozytenpopulationen ist, entsprechend den Daten der NKG2D-Neutralisation bzw. NKG2D ko, in transferierten A.BY/SnJ Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zum A.BY/SnJ wt, d.h. durch den NK-Zelltransfer erfolgte eine Verschiebung der CVB3-spezifischen Immunantwort in Richtung des immunologischen C57BL/6 Phänotyps (Abbildung 30).

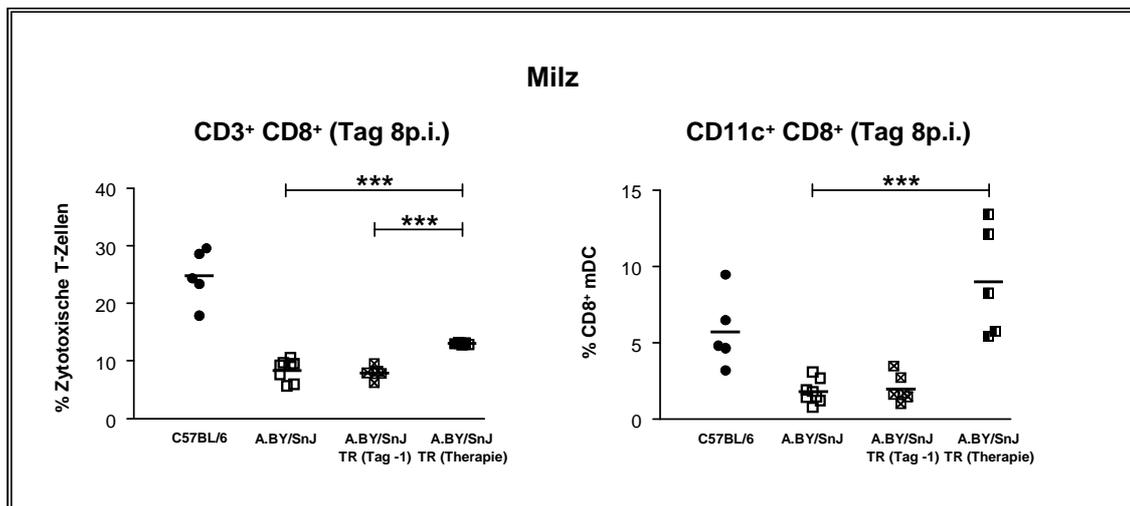


Abbildung 30: Der adoptive Transfer immunkompetenter C57BL/6 NK-Zellen in CVB3-permissive A.BY/SnJ Mäuse resultiert in einer Verschiebung der CTL- und CD8⁺ DC-Immunantwort in Richtung des resistenten C57BL/6 Phänotyps. Dargestellt ist eine vergleichende durchflusszytometrische Analyse von isolierten splenogenen CD8⁺ DCs und zytotoxischen T-Zellen CVB3-infizierter C57BL/6 (●), A.BY/SnJ (□) sowie transferierter A.BY/SnJ TR (Tag -1) (▣) und A.BY/SnJ TR (Therapie, Tag +2) (■) Tiere. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Test (*).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz von NK-Zellen, als wichtige Immunträger der angeborenen Immunität, in Bezug auf die natürliche Resistenz gegenüber einer chronisch verlaufenden Enterovirus-induzierten Myokarditis analysiert. Die Verwendung eines etablierten CVB3 Myokarditis fundierten Tiermodells sollte Aufklärung über die Mechanismen einer effektiven Immunantwort infolge einer CVB3-induzierten Herzmuskelentzündung bringen. Innerhalb dieses Myokarditismodells wurden Mäuse des resistenten C57BL/6 Stammes, der im Zuge einer CVB3-Infektion eine akute Myokarditis ohne Übergang in eine chronische Phase entwickelt, und permissive A.BY/SnJ Tiere, die sowohl eine akute als auch eine chronische Entzündung ausbilden, gegenübergestellt und vergleichend analysiert. Dabei konnten, im Gegensatz zu resistenten Mäusen (C57BL/6), im Verlauf der Chronifizierung zunehmend pathologische Veränderungen der myokardialen Struktur sowie eine Persistenz replizierender CVB3 im Herzgewebe permissiver A.BY/SnJ Tiere nachgewiesen werden. Diese Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der zugrunde liegenden ineffizienten immunologischen Prozesse und Mechanismen leisten, die zur Entwicklung einer chronisch verlaufenden CVB3 Myokarditis führen.

4.1 C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäuse unterscheiden sich hinsichtlich ihrer CVB3-induzierten Immunantwort

Zunächst wurde der Einfluss einer CVB3-Infektion auf diverse Lymphozytenpopulationen in der Milz und im Herz von C57BL/6 und A.BY/SnJ Mäusen untersucht. Hinsichtlich der Migration von T-Zellen konnte in der akuten Phase der Erkrankung (Tag 8p.i.) eine starke kardiale Infiltration innerhalb beider Mausstämme detektiert werden. Interessant war dabei, dass die T-Zellsubpopulationen CD3⁺ CD4⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen sich innerhalb des Mausmodells gegensätzlich verhielten. Während resistente C57BL/6 eine höhere Anzahl Myokard infiltrierender CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen aufwiesen, konnte in permissiven A.BY/SnJ eine höhere Frequenz an CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen gemessen werden (Abbildung 8A). Diese Daten suggerieren, dass eine Verschiebung der T-Zellantwort in Richtung zytotoxischer (CD8⁺) T-Zellen der Entwicklung einer

chronischen CVB3 Myokarditis in Mäusen entgegenwirkt. Die Beteiligung einer CD3⁺ CD8⁺ T-Zellenantwort an einer schützenden CVB3-induzierten Immunantwort, vermittelt durch Zytotoxizität und die Expression protektiver Zytokine, wie IFN- γ , ist umstritten. Kemball et al. konnten zeigen, dass CVB3 die MHC-I basierende Oberflächenpräsentation viraler Epitope auf infizierten Zellen limitieren kann und damit die über diesen Signalweg vermittelte Immunabwehr durch zytotoxische T-Zellen weitestgehend inhibiert wird. Weiterhin geht aus experimentellen Daten dieser Arbeit hervor, dass CVB3 lediglich eine minimale CD3⁺ CD8⁺ T-Zellantwort induziert (129). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine MHC-I abhängige CD3⁺ CD8⁺ T-Zellantwort in Bezug auf eine protektive Funktion bei der Immunkontrolle einer CVB3 Myokarditis nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Weiterhin konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass DCs wichtige Lymphozyten einer effektiven, antiviralen Immunantwort infolge einer CVB3 Myokarditis sind (130). Insbesondere ist dabei auf die Interaktion von DCs mit NK-Zellen hinzuweisen. Andoniou et al. konnten in einem MCMV (murines Zytomegalievirus) basierenden Mausmodell zeigen, dass eine direkte DC-NK-Zellkommunikation zur antiviralen Aktivierung der NK-Zellen erforderlich war, und dass diese Aktivität eine erhöhte Migration, Zytokinausschüttung (IFN- γ) und Zytotoxizität dieser Zellen *in vivo* und *in vitro* zur Folge hatte (131). Diese stimulierende Wirkung auf NK-Zellen konnte für beide Subpopulationen Dendritischer Zellen, mDCs (myeloide DCs) und pDCs (plasmazytoide DCs), beschrieben werden (132,133). Die Wechselbeziehung von pDCs und NK-Zellen führt dabei zu einer Hochregulation von Aktivierungsmarkern und Zytotoxizität der NK-Zellen, aber nur zu einer geringen NK-Zellsekretion antiviraler Zytokine, insbesondere von IFN- γ (134). Im Gegensatz dazu resultiert die Interaktion von mDCs mit NK-Zellen in der Aktivierung der Zytotoxizität, CD69 Expression sowie Migration und vor allem in einer starken IFN- γ Sekretion (135). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit eine signifikant effektivere Induktion von mDCs in der Milz und im Myokard von C57BL/6 Mäusen nachgewiesen werden, während CVB3-suszeptible A.BY/SnJ Tiere eine erhöhte Frequenz an pDCs zeigten (Abbildung 8B). Dieses Phänomen konnte weitestgehend in allen Phasen der Erkrankung beobachtet werden. Aus diesen funktionellen Daten lässt sich schließen, dass eine mDC basierende Aktivierung der NK-Zellen für die Immunkontrolle einer CVB3 Myokarditis effektiver ist als die durch pDCs. Dieses effiziente antivirale Potential der mDCs ist vermutlich auf die Aktivierung

von NK-Zellzytotoxizität und vor allem auf die Induktion einer starken Sekretion des antiviralen Zytokins IFN- γ durch NK-Zellen zurückzuführen.

Zusätzlich konnte ein direkter Einfluss der DC-vermittelten Immunantwort auf eine CVB3-Infektion nachgewiesen werden. DCs sind kompetente Phagozytosezellen, die extrazelluläre Bestandteile durch Aufnahme in ein Phagosom und dessen Fusion mit endosomalen und lysosomalen Kompartimenten prozessieren und präsentieren. Dieser Vorgang führt im entstandenen Endosom zu einer Erhöhung des pH-Wertes und zur Induktion intrazellulärer endosomaler TLRs. Virale Infektionen aktivieren in mDCs unter anderem TLR3, welcher über das Adapterprotein TRIF (*TIR Domain-Containing Adaptor Inducing Interferon*) eine Signalkaskade aktiviert, die zur Induktion von Typ-I und Typ-II Interferonen führt. Riad et al. konnten an TRIF defizienten Mäusen eine essentielle Rolle von TRIF für die Immunkontrolle einer CVB3-Infektion nachweisen. Mäuse, die dieses Adapterprotein nicht exprimieren zeigten nach CVB3-Inokulation eine hohe Viruslast im Herzmuskel, starke myokardiale, pathogene Morphologieänderungen verbunden mit progredienten kardialen Dysfunktionen und einer Mortalität von 100% (136). Im Gegensatz dazu entfalten pDCs ihre antivirale Aktivität überwiegend über den intrazellulär lokalisierten TLR9. Die Stimulation des TLR9 erfolgt, anders als bei TLR3, über die Aktivierung des Adapterproteins MyD88 und führt zur Sekretion von IFN- α und - β . In MyD88 Defizienzstudien konnte nachgewiesen werden, dass MyD88 einen negativen Effekt auf die Immunkontrolle einer CVB3-Infektion hat, belegt durch erhöhte Virustiter (137) und stärker ausgeprägte Myokardentzündungen in MyD88 exprimierenden Mäusen (138). Es ist deshalb anzunehmen, dass die antivirale Immunabwehr in permissiven A.BY/SnJ Mäusen durch die Überexpression von pDCs zusätzlich ungünstig beeinflusst wird.

Hinsichtlich der kardialen Infiltration von NK-Zellen konnte in der frühen (Tag 3p.i.) und akuten (Tag 8p.i.) Phase der CVB3-Pathologie, in beiden Mausstämmen, eine Frequenzzunahme gemessen werden, die in resistenten C57BL/6 Mäusen meist stärker ausfiel als in A.BY/SnJ Tieren (Abbildung 8C). Dieses Resultat fundiert die Vermutung einer dominierenden effizienten NK-Zellantwort in Bezug auf die Immunabwehr einer CVB3-Infektion.

Die phänotypische Charakterisierung des CVB3-basierenden Myokarditis-Mausmodells liefert erste Hinweise auf eine NK-zellspezifische Immunität in resistenten C57BL/6

Tieren, die von einer effizienten Interaktion mit mDCs abhängig ist, aber überwiegend autonom von einer MHC-I vermittelten CD8⁺ T-Zellantwort abläuft.

4.2 Unterschiede in der NK-Zellaktivität zwischen resistenten und permissiven Mäusen

Die Aktivierung von NK-Zellen führt unter anderem zur Induktion ihrer zytotoxischen Funktion. Die Degranulation der NK-Zelle ist gekennzeichnet durch die Ausschüttung zytotoxischer Granula und ist ein Prozess, der dem eigentlichen Vorgang der Zytotoxizität vorausgeht. In der vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass die Degranulationskapazität splenogener IL-2 aktivierter naiver und CVB3-infizierter C57BL/6 NK-Zellen gegenüber der Tumorzelllinie YAC-1 signifikant größer ist als die der IL-2 stimulierten NK-Zellen aus A.BY/SnJ Tieren (Abbildung 9). Die murine Lymphomzelllinie YAC-1 gilt aufgrund ihrer geringen Expression an MHC-I Molekülen in Verbindung mit der Induktion von spezifischen NK-Zellrezeptorliganden als hochsensitiv gegenüber NK-Zellen (50).

Zusätzlich wurde, durch Verwendung der Kardiomyozytenzelllinie HL-1 als Zielzellen im Degranulationsversuch, die äußeren Bedingungen denen während einer CVB3-Infektion bestehenden *in vivo* Verhältnissen physiologisch angepasst. Das Experiment wurde sowohl auf naiven als auch auf CVB3-infizierten (Tag 3p.i.) HL-1 Zellen durchgeführt. Auch hier demonstrierten die aus C57BL/6 generierten NK-Zellen eine signifikant größere Degranulationskapazität im Vergleich zu permissiven A.BY/SnJ NK-Zellen. Zudem führte die CVB3-Infektion der HL-1 Myozyten zu einer verstärkten zytotoxischen Degranulation der NK-Zellen resistenter Tiere, während jene aus A.BY/SnJ Mäusen eine geringe Bereitschaft zur Degranulation zeigten, die zudem durch eine CVB3-Infektion unbeeinflusst blieb (Abbildung 10). Die reduzierte Aktivität zusammen mit der zuvor ermittelten verminderten Frequenz an NK-Zellen in A.BY/SnJ Mäusen verdichten die Hinweise auf eine ineffiziente NK-Zellimmunität als Auslöser der Chronifizierung einer CVB3 Myokarditis in A.BY/SnJ Mäusen.

4.3 C57BL/6 Mäuse zeigen eine höhere Frequenz an reifen NK-Zellen im Vergleich zu A.BY/SnJ

Auch innerhalb der NK-Zellreifestadien, welche anhand des Modells von Chiossone *et al.* klassifiziert wurden, konnten signifikante Unterschiede zwischen beiden Stämmen detektiert werden (123). NK-Zellen werden aufgrund der Expressionsstärke von CD11b in unreife und reife Stadien unterteilt. Dabei beschreibt die niedrige Expression von CD11b (CD11b^{low}) unreife und eine hohe Dichte (CD11b^{high}) reife NK-Zellen. Durch die Expression des Oberflächenmoleküls CD27 werden reife CD11b^{high} NK-Zellpopulationen nochmals in zwei getrennte Untereinheiten, in CD11b^{high} CD27^{high} und CD11b^{high} CD27^{low} Fraktionen, geteilt. Funktionell zeigen beide NK-Zelluntergruppen eine unterschiedlich starke Ausprägung der Zytotoxizität und der Zytokinsekretion. CD11b^{high} CD27^{high} NK-Zellen sind zwar stärker in der Ausbildung des zytotoxischen Potentials jedoch zeigen CD11b^{high} CD27^{low} NK-Zellen eine größere Zytokinsekretion, insbesondere von IFN- γ . In dem verwendeten Myokarditismodell zeigten resistente C57BL/6 Tiere in der Milz als auch im Myokard eine höhere Frequenz an reifen CD11b^{high} CD27^{high} und CD11b^{high} CD27^{low} NK-Zellen als permissive A.BY/SnJ Mäuse. Dieses Ergebnis war im Herz über den gesamten Verlauf der Infektion nachweisbar. Darüber hinaus konnte in A.BY/SnJ Tieren eine höhere Anzahl an unreifen CD11b^{low} NK-Zellen als in Mäusen des Stammes C57BL/6 detektiert werden (Abbildung 12). Dieses Resultat konnte in Übereinstimmung zu den Daten des Degranulationsversuchs gebracht werden, wobei die geringe zytotoxische Aktivität gegenüber YAC-1 Zellen als auch CVB3-infizierter HL-1 Kardiomyozyten unter anderem auf das ungünstige Verhältnis zwischen reifen und unreifen NK-Zellen in A.BY/SnJ Tieren zurückgeführt werden kann.

4.4 Die verstärkte Expression des aktivierenden NK-Zellrezeptors NKp46 hat keinen protektiven Effekt auf den Verlauf einer CVB3 Myokarditis

Die Aktivierung von NK-Zellen kann unter anderem durch die Stimulation aktivierender Rezeptoren, welche auf der Oberfläche infizierter Zellen virale Proteine oder stressinduzierte Moleküle registrieren, katalysiert werden. Einen dieser NK-Zellrezeptoren stellt das NKp46 dar. Es handelt sich dabei um einen MHC-I-unabhängigen, aktivierenden Rezeptor. NKp46 wird früh in der NK-Zellreifung

exprimiert und ist auf allen reifen CD11b^{high} NK-Zellen stabil exprimiert. Er hat eine Schlüsselfunktion in der IL-2-abhängigen NK-Zellreaktivität und ist von großer Bedeutung in der Immunreaktion gegenüber virusinfizierten- und Krebszellen (139). Frühere Studien zeigen, dass dieser Rezeptor an oberflächenpräsentierte Virusproteine wie Hämagglutinin auf influenzainfizierten Zellen und Hämagglutinin-Neuraminidase während einer Sendai-Virus Infektion bindet und eine NK-Zellaktivierung initiiert (94). Weiterhin konnten ihm wichtige Funktionen bei der Tumorerkennung und Tumorzelllyse *in vivo* nachgewiesen werden (95). Zudem wurden kürzlich durch Narni-Mancinelli et al. entdeckt, dass NKp46 eine kritische Rolle bei der Entwicklung einer antiviralen und antibakteriellen T-Zellantwort spielt, d. h., dass die NKp46-abhängige Regulation der NK-Zellaktivität Einfluss auf die optimale Entfaltung einer adaptiven Immunantwort hat (140). Unsere Daten zeigten eine starke Variation der Expressionsdichte dieses Rezeptors zwischen NK-Zellen aus C57BL/6 und A.BY/SnJ Tieren. Überraschenderweise war die zellspezifische Expressionsdichte von NKp46 in permissiven A.BY/SnJ Mäusen pro Zelle signifikant höher als in resistenten Tieren (Abbildung 13). Um die funktionelle Bedeutung von NKp46 in Bezug auf die Etablierung einer CVB3 Myokarditis näher charakterisieren zu können wurden Analysen an CVB3-infizierten NKp46-depletierten Mäusen (C57BL/6 Hintergrund) herangezogen. Die Deletion dieses Rezeptors führte zwar initial zu einer progressiveren Ausprägung der akuten Myokarditis, in deren Verlauf das CVB3 Virus aber vollständig eliminiert werden konnte und sich keine chronische Entzündung etablierte (Abbildungen 14-16). Dieses Resultat suggeriert, dass dieser aktivierende Rezeptor für die effiziente Immunabwehr einer CVB3-Infektion lediglich eine nebensächliche Rolle spielt. Tatsächlich aber sind Studien bekannt, die beschreiben, dass gerade eine geringe Expression des Rezeptors NKp46 positive Effekte auf den Verlauf bestimmter Virusinfektionen hat. Durch Narni-Mancinelli et al. konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust von NKp46 auf der NK-Zelloberfläche zu hyperreaktiven NK-Zellen führen kann, die zum Beispiel bei einer murinen Infektion mit MCMV (murines Zytomegalievirus) eine effizientere Immunabwehr zur Folge hat (140). Zusätzlich konnte in der Arbeit von Pembroke et al. beschrieben werden, dass immunologische Prozesse, die auf einer NKp46-reichen NK-Zellantwort basierten, innerhalb der Leber von Patienten mit HCV-induzierter (humanes Zytomegalievirus) Hepatitis, in einer stärkeren Leberentzündung resultierten als bei Hepatitis-Erkrankten mit verminderter NKp46 Expression. Der Mechanismus der HCV-induzierten Immunpathologie ist dabei auf eine Störung der intrinsischen Homöostase

der NK-Zellen innerhalb der chronisch infizierten Leber zurückzuführen (141). Für die vorliegende Arbeit bleibt zu klären, ob solche Mechanismen, die mit einer gegensätzlichen Korrelation zwischen NKp46 und dem Krankheitsverlauf einhergehen, im Falle einer CVB3-initiierten Immunabwehr zum Tragen kommen.

4.5 Der aktivierende NK-Zellrezeptor NKG2D ist von essentieller Bedeutung für eine effektive CVB3-Immunität

Ein weiterer aktivierend wirkender Rezeptor auf NK-Zellen, der Einfluss auf die Entwicklung der Immunität gegenüber einer CVB3-induzierten Myokarditis haben könnte, ist NKG2D. Dieser Rezeptor ist genau wie NKp46 ein wichtiger Vermittler der NK-zellspezifischen Aktivierung. NKG2D wird große Bedeutung bei der Immunabwehr viraler Infektion, wie beispielsweise Influenza (142), HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) (143), HCMV (144) und EBV (Epstein-Barr-Virus) (145) zugewiesen. Infolge einer Virusinfektion kommt es dabei zur Induktion der Expression verschiedener NKG2DL auf virusinfilierten Zellen. So konnte im Falle einer HIV-Infektion gezeigt werden, dass durch die Expression des viruscodierten Proteins Vpr (virales Protein R) die Induktion der NKG2D-Liganden ULBP1, -2, -3 *in vitro* und *in vivo* stimuliert wurden (143). Dieser Prozess resultiert aus der Vpr-abhängigen Initiation der stresssensiblen wirtszelleigenen ATR Kinase (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*), die unter anderem auch an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist. Zusätzlich konnte eine Hochregulation des NKG2D-Liganden ULBP auf humanen HIV infizierten CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (146). Aber auch eine Infektion mit verschiedenen Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa* (147), *Escherichia coli* (148) und *Mycobacterium tuberculosis* (149) führt zur Induktion von NKG2DL.

Enteroviren, wie CVB3, sind zur Produktion infektiöser Partikel unabhängig von einem intakten Golgi-Apparat. Studien von Kirkegaard und Kollegen zeigen deutlich, dass das Poliovirus protein 3A den Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat inhibieren kann und es infolge dessen zu einer Störung der MHC-I abhängigen Antigenpräsentation und zur Herunterregulation der antiviralen Zytokinsekretion kommt (150, 151). Diese Vorgänge der viralen Mimikry konnten auch für CVB3 nachgewiesen werden. Die Virusproteine 2B, 2BC und 3A inhibieren den Proteintransport durch den Golgi-Apparat ähnlich dem Poliovirus, wobei die Aktivität des 3A Proteins sehr effizient in der Inhibition

der Proteinsekretion ist und bis hin zur Zerstörung dieser Organelle führen kann (152, 153). CVB3 Virusproteine beeinflussen demnach eine effiziente antivirale adaptive Immunantwort durch Störung der Zytokinsekretion und der direkten MHC-I abhängigen Antigenpräsentation. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist anzunehmen, dass für eine erfolgreiche Etablierung einer effektiven antiviralen Immunantwort in erster Linie ein effizienter indirekter Signalweg zur Viruslokalisierung und -elimination erforderlich ist. NKG2D als aktivierender Rezeptor, der unabhängig von einer MHC-I vermittelten Antigenpräsentation induziert wird und Zytokinsekretion sowie zytotoxische Aktivität in NK-Zellen initiiert, könnte somit eine fundamentale Rolle in der anti-CVB3 Immunabwehr spielen. Fundiert wird diese Annahme, durch die Detektion signifikant erhöhter Frequenzen splenogener NKG2D-exprimierender NK-Zellen in resistenten C57BL/6 Tieren im Vergleich zu A.BY/SnJ Mäusen (Abbildung 17). Zudem ist in der Milz und im Myokard die Expressionsdichte des Rezeptors NKG2D auf C57BL/6 generierten NK-Zellen signifikant größer als auf NK-Zellen permissiver A.BY/SnJ Tiere.

Virale Produkte stimulieren die Aktivierung einer NK-Zellaktivität unter anderem durch Induktion von DCs. Die Interaktion von DCs mit NK-Zellen kann Zytotoxizität und Zytokinsekretion MHC-unabhängig noch vor einer zellulären Immunität initiieren (142). Unreife DCs haben effiziente Mechanismen zur Detektion und Aufnahme von Pathogenen. Im Verlauf einer Infektion kommt es zur Reifung der DCs verbunden mit zunehmender Sekretion von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen (154). Ebihara et al. konnten zeigen, dass die im Zuge einer viralen Infektion auftretende Virus-RNA die Expression von NKG2DL auf mDCs induziert und daraus eine NK-Zellproliferation und -aktivierung resultiert (155). In unserem Myokarditismodell konnte nachgewiesen werden, dass im Verlauf einer CVB3 Myokarditis, die Frequenz an NKG2D Liganden (RAE-1 δ , MULT1) exprimierenden mDCs in C57BL/6 Mäusen signifikant höher war als in A.BY/SnJ Mäusen (Abbildung 18).

Primär führt die Inokulation mit RNA Viren und/oder die RNA-Virusreplikation in DCs zur Generation von doppelsträngiger RNA (dsRNA) und damit verbundener Toll-like Rezeptor Stimulation. Während die Aktivierung der pDCs durch Stimulation der PRRs TLR9, welcher DNA-Viren erkennt, und TLR7, der RNA-Viren registriert, erfolgt (156, 157) führt die Interaktion von PAMPs mit TLR3 und TLR4 zu mDC-Aktivität (158, 159). Die Erkennung von PAMPs durch die PRRs hat schließlich die Sekretion von Typ I

Interferonen (pDCs) und die Expression großer Mengen an IL-12 und IFN- γ (mDCs) zur Folge. Sekundär zieht eine Infektion mit RNA-Viren die Expression dsRNA-Sensoren, wie MDA5 und RIG-1 im Zytoplasma nach sich (160). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl die TLR Stimulation als auch die Induktion zytoplasmatischer RNA-Sensoren in einer Hochregulation von NKG2DL resultiert (161). Die von uns generierten Daten weisen darauf hin, dass eine effektive PRR vermittelte antivirale Immunantwort eine positive Wirkung auf eine CVB3 Elimination hat. Im Myokardgewebe CVB3-infizierter C57BL/6 Mäuse war eine deutliche Induktion der Transkripte von TLR3, MDA-5 und RIG-1 zu detektieren, die zudem signifikant größer war als in permissiven A.BY/SnJ Tieren (Abbildung 19).

Die Analyse der NKG2D-Expression auf den durch CD11b und CD27 charakterisierten Reifestadien der NK-Zellen brachte weitere Hinweise in Bezug auf eine effiziente NKG2D-abhängige Immunabwehr der CVB3 Myokarditis. Hayakawa et al. konnten nachweisen, dass innerhalb der reifen NK-Zellen (CD11b^{high}) die CD27^{high} Zellen hohe, weitestgehend NKG2D-unabhängige zytotoxische Kapazität aufweisen, während CD27^{low} NK-Zellen eine wichtige Rolle in Bezug auf eine effektive NKG2D-induzierte Zytotoxizität spielen; wenngleich das zytotoxische Potential der CD11b^{high} CD27^{low} NK-Zellen geringer ist als das der CD11b^{high} CD27^{high} (162). In unserem Mausmodell exprimieren, in allen Phasen der CVB3-Infektion, sowohl mehr unreife (CD11b^{low}) als auch reife (CD11b^{high}) NK-Zellen der resistenten C57BL/6 Mäuse den aktivierenden Rezeptor NKG2D im Vergleich zum A.BY/SnJ Stamm (Abbildung 20). Interessant ist dabei, dass diese Unterschiede im letzten NK-Zellreifestadium (CD11b^{high} CD27^{low}) besonders deutlich ausgeprägt sind. Diese Resultate, in Übereinstimmung mit einer signifikant erhöhten Anzahl an CD11b^{high} CD27^{low} NK-Zellen in C57BL/6 Tieren suggerieren, dass eine NK-zellspezifische NKG2D-vermittelte Zytotoxizität in einer effizienteren CVB3-Immunantwort resultiert als es eine NKG2D-unabhängigen NK-Zellaktivierung vermag.

Die bisher generierten Daten weisen auf eine starke Initiation reifer NK-Zellen im Zusammenhang mit einer kompetenten Vermittlung NKG2D-induzierter Effektormechanismen bezüglich der erfolgreichen Immunabwehr einer CVB3-Infektion hin. Diese Erkenntnisse werden weiterhin fundiert durch Analysen der NKG2D-vermittelten Zytotoxizität von NK-Zellen anhand der Messung der

Degranulationskapazität gegenüber einer NKG2DL-exprimierenden Zelllinie RMA-H60. Splenogene NK-Zellen aus resistenten C57BL/6 Tieren zeigten dabei eine signifikant höhere NKG2D-induzierte zytotoxische Aktivität im Vergleich zu denen aus A.BY/SnJ Mäusen (Abbildung 21). Der permissive Mausstamm A.BY/SnJ zeigt große Defizite innerhalb der NKG2D-umfassenden Funktionen, welche eine effiziente Immunabwehr einer CVB3-Infektion beeinträchtigen. Diese Hypothese wird zusätzlich gestützt durch die zuvor ermittelte stärkere Degranulationskapazität splenogener C57BL/6 NK-Zellen infolge einer Koinkubation mit murinen Kardiomyozyten der Zelllinie HL-1 im Vergleich zu A.BY/SnJ NK-Zellen. Bemerkenswert ist dabei, dass in HL-1 Zellen eine CVB3-initiierte Hochregulation der Expression von NKG2DL (MULT1, RAE-1 δ , RAE-1 ϵ) *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Abbildung 31).

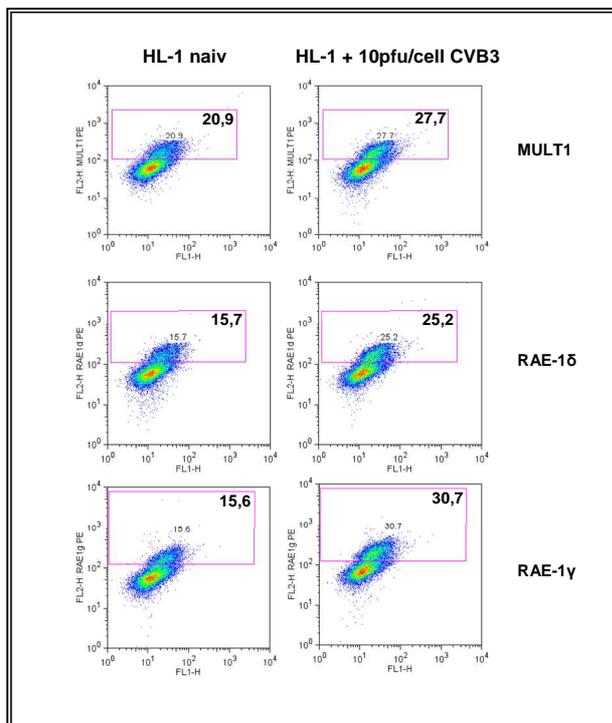


Abbildung 31: Eine CVB3-Infektion führt in der Kardiomyozytenzelllinie HL-1 zur Induktion von NKG2DL.

Expression der NKG2DL MULT1, RAE-1 δ und RAE-1 γ auf CVB3 infizierten HL-1 Zellen *in vitro*. Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse in dot plot Graphen.

Die NK-zellspezifische Sekretion von IFN- γ spielt eine große Rolle in der frühen Abwehr viraler Infektionen und reguliert die angeborene und erworbene Immunität gegenüber Pathogenen. So konnte bisher gezeigt werden, dass eine effektive IFN- γ Antwort protektiven Einfluss auf virusinduzierte pathogene Prozesse einer LCMV Infektion hat, und dass diese in erster Linie durch NK-Zellen prozessiert wird (163). IFN- γ wird durch NK-Zellen in großen Mengen sezerniert und in diesen unter anderem durch NKG2D-NKG2DL Interaktion sowie durch Stimulation mit IL-12, IL-18 und IL-2 induziert (164, 165). Eine *in vitro* Stimulation von NKG2D auf der Oberfläche C57BL/6 NK-Zellen durch

immobilisierte anti-NKG2D Antikörper führte in unserem Modell zu einer signifikant höheren IFN- γ Sekretion in resistenten Tieren im Vergleich zu NK-Zellen des A.BY/SnJ Stammes (Abbildung 22). IFN- γ erkennt, im Zuge einer Virusinfektion auftretende, dsRNA und trägt maßgeblich zur Immunkontrolle der Infektion bei. Durch Bildung des Liganden-Rezeptorkomplexes, bestehend aus zwei Molekülen IFNGR1 und 2 (Interferon Gamma Rezeptor) sowie einem IFN- γ Homodimer, werden Komponenten des STAT Signalwegs in Zielzellen stimuliert und ein breites Spektrum immunregulatorischer Funktionen initiiert (166). Übertragen auf unser Myokarditismodell bedeutet eine frühzeitig in der Infektion initiierte starke NKG2D-induzierte IFN- γ Sekretion im Zusammenspiel mit einer effektiven NKG2D-vermittelten Zytotoxizität von NK-Zellen eine optimale CVB3 Immunität gekennzeichnet durch geringe Viruslast und reduzierte Myokardschädigungen.

Während die NKG2D-vermittelte Sekretion von IFN- γ hauptsächlich über den DAP12-Syk-Zap70 Signalweg stimuliert wird, ist die NKG2D-abhängige Aktivierung der NK-Zellzytotoxizität durch DAP10 oder DAP12-SYK-Zap70 induzierbar (167). Die Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 sind in unterschiedlicher Art und Weise mit dem aktivierenden Rezeptor NKG2D assoziiert und bilden so die lange (DAP12) und die kurze (DAP10 und DAP12) Isoform dieses Rezeptors. Auf ruhenden NK-Zellen wird lediglich die kurze Form (NKG2D-*short*) und auf aktivierten NK-Zellen, neben der kurzen, auch die lange (NKG2D-*long*) Isoform exprimiert. Kardiale NK-Zellen der resistenten C57BL/6 Tiere zeigten vor allem in der frühen Phase (Tag 3p.i.) signifikant höhere Expressionen der Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 als jene aus Mäusen des permissiven A.BY/SnJ Stammes (Abbildung 23). Die verminderte Expression der beiden Adaptermoleküle in A.BY/SnJ Mäusen bestätigt unsere bisherigen Resultate bezüglich reduzierter NKG2D-abhängigen NK-Zelleffektorfunktionen in diesen Tieren. Interessant ist dabei, dass der CVB3-suszeptible Stamm bereits im naiven Zustand signifikant geringere Mengen an DAP10 und DAP12 in NK-Zellen exprimiert, d.h. es handelt sich nicht um einen virusbedingten Effekt, sondern die A.BY/SnJ NK-Zellen scheinen konstitutionell hinsichtlich ihrer immunologischen Aktivität funktionell eingeschränkt zu sein. In früheren Arbeiten konnte demonstriert werden, dass dezimierte DAP10 und DAP12 Expressionen Auswirkungen auf NKG2D-initiierte Funktionen haben. NK-Zellen aus DAP10 defizienten Mäusen zeigen eine geringere NKG2D Expression, eine reduzierte Zytotoxizitätskapazität und eine eingeschränkte

NKG2DL Interaktion als wt Tiere (79). Im humanen System fand man heraus, dass der Komplex, bestehend aus NKG2D und DAP10, die Granulasekretion während des Degranulationsprozesses stimuliert und damit von entscheidender Bedeutung für die NKG2D-abhängige Zytotoxizität ist. In DAP12 defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die NKG2D-abhängige Sekretion von Zytokinen, einschließlich IFN- γ gestört ist (168).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die reduzierte NKG2D Expression auf NK-Zellen die Suszeptibilität von A.BY/SnJ Mäusen gegenüber CVB3 erhöht und die in unserem Myokarditismodell auftretende eingeschränkte Funktionalität von NKG2D teilweise auf genetische Faktoren zurückgeführt werden kann.

4.6 Die Neutralisation bzw. Depletion von NKG2D führt zu einem progressiven Verlauf der CVB3 Myokarditis

Die bedeutende Rolle von NKG2D in der Immunabwehr einer CVB3-induzierten Myokarditis konnte durch eine *in vivo* Depletion dieses Rezeptors bestätigt werden. NKG2D-neutralisierte bzw. NKG2D ko Mäuse demonstrierten nach einer CVB3-Infektion eine deutliche Zunahme der viralen Replikation und eine Beschleunigung der pathogenen, inflammatorischen und virusbedingten Schädigung des Herzgewebes. Zusätzlich ist eine vermehrte Infiltration von Entzündungszellen, wie MAC3⁺ und CD3⁺, in das Myokard infizierter NKG2D ko Tiere dokumentiert (Abbildungen 27). Des Weiteren resultierte die antikörpervermittelte Blockade von NKG2D bzw. die Deletion in einer signifikant reduzierten splenogenen CD3⁺ CD8⁺ und einer erhöhten CD3⁺ CD4⁺ T-Zellfrequenz, ähnlich dem lymphozytären Phänotyp der A.BY/SnJ Tiere (Abbildungen 25A und 28). Diese Daten führten zu der Vermutung, dass neben einer funktionierenden NKG2D-abhängigen NK-Zellantwort, eine effektive CD3⁺ CD8⁺ T-zellvermittelte Immunität während der akuten und vor allem chronischen Phase der Infektion für die Immunkontrolle der CVB3-Myokarditis von Vorteil ist. Die zytotoxischen T-Zellen sind Teil der adaptiven Immunantwort und können intrazellulär infizierte Zellen durch rezeptorvermittelte Erkennung von Antigenen direkt eliminieren. Zudem sind sie effiziente Produzenten von IFN- γ , welches von elementarer Bedeutung für die Immunkontrolle einer CVB3-Virusinfektion zu sein scheint. Es ist bekannt, dass

CD3⁺CD8⁺T-Zellen genau wie NK-Zellen den aktivierenden Rezeptor NKG2D exprimieren, welcher zytotoxische Aktivität unabhängig von der durch den CD8-Rezeptor induzierten Zytotoxizität aktiviert. Während der CD8-T-Zellrezeptor MHC-I präsentierte Antigene virusinfizierter oder tumoröser Zellen erkennt, benötigt NKG2D auf zytotoxischen T-Zellen, ähnlich der Funktionalität auf NK-Zellen, lediglich die Interaktion mit spezifischen stressinduzierten Liganden (MULT1, RAE, H60) um Zytotoxizität (antigenunabhängig) auszulösen. Neben der Induktion zytotoxischer Aktivität vermittelt die Bildung des NKG2D-NKG2DL-Komplexes auf CD3⁺CD8⁺T-Zellen die Ausschüttung essentieller antiviraler Zytokine, wie IFN- γ und TNF- α . *In vitro* konnte gezeigt werden, dass eine Rezeptorfunktion blockierende Depletion von NKG2D auf zytotoxischen T-Zellen zur Inhibition der lytischen Funktion der CD3⁺CD8⁺T-Zellen gegenüber autologen Myelomzellen führt (169). Aus einer anderen Arbeit geht hervor, dass regulatorische CD3⁺CD4⁺T-Zellen die Expression von NKG2D auf zytotoxischen T-Zellen reduzieren können (170). Die in unserem Tiermodell durch Depletion des NKG2D Rezeptors auftretende dezimierte Frequenz an CD3⁺CD8⁺T-Zellen suggeriert einen direkten Zusammenhang zwischen diesen Zellen und einer intakten NKG2D Expression. Der in permissiven A.BY/SnJ Tieren auftretende T-Zellphänotyp könnte auf eine ubiquitär verminderte Expression von NKG2D zurückzuführen sein. Die starke Ausprägung der CD3⁺CD4⁺T-Zellenantwort in A.BY/SnJ Mäusen könnte zusätzlich eine negative Regulation der NKG2D-Expression zur Folge haben. Interessanterweise konnte aber während der frühen Phase (Tag 3p.i.) im Myokard der CVB3-infizierten NKG2D-depletierten Tiere eine signifikant erhöhte CD3⁺CD8⁺T-Zellfrequenz im Vergleich zum C57BL/6 wt detektiert werden, die jedoch zu keiner protektiven Wirkung gegenüber einer CVB3 Myokarditis beitragen konnte (Abbildung 28). Zusammenfassend implizieren diese funktionellen Daten, dass der Krankheitsverlauf einer CVB3 Myokarditis wahrscheinlich weniger von einem konventionellen CD8-rezeptorinduzierten Signalweg sondern vielmehr von einer allgemeinen starken NKG2D-vermittelten antiviralen Immunantwort abhängig ist.

Hinsichtlich der NK-Zellen konnte eine verringerte Frequenz an reifen splenogenen und kardialen CD11b^{high}D27^{low} NK-Zellen in der frühen (Tag 3p.i.) und akuten (Tag 8p.i.) Phase der Infektion detektiert werden (Abbildungen 26, 29). Eine NKG2D-Neutralisation bzw. Depletion resultierte in einem permissiven lymphozytären Phänotyp und in einer

Zunahme der myokardialen Schädigung ähnlich den Verhältnissen des A.BY/SnJ Stammes.

4.7 Der adoptive Transfer immunkompetenter C57BL/6 NK-Zellen in permissive A.BY/SnJ Tiere mildert den CVB3-Infektionsverlauf

Der adoptive Transfer von NK-Zellen im Zusammenhang mit viralen Infektionen wurde bereits 1985 beschrieben. Damals konnte gezeigt werden, dass in C57BL/6 Mäuse transferierte geklonte NK-Zellen und anschließende MCMV Infektion, protektive Effekte auf die MCMV induzierte Pathogenese ausübten (171).

Die pathologische Ausprägung einer CVB3 Myokarditis korreliert in erster Linie mit der Frequenz an immunkompetenten NK-Zellen. Basierend auf dieser Annahme wurden NK-Zellen aus resistenten C57BL/6 Mäusen isoliert, gereinigt und einen Tag vor der CVB3-Infektion in permissive A.BY/SnJ Tiere transferiert (Tag -1). Es konnte damit gezeigt werden, dass eine effektive NK-Zellaktivität in einer protektiven Immunität gegenüber CVB3, gekennzeichnet durch eine Minderung der Viruslast und der Myokardschädigung sowie der Infiltration von Entzündungszellen ins Herzgewebe, resultiert. Der als Therapieansatz durchgeführte zweite Transfer von immunkompetenten C57BL/6 NK-Zellen während der frühen Phase einer CVB3-Infektion (Tag +2). erbrachte das gleiche Resultat. Auch hier ist Virusreplikation, Myokardläsionen und die Frequenz an myokardinfiltrierenden Entzündungszellen im Vergleich zum A.BY/SnJ wt deutlich reduziert. Der Transfer isolierter NK-Zellen aus resistenten C57BL/6 Tieren auf permissive A.BY/SnJ Mäuse vor bzw. während einer CVB3-Infektion führte in beiden Fällen zu einer wesentlichen Besserung des Krankheitsverlaufs (Abbildung 29). Der positive Einfluss des NK-Zelltransfers auf die kardiale Funktion in CVB3-infizierten A.BY/SnJ Tieren birgt großes therapeutisches Potential im Hinblick auf die Behandlung einer CVB3-induzierten Myokarditis. In der Krebsfundierten Immuntherapie konnten bereits NK-Zellübertragungen erfolgreich durchgeführt werden. Passweg et al. berichten über 5 Patienten, denen im Anschluss an eine haploidente Stammzellentherapie Spender-NK-Zellen wegen eines drohenden Rückfalls infundiert wurden und die ohne Nebenwirkungen toleriert wurden (172). Aus einem Bericht von Slavin et al. geht hervor, dass durch den Transfer IL-2 aktivierter NK-Zellen im Rahmen HLA-identischer Geschwister- oder Fremdspender sowie haploidenter Transplantationen bei 2 Leukämiepatienten eine Remission erreicht

werden konnte (173). Interessant ist die aus dem adoptiven Transfer resultierende Zunahme der CD8⁺ T-Zellantwort in der Milz transferierter A.BY/SnJ Tiere. Diese Erhöhung konnte im Zusammenhang mit einer Frequenzzunahme von CD8⁺ DCs nachgewiesen werden (Abbildung 30). Korrelierende Daten konnten bereits aus der NKG2D Depletion und dem NKG2D ko ermittelt werden. Diese Daten suggerieren einen regulatorischen Einfluss der NKG2D-Expression auf die adaptive Immunantwort.

In dieser Arbeit wurden neue Aspekte bezüglich der Relevanz funktionaler NK-Zellaktivität bei der natürlichen Resistenz gegenüber einer Enterovirus-vermittelten Myokarditis präsentiert. Enteroviren sind zur Freisetzung infektiöser Partikel nicht auf einen intakten sekretorischen Signalweg der Wirtszelle angewiesen. Sie sind sogar in der Lage die Proteinsekretion im Zuge viraler Mimikry zu blockieren. Dabei inhibieren die Nicht-Strukturproteine 3A und 2B des CVB3 den Proteintransport zwischen ER und Golgi-Apparat (153). Das CVB3-translatierte Protein 2B blockiert den Proteintransport durch den Golgi-Apparat, während 3A zur Zerstörung dieser Organellen führt (152). Zusätzlich verhindert CVB3 durch die 3A- und 2B-vermittelte Inhibition des Proteintransports in der Wirtszelle die Sekretion von Zytokinen und die klassische Antigenpräsentation über den MHC-Komplex (150, 151). NK-Zellen sind wichtige Komponenten der angeborenen Immunität, die früh während einer Infektion aktiv werden und über Mechanismen einer MHC-unabhängigen Aktivierung verfügen. Zudem haben sie regulatorische Eigenschaften hinsichtlich der Koordination einer später einsetzenden angeborenen Immunabwehr. Die Aktivierung von NK-Zellen erfolgt über die Stimulation inhibierender und aktivierender Rezeptoren. Für die Immunkontrolle einer CVB3-induzierten Myokarditis scheint der auf NK-Zellen exprimierte Rezeptor NKG2D von fundamentaler Bedeutung zu sein. Dieser Rezeptor vermittelt NK-Zellaktivität über die Interaktion mit stressinduzierten Liganden auf infizierten und entarteten Zellen. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass innerhalb eines CVB3 Myokarditis etablierten Mausmodells CVB3-resistente C57BL/6 Mäuse nicht nur eine höhere Frequenz an NKG2D-exprimierenden NK-Zellen aufweisen sondern auch, dass die Expressionsdichte dieses Rezeptors auf NK-Zellen höher ist als in permissiven A.BY/SnJ Tieren. Zudem konnten wir zeigen, dass die NKG2D-vermittelte Degranulationskapazität der aus resistenten C57BL/6 Mäusen isolierten NK-Zellen signifikant höher ist als derer aus permissiven Tieren. Einen zusätzlichen Hinweis auf

eine vordergründig NKG2D-vermittelte Immunität gegenüber einer CVB3-Infektion lieferte die detektierte Induktion diverser NKG2DL auf einer Kardiomyozytenzelllinie infolge einer CVB3-Infektion *in vitro*. Es ist also nicht überraschend, dass A.BY/SnJ NK-Zellen auch gegenüber diesen Zellen ein geringeres Potential zur Degranulation aufwiesen als C57BL/6. Die NKG2D Signaltransduktion wird über die Adapterproteine DAP10 und DAP12 katalysiert. Sie bilden durch unterschiedliche Assoziation mit NKG2D die lange (NKG2D-*long*) und kurze (NKG2D-*short*) Isoform dieses Rezeptors. Zytotoxische Aktivität der NK-Zelle wird dabei durch DAP10 und DAP12 induziert während die Sekretion von Zytokinen, insbesondere von IFN- γ , durch DAP12 vermittelt wird. Unsere Daten demonstrieren eine signifikant höhere Frequenz der Adaptermoleküle DAP10 und DAP12 in C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu A.BY/SnJ Tieren, d. h. permissive NK-Zellen sind weniger effizient in ihrer antiviralen NKG2D-vermittelten Aktivierung als C57BL/6 NK-Zellen.

Aus unseren weiteren Analysen geht hervor, dass die NK-DC Interaktion große Bedeutung in der Abwehr einer CVB3-Infektion zu haben scheint und dieses Zusammenspiel wahrscheinlich in erster Linie auf der Wechselwirkung von NKG2D auf NK-Zellen und viral induzierten NKG2DL auf DCs beruht. Wie erwartet zeigen permissive A.BY/SnJ geringere Frequenzen CVB3-initiiertes Induktion von NKG2DL im Vergleich zu resistenten Tieren. Die antivirale Stimulation von NKG2DL ist unter anderem auf eine Aktivierung von sogenannten PRRs zurückzuführen. Diese intrazellulär lokalisierten Rezeptoren werden durch Interaktion mit PAMPs, wie beispielsweise dsRNA, die im Verlauf der Replikation von RNA-Viren gebildet wird, mobilisiert (161). In unserem Mausmodell konnten wir auch hier zeigen, dass es in resistenten Tieren nach CVB3-Infektion zu einer starken myokardialen Induktion dieser PRRs kommt, während die CVB3-Inokulation in A.BY/SnJ Mäusen kaum einen Effekt auf die Aktivierung dieser Rezeptoren ausübt. Aus Arbeiten von Gerosa et al. ist bekannt, dass die DC-Subpopulationen mDCs und pDCs unterschiedliche Einflüsse auf die funktionale NK-Zellaktivierung ausüben. Die Interaktion von NK-Zellen mit mDCs führt zu Aktivierung, Migration, Zytotoxizität und einer hohen Sekretion des Zytokins IFN- γ während pDCs zytolytische Aktivität aber lediglich eine geringe Zytokinausschüttung induzieren (135). In Korrelation mit dieser Studie konnten wir feststellen, dass sich CVB3-permissive und -resistente Tiere hinsichtlich ihrer Frequenz an DC-Subpopulationen gegensätzlich verhalten. Während C57BL/6 Tiere signifikant mehr mDCs aufweisen, zeigen A.BY/SnJ Mäuse größere Mengen an pDCs. Daraus

lässt sich schließen, dass mDCs ein größeres Potential haben, NK-Zellen in Bezug auf eine effektive CVB3-Immunantwort zu aktivieren, als pDCs. Dabei scheint die effiziente Sekretion von IFN- γ eine große Rolle zu spielen. Die bedeutende antivirale Wirkung von IFN- γ ist unter anderem für HCV (174) und LCMV (163) beschrieben worden. Das eine starke NKG2D-vermittelte IFN- γ Ausschüttung positive Effekte auf eine CVB3-Immunabwehr hat suggeriert auch die signifikant höhere Produktion dieses Zytokins durch anti-NKG2D Antikörper stimulierte NK-Zellen von C57BL/6 Mäusen im Vergleich zum A.BY/SnJ Stamm. In Bezug auf eine effiziente antivirale NK-Zellaktivität konnten wir Unterschiede im NK-Zellreifeprozess zwischen beiden Tierstämmen feststellen. Während A.BY/SnJ eine höhere Frequenz an unreifen NK-Zellen demonstrieren (CD11b^{low}) sind in C57BL/6 Tieren reife NK-Zellen (CD11b^{high}) präsenter. Reife NK-Zellen zeigen ein hohes Potential an Zytotoxizität und eine starke Sekretion von IFN- γ . Die CVB3-Immunität des C57/BL6 Stamms beruht in hohem Maße auf einer effektiven Stimulation NK-zellvermittelter Zytotoxizität und Zytokinsekretion, wobei ein deutlicher Zusammenhang zwischen antiviraler NKG2D-abhängiger NK-Zelleffektorfunktion und einer Resistenz gegenüber CVB3 besteht. Diese Hypothese wird fundiert durch korrelierende Daten, die aus NKG2D-Neutralisations- bzw. Depletionsversuchen hervorgehen. Hierbei konnte bezüglich einer CVB3 Myokarditis nachgewiesen werden, dass eine Neutralisation bzw. Deletion des aktivierenden Rezeptors NKG2D einen progredienten klinischen Verlauf der Erkrankung, mit höherer Viruslast und zunehmender Myokardschädigung, zur Folge hat. Interessant war dabei eine zu detektierende Verschiebung der NK-Zelldifferenzierungsstadien und der auftretenden T-Zellantwort in Richtung eines permissiven A.BY/SnJ Phänotyps. Die Neutralisation bzw. Deletion von NKG2D verursachte eine Herunterregulation sowohl der reifen CD11b^{high} CD27^{low} NK-Zellen als auch der CD3⁺ CD8⁺ T-Zellantwort. Zytotoxische T-Zellen sind der adaptiven Immunantwort zuzurechnen und genau wie NK-Zellen NKG2D-exprimierende, kompetente Zytotoxizitäts-induzierende und IFN- γ -produzierende Lymphozyten. Es ist nicht auszuschließen, dass CD3⁺ CD8⁺ T-zellvermittelte Mechanismen eine Rolle bei der Induktion einer effizienten Immunantwort gegenüber einer CVB3 Myokarditis spielen. Um diesen Tatbestand zu klären wurde in der Arbeitsgruppe Kotsch/Klingel et al. eine Depletion der CD8⁺ T-Zellen durch die Behandlung von C57BL/6 und A.BY/SnJ Tieren mit einem neutralisierenden anti-CD8 Antikörper (Klon: YTS169) durchgeführt. Dabei konnte nach CVB3-Infektion in beiden Tierstämmen weder eine Erhöhung der Virusreplikation noch eine zunehmende

Zerstörung von Herzmuskelgewebe detektiert werden (175). Diese Resultate führen zu dem Schluss, dass eine effektive antivirale CVB3-Immantwort in erster Linie von NKG2D-vermittelten Effektorfunktionen reifer NK-Zellen abhängt und unabhängig von einer CD8⁺ T-Zellreaktion abläuft.

Schließlich konnte in einem adoptiven Transfermodell die antivirale Wirksamkeit kompetenter C57/BL6 NK-Zellen nachgewiesen werden. Besonders hervorzuheben ist dabei der erfolgreiche therapeutische Transfer immunkompetenter C57BL/6 NK-Zellen auf CVB3-infizierte permissive A.BY/SnJ Tiere, die dadurch eine deutliche Verbesserung ihres Krankheitszustandes erfuhren. Unsere funktionellen Daten und nicht zuletzt der adoptive NK-Zelltransfer bieten großes therapeutisches Potential zur zukünftigen Behandlung Enterovirus-induzierter Myokarditiden.

5 Literatur

- 1 Mattingly TW. Changing Concepts of Myocardial Diseases. *Jama* 1965; 191: 33-37.
- 2 Corvisart JN. *Essai sur les maladies et les lesions organique du coeur*. *Gates J MMSS*. 1812; 182: 299-303.
- 3 Sobernheim JF. *Praktische Diagnostik der inneren Krankheiten mit vorzüglicher Rücksicht auf pathologische Anatomie*. Hirschwald, Berlin. 1837; 118.
- 4 Godeny EK, Gauntt CJ. Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced murine Myocarditis. *J Immunol*. 1986; 137: 1695-1702.
- 5 Richardson P, McKenna W, Bristow M. Report of the 1995 World Health Organisation/International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996; 93: 341-2.
- 6 Cooper Jr. LT. Myocarditis. *N Engl J Med*. 2009; 360: 1526-38.
- 7 Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kuhl U, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Towbin JA. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 1999; 99: 1348-54.
- 8 Kuhl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CP, Seeberg B, Krautwurm L, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108: 945-50.
- 9 Lieberman EB, Hutchins GM, Herskowitz A, Rose NR, Baughman KL. Clinicopathologic description of myocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 1991;18:1617-26.
- 10 Gravanis MG, Sternby NH. Incidence of myocarditis. *Arch Pathol Lab Med*. 1991; 15: 390-2.

- 11 Wakafuji S, Okada R. Twenty year autopsy statistics of myocarditis incidence in Japan. *Jpn Circ J.* 1986; 50: 1280-93.
- 12 Peters NS, Poole-Wilson PA. Myocarditis. continuing clinical and pathologic confusion. *Am Heart J.* 1991; 121: 942-7.
- 13 Olbrich HG. Epidemiologie - Ätiologie der dilatativen Kardiomyopathie. *Z Kardiol* 2001; 90: 12-19.
- 14 Matsumori A, Matoba Y, Sasayama S. Dilated cardiomyopathy associated with Hepatitis C Virus infection. *Circulation* 1995; 92: 2519-25.
- 15 Feldmann AM, McNamara D. Myocarditis. Review Article. *N Engl J Med* .2000; 343: 1388-98.
- 16 Griffin BP, Topol EJ, Nair D, Ashley K. *Manual of Cardiovascular Medicine.* Wolters Kluwer Health 2008; 154.
- 17 Sutton D, Sutton Q, Kent G. Needle biopsy of human ventricular myocardium. *Q Bull Northwest Univ Med Sch.* 1956; 30: 213-14.
- 18 Wu LA, Lapeyre AC, Cooper LT. Current role of endomyocardial biopsy in the management of dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Mayo Clin Proc.* 2001; 76: 1030-8.
- 19 Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG, Archad LC. Detection of Coxsackie B virusspecific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1986; 1: 1120-3.
- 20 Kandolf R, Ameis D, Kirschner P, Canu A, Hofschneider PH. In situ detection of enteroviral genomes in myocardial cells by nucleic acid hybridization: An approach to the diagnosis of viral heart disease. *Pro. Natl Acad Sc USA* 1987; 84: 6272-6.

- 21 Jin O, Sole MJ, Butany JW, Chia WK, McLaughlin PR, Liu P, Liew CC. Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Circulation* 1990; 82: 8-16.
- 22 Kuhl U, Pauschinger M, Schultheiss HP. Neue Konzepte zur Diagnostik der entzündlichen Herzerkrankung. *DMW* 1997;122: 690-8.
- 23 D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, Sinagra G, Di Lenarda A, Silvestri F, Di Sciascio G. The fate acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart* 2001; 85: 499-504.
- 24 Strauer BE, Kandolf R, Mall G, Maisch B, Mertens T, Figulla HR, Schwartzkopff B, Brehm M, Schultheiss HP. Myokarditis - Kardiomyopathie. *Med Klein* 1994; 89/Suppl.I: 23-38.
- 25 Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 2001; 104: 1076-90.
- 26 Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Waltz DA, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report 2006. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25 : 869-79.
- 27 Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ, Melton LJ. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1989; 80: 564-72.
- 28 Pankuweit S, Portig I, Maisch B. Pathophysiology of Cardiac Inflammation: Molecular Mechanisms. *Herz* 2002; 27: 669-76.
- 29 Kim KS, Hufnagel G, Chapman NM, Tracy S. The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol.* 2001; 11: 355-68.
- 30 Rueckert RR. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: *Fields Virology* (Knipe DM, Howley PM) 3rd edn., Lippincott-Raven, Philadelphia 1996; 3rd edn.: 609-54.

-
- 31 Modrow S, Falke D. Viren mit einzelsträngigem RNA-Genom in Plusstrangorientierung. In: Molekulare Virologie, ed Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag 1998; 113-42.
- 32 Herskowitz A, Wolfgram LJ, Rose NR, Beisel KW. Coxsackievirus B3 murine myocarditis: a pathologic spectrum of myocarditis in genetically defined inbred strains. *J Am Coll Cardiol.* 1987; 9: 1311-19.
- 33 Klump WM, Bergmann I, Muller BC, Ameis D, Kandolf R. Complete nucleotide sequence of infectious Coxsackievirus B3 cDNA: two initial 5` uridine residues are regained during plus-strand RNA synthesis. *J Virol.* 1990; 64: 1573-83.
- 34 Hober H, Sané F, Riedweg K, Moumna I, Goffard A, Choteau L, Alidjinou EK, Desailoud R. Viruses and Type 1 Diabetes: Focus on the Enteroviruses. *Medicine "Endocrinology and Metabolism" Type 1 Diabetes 2013; chapter 2.*
- 35 Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3352-6.
- 36 Whitton JL. Immunopathology during coxsackievirus infection. *Springer Semin Immunopathol.* 2002; 24: 201-13.
- 37 Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 1999; 99: 1091-100.
- 38 Harvala H, Kalimo H, Bergelson J, Stanway G, Hyypia T. Tissue tropism of recombinant coxsackieviruses in an adult mouse model. *J Gen Virol.* 2005; 86: 1897-907.
- 39 Woodruff JF. Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol.* 1980; 101: 425-84.

- 40 McManus BM, Chow LH, Wilson JE, Anderson DR, Gulizia JM, Gauntt CJ, Klingel K, Beisel KW, Kandolf R. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993; 68: 159-69.
- 41 Kerekatte V, Keiper BD, Badorff C, Cai A, Knowlton KU, Rhoads RE. Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J Virol.* 1999; 73: 709-17.
- 42 Badorff C, Lee GH, Knowlton KU. Enteroviral cardiomyopathy: bad news for the dystrophin-glycoprotein complex. *Herz* 2000; 25: 227-32.
- 43 Gebhard JR, Perry CM, Harkins S, Lane T, Mena I, Asensio VC, Campbell IL, Whitton JL. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance. *Am J Pathol.* 1981; 53: 417-28.
- 44 Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL. The role of CD8⁺ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol.* 1995; 69: 6720-8.
- 45 Gulick T, Chung MK, Pieper, Lange LG, Schreiner GF. Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6753-7.
- 46 Deschamps AM, Spinale FG. Matrix modulation and heart failure: new concepts question old beliefs. *Curr Opin Cardiol.* 2005; 20: 211-6.
- 47 Huber SA, Job LP, Woodruff JF. Lysis of infected myofibers by coxsackievirus B-3-immune T lymphocytes. *Am J Pathol.* 1980; 98: 681-94.
- 48 Kandolf R. Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Med Klein. (Munich)* 1998; 93: 215-22.
- 49 Kandolf R, Sauter M, Aepinus C, Schnorr JJ, Selinka HC, Klingel K. Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus Res.* 1999; 62: 149-58.

-
- 50 Kiessling R, Klein E, Wigzell H. Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 1975; 5: 112-7.
- 51 Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 413-25.
- 52 Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001; 22: 633-40.
- 53 Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med.* 1997; 186: 1129-36.
- 54 Henkart PA. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 1985; 3: 31-58.
- 55 Trauth BC, Klas C, Peters AMJ, Matzuku S, Möller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 245: 301-05.
- 56 Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17: 29-35.
- 57 Gauntt CJ, Goneny EK, Lutton CW, Fernandes G. Role of Natural Killer cells in experimental murine myocarditis. *Springer Semin Immunopathol.* 1989; 11: 51-9.
- 58 Yokoyama WM. Natural killer cell receptors. *Cur Opin Immunol.* 1998; 10: 298-305.
- 59 Ryan JC, Seaman WE. Divergent functions of lectin-like receptors on NK cells. *Immunol Rev.* 1997; 155: 79-89.
- 60 Colonna M, Samaridis J. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 1995; 268: 405-408.

-
- 61 Uhrberg M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. *Eur J Immunol.* 2005; 35: 10-15.
- 62 Yokoyama WM, Kehn PJ, Cohen DI, Shevach EM. Chromosomal location of the Ly-49 multigene family. Genetic association with the NK1.1 antigene. *J Immunol.* 1990; 145: 2353-8.
- 63 Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev. Immunol.* 1999; 17: 875-904.
- 64 Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells [see comments]. *Nature* 1998; 391: 703-07.
- 65 Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol.* 2003; 5: 308-14.
- 66 Algarra I, Cabrera T, Garrido F. The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum Immunol.* 2000; 61: 65-73.
- 67 del Val M, Hengel H, Häcker H, Hartlaub U, Ruppert T, Lucin P, Koszinowski UH. Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J Exp Med.* 1992; 176: 729-38.
- 68 Kärre K. NK Cells, MHC Class I Molecules and the Missing Self. *Scand J Immunol.* 2002; 55: 221–28.
- 69 Calabi F, Milstein C. A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6. *Nature* 1986; 323: 540-543.
- 70 Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004; 305: 872-4.

-
- 71 Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet.* 2002; 31:429-34.
- 72 Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 359-93.
- 73 Smith HR, Karlhofer FM, Yokoyama WM. Ly-49 multigene family expressed by IL-2-activated NK cells. *J Immunol.* 1994; 153: 1068-79.
- 74 Silver ET, Gong D, Hazes B, Kane KP. Ly-49W, an activating receptor of nonobese diabetic mice with close homology to the inhibitory receptor Ly-49G, recognizes H-2D(k) and H-2D(d). *J.Immunol.* 2001; 166: 2333-41.
- 75 Brennan J, Mager D, Jefferies W, Takei F. Expression of different members of the Ly-49 gene family defines distinct natural killer cell subsets and cell adhesion properties. *J Exp Med.* 1994; 180: 2287-95.
- 76 Held W, Kunz B. An allele-specific, stochastic gene expression process controls the expression of multiple Ly49 family genes and generates a diverse, MHC-specific NK cell receptor repertoire. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 2407-16.
- 77 Colonna M, Moretta A, Vély F, Vivier E. A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function. *Immunol Today* 2000; 21: 428-31.
- 78 Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 781-90.
- 79 Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cells activation and costimulation. *Nat Immunol.* 2002; 3: 1150-55.
- 80 Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M, Jamieson AM, Hsla JK, Vivier E, Raulet, DH. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol.* 2002; 3: 1142-49.

-
- 81 Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; 285: 730-32.
- 82 Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, Lanier LL. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 2000; 12: 721-7.
- 83 Malarkannan S, Shih PP, Eden PA, Horng T, Zuberi AR, Christianson G, Roopenian D, Shastri N. The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J Immunol.* 1998; 161: 3501-09.
- 84 Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol.* 2002; 169: 4079-83.
- 85 Carapito R, Bahram S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunological Reviews* 2015; 267: 88–116.
- 86 Spear P, Wu MR, Sentman ML, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer Immun.* 2013; 13: 8.
- 87 Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005; 436: 1186-90.
- 88 Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 2008; 27: 5944-58.
- 89 Fang M, Lanier LL, Sigal LJ. A role for NKG2D in NK cell-mediated resistance to poxvirus disease. *PLoS Pathog.* 2008; 4: e30.
- 90 Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L. Surface receptors delivering opposite signals regulate the function of human NK cells. *Semin Immunol.* 2000; 12: 129-38.

- 91 Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 577-83.
- 92 Biassoni R, Pessino A, Bottino C, Pende D, Moretta L, Moretta A. The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 1999; 29: 1014-20.
- 93 Westgaard IH, Berg SF, Vaage JT, Wang LL, Yokoyama WM, Dissen E, Fossum S. Rat NKp46 activates natural killer cell cytotoxicity and is associated with FcepsilonRIgama and CD3zeta. *J Leukoc Biol.* 2004; 76: 1200-6.0
- 94 Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 2001; 409: 1055-60.
- 95 Elboim M, Gazit R, Gur C, Ghadially H, Betser-Cohen G, Mandelboim O. Tumor Immunoediting by NKp46. *J Immunol.* 2010; 184: 5637-44.
- 96 Vankayalapati R, Wizel B, Weis SE, Safi H, Lakey DL, Mandelboim O, Samten B, Porgador A, Barnes PF. The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J Immunol.* 2002; 168: 3451-7.
- 97 Gur C, Porgador A, Elboim M, Gazit R, Mizrahi S, Stern-Ginossar N, Achdout H, Ghadially H, Dor Y, Nir T, Doviner V, Hershkovitz O, Mendelson M, Naparstek Y, Mandelboim O. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol.* 2010; 11: 121-8.
- 98 Hudspeth K, Silva-Santos B, Mavilio D. Natural cytotoxicity receptors: broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells. *Front Immunol.* 2013; 4: 69.

- 99 Huber SA, Graveline D, Born WK, O'Brien RL. Cytokine production by Vgamma(+)-T-cell subsets is an important factor determining CD4(+)-Th-cell phenotype and susceptibility of BALB/c mice to coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol.* 2001; 75: 5860–9.
- 100 Leipner C, Grun K, Borchers M, Stelzner A. The outcome of coxsackievirus B3-(CVB3-) induced myocarditis is influenced by the cellular immune status. *Herz* 2000; 25: 245–8.
- 101 Mena I, Perry CM, Harkins S, Rodriguez F, Gebhard J, Whitton JL. The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *Am J Pathol.* 1999; 155: 1205–15.
- 102 Klingel K, Kandolf R. The role of enterovirus replication in the development of acute and chronic heart muscle disease in different immunocompetent mouse strains. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1993; 88: 79–85.
- 103 Frisancho-Kiss S, Davis SE, Nyland JF, Frisancho JA, Cihakova D, Barrett MA, Rose NR, Fairweather D. Cutting edge: cross-regulation by TLR4 and T cell Ig mucin-3 determines sex differences in inflammatory heart disease. *J Immunol.* 2007; 178: 6710-14.
- 104 Leipner C, Grün K, Schneider I, Glück B, Sigusch HH, Stelzner A. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: differences in the immune response of C57BL/6 and Balb/c mice. *Med Microbiol Immunol.* 2004; 193: 141-7.
- 105 Lane JR, Neumann DA, Lafond-Walker A, Herskowitz A, Rose NR. LPS promotes CB3-induced myocarditis in resistant B10.A mice. *Cell Immunol.* 1991; 136: 219–33.
- 106 Woodruff JF, Woodruff JJ. Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackie virus B3 heart disease. *J Immunol.* 1974; 113: 1726-34.
- 107 Horwitz MS, La Cava A, Fine C, Rodriguez E, Ilic A, Sarvetnick N. Pancreatic expression of interferon-gamma protects mice from lethal coxsackievirus B3 infection and subsequent myocarditis. *Nat Med.* 2000; 6: 693-7.

- 108 Jiang, Z., W. Xu, et al. Remission of CVB3-induced viral myocarditis by in vivo Th2 polarization via hydrodynamics-based interleukin-4 gene transfer. *J Gene Med.* 2008; 10: 918-29.
- 109 Bo H, Zhenhu L, Lijian Z. Blocking the CD40-CD40L interaction by CD40-Ig reduces disease progress in murine myocarditis induced by CVB3. *Cardiovasc Pathol.* 2010; 19:371-6.
- 110 Kemball CC, Alirezaei M, Whitton JL. Type B coxsackieviruses and their interactions with the innate and adaptive immune systems. *Future Microbiol.* 2010; 5: 1329-47.
- 111 Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007; 204: 3037-47.
- 112 Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA, Barrett MA, Davis SE, Steele RA, Gatewood SJ, Rose NR. IL-12 protects against coxsackievirus B3-induced myocarditis by increasing IFN-gamma and macrophage and neutrophil populations in the heart. *J Immunol.* 2005; 174: 261-9.
- 113 Godeny EK, Gauntt CJ. Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol.* 1987; 139: 913-18.
- 114 Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 314-18.
- 115 Klingel K, Stephan S, Sauter M, Zell R, McManus B, Bültmann B, Kandolf R. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: Virus dissemination and immune cell targets. *J Virol.* 1996; 70: 8888-95.
- 116 Huber SA, Lodge PA. Coxsackievirus B3 myocarditis in BALB/c mice: Evidence for autoimmunity to myocytes antigens. *Am J Pathol.* 1984; 116: 21-29.

117 Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319: 675-8.

118 Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumor immunity. *Nature* 2001; 413: 165–71.

119 Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 2979-84.

120 Gazit R, Gruda R, Elboim M, Arnon TI, Katz G, Achdout H, Hanna J, Qimron U, Landau G, Greenbaum E, Zakay-Rones Z, Porgador A, Mandelboim O. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*. *Nat Immunol.* 2006; 7: 517-23.

121 Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods.* 2004; 294: 15–22.

122 Kim S, Iizuka K, Kang HS, Dokun A, French AR, Greco S, Yokoyama WM. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat. Immunol.* 2002a; 6: 523-28.

Kim S, Iizuka K, Kang HS, Dokun A, French AR, Greco S, Yokoyama WM. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat. Immunol.* 2002b; 6: 523-28.

Kim S, Iizuka K, Kang HS, Dokun A, French AR, Greco S, Yokoyama WM. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat. Immunol.* 2002c; 6: 523-28.

123 Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* 2009; 113: 5488-96.

124 Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 405-29.

- 125 Zafirova B, Mandarić S, Antulov R, Krmpotić A, Jonsson H, Yokoyama WM, Jonjić S, Polić B. Altered NK cell development and enhanced NK cell-mediated resistance to MCMV in NKG2D-deficient Mice. *Immunity* 2009; 31: 270–82.
- 126 Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J. Immunol.* 2004; 172: 2001-05.
- 127 Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2013; 31: 413–41.
- 128 Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 2002; 17: 19-29.
- 129 Kemball CC, Harkins S, Whitton JL. Enumeration and functional evaluation of virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in lymphoid and peripheral sites of coxsackievirus B3 infection. *J Virol.* 2008; 82: 4331-42.
- 130 Weinzierl AO, Szalay G, Wolburg H, Sauter M, Rammensee HG, Kandolf R, Stevanović S, Klingel K. 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.* 2008; 82: 8149-60.
- 131 Andoniou CE, van Dommelen SL, Voigt V, Andrews DM, Brizard G, Asselin-Paturel C, Delale T, Stacey KJ, Trinchieri G, Degli-Esposti MA. Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat Immunol.* 2005; 6: 1011-9.
- 132 Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM and Münz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med.* 2002; 195: 343–51.
- 133 Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *J Leukoc Biol.* 2004; 75: 504-14.

- 134 Hanabuchi S, Watanabe N, Wang YH, Wang YH, Ito T, Shaw J, Cao W, Qin FX, Liu YJ. Human plasmacytoid predendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood*. 2006; 107: 3617-23.
- 135 Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, Trinchieri G. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J. Immunol*. 2005; 174: 727-34.
- 136 Riad A, Westermann D, Zietsch C, Savvatis K, Becher PM, Bereswill S, Heimesaat MM, Lettau O, Lassner D, Dörner A, Poller W, Busch M, Felix SB, Schultheiss HP, Tschöpe C. TRIF is a critical survival factor in viral cardiomyopathy. *J Immunol*. 2011; 186: 2561-70.
- 137 Fuse K, Chan G, Liu Y, Gudgeon P, Husain M, Chen M, Yeh WC, Akira S, Liu PP. Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of Coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences type I interferon production. *Circulation* 2005; 112: 2276-85.
- 138 Riad A, Westermann D, Escher F, Becher PM, Savvatis K, Lettau O, Heimesaat MM, Bereswill S, Volk HD, Schultheiss HP, Tschöpe C. Myeloid differentiation factor-88 contributes to TLR9-mediated modulation of acute coxsackievirus B3-induced myocarditis in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298: 2024-31.
- 139 Narni-Mancinelli E, Chaix J, Fenis A, Kerdiles YM, Yessaad N, Reynders A, Gregoire C, Luche H, Ugolini S, Tomasello E, Walzer T, Vivier E. Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 18324-9.
- 140 Narni-Mancinelli E, Jaeger BN, Bernat C, Fenis A, Kung S, De Gassart A, Mahmood S, Gut M, Heath SC, Estellé J, Bertosio E, Vely F, Gastinel LN, Beutler B, Malissen B, Malissen M, Gut IG, Vivier E, Ugolini S. Tuning of natural killer cell reactivity by NKp46 and Helios calibrates T cell responses. *Science*. 2012; 335: 344-8.

- 141 Pembroke T, Christian A, Jones E, Hills RK, Wang EC, Gallimore AM, Godkin A. The paradox of NKp46⁺ natural killer cells: drivers of severe hepatitis C virus-induced pathology but in-vivo resistance to interferon α treatment. *Gut*. 2014; 63: 515-24.
- 142 Draghi M, Pashine A, Sanjanwala B, Gendzekhadze K, Cantoni C, Cosman D, Moretta A, Valiante NM, Parham P. NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. *J Immunol*. 2007; 178: 2688-98.
- 143 Richard J, Sindhu S, Pham TN, Belzile J P, Cohen E A. HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood* 2010; 115: 1354–63.
- 144 Rölle A, Mousavi-Jazi M, Eriksson M, Odeberg J, Söderberg-Nauclér C, Cosman D, Kärre K, Cerboni C. Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. *J Immunol*. 2003; 171: 902-8.
- 145 Chaigne-Delalande B, Li FY, O'Connor GM, Lukacs MJ, Jiang P, Zheng L, Shatzer A, Biancalana M, Pittaluga S, Matthews HF, Jancel TJ, Bleesing JJ, Marsh RA, Kuijpers TW, Nichols KE, Lucas CL, Nagpal S, Mehmet H, Su HC, Cohen JI, Uzel G, Lenardo MJ. Mg²⁺ regulates cytotoxic functions of NK and CD8 T cells in chronic EBV infection through NKG2D. *Science* 2013; 341: 186–91.
- 146 Ward J, Davis Z, DeHart J, Zimmerman E, Bosque A, Brunetta E, Mavilio D, Planelles V, Barker E. HIV-1 Vpr triggers natural killer cell-mediated lysis of infected cells through activation of the ATR-mediated DNA damage response. *PLoS Pathog*. 2009; 5: e1000613.
- 147 Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Zhang S, Chen Y, Young L, Lau GW. The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 2006; 74: 2578-86.

- 148 Tieng V, Le Bouguéne C, du Merle L, Bertheau P, Desreumaux P, Janin A, Charron D, Toubert A. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2977-82.
- 149 Rausch A, Hessmann M, Hölscher A, Schreiber T, Bulfone-Paus S, Ehlers S, Hölscher C. Interleukin-15 mediates protection against experimental tuberculosis: a role for NKG2D-dependent effector mechanisms of CD8⁺ T cells. *Eur J Immunol.* 2006; 36: 1156-67.
- 150 Deitz SB, Dodd DA, Cooper S, Parham P, Kirkegaard K. MHC I-dependent antigen presentation is inhibited by poliovirus protein 3A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13790-5.
- 151 Dodd DA, Giddings TH Jr, Kirkegaard K. Poliovirus 3A protein limits interleukin-6 (IL-6), IL-8, and beta interferon secretion during viral infection. *J Virol.* 2001; 75: 8158-65.
- 152 Cornell CT, Kiosses WB, Harkins S, Whitton JL. Inhibition of protein trafficking by coxsackievirus b3: multiple viral proteins target a single organelle. *J Virol.* 2006; 80: 6637-47.
- 153 Wessels E, Duijsings D, Notebaart RA, Melchers WJ, van Kuppeveld FJ. A proline-rich region in the coxsackievirus 3A protein is required for the protein to inhibit endoplasmic reticulum-to-golgi transport. *J Virol.* 2005; 79: 5163-73.
- 154 Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 767-811.
- 155 Ebihara T, Masuda H, Akazawa T, Shingai M, Kikuta H, Ariga T, Matsumoto M, Seya T. Induction of NKG2D ligands on human dendritic cells by TLR ligand stimulation and RNA virus infection. *Int. Immunology.* 2007; 19: 1145-55.

- 156 Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2003; 198: 513-20.
- 157 Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004; 303: 1526-9.
- 158 Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol.* 2003; 171: 3154–62.
- 159 Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001; 194: 863-9.
- 160 Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis E, Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006; 441: 101-05.
- 161 Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol.* 2004; 172: 2001-5.
- 162 Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J. Immunol.* 2006; 176: 1517-24.
- 163 Mack EA, Kallal LE, Demers DA, Biron CA. Type 1 Interferon Induction of Natural Killer Cell Gamma Interferon Production for Defense during Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. *mBio* 2011; 2: e00169-11.
- 164 Pien GC, Satoskar AR, Takeda K, Akira S, Biron CA. Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma responses during viral infection. *J Immunol.* 2000; 165: 4787-91.

- 165 Orange JS, Biron CA. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN- γ production and antiviral defense: studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J. Immunol.* 1996; 159: 1138-42.
- 166 Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 75: 163-89.
- 167 Zompi S, Hamerman JA, Ogasawara K, Schweighoffer E, Tybulewicz VL, Di Santo JP, Lanier LL, Colucci F. The NKG2D receptor triggers cytotoxicity but not cytokine production in mouse NK cells lacking DAP12 or Syk and ZAP-70. *Nat Immunol.* 2003; 4: 565-72.
- 168 Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol.* 2003; 4: 557-64.
- 169 Talebian L, Fischer DA, Wu J, Channon JY, Sentman CL, Ernstoff MS, Meehan KR. The natural killer-activating receptor, NKG2D, on CD3⁺CD8⁺ T cells plays a critical role in identifying and killing autologous myeloma cells. *Transfusion.* 2014; 54: 1515-21.
- 170 Cerboni C, Ardolino M, Santoni A, Zingoni A. Detuning CD8⁺ T lymphocytes by down-regulation of the activating receptor NKG2D: role of NKG2D ligands released by activated T cells. *Blood.* 2009; 13: 2955-64.
- 171 Bukowski JF, Warner JF, Dennert G, Welsh RM. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J Exp Med.* 1985; 161: 40-52.
- 172 Passweg JR, Tichelli A, Meyer-Monard S, Heim D, Stern M, Kühne T, Favre G, Gratwohl A. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia.* 2004; 18: 1835-8.

173 Slavin S, Or R, Aker M, Shapira MY, Resnick I, Bitan M et al. Treatment of resistant leukemia by rIL-2 activated NK cells in recipients of HLA matched and haploidentically mismatched stem cell allografts while avoiding GVHD. *Blood* 2004; 104: 379.

174 Frese M, Schwärzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Haller O, Bartenschlager R. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 2002; 35: 694-703.

175 Klingel K, Fabritius C, Sauter M, Göldner K, Stauch D, Kandolf R, Ettischer N, Gahlen S, Schönberger T, Ebner S, Makrigiannis AP, Bélanger S, Diefenbach A, Polić B, Pratschke J, Kotsch K. The activating receptor NKG2D of natural killer cells promotes resistance against enterovirus-mediated inflammatory cardiomyopathy. *J Pathol.* 2014; 234: 164-77.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katrin Göldner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Funktionelle Bedeutung und Immunregulation Natürlicher Killerzellen bei der akuten und chronischen Enterovirusmyokarditis.“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift
(Hochschullehrer)

Unterschrift
(Doktorandin)

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Katrin Göldner hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation : Klingel K, Fabritius C, Sauter M, **Göldner K**, Stauch D, Kandolf R, Ettischer N, Gahlen S, Schönberger T, Ebner S, Makrigiannis AP, Bélanger S, Diefenbach A, Polić B, Pratschke J, Kotsch K. The activating receptor NKG2D of natural killer cells promotes resistance against enterovirus-mediated inflammatory cardiomyopathy. J Pathol. 2014; 234: 164-77.

Beitrag im Einzelnen:

- durchflusszytometrische Messung der Lymphozyten im Herz und in der Milz der C57BL/6 und A.BY/SnJ Tiere
- Bestimmung des Differenzierungsprofils der NK-Zellen innerhalb des Mausmodells
- Messung der NKG2D Expression auf NK-Zellen und dessen Liganden in C57BL/6 und A.BY/SnJ Tieren
- Durchführung der Degranulationsversuche (YAC-1, RMA-S, RMA-H60, HL-1 naiv und infiziert) und Bestimmung der NK-zellbedingten IFN- γ Sekretion durch Antikörperstimulation
- Bestimmung der relativen Expression von PRRs mittels *real-time* PCR
- durchflusszytometrische Analysen der NKG2D-neutralisierten und NKG2D ko Tiere
- Durchführung des adoptiven Transfers resistenter C57BL/6 NK-Zellen in permissive A.BY/SnJ Tiere und deren durchflusszytometrische Analysen
- graphische und statistische Auswertung der oben aufgeführten Analysen
- Mitarbeit an der Anfertigung des Manuskriptes

Datum

Unterschrift
(Hochschullehrer)

Unterschrift
(Doktorandin)

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Wissenschaftliche Publikationen

Klingel K, Fabritius C, Sauter M, **Göldner K**, Stauch D, Kandolf R, Ettischer N, Gahlen S, Schönberger T, Ebner S, Makrigiannis AP, Bélanger S, Diefenbach A, Polić B, Pratschke J, Kotsch K. The activating receptor NKG2D of natural killer cells promotes resistance against enterovirus-mediated inflammatory cardiomyopathy. *J Pathol.* 2014; 234: 164-77.

Wilk S, Jenke A, Stehr J, Yang CA, Bauer S, **Göldner K**, Kotsch K, Volk HD, Poller W, Schultheiss HP, Skurk C, Scheibenbogen C. Adiponectin modulates NK-cell function. *Eur J Immunol.* 2013; 43: 1024-33.

Stauch D, Yahyazadeh A, Bova R, Melloh GC, Földner A, Baron U, Olek S, **Göldner K**, Weiss S, Pratschke J, Kotsch K. (2012) Induction of bona fide regulatory T cells after liver transplantation - the potential influence of polyclonal antithymocyte globulin. *Transpl Int.* 2012; 25: 302-13.

Noutsias M, Rohde M, **Göldner K**, Block A, Blunert K, Hemaidan L, Hummel M, Blohm JH, Lassner D, Kühl U, Schultheiss HP, Volk HD, Kotsch K. Expression of functional T-cell markers and T-cell receptor Vbeta repertoire in endomyocardial biopsies from patients presenting with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2011; 13: 611-8.

Streitz M, Noutsias M, Volkmer R, Rohde M, Brestrich G, Block A, **Klippert K**, Kotsch K, Ay B, Hummel M, Kühl U, Lassner D, Schultheiss HP, Volk HD, Kern F. NS1 specific CD8⁺ T-cells with effector function and TRBV11 dominance in a patient with parvovirus B19 associated inflammatory cardiomyopathy. *PLoS One.* 2008; 3: e2361.

Noutsias M, Rohde M, Block A, **Klippert K**, Lettau O, Blunert K, Hummel M, Kühl U, Lehmkuhl H, Hetzer R, Rauch U, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Volk HD, Kotsch K. Pre-amplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC Mol Biol.* 2008; 9: 3.

Kunert K, Seiler M, Mashreghi MF, **Klippert K**, Schönemann C, Neumann K, Pratschke J, Reinke P, Volk HD, Kotsch K. KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation. *Transplantation*. 2007; 84: 1527-33.

Schäfer H, **Klippert K**, Meuer P, Borsdorf B, Kiderlen AF, Burger R. Biologic activity of guinea pig IFN-gamma in vitro. *J Interferon Cytokine Res*. 2007; 27: 305-15.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei vielen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit sehr unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk, Direktor des Institutes für Medizinische Immunologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, für die Möglichkeit der Ausführung meiner Promotion an seinem Institut.

Ein sehr großer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katja Kotsch für die freundliche Überlassung der interessanten Fragestellung und ihre hervorragende Betreuung meiner Dissertation. Darüber hinaus danke ich ihr für die hilfreiche Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen.

Zum anderen danke ich Frau Prof. Dr. Karin Klingel für ihren kompetenten Rat und die professionelle Begleitung meiner Arbeit. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Molekulare Pathologie“ des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Tübingen danke ich für die Ausführungen der histologischen und immunhistochemischen Arbeiten. Besonders möchte ich mich bei Dr. Martina Sauter für die Hilfe bei der Zucht, Haltung und Infektion der Versuchstiere bedanken.

Weiterhin danke ich meinen ehemaligen Kollegen Annelie Dernier, Dr. Diana Stauch, Dr. Cam-Tien Le und Cornelia Fabritius, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir stets hilfreich zur Seite standen.

Ich möchte auch ganz besonders meinen Eltern danken, die mir das Studium der Biologie ermöglichten und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

Meinem Mann Lennart Göldner danke ich von ganzem Herzen für die unermüdliche Unterstützung und seine fortwährende Geduld in dieser Zeit.