

Aus dem Institut für Virologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Myeloide Suppressorzellen vermindern die Aktivität
Natürlicher Killerzellen bei der Coxsackievirus B3 Myokarditis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lisa Maria Holz

Tierärztin

aus Tübingen

Berlin 2016

Journal-Nr.: 3922

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Nikolaus Osterrieder
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Karin Klingel
Dritter Gutachter:	PD Dr. Michael Veit

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): mice; animal models, Coxsackieviruses; man; myocarditis; spleen; suppressor cells; natural killer cells; polymerase chain reaction; in situ hybridization; flow cytometry; immunofluorescence

Tag der Promotion: 28.11.2016

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungen	4
2.	Einleitung	6
2.1.	Myokarditiden	6
2.1.1.	Virus-induzierte Myokarditiden beim Menschen	6
2.2.	Picornaviren	7
2.2.1.	Veterinärmedizinisch relevante Picornaviren	8
2.2.2.	Humanpathogene Picornaviren	9
2.3.	Coxsackievirus B3	10
2.3.1.	Replikationszyklus	10
2.3.2.	Pathogenese der humanen Enterovirusmyokarditis	12
2.3.3.	Verlauf der murinen CVB3 Myokarditis	14
2.4.	Das Immunsystem bei der CVB3 Myokarditis	15
2.4.1.	Angeborene und adaptive Immunantwort	15
2.4.2.	Natürliche Killerzellen (NK)	16
2.4.3.	Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)	19
2.4.4.	S100A8 und S100A9 Proteine	21
2.5.	Zielsetzung	23
3.	Material und Methoden	24
3.1.	Geräte und Apparaturen	24
3.2.	Verbrauchsmaterialien	24
3.2.1.	Chemikalien	24
3.2.2.	Zellkulturmedien und Zusätze	26
3.2.3.	Enzyme und andere Proteine	26
3.2.4.	Antikörper	26
3.2.5.	Kits	27
3.2.6.	Zelllinien	27
3.2.7.	Software	27
3.3.	Viren	27
3.4.	Versuchstiere - ingezüchtete Mausstämme	28
3.5.	Zellkultur und Zellisolierung	28
3.5.1.	Kultivierung von HeLa-Zellen und RAW-Zellen	28
3.5.2.	Isolierung von Immunzellen aus der Milz	28
3.5.3.	Isolierung von Immunzellen aus dem Herzen	29

3.5.4.	Isolierung von NK Zellen aus der Milz.....	30
3.5.5.	Isolierung von MDSC aus der Milz.....	31
3.6.	Molekularbiologische Methoden.....	32
3.6.1.	RNA Isolierung aus Gewebe mit der TriFast™-Methode.....	32
3.6.2.	Quantitative real-time RT-PCR.....	33
3.6.3.	In situ Hybridisierung.....	36
3.7.	Zellfärbungen.....	40
3.7.1.	Durchflusszytometrie.....	40
3.7.2.	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	42
3.7.3.	Histologische Färbungen.....	44
3.7.4.	Auswertung histologischer Schnitte.....	45
3.7.5.	Immunhistochemie.....	45
3.8.	Virologische Methoden.....	47
3.8.1.	CVB3 Infektion von HeLa-Zellen.....	47
3.8.2.	In vitro Untersuchung des Einflusses von MDSC auf NK Zellen.....	47
3.9.	Tierversuche.....	47
3.9.1.	Tierhaltung.....	47
3.9.2.	Infektion und Tötung der Versuchstiere.....	48
3.9.3.	Organentnahme und Fixierung der Organe.....	48
3.9.4.	In vivo Depletion der MDSC.....	49
3.10.	Statistische Auswertung der Daten.....	49
4.	Ergebnisse.....	50
4.1.	Das Mausmodell: CVB3 Myokarditis bei A.BY/SnJ und C57BL/6J Mäusen.....	50
4.2.	Nachweis von MDSC und ihre Wirkung im Verlauf der akuten CVB3 Infektion in C57BL/6J und A.BY/SnJ Mäusen.....	55
4.2.1.	Nachweis von Subpopulationen der MDSC in der Milz CVB3-infizierter Mäuse mittels Durchflusszytometrie.....	55
4.2.2.	Nachweis der Verteilung von MDSC Subpopulationen in Herzen CVB3-infizierter Mäuse mittels Durchflusszytometrie.....	59
4.2.3.	Immunfluoreszenzdarstellung von MDSC in der Milz.....	61
4.2.4.	Immunfluoreszenzdarstellung von MDSC im Herzen.....	64
4.2.5.	Regulation von NK Zellen durch MDSC in vitro.....	65
4.3.	Untersuchung des Einflusses proinflammatorischer Proteine in Zusammenhang mit MDSC während der CVB3 Myokarditis.....	68

4.3.1.	Bedeutung und Verteilung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β und Interleukin-6 bei der CVB3 Myokarditis.....	68
4.3.2.	Untersuchung der MDSC-Regulatoren S100A8 und S100A9 in der Milz	73
4.3.3.	Nachweis der MDSC-Regulatoren S100A8 und S100A9 im Herzen	74
4.3.4.	Untersuchung von MDSC auf die Expression von S100A8/9.....	76
4.4.	In vivo Depletion der MDSC.....	79
4.4.1.	Nachweis der Depletion von Gr-1 ⁺ Zellen	79
4.4.2.	Veränderung der CVB3 Viruslast nach Depletion der MDSC.....	80
4.4.3.	Histologische Untersuchung des Myokards nach MDSC Depletion.....	81
4.4.4.	Immunhistochemische Darstellung von Mac3 ⁺ Makrophagen und CD3 ⁺ T-Lymphozyten im Herzen nach MDSC Depletion	84
4.4.5.	Untersuchung von S100A8/9 im Herzen nach MDSC Depletion	88
4.4.6.	Analyse der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α in CVB3-infizierten Herzen nach MDSC Depletion	97
4.4.7.	Wirkung der MDSC Depletion auf die Zytokinexpression in NK Zellen	101
5.	Diskussion.....	105
5.1.	Akkumulation von MDSC im Verlauf der CVB3 Infektion in A.BY/SnJ Mäusen	106
5.2.	In vivo Depletion von MDSC vermindert die verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine im Myokard bei der CVB3 Infektion.....	107
5.3.	Die Interaktion von MDSC mit S100A8 und S100A9 in Milz und Herz	110
5.4.	MDSC supprimieren die Funktion von NK Zellen bei der CVB3 Infektion	111
5.5.	Ausblick	116
6.	Erklärung	117
7.	Zusammenfassung	118
8.	Summary.....	119
9.	Literaturverzeichnis.....	120
I.	Abbildungsverzeichnis	135
II.	Tabellenverzeichnis.....	138
III.	Anhang.....	139
III.I.	Publikationsverzeichnis.....	139
III.II.	Danksagung	140
III.III.	Selbstständigkeitserklärung.....	141

1. Abkürzungen

AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BSA	Bovines Serum Albumin
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ci	Curie
CVB3	Coxsackievirus B3
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern molecules</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	<i>Dendritic cell</i> / Dendritische Zelle
DCM	<i>Dilatative cardiomyopathy</i> / Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>days post infection</i> / Tage nach der Infektion
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> / fötales Kälberserum
fg	Femtogramm
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>forward scatter channel</i>
g	Mittlere Erdbeschleunigung
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase
IFN- α	Interferon alpha
IFN- β	Interferon beta
IFN- α R	Interferon alpha Rezeptor
IFN- γ	Interferon gamma
IFN- γ R	Interferon gamma Rezeptor
IL	Interleukin
IMC	<i>immature myeloid cells</i> / unreife myeloide Zellen
iNOS	induzierbare NO-Synthase
ip	intraperitoneal
JAK3	Janus Kinase 3
kb	kilo Basenpaare
MAC3	<i>Macrophage-3 antigen</i>
MACS	<i>Magnetic cell separation</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i> / Myeloide Suppressorzellen
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> / Haupthistokompatibilitätskomplex

min	Minute (n)
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1α</i>
MKS	Maul- und Klauenseuche
mM	millimolar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> / Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRP8	<i>Myeloid-related protein 8</i> (= S100A8)
MRP14	<i>Myeloid-related protein 14</i> (= S100A9)
ml	Milliliter
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NKG2D	<i>Natural-killer group 2 member D</i>
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NO	<i>Nitric oxide</i> / Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> / phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> / Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pg	Pikogramm
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pi	<i>post infectionem</i>
pmol	Pikomol
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming units</i>
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase PCR
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> / reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> / Umdrehung pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
S100A8	<i>S100 calcium-binding protein A8</i>
S100A9	<i>S100 calcium-binding protein A9</i>
SCF	<i>stem-cell factor</i> / Stammzellfaktor
sec	Sekunden
SSC (FACS)	<i>side scatter channel</i>
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
STAT5	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 5</i>
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
U	<i>Units</i>
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
rpm	<i>revolutions per minute</i> / Umdrehungen per Minute

2. Einleitung

2.1. Myokarditiden

Von Myokarditis spricht man bei einer Schädigung kardialer Myozyten mit reaktiver Infiltration des Herzmuskels durch Entzündungszellen. Hierzu gehören jedoch nicht Läsionen, welche durch Ischämie verursacht werden (Maisch, Portig et al., 2000). Die Ursachen für Myokarditiden sind vielfältig und können sowohl infektiöser als auch nicht-infektiöser Natur sein (Feldman und McNamara, 2000; Kandolf, 2011; Caforio, Pankuweit et al., 2013). Für eine ätiologische Diagnose der Myokarditis ist die Entnahme einer Endokardbiopsie notwendig (Caforio, Pankuweit et al., 2013; Yilmaz, Kindermann et al., 2010). An ihr kann durch histopathologische und immunhistologische Untersuchungen in Kombination mit *in situ* Hybridisierung und Polymerasekettenreaktionen (PCR) die Diagnose Myokarditis gestellt und in den meisten Fällen ein ätiologischer Hintergrund bestimmt werden. Ursächlich kommen für eine Myokarditis, die auch inflammatorische Kardiomyopathie genannt wird, Infektionen durch Viren (z.B. verschiedene Enteroviren oder Herpesviren), Bakterien (beispielsweise *Borrelia burgdorferi*), Parasiten (v.a. *Trypanosoma cruzi*) oder Pilze in Frage. Doch auch entzündliche Systemerkrankungen, wie Sarkoidose, Sklerodermie oder Lupus erythematodes sowie Arzneimittelüberempfindlichkeiten und toxische Substanzen, wie Kokain, Eisen und Kupfer können das Myokard schädigen (Liu, Martino et al., 1996; Feldman und McNamara, 2000; Cooper, 2009). Häufig ist eine inflammatorische Kardiomyopathie auch immunologisch bedingt, wie bei der Riesenzellenmyokarditis oder der lymphofollikulären Myokarditis (Klingel, Lang et al., 2010; Kandolf, 2011).

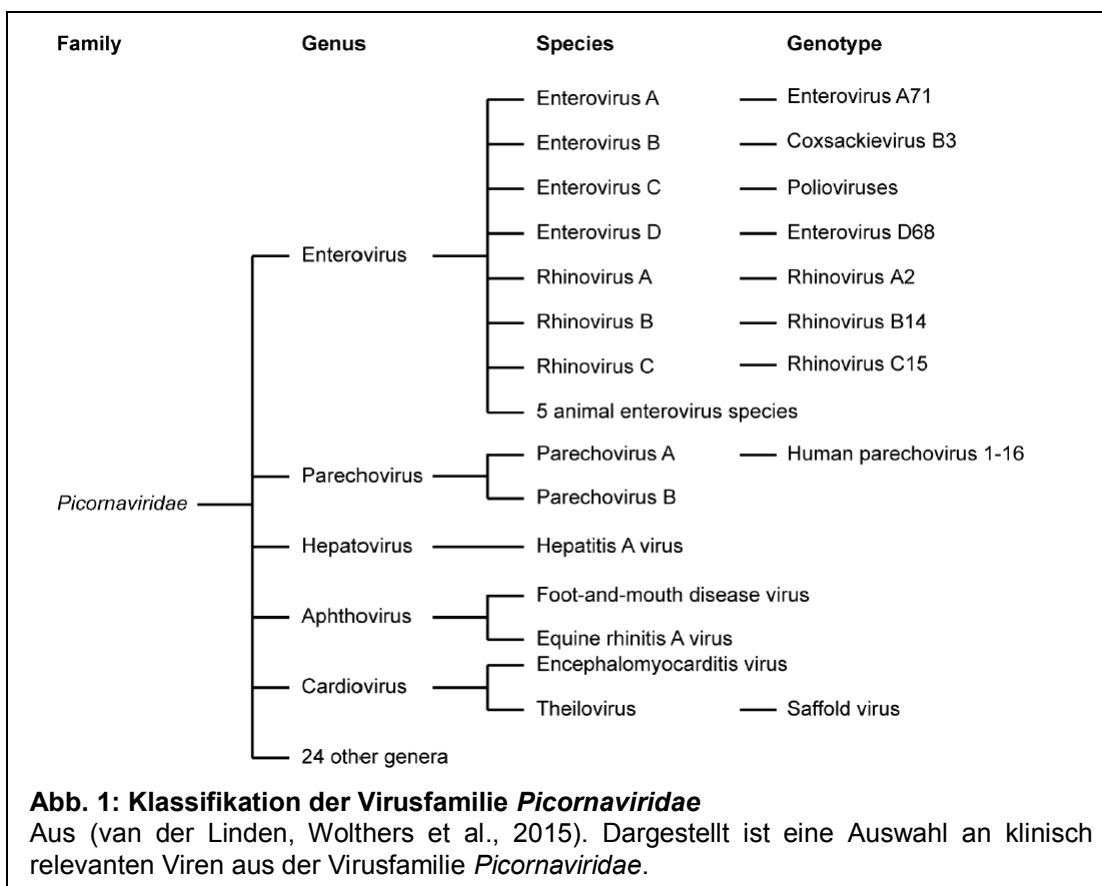
2.1.1. Virus-induzierte Myokarditiden beim Menschen

Viren sind in Industrieländern die häufigste Ursache einer inflammatorischen Kardiomyopathie (Esfandiari und McManus, 2008), wobei über 20 verschiedene Viren mit Myokarditis assoziiert werden (Grist und Reid, 1997). Manchen Viren, wie den Enteroviren, kommt eine direkte ätiopathogenetische Bedeutung zu (Bowles, Richardson et al., 1986). Ebenso konnten im Herz Infektionen mit Parvovirus B19, Adenoviren, humanes Herpesvirus 6, humanes Cytomegalievirus und Epstein Barr-Virus mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden (Pankuweit und Klingel, 2013). Für andere Viren konnte bisher keine direkte Schädigung durch Virusvermehrung im Herzen gezeigt werden; stattdessen geht man hier von schädlichen

Einflüssen durch systemische Immunprozesse aus. Dazu gehören Influenzaviren sowie das humane Immundefizienz Virus und das Hepatitis C Virus (Matsumori, 2005; Cooper, 2009). Trotz der Vielfalt potenziell ursächlicher Viren sind Coxsackieviren einer der Hauptgründe für eine Myokarditis, besonders bei Neugeborenen und Kleinkindern (Esfandiarei und McManus, 2008). Coxsackieviren gehören zum Genus der Enteroviren und damit zur Familie der Picornaviridae, einer vielfältigen Gruppe von RNA Viren (van der Linden, Wolthers et al., 2015).

2.2. Picornaviren

Derzeit besteht die Familie der Picornaviridae (pico, lat. für klein) aus 29 Genera, von denen Enterovirus, Parechovirus, Hepatovirus, Cardiovirus, Aphthovirus und Teschovirus die klinisch relevantesten sind (van der Linden, Wolthers et al., 2015; Adams, King et al., 2013). Zudem werden ständig neue Viren beschrieben, welche der Virusfamilie hinzugefügt werden können.



Mit ungefähr 30 nm Durchmesser sind die Viren dieser Familie relativ klein. Das Genom liegt als einzelsträngige RNA mit Plusstrang-Orientierung ((+)ssRNA) vor, sodass das Virusgenom direkt transkribiert und dann in ein großes Polyprotein translatiert werden kann (Racaniello, 2001). Die

Viren bestehen aus einem ikosaedrischen Kapsid ohne Membranhülle, was sie gegenüber Detergentien unempfindlich macht. Das Kapsid setzt sich aus jeweils 60 Einheiten der 4 Virusproteine VP1 bis 4 zusammen, wobei VP4 sich an der Innenseite des Kapsids befindet und mit dem RNA Genom assoziiert ist.

Die Vertreter dieser Familie sind divers und können sowohl Menschen als auch Tiere infizieren. Ihre Entdeckung gehört mit zu den ersten Forschungsarbeiten an Viren in der Geschichte der Infektionskrankheiten. So wurde das Maul- und Klauenseuche Virus in den Jahren 1897/98 von Friedrich Loeffler und Paul Frosch als erstes tierpathogenes Virus überhaupt entdeckt. Die erste Beschreibung eines humanpathogenen Erregers der Picornaviridae erfolgte 1909, als sowohl Jacob von Heine als auch Oskar Medin Viren als Ursache der Kinderlähmung erkannten, die Charakterisierung des Poliovirus erfolgte jedoch erst 1955. Bei den Vertretern dieser Virusfamilie reicht das durch sie ausgelöste Krankheitsspektrum von schwachen Erkrankungen, wie Schnupfen, bis hin zu sehr schwerwiegenden Leiden, wie beispielsweise Hirnhaut- und Herzmuskelentzündung (Mayr und Rolle, 2006; Modrow, Falke et al., 2009).

2.2.1. Veterinärmedizinisch relevante Picornaviren

Von den veterinärmedizinisch relevanten Picornaviren ist das Maul- und Klauenseuche Virus, ein Aphthovirus, das Bekannteste. Die Maul- und Klauenseuche (MKS) war die erste Infektionskrankheit, bei der Löffler und Frosch 1897/98 ein Virus als Erreger nachwiesen (Mayr und Rolle, 2006). Diese hochkontagiöse, anzeigepflichtige Tierseuche ist eine der wichtigsten Viruserkrankungen der Paarhufer und führt durch Handelseinschränkungen und Langzeitschäden sowie einer verminderten Produktivität der Tiere vor allem zu hohen ökonomischen Schäden (Jamal und Belsham, 2013). Zwischen den 7 bekannten Serotypen O, A, C, SAT 1-3 und Asia 1 besteht keine Kreuzreaktivität, was eine Bekämpfung zusätzlich erschwert (Brooksby, 1958). Das typische Erscheinungsbild der MKS mit Aphthenbildung im Bereich des Mauls, der Zitzen und im Zwischenklauenspalt kann auch bei anderen Virusinfektionen auftreten, weshalb ein weiteres Picornavirus, das Vesicularvirus, genauso anzeigepflichtig ist. Das Vesicularvirus vom Genus der Enteroviren ruft bei Schweinen ebenfalls Aphthen (*SVD, swine vesicular disease*) hervor und ist klinisch nur schwer von der MKS abzugrenzen. Der Erreger wird auch als porcines Enterovirus Serotyp 9 bezeichnet und ist antigenverwandt mit dem humanpathogenen Coxsackievirus B5. Ein weiteres Enterovirus der Schweine ist das Teschovirus, welches auch als ansteckende Schweinelähme sowie Teschen Krankheit und *Talfan disease* bezeichnet wird. Neben seiner Affinität zum Darmtrakt hat das

Virus auch neurotrope Eigenschaften, so ähnelt die Lähmungsform der ebenfalls durch Enteroviren hervorgerufenen Poliomyelitis des Menschen und der Theilerschen Krankheit der Mäuse (Mayr und Rolle, 2006). In den Jahren 1930 bis 1950 waren hochvirulente Stämme für eine tödliche Enzephalomyelitis verantwortlich, die als Teschen-Krankheit beschrieben wurde. Heutzutage ist eine eher milde, abortive Form in den meisten Teilen der Welt endemisch, welche als Talfan disease bekannt ist, und häufig mit anderen Pathogenen zusammen zu multifaktoriellen Krankheitsgeschehen führt (Chiu, Hu et al., 2012). Auch die aviäre Enzephalomyelitis, verursacht durch Enteroviren, gleicht klinisch dem Erscheinungsbild der bei Menschen, Schweinen und Mäusen vorkommenden Poliomyelitiden. Die meist bei Küken akut auftretende Viruserkrankung führt zu hohen wirtschaftlichen Verlusten (Calnek, 1998). Überdies spielen die zu dem Genus der Cardioviren gehörenden EMC-Viren (*Encephalomyocarditisvirus*) sowohl für das Tier als auch für den Menschen eine Rolle. Die bei wildlebenden Nagern vorkommenden Viren können auf Schweine und als Zoonose auch auf den Menschen übertragen werden und verursachen hauptsächlich eine Myokarditis, in einigen Fällen auch eine milde, nichteitrige Enzephalitis (Mayr und Rolle, 2006; Carocci und Bakkali-Kassimi, 2012). Wie beim Menschen verursachen Rhinoviren, die ebenfalls zu den Picornaviren gehören, vor allem bei Rindern und Pferden respiratorische Erkrankungen und sind weit verbreitet. Häufig kommt es erst durch sekundäre bakterielle Infektionen zu klinischen Symptomen. Bei Rindern können Rhinovirusinfektionen an der enzootischen Bronchopneumonie beteiligt sein (Phillip und Darbyshire, 1971; Mayr und Rolle, 2006). Im Gegensatz zum Menschen spielen Hepatoviren bei Tieren keine wesentliche pathogenetische Rolle.

2.2.2. Humanpathogene Picornaviren

Die wichtigsten Erreger der humanpathogenen Picornaviren stammen aus dem Genus der Enteroviren, diese teilen sich auf in die Spezies der Entero- und der Rhinoviren. Enteroviren, deren bekannteste Vertreter Coxsackieviren und Polioviren darstellen, dringen in der Regel über den Mund ein und können sich auf Grund ihrer Säurestabilität im Magen-Darm-Trakt vermehren. Das Spektrum der durch sie hervorgerufenen Krankheiten und Symptome ist breit, wobei der Verlauf der Infektion sowohl durch die Virulenz, also die Fähigkeit des Erregers den infizierten Organismus zu schädigen, als auch durch Wirtsfaktoren bestimmt wird (van der Linden, Wolthers et al., 2015). So verläuft beispielweise eine Poliovirusinfektion meistens mild und klinisch inapparent, in 1-2% der Fälle kann sich jedoch eine nicht-paralytische aseptische Meningitis oder noch seltener (0,1-1% der Fälle) eine Poliomyelitis entwickeln (Atkinson,

Hamborsky et al., 2012). Rhinoviren können den oberen und den unteren Respirationstrakt infizieren und bilden die Hauptursache für leichte Erkältungskrankheiten, teilweise verursachen sie allerdings schwere Pneumonien (Tapparel, Siegrist et al., 2013).

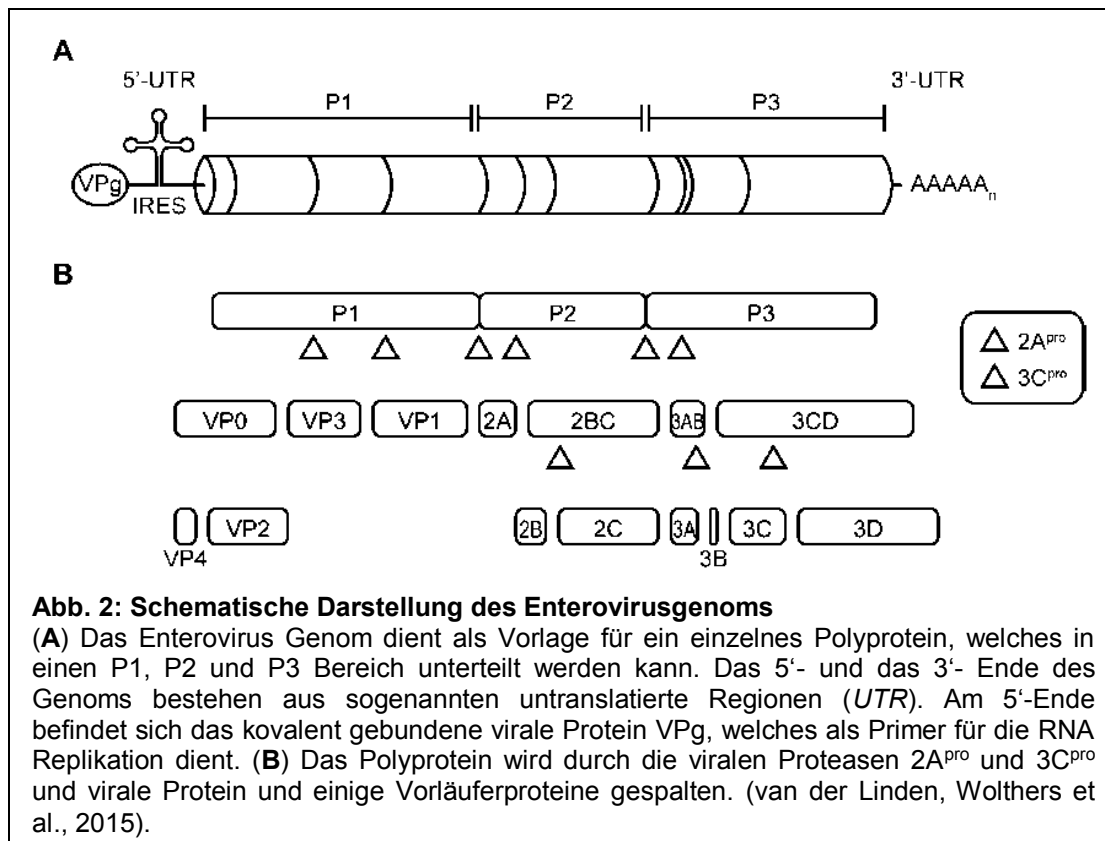
Die zum Genus der Enteroviren gehörenden Coxsackieviren wurden 1947 erstmals beschrieben, als Gillbert Dalldorf in Coxsackie im US-Bundesstaat New York entdeckte, dass eine Infektion mit virushaltigem Material zu einer Lähmung bei neugeborenen Mäusen führt (Modrow, Falke et al., 2009). Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens bei dieser Infektion werden die Coxsackieviren den Gruppen A (CVA) und B (CVB) zugeteilt. Coxsackieviren der Gruppe A, welche die Serotypen 1-22 und 24 beinhaltet, führen bei neugeborenen Mäusen zu einer generalisierten Myositis mit peraktem Infektionsverlauf (Gifford und Dalldorf, 1951). Beim Menschen verursachen sie vor allem die Hand-Fuß-Mund-Krankheit, können aber auch zu Konjunktivitis, Perikarditis, Meningitis und Myokarditis führen (Mao, Wang et al., 2014). Coxsackieviren der Gruppe B mit den Serotypen 1-6 verursachen bei neugeborenen Mäusen eine akute Infektion mit Multiorganbeteiligung (Gifford und Dalldorf, 1951) und werden beim Menschen vor allem mit Myokarditis, Meningitis und der Bornholm-Erkrankung assoziiert (Tapparel, Siegrist et al., 2013; Kandolf, 2004). Von den 6 Serotypen der Gruppe B handelt es sich bei CVB6 um den einzigen apathogenen Vertreter. Bei Infektionen mit CVB4 wird ein Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ 1 vermutet (Coppieters, Boettler et al., 2012). Die bedeutendsten Erreger einer virusinduzierten Myokarditis sind allerdings die CVB1-5, insbesondere CVB3 (Gaaloul, Riabi et al., 2011; Baboonian, Davies et al. 1997; Verma, Zheng et al. 2009; Kandolf und Hofschneider, 1989).

2.3. Coxsackievirus B3

2.3.1. Replikationszyklus

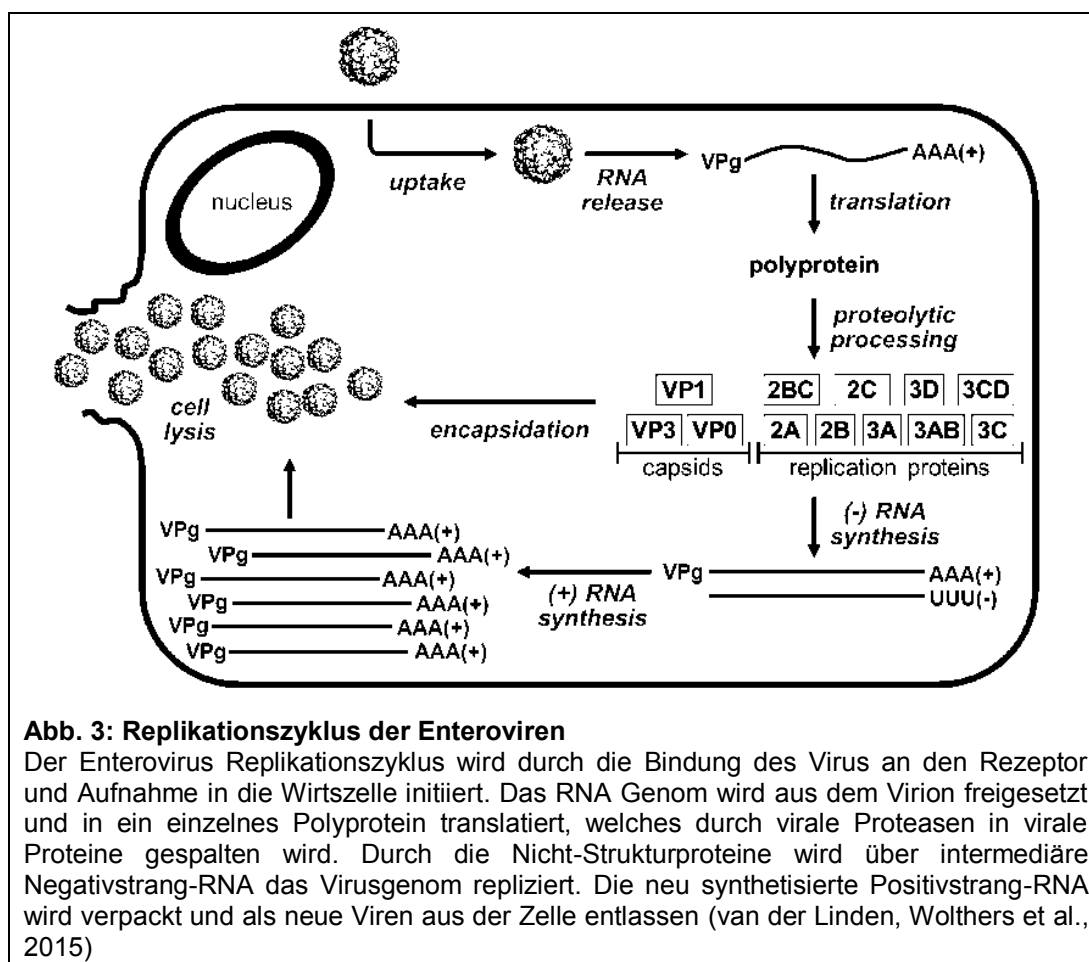
Die Initiation eines produktiven Replikationszyklus findet vermutlich durch die Bindung von CVB3 an das Membranprotein CD55 (*decay accelerating factor*, DAF) statt. Diese Bindung nutzt das Virus, um über einen Remodellierungsmechanismus des Aktinzytoskeletts zu dem eigentlichen Internalisierungsrezeptor CAR (*Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor*) vorzudringen (Coyne und Bergelson, 2006). Das Transmembranprotein CAR, unter anderem in Herz, Hirn und Pankreas exprimiert, ist assoziiert mit *tight-junctions* und somit für die Virusbindung nicht frei zugänglich (Tomko, Xu et al., 1997; Wang und Bergelson, 1999). Nach der Aufnahme des Virus in die Wirtszelle erfolgt das Freisetzen der viralen RNA in das Zytoplasma der Zielzelle. Da das

7,4 kb große, einzelsträngige Genom in Positivstrangorientierung vorliegt, dient es als direkte Vorlage für die Generierung eines großen viralen Polyproteins (Modrow, Falke et al., 2009), welches unterteilt wird in P1, P2, und P3 (Abb. 2) (van der Linden, Wolthers et al., 2015).



Das CVB3 Genom verfügt über ein kleines Virusprotein VPg am 5'-Ende, welches für den Start der Proteinsynthese verantwortlich ist. Das entstandene Polyprotein wird durch die von dem Virus encodierten Proteasen 2A^{pro} und 3C^{pro} in drei Vorläufermoleküle P1-P3 gespalten (Abb. 2B) (van der Linden, Wolthers et al., 2015). Aus P1 entstehen nach Spaltung durch die Protease 3C^{pro} die strukturgebenden Kapsidproteine (VP1-4). Bei P2 und P3 handelt es sich um Nicht-Strukturproteine, bestehend aus viralen Proteasen und Polymerasen. Dabei übernehmen die Proteine 2A-C verschiedene Aufgaben, wie die Spaltung des zellulären Dystrophins und die Erhöhung der Zellpermeabilität, welche eine Freisetzung neu gebildeter Virionen fördern (Esfandiari und McManus, 2008). Aus P3 entwickelt sich unter anderem 3D^{pol}, eine RNA-abhängige-RNA-Polymerase, die am 3'-PolyA-Ende des Genoms ansetzt, um intermediäre Negativstrang-RNA herzustellen, welche als Vorlage für die Produktion neuer Positivstrang-RNA dient (Abb. 3) (van der Linden, Wolthers et al., 2015; Paul, van Boom et al., 1998). Von einer

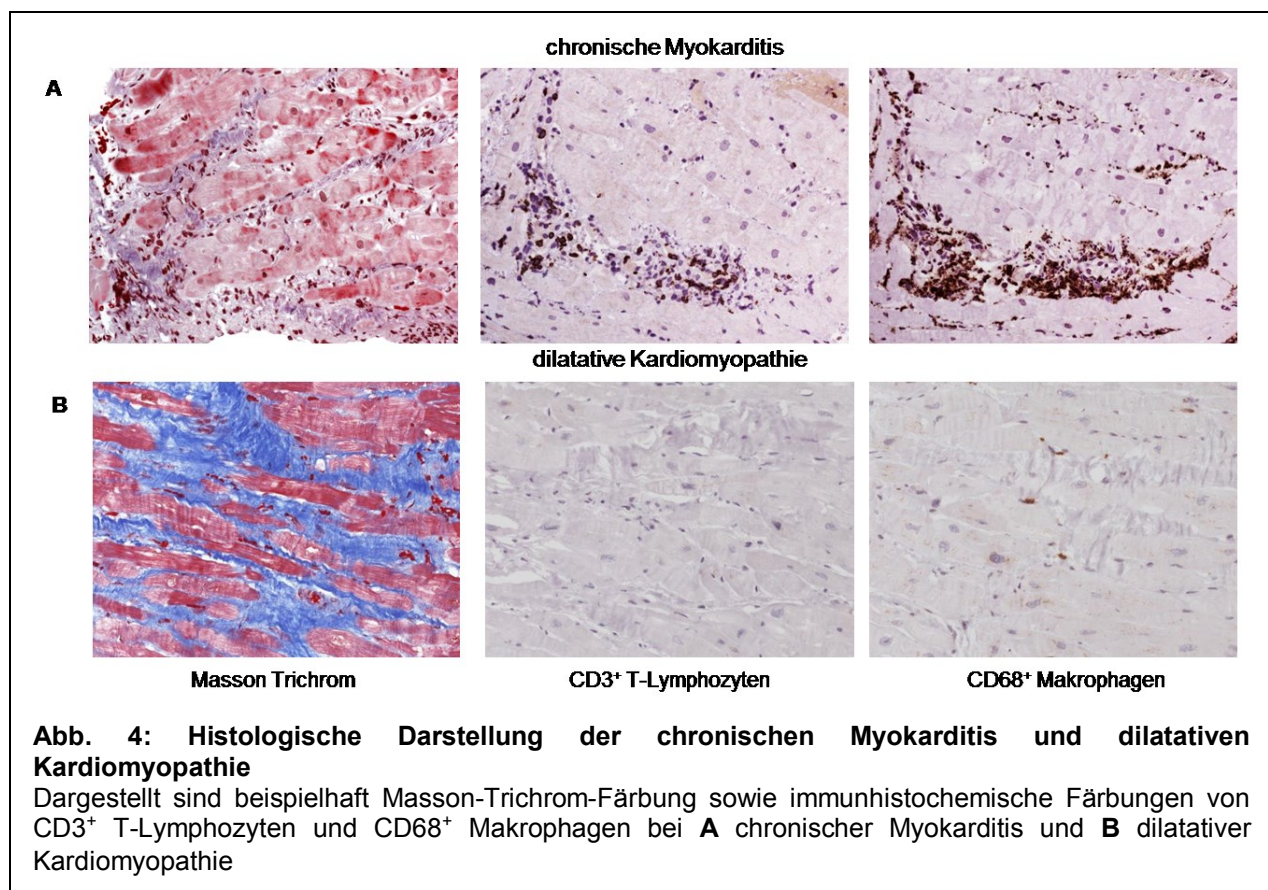
viralen Negativstrang-RNA können viele positiv-orientierte Kopien erstellt werden, wobei während der akuten Infektion die Ratio von negativen zu positiven RNA-Strängen ca. 1:100 beträgt (Hohenadl, Klingel et al., 1991). Die neu gebildete Positivstrang-RNA wird verpackt und als neue Viren aus der Zelle entlassen, wobei es zur Lyse der infizierten Zelle kommt (Kandolf, Sauter et al., 1999; Whitton, Cornell et al., 2005).



2.3.2. Pathogenese der humanen Enterovirusmyokarditis

Von den Coxsackieviren B1–5, die mit viraler Myokarditis assoziiert sind, wird CVB3 die bedeutendste Rolle bei der Pathogenese zugeschrieben (Longson, Cole et al., 1969). Als säurestabiles Enterovirus wird CVB3 oral aufgenommen und infiziert das lymphatische Gewebe des Gastrointestinaltrakts. Viele Infektionen verlaufen asymptomatisch oder zeigen nach 1-2 Wochen Inkubationszeit leichte erkältungsähnliche („Sommergrippe“), teilweise mit Durchfall verbundene Symptome (Modrow, Falke et al., 2009). Abhängig von der Wirtsabwehr kann es allerdings auch zu einer sekundären Virämie im Blut mit Ausbreitung des Erregers in Herz,

Zentralnervensystem oder Pankreas kommen (Klingel, Stephan et al., 1996; Melnick, 1996). Sowohl die Virulenz und der Tropismus des Virusstammes als auch Wirtsfaktoren wie Alter und Immunstatus entscheiden über den weiteren Verlauf und das Ausmaß der Organbeteiligung. Besonders bei Säuglingen führt eine CVB3 Infektion häufig zu einer Multiorganbeteiligung und endet in 50% der Fälle tödlich, während sie sich bei Erwachsenen mit intaktem Immunsystem hauptsächlich im Myokard manifestiert und auch ohne Folgeschäden ausheilen kann (Woodruff, 1980; Kim, Hufnagel et al., 2001). Fast ein Drittel der Patienten mit viraler Myokarditis entwickelt allerdings eine chronische Erkrankung, die teilweise mit einer Viruspersistenz einhergeht und aus der eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) entstehen kann (Mason, 2003; Esfandiarei und McManus, 2008). Während bei der chronischen Myokarditis (Abb. 4A) die Persistenz von Immunzellen wie T-Lymphozyten und Makrophagen im Vordergrund steht und eine geringgradige herdförmige Fibrose vorhanden ist, ist die dilatative Kardiomyopathie (Abb. 4B) gekennzeichnet durch großflächige Fibrose mit starken Kaliberschwankungen der Kardiomyozyten ohne Inflammation.



Welche Pathomechanismen genau die Myokardschäden bei der CVB3 Infektion verantworten, wird kontrovers diskutiert. Für eine direkt durch das Virus verursachte Schädigung der Myozyten spricht die Tatsache, dass eine Virusreplikation *in vitro* und *in vivo* zum Zelltod führt (Saraste, Arola et al., 2003). Außerdem konnte im transgenen Mausmodell gezeigt werden, dass eine herzspezifische Expression einer replikationslimitierten CVB3 cDNA in einer Kardiomyopathie resultiert (Wessely, Klingel et al., 2001). Obwohl das Immunsystem des Wirts eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung der CVB3 Myokarditis spielt, konnte ebenso ein schädigender Einfluss beispielsweise durch T-Lymphozyten gezeigt werden (Henke, Huber et al., 1995). Verschiedene immunsuppressive Therapien, wie zum Beispiel die Gabe von Prednisolon oder IFN α , zeigten gleichwohl keinen Erfolg bei einer CVB3 Infektion (Hia, Yip et al., 2004), lediglich immunmodulatorische Ansätze wurden als erfolgreich beschrieben (Nishio, Matsumori et al., 1999). Außerdem steht eine autoimmunvermittelte Schädigung des Myokards in der Diskussion, bei der autoreaktive Antikörper und antigenspezifische T-Lymphozyten eine Rolle spielen (Wolff, Kühl et al., 1989; Schwimbeck, Badorff et al., 1996). Es ist offensichtlich, dass ein fragiles Zusammenspiel von Virus- und Wirtsfaktoren über Verlauf und Ausgang einer CVB3 Myokarditis entscheidet.

2.3.3. Verlauf der murinen CVB3 Myokarditis

Ein Großteil des Wissens über die Pathophysiologie viraler Myokarditiden des Menschen stammt aus Mausmodellen. Obwohl verschiedene Viren an der Ätiologie einer Kardiomyopathie beteiligt sein können, sind zelluläre und molekulare Mechanismen der viralen Myokarditis in CVB3 Mausmodellen am besten untersucht (Yajima, 2011; Klingel, Hohenadl et al., 1992). Da der histopathologische Verlauf der Enterovirusmyokarditis und die klinischen Symptome beim Menschen und in der Maus große Ähnlichkeiten aufweisen, ermöglicht dieses Mausmodell eine einzigartige Differenzierung spezifischer Virus-Wirt-Wechselwirkungen *in vivo* (Melnick und Godman, 1951; Woodruff, 1980). Ebenso wie die meisten der Patienten eliminieren intraperitoneal CVB3-infizierte C57BL/6J und DBA/1J Mäuse das Virus während der Phase der akuten Myokarditis. Im Gegensatz dazu führt die CVB3 Infektion bei A.BY/SnJ und SWR/J Mäusen zu einer Viruspersistenz in Myokard, Milz und den Lymphknoten und die Tiere entwickeln eine chronische inflammatorische Herzmuskelerkrankung (Klingel, McManus et al., 1995; Kandolf, Sauter et al., 1999; Esfandiarei und McManus, 2008). Der entscheidende Einfluss der Wirtsgenetik und hierbei insbesondere des Immunsystems auf die Chronizität der CVB3 Myokarditis wird hierdurch demonstriert (Klingel, Hohenadl et al., 1992).

2.4. Das Immunsystem bei der CVB3 Myokarditis

2.4.1. Angeborene und adaptive Immunantwort

Die unterschiedliche Entwicklung einer CVB3 Infektion je nach Alter und genetischer Prädisposition des Wirtes verdeutlicht die elementare Rolle des Immunsystems bei einer Virus-induzierten Kardiomyopathie. Man unterscheidet anhand immunologischer und pathologischer Befunde verschiedene Phasen während einer CVB3 Myokarditis.

Während der akuten Phase kommt es nach hämatogener Infektion zu einer Virusreplikation in den Myozyten und durch Zell-zu-Zell-Infektion zur Schädigung des Myokards (Kandolf, Sauter et al., 1999). Bereits frühzeitig kann im Herzen ein Anstieg an proinflammatorischen Molekülen, wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und der Interferone Typ 1 (IFN α + β) und Typ 2 (IFN γ) detektiert werden (Seko, Takahashi et al., 1997). Suszeptible A.BY/SnJ Mäuse, die einen schwereren akuten Verlauf der CVB3 Infektion zeigen und eine chronische Myokarditis entwickeln, fallen dabei mit deutlich niedrigerem und später ansteigenden IFN γ als resistente C57BL/6J Mäuse auf (Szalay, Sauter et al., 2006). Die CVB3 Infektion IFN-Rezeptor-defizienter Mäuse weist auf eine große Relevanz von IFN α und β hin, da die Abwesenheit von IFN Typ 1 Rezeptoren im Gegensatz zu IFN Typ 2 Rezeptoren zu einer höheren Mortalität führt (Wessely, Klingel et al., 2001). Durch die Migration von Zellen des angeborenen Immunsystems wird die Virusreplikation eingedämmt, bis das adaptive Immunsystem antigenspezifisch reagiert. Somit wandern in der Frühphase der Infektion dendritische Zellen (DC), Natürliche Killerzellen (NK Zellen) und Makrophagen in das Myokard ein (Yajima, 2011). Sobald das Virus von DC erkannt wird, wird es in Fragmenten über MHC-II Rezeptoren T-Lymphozyten präsentiert und diese hierdurch aktiviert. Die elementare Fähigkeit diese antigenen Virusfragmente CD4 $^{-}$ /CD8 $^{+}$ T-Lymphozyten angemessen zu präsentieren hängt von der Subpopulation der DC ab. Es wurde gezeigt, dass sich C57BL/6J und A.BY/SnJ Mäuse in diesem Bereich des Immunsystems grundsätzlich unterscheiden. So weisen dendritische Zellen resistenter C57BL/6J Mäuse deutlich mehr Interleukin 10 (IL-10), IL-6 und TNF α auf und sind kompetenter darin, T-Zellen in eine CD4 $^{-}$ /CD8 $^{+}$ -Richtung zu aktivieren als die suszeptibler A.BY/SnJ Mäuse (Weinzierl, Szalay et al., 2008). Zusätzlich produzieren Makrophagen suszeptibler A.BY/SnJ Mäuse später dafür jedoch länger als bei C57BL/6J Mäusen im Verlauf der CVB3 Infektion zytotoxische iNOS (induzierbare NO-Synthase). Diese erhöhte iNOS Expression trägt somit zur Progression der kardialen Inflammation bei suszeptiblen Tieren bei (Szalay, Sauter et al., 2006).

Während der subakuten Phase der CVB3 Myokarditis wandern Zellen der adaptiven Immunantwort ins Herz ein. Von DC aktiviert, erkennen CD8⁺ T-Lymphozyten CVB3-infizierte Myozyten über den MHC-I Rezeptor (Seko, Tsuchimochi et al., 1990; Klingel und Kandolf, 1996). Die Zytokine IFN γ und TNF α verstärken diese Reaktion zusätzlich durch eine gesteigerte Expression von MHC-I Rezeptoren und einer intensivierten Zell-zu-Zellbindung (Seko, Matsuda et al., 1993). Auch Antikörper gegen CVB3 tragen zu einer antiviralen Reaktion in dieser Phase der Erkrankung bei (Yajima, 2011). Etwa 2 Wochen nach der CVB3 Infektion entscheidet die Effizienz der Immunantwort über eine erfolgreiche Eliminierung des Virus aus dem Herzmuskel. Während resistente C57BL/6J Mäuse CVB3 komplett eliminieren und genesen, persistiert bei suszeptiblen A.BY/SnJ das Virus in Myozyten sowie in B-Lymphozyten und Makrophagen (Kandolf, Sauter et al., 1999). Bei diesen Mäusen führen Viruspersistenz und chronisch-inflammatorische Läsionen zu einer interstitiellen Fibrose und Myozytendegeneration (Chow, Gauntt et al., 1991; Klingel, Hohenadl et al., 1992; Klingel und Kandolf, 1996). Eine anhaltende Schädigung des Myokards kombiniert mit Remodelling des Gewebes kann zu degenerativen Veränderungen wie einer DCM führen (Kawai, 1999). Der Zusammenhang zwischen Viruspersistenz und der Entwicklung einer DCM konnte zwar im transgenen nicht-infektiösen CVB3 Mausmodell gezeigt werden (Wessely, Klingel et al., 2001), wird beim Menschen jedoch noch kontrovers diskutiert (Kühl, Pauschinger et al., 2005; Kindermann, Kindermann et al., 2008).

Zusammenfassend sind die angeborene und die erworbene Immunantwort entscheidende Faktoren für die Schwere der Myokardschäden sowie die Entwicklung einer chronischen Myokarditis. Ungeachtet seiner schützenden Funktion hat das Immunsystem bei der CVB3 Myokarditis schädigende Einflüsse. Eine ausgeglichene Balance in der Immunreaktion ist entscheidend für eine Eliminierung des Virus und die Ausheilung der Myokarditis.

2.4.2. Natürliche Killerzellen (NK)

Als Effektorzellen des schnellen angeborenen Immunsystems spielen NK Zellen eine zentrale Rolle in der antiviralen Immunabwehr (Biron, Nguyen et al., 1999; Orange, 2006; Vidal und Lanier, 2006). Die unterschiedlichen Mechanismen, welche NK Zellen nutzen um virale Infektionen zu bekämpfen, werden durch verschiedene Stimuli induziert. Zytokine der angeborenen Immunantwort wie IFN α und β können von vielen Zelltypen produziert werden, aktivieren NK Zellen und garantieren damit eine schnelle Reaktion auf Virusinfektionen (Garcia-Sastre und Biron, 2006). Zusätzlich wird durch die Aktivierung von dendritischen Zellen IL-12

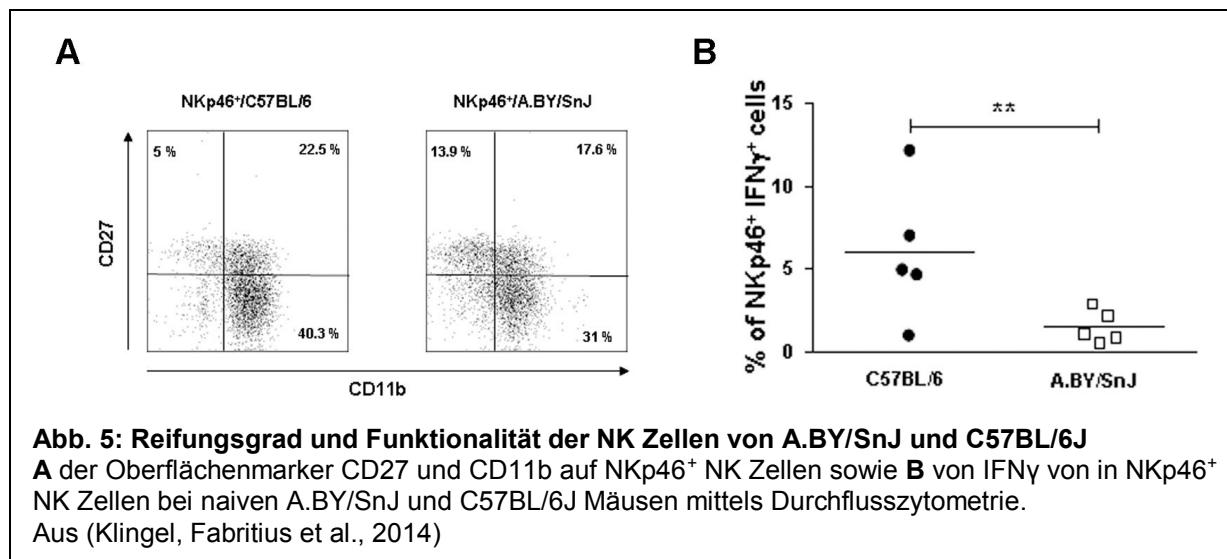
produziert, welches ebenfalls zur Stimulation der NK Zellen führt (Kaisho und Akira, 2003). Neben Zytokinen werden NK Zellen auch über Rezeptoren auf ihrer Oberfläche stimuliert. Hierbei wirken inhibierende Rezeptoren in einem eng regulierten Zusammenspiel mit aktivierenden Rezeptoren.

Inhibierende Rezeptoren auf NK Zellen gehören bei der Maus zu der Ly49 Rezeptor Familie und erkennen körpereigene MHC-I Moleküle auf der Oberfläche kernhaltiger Zellen (Lavender und Kane, 2010). Im Zuge einer Entartung oder Infektion einer Zelle kann es zum Verlust der MHC-I Moleküle kommen, was eine Lyse der Zielzelle durch NK Zellen zur Folge hat. Dieses Abtöten körpereigener Zellen bei Abwesenheit der Signalproteine wird als *missing-self* bezeichnet (Lanier, 2005). Der bekannteste aktivierende Rezeptor ist NKG2D (*natural-killer group 2 member D*). Er wird auf NK Zellen, aber auch auf CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen und einigen dendritischen Zellen exprimiert (Raulet, 2003; Lanier, 2005). NKG2D erkennt Liganden wie H60 (Malarkannan, Shih et al., 1998), RAE Isoformen (*retinoic acid early inducible gene*) (Cerwenka, Bakker et al., 2000) und MULT-1 (*murine UL-16 binding protein-like-transcript 1*) (Carayannopoulos, Naidenko et al., 2002), welche auf Zellen infolge von DNA-Schäden, Tumortransformation und intrazelluläre Infektionen exprimiert werden (Gasser, Orsulic et al., 2005; Nausch und Cerwenka, 2008; Champsaur und Lanier, 2010). Der Rezeptor NKp46 wird sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten humanen und murinen NK Zellen exprimiert. Daher wird dieser Rezeptor besonders bei der Durchflusszytometrie häufig genutzt, um NK Zellpopulationen zu definieren (Sivori, Vitale et al., 1997; Hollyoake, Campbell et al., 2005). Ein fein abgestimmtes Zusammenspiel hemmender und aktivierender Rezeptoren entscheidet darüber, ob NK Zellen zytochemisch bzw. zytolytisch reagieren (Nausch und Cerwenka, 2008; Vivier, Raulet et al., 2011).

Aktivierte NK Zellen können über verschiedene Mechanismen antivirale Effekte ausüben (Lee, Miyagi et al., 2007). Die Möglichkeit infizierte Zielzellen durch zytolytische Granula zu töten, war namensgebend für NK Zellen (Loh, Chu et al., 2005). Zusätzlich kann auf NK Zellen TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) exprimiert werden, welcher bei der Bindung des sogenannten *death receptor* auf Zielzellen in diesen Apoptose induziert (Sato, Hida et al., 2001; Mirandola, Ponti et al., 2004). Außerdem werden vor allem durch Zytokine wie IFN α und β sowie IL-12 und IL-15 in den NK Zellen die Produktion von IFN γ und TNF α stimuliert (Orange, Wang et al., 1995; Biron und Brossay, 2001). Diese beiden Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der nicht-lytischen Kontrolle von Virusinfektionen und helfen die spätere adaptive Immunantwort zu

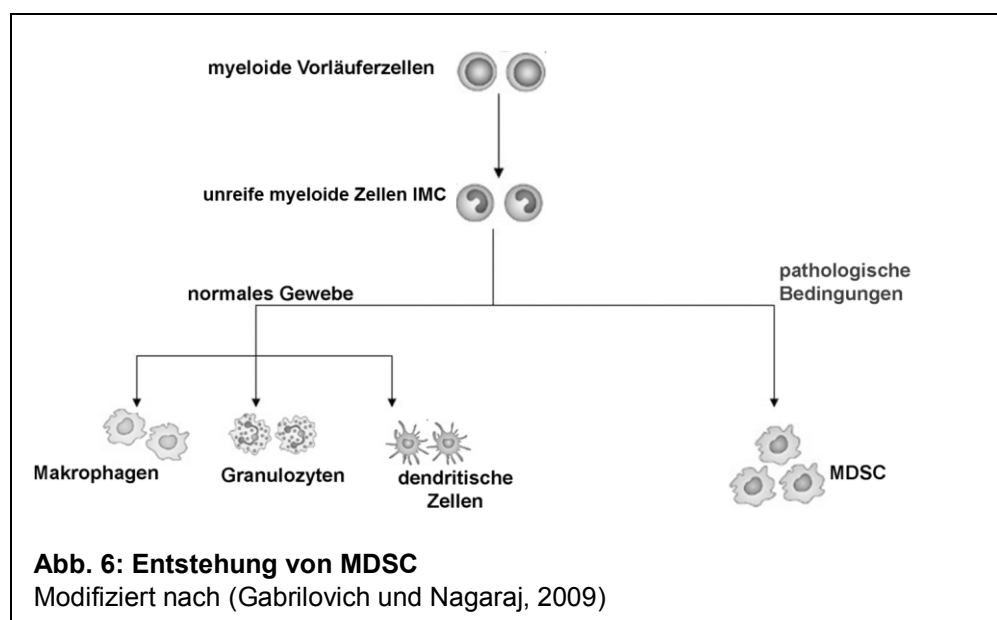
gestalten (Guidotti und Chisari, 2001). Stimuliert durch Zytokine wie IL-12, TNF α und IL-1 β produzieren NK Zellen außerdem das proinflammatorische Zytokin MIP-1 α (*Macrophage inflammatory protein 1 α*), welches sowohl Makrophagen aktiviert als auch die Zytotoxizität und Akkumulation von NK Zellen bewirkt. Zusätzlich verstärkt es die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins IFN γ und spielt somit eine bedeutende Rolle in der frühen Immunantwort auf Virusinfektionen (Bluman, Bartynski et al., 1996; Salazar-Mather, Lewis et al., 2002; Baschuk, Wang et al., 2014).

Durch diese vielfältigen Funktionen spielen NK Zellen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von Virusinfektionen beim Menschen und in der Maus (Orange, 2002; French und Yokoyama, 2003; Vidal und Lanier, 2006). Seit vielen Jahren ist bekannt, dass NK Zellen bei einer CVB3 Infektion in der Maus proliferieren, ab Tag 4 post infectionem (p.i.) im Herzen nachweisbar sind und einen limitierenden Einfluss auf die Virusreplikation haben (Godeny und Gauntt, 1987; Gauntt, Godeny et al., 1989). Erst kürzlich konnte dargestellt werden, wie wichtig die Eigenschaften der NK Zellen im Rahmen der Immunantwort bei einer CVB3 Myokarditis sind. Beim Vergleich von suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen mit resistenten C57BL/6J Mäusen wurde gezeigt, dass beide Mausstämme die gleiche Anzahl an NK Zellen aufweisen, suszeptible Mäuse jedoch sowohl in naivem Zustand als auch 3 und 8 Tage p.i. CVB3 signifikant mehr unreife NK Zellen (im FACS dargestellt durch: CD27^{low} CD11b^{low} und CD27^{high} CD11b^{low}) aufweisen als resistente Mäuse (Abb. 5A). Zusätzlich wurde auf NK Zellen von resistenten C57BL/6J Mäusen eine höhere Expression des aktivierenden Rezeptors NKG2D nachgewiesen. Die Tatsache, dass bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen auf NK Zellen weniger Degranulationsmarker CD107a exprimiert und in NK Zellen weniger IFN γ produziert (Abb. 5B) wird, lässt darauf schließen, dass diese, verglichen mit resistenten C57BL/6J Mäusen, eine verminderte Zytotoxizität haben und somit die Virusreplikation bei einer CVB3 Infektion weniger effizient limitieren können (Klingel, Fabritius et al., 2014). Folglich ist der genetische Hintergrund sowie Reifegrad und Reaktionsfähigkeit der NK Zellen elementar für die Bekämpfung einer CVB3 Infektion.



2.4.3. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)

Unter physiologischen Bedingungen entwickeln sich aus myeloide Vorläuferzellen im Knochenmark unreife myeloide Zellen (immature myeloid cells, IMC). Diese IMC reifen im normalen Gewebe weiter zu Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen (Abb. 6). Kommt es durch Krebs, Infektionen oder Traumata zu pathologischen Bedingungen, wird diese Differenzierung teilweise blockiert und die IMC entwickeln sich stattdessen zu Myeloid-derived suppressor cells (MDSC). Dieser Prozess geht mit einer vermehrten Produktion an immunsuppressiven Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) innerhalb der MDSC einher (Gabilovich und Nagaraj, 2009).



Als myeloide Vorläuferzellen stellt sich die Population der *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) sehr heterogen dar. Bestehend aus unreifen Monozyten, dendritischen Zellen und Granulozyten weisen sie eine Vielzahl an Oberflächenmarkern auf (Gabrilovich und Nagaraj, 2009; Ostrand-Rosenberg und Sinha, 2009). Bei Mäusen ist die Definition von MDSC als CD11b⁺ Gr-1⁺-Zellen unumstritten (Peranzoni, Zilio et al., 2010). Da humane MDSC jedoch über kein *Gr-1*-Gen verfügen, ist eine eindeutige Bestimmung bedeutend schwieriger. So kommt es in der Literatur zu unterschiedlichen Beschreibungen von humanen MDSC, wie CD11b⁺ CD14⁺ CD15⁺ (Zea, Rodriguez et al., 2005) und CD11b⁺ CD33⁺ CD15⁺ (Srivastava, Bosch et al., 2008). In der Maus wird der Anteil der MDSC mit 20–30% der Zellen im Knochenmark und mit 2–4% in der Milz beschrieben (Zhu, Huang et al., 2012). Durch die bereits erwähnte Heterogenität kann man bei murinen MDSC, je nach definiertem Oberflächenmarker, eine Vielzahl von Subpopulationen bestimmen. Da der Gr-1 Antikörper an zwei Oberflächenmoleküle der Ly6-Gruppe bindet, unterscheidet man zwischen CD11b⁺ Ly6G^{hoch} Ly6C^{niedrig} und CD11b⁺ Ly6G^{niedrig} Ly6C^{hoch} positiven Zellen. Ly6G befindet sich vor allem auf Granulozyten, weshalb man bei CD11b⁺ Ly6G^{hoch} MDSC auch von einer granulozytären Subpopulation spricht. Äquivalent werden CD11b⁺ Ly6C^{hoch} MDSC als monozytäre Untergruppe bezeichnet, da sich dieser Marker besonders häufig auf Monozyten findet (Peranzoni, Zilio et al., 2010).

Erstmals beschrieben wurden MDSC 1987 in Mäusen mit Lungentumoren (Young, Newby et al., 1987), mehr als zwei Jahrzehnte später haben sie die Krebsforschung revolutioniert (Talmadge und Gabrilovich, 2013). Mittlerweile wird auch das Wissen über ihre Bedeutung bei bakteriellen (Martino, Badell et al., 2010), parasitären (Van Ginderachter, Beschin et al., 2010) und viralen Infektionen (De Santo, Salio et al., 2008; Bowen und Olson, 2009) sowie bei Sepsis (Sander, Sackett et al., 2010) und Autoimmunerkrankungen (Zhu, Bando et al., 2007) umfangreicher. MDSC konnten beispielsweise vermehrt bei einer Infektion mit Hepatitis C Virus (Tacke, Lee et al., 2012) oder dem humanen Immundefizienz Virus (HIV) (Macatangay, Landay et al., 2012) im Blut von Patienten nachgewiesen werden. Eine vermehrte Anzahl von MDSC in der Milz als Reaktion auf eine Vesicular Stomatitis Virusinfektion wurde bei C57BL/6J Mäusen beschrieben (Liu, Zhang et al., 2011).

Ein hemmender Einfluss von MDSC auf T-Zellen (Song, Krelin et al., 2005; Tacke, Lee et al., 2012) ist ebenso beschrieben wie auf Makrophagen (Sinha, Clements et al., 2005). Somit wirken sie sowohl auf die angeborene als auch auf die erworbene Immunantwort ein. Erst seit kurzer Zeit wird auch an der Wirkung der MDSC auf NK Zellen geforscht. Eine direkte Hemmung der NK Zellen beispielsweise durch TGFβ (*transforming growth factor β*), welcher die zytotoxische Aktivität und die Zytokinproduktion der NK Zellen reduziert und auch eine indirekte

Unterdrückung durch die Minderung von aktivierendem IL-12 aus Makrophagen (Sinha, Clements et al., 2005) ist bekannt. Nicht nur bei einem Gentransfer mit Adenoviren (Zhu, Huang et al., 2012), sondern auch bei einer Vaccinia Virus Infektion (Fortin, Huang et al., 2012) führte eine *in vivo* Depletion der MDSC im Mausmodell zu einer Vermehrung und verstärkten Aktivierung von NK Zellen in Milz und Leber. Bei beiden Untersuchungen stieg nach MDSC Depletion die Expression von IFN γ und Granzym B in NK Zellen an und verstärkten somit deren antivirale Aktivität. Des Weiteren gibt es Hinweise dafür, dass die granulozytäre Subpopulation der MDSC einen stärker supprimierenden Einfluss auf NK Zellen hat als die monozytäre Subpopulation (Fortin, Huang et al., 2012; Zhu, Huang et al., 2012).

Die Reifung, Aktivierung und Migration von MDSC wird durch ein vielfältiges Spektrum an Zytokinen und Chemokinen gesteuert. Da diese Zellen aus dem Knochenmark von granulozytären und monozytären Vorläuferzellen abstammen, fördern besonders Wachstumsfaktoren wie der *stem-cell factor* (SCF) (Pan, Wang et al., 2008) und der *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) (Foti, Ferrandina et al., 1999; Serafini, Carbley et al., 2004) deren Reifung und Differenzierung. Proinflammatorische Zytokine, wie IL-6 und IL-1 β , werden häufig beschrieben an der Aktivierung von MDSC beteiligt zu sein (Krupitza, Fritsche et al., 1995; Sander, Sackett et al., 2010). Aber auch Produkte der Arachidonsäure, wie Leukotrien D4 (Youn, Nagaraj et al., 2008) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) (Obermajer, Muthuswamy et al., 2011), scheinen auf die Akkumulation von MDSC zu wirken. Besonders häufig werden im Zusammenhang mit MDSC Aktivierung und Migration die proinflammatorischen Zytokine S100A8 und S100A9 erwähnt (Cheng, Corzo et al., 2008). Initiiert wird die Produktion von S100A8/9 unter anderem durch TNF α , ein Zytokin, welches besonders in chronischen Entzündungsgeschehen präsent ist, wodurch myeloide Vorläuferzellen in der Ausreifung blockiert werden und MDSC akkumulieren (Sade-Feldman, Kanterman et al., 2013).

2.4.4. S100A8 und S100A9 Proteine

Die S100-Proteinfamilie besteht aus calciumbindenden Proteinen und gehört zu den sogenannten *damage-associated molecular pattern molecules* (DAMPs). Sie sind wichtige proinflammatorische Faktoren der angeborenen Immunreaktion (Oppenheim und Yang, 2005). Während sie intrazellulär ihre Aufgabe bei der Verbindung mit dem Zytoskelett erfüllen (Foell, Wittkowski et al., 2007), gelangen sie durch Zellschäden in den extrazellulären Raum und wirken als proinflammatorische Warnsignale für den Körper und reagieren so auf Infektionen, Entzündungen und anderweitig verursachte Zellschäden (Donato, 2001; Roth, Vogl et al., 2003;

Foell, Wittkowski et al., 2007). Das erste Mitglied dieser Gruppe wurde bereits vor 40 Jahren aus dem Gehirn eines Rindes isoliert und auf Grund seiner Löslichkeit in 100% Ammoniumsulfat-Lösung als S100 benannt (Moore, 1965). Vor allem S100A8 (Synonyme: Calgranulin A oder *myeloid related Protein 8* MRP8) und S100A9 (Synonyme: Calgranulin B und MRP14) sind mit der angeborenen Immunantwort verbunden (Odink, Cerletti et al., 1987; Zwadlo, Bruggen et al., 1988; Roth, Teigelkamp et al., 1992). Im Gegensatz zu den meisten S100-Proteinen können S100A8 und S100A9 nicht nur Homodimere, sondern auch Heterodimere untereinander bilden (Heizmann, Fritz et al., 2002). Sie werden in Zellen myeloiden Ursprungs, wie Granulozyten, Monozyten und frühen Stadien von Makrophagen, aber auch von MDSC direkt exprimiert (Odink, Cerletti et al., 1987; Zwadlo, Bruggen et al., 1988; Sinha, Okoro et al., 2008). MDSC exprimieren nicht nur S100A8/9, sondern haben auch Rezeptoren für diese Proteine, hierdurch entsteht eine positive Verstärkungsschleife. S100A8/9 aktivieren MDSC durch den *NF- κ B Pathway*, indem sie an carboxylierte Glykane auf der Zelloberfläche binden. Zusätzlich wirken sie chemotaktisch für MDSC (Sinha, Okoro et al., 2008). Eine Behandlung mit einem S100A8/9-blockierenden Antikörper kann die Ansammlung von MDSC bei Tumor-infizierten Mäusen reduzieren (Sinha, Okoro et al., 2008). Des Weiteren wurden auch bei der Infektion von Mäusen mit dem murinen Gammaherpesvirus 68 von einem Zusammenhang zwischen MDSC und einem erhöhten S100A8/9-Level im Serum berichtet (Nelson, Chauhan et al., 2012). Aus diesem Grund ist es sinnvoll, S100A8 und S100A9 in eine Untersuchung der MDSC bei CVB3 Infektion einzubinden.

2.5. Zielsetzung

Die Persistenz von Enteroviren kann zum Übergang einer akuten Myokarditis in eine chronische Verlaufsform beitragen und zur Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen (Mason, 2003). Eine zentrale Rolle in der Eliminierung von CVB3 spielen NK Zellen als Effektorzellen der unspezifischen Immunabwehr (Gauntt, Godeny et al., 1989). Die Effektivität von NK Zellen, CVB3-infizierte Zielzellen zu erkennen, variiert deutlich bei permissiven und resistenten Mausstämmen (Klingel, Fabritius et al., 2014). Es ist anzunehmen, dass die antivirale Aktivität von NK Zellen gegen CVB3 durch Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) beeinflusst wird, wie unter anderem bei Vaccinia Virus Infektionen (Fortin, Huang et al., 2012) beschrieben wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Relevanz der MDSC für die Pathogenese der CVB3 Myokarditis im Mausmodell zu eruieren. Der Einfluss der Präsenz von MDSC auf die NK Zellaktivität soll in *in vitro* Experimenten untersucht werden. Die Analyse der an der MDSC Aktivierung beteiligten Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α sowie S100A8 und S100A9 soll klären, ob und in welchem Ausmaß diese proinflammatorischen Proteine an der Pathogenese der CVB3 Myokarditis beteiligt sind. Anhand der MDSC Depletion CVB3-infizierter Mäuse soll überprüft werden, inwieweit das Immunsystem und im Besonderen NK Zellen im Rahmen der CVB3 Myokarditis durch MDSC beeinflusst werden und ob MDSC hierdurch indirekt eine Rolle bei der Viruseliminierung spielen.

3. Material und Methoden

3.1. Geräte und Apparaturen

AxioVision 3.1	Zeiss (Oberkochen)
Brutschränke	Heraeus (Hanau)
Facscalibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop Imager M2	Zeiss (Oberkochen)
Gefriermikrotom CM1900	Leica (Solms)
MACS Separator Quadro	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Mikroskop Phase Contrast 2	Nikon (Düsseldorf)
Mikrotom Microm H355S	Scientific Fisher (Schwerte)
Mirax Scanner	Zeiss (Oberkochen)
Nanodrop 1000	PeqLab (Erlangen)
Pipetten	Gilson (Middleton)
Sterilwerkbank	Heraeus (Hanau)
VWR Pellet Mixer	VWR International (Darmstadt)
Zentrifugen	Heraeus (Hanau)
7300 RealTime PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt)

3.2. Verbrauchsmaterialien

FACS Röhrchen	BD Falcon (Heidelberg)
C-Chip Einmalzählkammer	Digitalbio (Montreal)
24-well Zellkulturplatten	Greiner bio-one (Frickenhausen)
100µm Cell Strainer Nylon	BD Falcon (Heidelberg)
50ml Bluecap Röhrchen	BD Falcon (Heidelberg)
15ml Bluecap Röhrchen	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Eppendorfgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Objektträger Super Frost Plus	R. Langenbrinck (Emmendingen)
Deckgläschen	R. Langenbrinck (Emmendingen)
96-well Platten PCR	PeqLab (Erlangen)
MicroAmp Optical 8-Cap Strip	Life Technologies (Darmstadt)

3.2.1. Chemikalien

Anilinblau	Roth (Karlsruhe)
ATP	Roche (Basel, CH)
BSA	Sigma Aldrich (München)
Biebrich Scharlachrot	Waldeck GmbH & Co. KG (Münster)

Blocking Solution	Zytomed Systems (Berlin)
CTP	Roche (Basel, CH)
DAPI	Sigma Aldrich (München)
DEPC	AppliChem (Darmstadt)
Dextransulfat	Q Biogene
Dithiotreitol / DTT	Sigma Aldrich (München)
EDTA – Lösung pH 8,0 (05M)	AppliChem (Darmstadt)
Entellan	Merck Millipore (Darmstadt)
Entwicklerlösung Kodak D19	Kodak GmbH (Stuttgart)
Eosin Y Lösung	Merck Millipore (Darmstadt)
Essigsäure	Merck Millipore (Darmstadt)
Ethanol	VWR International (Darmstadt)
Ficoll (0,02%)	Sigma Aldrich (München)
Filmemulsion	Kodak GmbH (Stuttgart)
Fixierlösung	Kodak GmbH (Stuttgart)
Formamid	Merck Millipore (Darmstadt)
GTP	Roche (Basel, CH)
Hämatoxillin	Merck Millipore (Darmstadt)
HistoGreen	Linaris (Dossenheim)
Histopaque®-1083	Sigma Aldrich (München)
Lachs Sperma DNA	Sigma Aldrich (München)
MACS Puffer	PBS + 0,5 % FCS +2 mM EDTA
Mayers Häkalaun	Merck Millipore (Darmstadt)
Mounting Medium IS	Dianova (Hamburg)
MgCl ₂	Merck Millipore (Darmstadt)
Molybdato-phosphorsäure	Roth (Karlsruhe)
NaCl	Merck Millipore (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat	Roth (Karlsruhe)
Natriumazid	Merck Millipore (Darmstadt)
PBS	Life Technologies (Darmstadt)
Pertex	Medite GmbH (Burgdorf)
Polyvinylpyrrolidon	Sigma Aldrich (München)
Proteinase K	Ambion (Darmstadt)
Qiazol Lysis Puffer	Qiagen (Hilden)
Rabbit-on-Rodent HRP-Polymer	Biocare Medical (Kalifornien, USA)
Rat-on-Mouse HRP-Polymer	Biocare Medical (Kalifornien, USA)
Rat probe	Biocare Medical (Kalifornien, USA)
RNAguard	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg)
RNase ZAP	Sigma Aldrich (Hamburg)
Salzsäure / HCl	Merck Millipore (Darmstadt)
Saponin	AppliChem (Darmstadt)
SSC (NaCl und Natriumcitrat)	Merck Millipore (Darmstadt)
³⁵ S UTP	NEN
TriFast	PeqLab (Erlangen)

triNatriumcitrat	Merck Millipore (Darmstadt)
Tris / HCl	Sigma Aldrich (München)
Xylol	VWR International (Darmstadt)
Wasser (Nuklease-frei, steril-filtriert, autoklaviert, DEPC-behandelt)	Carl Roth (Karlsruhe)
Zytoperm	PBS + 4% PFA + 0,1% Saponin
Zytowash	PBS + 0,1 % Saponin + 1% FCS

3.2.2. Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (wenig Glukose)	Life Technologies (Darmstadt)
L-Glutamin / Natriumpyruvat / HEPES / Phenolrot	
DMEM (viel Glukose)	ATCC (Wesel)
L-Glutamin / Natriumpyruvat / Natriumbicarbonat	
RPMI 1640	Life Technologies (Darmstadt)
L-Glutamin / HEPES	
FCS	Life Technologies (Darmstadt)
murines Interleukin 2	Miltenyi (Bergisch Gladbach)

3.2.3. Enzyme und andere Proteine

Golgi Plug (Brefeldin A)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Kollagenase 2	Genaxxon (Ulm)
Trypsin	Life technologies (Darmstadt)

3.2.4. Antikörper

anti-CD3-rabbit (SP7)	Thermo Scientific (Karlsruhe)
anti-CD11b (M1/70)– AlexaFluor 488	Biolegend (Fell)
anti-CD11b (M1/70)– PE	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
anti-CD49b (DX5) -APC	eBioscience (Frankfurt)
anti-CD107a (1D4B) – eFluor 660	eBioscience (Frankfurt)
anti-CD119 /IFN γ R (2E2) - PE	eBioscience (Frankfurt)
anti-Gr-1 (RB6-8C5)– AlexaFluor 647	Biolegend (Fell)
anti-Gr-1 (RB6-8C5)– FITC	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
anti-GranzymB (GB11) - AlexaFluor 647	Biolegend (Fell)
anti-IFN α R (MAR15A3) – APC	Biolegend (Fell)
anti-IFN γ (XMG1.2) – eFluor 660	eBioscience (Frankfurt)
anti-Ly6C (HK1.4)– AlexaFluor 647	Biolegend (Fell)
anti-Ly6C (HK1.4)– APC	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
anti-Ly6G (RB6-8C5) <i>in vivo</i> mAb	BioXCell (New Hampshire, USA)
anti-Ly6G (1A8)– FITC	Biolegend (Fell)
anti-Ly6G (1A8)– AlexaFluor 647	Biolegend (Fell)

anti-Mac3-rat (M3/84)	BD Bioscience (Heidelberg)
anti-NKG2D (CX5) – rat	LS Bio
anti-NKp46 (29A1) -FITC	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
anti-S100A8 / MRP-8- rabbit	Biomedica (Singapur)
anti-S100A9 / MRP-14 – rabbit	Biomedica (Singapur)
goat-anti hamster – FITC	eBioscience (Frankfurt)
goat-anti rat - AlexaFluor 647	Life Technologies (Darmstadt)
goat-anti rabbit - AlexaFluor 647	Life Technologies (Darmstadt)

3.2.5. Kits

LS Säulen	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
NK cell Isolation Kit II	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation Kit	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
miRNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix	Life Technologies (Darmstadt)

3.2.6. Zelllinien

HeLa-Zellen	Zellen aus humanem Gebärmutterhalskarzinom (Kakalacheva, Maurer et al., 2011)
264. RAW Zellen	Murine Leukämie Monocyten (Byrum, Taverna et al., 2011)

3.2.7. Software

Adobe Photoshop CS2	Adobe (München)
Definiens Software	Definiens (München)
GraphPad 3 InStat	GraphPad Software (La Jolla, USA)
CellQuest Software	Becton Dickinson (Heidelberg)
WinMDI 2.8 Software	Purdue University (West Lafayette, USA)
Mirax viewer Software	Zeiss (Oberkochen)

3.3. Viren

cDNA generiertes CVB3 (Nancy strain), 3 x herzpassagiert	Kandolf, MPI für Biochemie (Martinsried)
---	---

3.4. Versuchstiere - ingezüchtete Mausstämme

C57BL/6J Mäuse (H-2^b)

Jackson Laboratories

A.BY/SnJ Mäuse (H-2^b)

Jackson Laboratories

3.5. Zellkultur und Zellisolierung

3.5.1. Kultivierung von HeLa-Zellen und RAW-Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in 75 cm² Flaschen bei 37°C und 5% CO₂. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die HeLa-Zellen trypsinisiert und anschließend in entsprechender Verdünnung passagiert oder ausgesät. Einen Tag vor der Infektion wurden HeLa-Zellen mit 2 ml Trypsin (Life Technologies) gewaschen und mit 1 ml Trypsin gelöst. Nach der Aufnahme der gelösten HeLa-Zellen in 10 ml DMEM-Medium (wenig Glukose) wurde die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die HeLa-Zellen wurden in einer Dichte von 2 x 10⁴ Zellen pro Loch in eine 24-Loch-Platte (Greiner bio-one) ausgesät. Zusätzlich wurden RAW-Zellen durch vorsichtiges Abkratzen von der Flaschenoberfläche geerntet. Diese wurden zusammen mit den HeLa Zellen ebenfalls mit einer Dichte von 2 x 10⁴ Zellen pro Loch ausgesät. Dabei wurde als Medium DMEM (viel Glukose) mit 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin verwendet. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.5.2. Isolierung von Immunzellen aus der Milz

Die Isolierung von Immunzellen aus Milzen erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation über das hydrophile Kolloid Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer. Für die Isolierung wurden Milzen mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb mit 100 µm großen Poren gedrückt. Dabei wurde mit insgesamt 25 ml PBS mit dem Zusatz von 1% FCS gespült. Die Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 7 ml PBS/1% FCS aufgenommen und auf einen Dichtegradienten (Histopaque® 1083) aufgetragen. Die Proben wurden bei 800 g für 30 Minuten und RT ohne Bremse zentrifugiert. Nach Abnahme des verdichteten Zellrings wurde dieser in 30 ml MACS-Puffer (PBS + 0,5%FCS und 2mM EDTA) resuspendiert und für 10 Minuten bei 4°C mit 1500 rpm zentrifugiert. Die so gewonnene Probe enthielt die Immunzellen der Milz der jeweiligen Maus.

3.5.3. Isolierung von Immunzellen aus dem Herzen

Zur Isolierung von Immunzellen aus dem Herzen erfolgte die mechanische Bearbeitung der Proben sowie ein Verdau durch Kollagenase, um den gesamten Zellverband des Gewebes aufzulösen.

Moscona Lösung	136 mM NaCl, pH 7,4 28,6 mM KCl 11,9 mM NaHCO ₃ 9,4 mM Glukose 0,08 mM NaH ₂ PO ₄
Krebs-Ringer Lösung 1	136 mM NaCl, pH 7,4 28,6 mM KCl 1,9 mM NaHCO ₃ 0,08 mM NaHPO ₄ 1 mg/ml BSA
Krebs-Ringer Lösung 2	136 mM NaCl, pH 7,4 28,6 mM KCl 1,9 mM NaHCO ₃ 0,08 mM NaHPO ₄ 20 mg/ml BSA 140 U/ml Kollagenase 2
Geys Lösung (Erythrozyten Lysis)	150 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃

Direkt nach der Isolierung wurden die Herzen zunächst in eiskalter Moscona Lösung, dann in Krebs-Ringer Lösung 1 gebadet und anschließend mit einem sterilen Skalpell zerkleinert. Nach einer Inkubation bei 37°C für 5 Minuten in Krebs-Ringer Lösung 1 wurde der Überstand mit bereits isolierten Zellen abgenommen und das restliche Gewebe in 3 ml Krebs-Ringer Lösung 2 mit einer Pipette vereinzelt. Dann erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 10 Minuten und der Überstand mit isolierten Zellen wurde entnommen. Dieser Vorgang mit Krebs-Ringer Lösung 2 wurde bis zu 6-mal wiederholt, bis eine Vereinzlung der Zellen durch eine

19 Gauge-Kanüle erfolgen konnte. Der gesamte isolierte Überstand wurde bei 1000 g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zur Lyse der Erythrozyten in 10 ml Gey Lösung aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 1000 g und 4°C für 5 Minuten. Die Zellen wurden in 7 ml PBS/1% FCS aufgenommen und die Immunzellen über einen Dichtegradienten (Histopaque® 1083) gewonnen. Der Dichtegradient wurde bei 800 g für 30 Minuten und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Es folgte die Abnahme des verdichteten Zellrings. Dieser wurde mit 30 ml MACS Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 4°C mit 1500 rpm zentrifugiert. Die so gewonnene Probe enthielt die Immunzellen aus dem Herzen der jeweiligen Maus.

3.5.4. Isolierung von NK Zellen aus der Milz

Die Isolierung spezifischer Immunzellen kann durch die jeweiligen Oberflächenmarker auf diesen Zellen erfolgen. Dafür bedient man sich der magnetischen Zellseparation (Magnetic Activated Cell Sorting; MACS) von Miltenyi (Bergisch Gladbach). Hierbei werden die Zellen mit Antikörpern, die an magnetische Partikel gekoppelt sind, inkubiert. Diese richten sich entweder speziell gegen die Oberflächenmoleküle der zu isolierenden Zellen (positive Selektion) oder gegen alle anderen Zellen (negative Selektion). Die Zellsuspensionen werden auf eine Trennsäule aufgetragen, welche eine Matrix von Plastik umhüllten magnetischen Fasern enthält und im Feld eines Magneten platziert wird. Die Zellen, an die zuvor die Magnetpartikel-gekoppelten Antikörper gebunden haben, werden zurückgehalten, während unmarkierte Zellen passieren. Durch Entfernung des Magnetfeldes können die zuvor gebundenen markierten Zellen eluiert werden.

Für die Separation der NK Zellen wurde eine negative Selektion verfolgt. Wie zuvor beschrieben, wurden Immunzellen aus den Milzen der Mäuse gewonnen. Nach der abschließenden Zentrifugation wurden die Zellpellets mit 20 ml MACS Puffer aufgenommen und die Zellzahl in einer Einmalzählkammer (C-Chip, Digitalbio) bestimmt. Anhand der Zellzahlen wurde nach weiterer Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm die Menge der Antikörperlösung (NK Isolation Kit II, Miltenyi) angepasst. Wie im Protokoll vorgegeben, wurde das Zellpellet in 10 µl Antikörperlösung und 40 µl MACS Puffer pro 1×10^7 Zellen gelöst und im Kühlschrank für 5 Minuten inkubiert. Die Zugabe von jeweils 5 ml MACS Puffer wurde wiederholt und für 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 20 µl Beads (NK Isolation Kit II, Miltenyi) und 80 µl MACS Puffer pro 1×10^7 Zellen und eine weitere Inkubation bei 4°C für 10 Minuten. Während dieser Zeit wurde der MACS Magnet (Miltenyi) mit LS Säulen bestückt und diese mit 3 ml MACS Puffer angefeuchtet. Die Proben wurden 1 ml

MACS Puffer aufgenommen und auf die Säulen gegeben. Es wurde 3 Mal mit jeweils 3 ml MACS Puffer gespült und der komplette Durchfluss mit NK Zellen aufgefangen.

3.5.5. Isolierung von MDSC aus der Milz

Um MDSC von Mäusen zu gewinnen, wurden im Sinne einer positiven Selektion mit der magnetischen Zellseparation Zellen isoliert. Hierfür wurden wie zuvor beschrieben Immunzellen aus den Milzen der Mäuse separiert. Um eine ausreichende Menge an MDSC zu erhalten, wurden die Zellen von jeweils 4 Mäusen zusammengeführt. Die Zellpellets wurden in 20 ml MACS Puffer aufgenommen und die Zellzahl in einer Einmalzählkammer (C-Chip, Digitalbio) bestimmt. Anhand der Zellzahlen wurde nach einer weiteren Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm, die Menge der Antikörperlösung (MDSC Isolation Kit, Miltenyi) angepasst. Wie im Protokoll vorgegeben wurde das Zellpellet in 50 µl *Fc-Blocking Reagent* und 350 µl MACS-Puffer pro 1×10^8 Zellen gelöst und bei 4°C für 10 Minuten inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 100 µl anti-Ly6G-Antikörper und eine weitere Inkubation für 10 Minuten bei 4°C. Nach dieser Zeit wurde den Proben jeweils 2 ml MACS Puffer zugegeben und diese für 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 800 µl MACS-Puffer und 200 µl anti-Biotin Microbeads aufgenommen. Es folgte eine weitere Inkubation bei 4°C für 15 Minuten und nach einer Verdünnung der Proben mit 20 ml MACS Puffer eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm. Während dieser Zeit wurde der MACS Magnet (Miltenyi) mit LS Säulen bestückt und diese mit 3 ml MACS-Puffer angefeuchtet. Das zentrifugierte Zellpellet wurde mit 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf die Säulen gegeben. Es wurde 3 Mal mit jeweils 3 ml MACS-Puffer gespült und der komplette Durchfluss aufgefangen. Zusätzlich wurde nach der Entnahme der Säulen von dem Magneten das zurückgehaltene Antikörper-Zell-Gemisch mit weiteren 5 ml MACS-Puffer und dem Stempel ebenfalls aufgefangen. Diese Fraktion stellt den Ly6G⁺-Anteil der MDSC dar. Der Durchfluss wurde abermals für 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 400 µl MACS-Puffer und 100 µl anti-Gr-1-Biotin-Antikörper resuspendiert, gefolgt von einer Inkubation für 10 Minuten bei 4°C. Nach Zugabe von 10 ml MACS-Puffer wurden die Proben 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet in 900 µl MACS-Puffer sowie 100 µl Streptavidin-Microbeads aufgenommen. Nach 15-minütiger Inkubation im Kühlschrank wurden die Proben mit 15 ml MACS-Puffer verdünnt und für 10 Minuten bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. Während dieser Zeit wurde der MACS Magnet (Miltenyi) mit LS-Säulen bestückt und diese mit 500 µl MACS-Puffer angefeuchtet. Das Zellpellet wurde mit 500 µl MACS-Puffer resuspendiert, auf die Säulen gegeben, 3 Mal mit jeweils 500 µl MACS-Puffer gespült und der

komplette Durchfluss aufgefangen. Zusätzlich wurde nach der Entnahme der Säulen von dem Magneten das zurückgehaltene Antikörper-Zell-Gemisch mit 1 ml MACS-Puffer und dem Stempel ebenfalls aufgefangen. Diese Fraktion stellt den Ly6C⁺-Anteil der MDSC dar.

3.6. Molekularbiologische Methoden

3.6.1. RNA Isolierung aus Gewebe mit der TriFast™-Methode

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden zuvor die Arbeitsoberflächen mit RNase ZAP (Sigma Aldrich) gereinigt um einen Verdau durch RNasen zu verhindern. Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde mittels TriFast™ (Peqlab) durchgeführt. Dieses enthält Guanidiniumthiocyanat, um die Zellen zu lysieren und RNasen zu hemmen, sowie Phenol um die RNA zu lösen. Im Detail wurden 500 µl TriFast™ auf die gefrorenen Organproben gegeben und diese mit dem VWR Pellet Mixer zerkleinert. Eine weitere Vereinzelnung der Zellen erfolgte durch das auf und ab Pipettieren der Suspension mit einer 1 ml Spritze sowie einer 24 Gauge-Kanüle. Die Zellen wurden im Anschluss für 3 Minuten bei RT inkubiert, die Zellsuspension mit 200 µl Chloroform für 15 Sekunden geschüttelt und weitere 3 Minuten bei RT inkubiert, um das Homogenat in eine wässrige sowie eine organische Phase zu unterteilen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 11000 rpm und 4°C wurde die durchsichtige, die RNA enthaltende Phase abgenommen und zur Präzipitation mit 500 µl 100% Isopropanol vermischt. Nach 15 Minuten wurden die Proben für 10 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 750 µl 70% Ethanol (-20°C) aufgenommen. Dieser Waschschrift durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 12000 rpm und 4°C erfolgte 2 Mal. Das die RNA enthaltende Pellet wurde 10 bis 20 Minuten getrocknet und die RNA in 100 µl RNase-freiem Wasser (Roth) gelöst (Lagerung bei -80°C).

Die Menge der aufgereinigten RNA wurde mit Hilfe des Nanodrop 1000 (PeqLab) bestimmt und in Nanogramm pro Mikroliter angegeben. Ebenso wurde die Reinheit der Probe bestimmt und über den Quotienten aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ bewertet. Diese sogenannte Ratio 260/280 vergleicht die Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen). Ein Wert von ungefähr 2,0 wird hierbei als größte Reinheit der RNA gewertet. Liegt der Wert der Probe unterhalb, ist sie wahrscheinlich mit DNA oder organischen Stoffen verunreinigt.

3.6.2. Quantitative real-time RT-PCR

Um quantitative Veränderungen von Zytokinen auf mRNA Ebene festzustellen, wurde eine real-time RT-PCR durchgeführt. Dies bedeutet, dass in Echtzeit (real-time) eine Veränderung der zugegebenen Fluoreszenzfarbstoffe gemessen wird und dadurch eine Aussage über die Quantität der mRNA getroffen werden kann. Zur Versuchsdurchführung wurde der TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix (Life Technologies) verwendet, welcher die reverse Transkription sowie die cDNA-Amplifikation im ersten Schritt (bei 48°C) beinhaltet. Das TaqMan-Verfahren arbeitet mit kurzen Sonden, sogenannten Probes, die am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (hier FAM) sowie am 3'-Ende mit einem Quencher (hier TAMRA) gekoppelt sind.

Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors wird bei an die cDNA gebundener TaqMan-Sonde durch den in räumlicher Nähe befindlichen Quencher unterdrückt. Während des RT-PCR-Zyklus wird durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase das 5'-Ende der Sonde abgebaut und die Fluoreszenz des Reporters wird freigesetzt und kann gemessen werden. Die Zunahme der Fluoreszenz ist proportional zur Menge des gebildeten RT-PCR-Produkts. Jede Probe wurde in einem Doppelansatz untersucht. Als Negativkontrollen dienten Ansätze, die Wasser statt RNA enthielten. Die RT-PCR wurde den Angaben in Tabelle 1 und 2 entsprechend am ABI PRISM 7300 Real-Time RT-PCR-System (Applied Biosystems) durchgeführt.

Tabelle 1: TaqMan® - RT-PCR Ansatz

Komponente	Menge
RNA	200 ng
TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix	12,5 µl
<i>forward</i> Primer (100 pmol)	0,08 µl
<i>reverse</i> Primer (100 pmol)	0,08 µl
Sonde (6 pmol)	0,5 µl
RNase-Inhibitor	0,6 µl
PCR-Wasser	ad 25 µl

Tabelle 2: Parameter der RT-PCR Reaktion

RT-PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Schritt
Reverse Transkription	48°C	30 min	initial
Aktivierung der TaqPolymerase	95°C	10 min	initial
Denaturierung cDNA	95°C	15 sec	40x
Anlagerung Primer und Probe	55°C	1 min	

Ziel dieser Analyse war die Untersuchung des quantitativen Unterschieds der mRNA-Expression von *m(murinem)S100A8*, *mS100A9*, *mIL-1 β* , *mIL-6* sowie *mMIP-1 α* , *mTNF α* und *mIFN γ* . Es handelt sich um eine relative Quantifizierung, bei der die Expression eines Zielgens im Verhältnis zur Expression eines konstant exprimierten Referenzgens (housekeeping gene) gesetzt wird. Die Ermittlung des Expressionsunterschieds erfolgt durch Normierung dieser Werte mittels der Formel $2e^{-\Delta Ct}$:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen HPRT}}$$

$$\text{Ratio} = 2e^{-\Delta Ct}$$

Abb. 7: Delta-Ct-Methode zur relativen Quantifizierung von DNA/RNA

In den durchgeführten Analysen wurde die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) als Referenzgen verwendet. Der Ct-Wert (Cycle Threshold) bezeichnet den Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal erstmals über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Je niedriger der Ct-Wert, also je früher das Fluoreszenzsignal ansteigt, desto mehr Kopien des Zielgens sind zu Beginn in der Probe enthalten.

Zur Bestimmung der Kopienzahl an CVB3 RNA wurde eine Referenzkurve/Standardkurve (von 1 fg bis 100 pg) mit Hilfe von RNA Transkripten, welche vom CVB3-R1 Plasmid (Hohenadl, Klingel et al., 1991) durch *in vitro* Transkription generiert wurden, erstellt.

Tabelle 3: Sequenzen der eingesetzten Primer

Name	Sequenz 5' > 3'
PanEntero1 -fwd	TCCTCCGGCCCCTGA
PanEntero1 - rev	RATTGTCACCATAAGCAGCCA
PanEntero1 - Sonde	<i>FAM</i> - CGGAACCGACTACTTTGGGTGWCCGT - <i>TAMRA</i>
murines HPRT - fwd	GACCGGTCCCGTCATG
murines HPRT - rev	AACCTGGTTCATCATCGCTAA
murines HPRT - Sonde	<i>FAM</i> - CGACCCGCAGTCCCAGCG - <i>TAMRA</i>
murines IFN γ - fwd	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA
murines IFN γ - rev	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
murines IFN γ - Sonde	<i>FAM</i> - TCACCATCCTTTTGCCAGTTCCTCCAG - <i>TAMRA</i>
murines IL-1 β - fwd	GTCGCTCAGGGTCACAAGAAA
murines IL-1 β - rev	CATCAGAGGCAAGGAGGAAAAC
murines IL-1 β - Sonde	<i>FAM</i> - CATGGCACATTCTGTTCAAAGAGAGCCTG - <i>TAMRA</i>
murines IL-6 - fwd	ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT
murines IL-6 - rev	AATCAGAATTGCCATTGCACAA
murines IL-6 - Sonde	<i>FAM</i> - TTCTCTGGGAAATCGTGAAATGAGAAAAGA - <i>TAMRA</i>
murines MIP-1 α - fwd	GCGCCATATGGAGCTGACAC
murines MIP-1 α - rev	TCAGGCATTCAGTTCCAGGT
murines MIP-1 α - Sonde	<i>FAM</i> - CCTGCTGCTTCTCCTACAGCCGGA - <i>TAMRA</i>

murines S100A8 - fwd	TCCTTGCGATGGTGATAAAAGTG
murines S100A8 - rev	CCCAGCCCTAGGCCAGAA
murines S100A8 - Sonde	FAM- TCTCACAAAGACAGCCACAAGGAGTAGCAGAG -TAMRA
murines S100A9 - fwd	GCTTTGAGGAGTGTATGATGCTGAT
murines S100A9 - rev	TGGGTTGTTCTCATGCAGCTT
murines S100A9 - Sonde	FAM- CAAAGTTGATCTTTGCCTGTCATG -TAMRA
murines TNF α - fwd	TCATGCACCACCATCAAGGA
murines TNF α - rev	TGCAGAACTCAGGAATGGACAT
murines TNF α - Sonde	FAM- AAATGGGCTTTCCGAATTCACCTGGAGC -TAMRA

3.6.3. *In situ* Hybridisierung

Herstellung der *in vitro* transkribierten, hydrolysierten ³⁵S-markierten CVB3 RNA-Sonde

Zum Nachweis coxsackieviraler Plusstrang-RNA mittels *in situ* Hybridisierung wurde eine strangspezifische CVB3 RNA-Sonde mit Minusstrang-Orientierung verwendet. Diese wurde durch *in vitro* Transkription mit SP6 RNA Polymerase des mit dem Restriktionsenzym SmaI linearisierten Plasmides pCVB3-R1 hergestellt, welches 7128 (98%) Nukleotide des CVB3 Genoms enthält und von Frau Professor Klingel zur Verfügung gestellt wurde (Hohenadl, Klingel et al., 1991). Als Kontrollsonde zum Nachweis unspezifischer Bindungen wurde das mit SmaI linearisierte Plasmid pSPT18-Neo, dessen 550 bp umfassendes Insert für die Neomycin-Resistenz kodiert, mit SP6 RNA-Polymerase transkribiert. Hierdurch erhält man 550 Nukleotide umfassende Minusstrang-Transkripte des Neomycin-Resistenzgens, welche - als Kontrollsonde eingesetzt - keine spezifischen Bindungen eingehen. Um radioaktiv markierte CVB3-Minusstrang-Transkripte zum Nachweis von CVB3-Plusstrang-RNA bzw. radioaktiv markierte Kontroll-RNA zu erhalten, wurden für die Transkription jeweils 250 μ Ci ³⁵S-UTP mit einer Aktivität von 1300 Ci/mmol in einer Vakuumzentrifuge eingedampft. Das Pellet wurde in 10 μ l Transkriptionslösung aufgenommen. Nach Zugabe von 1 μ g linearisierter Plasmid-DNA und 20 Einheiten SP6 RNA Polymerase wurde alles gemischt und der Ansatz für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Transkriptionslösung (Endkonzentrationen):

40 mM Tris/HCl, pH 8,0

10 mM DTT

6 mM MgCl₂

- 2 mM Spermidin
- 100 mg/ml BSA (RNase- und DNase frei)
- 500 μ M ATP
- 500 μ M CTP
- 500 μ M GTP
- 25 μ M 35 S-UTP
- 1 U RNAGuard

Nach Inkubation wurde der Ansatz DEPC-Wasser auf 50 μ l aufgefüllt und die Plasmid-DNA mit 20 Einheiten DNase I bei 37°C 20 Minuten verdaut. Anschließend wurden die nicht eingebauten Nukleotide durch Sephadex G50 Säulenzentrifugation abgetrennt und eine Phenolextraktion durchgeführt, um Proteinverunreinigungen zu entfernen. Nach Fällung der RNA mit 1/10 Volumen 8M LiCl und 3 Volumen absolutem Ethanol folgte eine alkalische Hydrolyse der RNA (siehe 3.2.6.3.). Abschließend wurde die RNA in DEPC-Wasser gelöst, dem 10 mM Dithiothreitol (DTT) als Oxidationsschutz zugegeben wurde. Die Aktivität der Proben wurde in einem Flüssigszintillationszähler (Packard Tri-Carb 1600TR) bestimmt. Die Länge der RNA-Fragmente wurde durch Agarosegelelektrophorese und anschließender Autoradiographie bestimmt.

Für die *in situ* Hybridisierung der Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Scientific Fisher) 5 μ m dicke Schnitte von den in Paraffin eingebetteten Organen angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden 24 Stunden bei 37°C getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Schnitte wurden nach folgenden Schritten bearbeitet:

1. 3 x 5 min Xylol
2. 5 min 100% Ethanol
3. 5 min 70% Ethanol
4. 1 min 40% Ethanol

Permeabilisierung der Gewebeschnitte:

1. 20 Sekunden bidestilliertes, autoklaviertes Wasser
2. 20 min 0,2 N Salzsäure
3. 20 Sekunden bidestilliertes, autoklaviertes Wasser
4. 30 min 2 x SSC (0,3 M NaCl; 0,035 M tri-Natriumcitrat) bei 70°C
5. 20 Sekunden bidestilliertes, autoklaviertes Wasser

6. 15 min in Puffer für den Proteinase K Verdau mit 1 µg Proteinase K/ml bei 37°C
7. 20 Sekunden bidestilliertes, autoklaviertes Wasser
8. 20 Sekunden bidestilliertes, autoklaviertes Wasser
9. 3 min 70% Ethanol
10. 3 min 70% Ethanol
11. 5 min 100% Ethanol

Anschließend wurden die Gewebeschnitte bei 37°C circa 30 Minuten getrocknet.

Hybridisierung der Gewebeschnitte:

Zur Hybridisierung der Proben wurden 14 µl Hybridisierungslösung auf die permeabilisierten, getrockneten Gewebeschnitte aufgetragen und diese anschließend mit einem silikonisierten Deckgläschen (18x18 mm) abgedeckt. Nach Abdichtung des Deckgläschens mit Fixogum Klebstoff wurden die Proben bei 42°C 18 Stunden im Dunkeln inkubiert. Die Hybridisierungslösung setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

3x10⁵ cpm/Gewebeschnitt *in vitro* transkribierte,
hydrolysierte ³⁵S-markierte CVB3-RNA-Sonde
50% deionisiertes Formamid
10 mM Tris/HCl, pH 7,4
1 mM EDTA, pH 7,2
200 µg sonifizierte Lachs Sperma DNA/ml
100 µg t-RNA (Kaninchenleber)/ml

Die Komponenten wurden gemischt, zur Denaturierung der Nukleinsäuren 5 Minuten auf 100°C erhitzt und sofort für 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden

600 mM NaCl
10% Dextransulfat
0,05% bovines Serumalbumin, RNase- und DNase-frei
0,02% Ficoll
0,02% Polyvinylpyrrolidon
0,02% Dithiotreitol
0,1% Natriumdodecylsulfat

zugegeben und erneut gemischt.

Posthybridisierung:

Nach der 18-stündigen Inkubationszeit wurden die Deckgläschen vorsichtig abgenommen und Reste der Hybridisierungslösung durch intensives Waschen von den Gewebeschnitten entfernt.

Folgende Waschschritte wurden durchgeführt:

1. 10 min 2xSSC (0,3 M NaCl; 0,035 M tri-Natriumcitrat)
2. 10 min 2xSSC (0,3 M NaCl; 0,035 M tri-Natriumcitrat)
3. 30 min 2xSSC/50% Formamid bei 42°C
4. 30 min in Puffer für den RNase A Verdau mit 20 µg /ml RNase A bei 37°C
5. 30 min in Puffer für den RNase A Verdau (ohne RNase A) bei 37°C
6. 30 min 2xSSC/50% Formamid bei 50°C
7. 60 min 2xSSC bei 55°C
8. 3 min 70% Ethanol
9. 3 min 100% Ethanol

Anschließend wurden die Gewebeschnitte bei 37°C getrocknet.

Autoradiographie:

Der Nachweis der ³⁵S-markierten RNA-RNA-Hybride erfolgte mittels Autoradiographie. Sämtliche Arbeiten, die in Zusammenhang mit der Filmemulsion stehen, fanden in der Dunkelkammer statt. Vor Gebrauch wurde die Filmemulsion im Wasserbad bei 43°C verflüssigt und portioniert. Zum Befilmen der Objektträger wurden diese einzeln in die verflüssigte Filmemulsion getaucht und anschließend in einen Objektträgerkasten eingeordnet.

Entwicklung:

Zur Entwicklung wurden die befilmten Objektträger in der Dunkelkammer unter adäquater Beleuchtung in Objektträgerständer umsortiert und wie folgt behandelt:

1. 4 min Entwicklerlösung (Kodak D19, 8g/100ml) bei 18°C
2. 20 Sekunden destilliertes Wasser
3. 8 min Fixierlösung (Kodak Fixer, 18g/100ml)
4. 5 min destilliertes Wasser

Die entwickelten Präparate wurden vor der lichtmikroskopischen Auswertung mit Hämatoxiniln und Eosin G angefärbt, anschließend wurden die Präparate mit Entellan eingedeckt.

3.7. Zellfärbungen

3.7.1. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting*; FACS) können Zellen durch ihre Oberflächenmoleküle und intrazellulären Proteine mit Hilfe von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern analysiert werden. Hierfür nutzt man Fluorochrome, Fluoreszenzfarbstoffe, die in der Lage sind, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und in einer höheren Wellenlänge mit weniger Energie wieder zu emittieren. Diese Fluorochrome sind an Antikörper gebunden und erkennen somit spezifische Strukturen auf oder in der Zelle nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip. Die Zellen liegen in Suspension vor und werden durch Überdruck sowie eine Trägerflüssigkeit in einer Küvette vereinzelt und an dem Laserstrahl eines 488 nm Argonlasers vorbeigeleitet. Von Detektoren werden dann sowohl Streulicht als auch Fluoreszenzsignale aufgefangen. Jede Zelle erzeugt hierbei Vorwärtsstreulicht (*forward scatter channel*; FSC), bei dem das Licht um die Zelle gebeugt wird und Aufschluss über die Größe der Zelle gibt. Ebenso entsteht auch Seitwärtsstreulicht (*side scatter channel*; SSC), welches ein Maß für die Granularität der Zellen darstellt. Je rauer die Oberfläche und je mehr Vesikel im Inneren der Zelle, desto mehr wird das Licht zur Seite abgelenkt. Darüber hinaus werden die energetisch niedrigeren Wellen der auf den Zellen gebundenen Fluorochrome detektiert. So werden für jede Zelle simultan fünf verschiedene Parameter erfasst: das Vorwärtsstreulicht, das Seitwärtsstreulicht sowie die Fluoreszenzen der Wellenlängen 530 nm (FL1), 585 nm (FL2) und 650 nm (FL3). Die Daten wurden mit dem Programm WinMDI ausgewertet. Die Darstellung der Werte erfolgte als zweidimensionale Punktwolke (Dot Plot), bei der auf der X-Achse das Signal eines Fluoreszenzkanals gegenüber dem Signal eines anderen Kanals auf der Y-Achse dargestellt wurde und jeder dargestellte Punkt einer gemessenen Zelle entspricht.

Tabelle 4: Anregungslaser und Emissionsmaximum der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorochrom	Anregungslaser	Emissionsmaximum
FITC (Fluoresceinisothiozyanat)	488 nm	518 nm
Alexa Fluor 488	488 nm	519 nm
PE (Phycoerythrin)	488 nm	575 nm
APC (Allophycocyanin)	633 – 635 nm	660 nm
Alexa Fluor 647	633 – 635 nm	668 nm
eFluor 660	633 – 635 nm	660 nm

Die Zellen wurden zunächst nach oben beschriebenen Protokollen aus Milz und Herz isoliert und mit MACS Puffer jeweils 2×10^5 Zellen in die FACS Röhren (BD Falcon) verteilt. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 1500 rpm für 10 Minuten wurden die Zellen in den FACS Röhren gefärbt. Dies erfolgte nach dem jeweiligen Färbungsprotokoll. Alle intrazellulären Antikörper wurden statt in PBS in Zytowash (PBS + 0,1 % Saponin + 1% FCS) aufgenommen, um die Permeabilität der Zellen zu gewährleisten.

Tabelle 5: Färbungsprotokolle für die Durchflusszytometrie

Nachweis	Antikörper	Verdünnung	Zeit	Temperatur	Permeabilisierung
CD49b	anti-CD49b (DX5)-APC	1:100	20 min	4°C	-
Gr-1	anti-Gr-1 (RB6-8C5)-FITC	1:10	10 min	4°C	-
Granzym B	anti-GzmB (GB11)-AlexaFluor 647	1:20	20 min	4°C	Zellen für 30 min in 200 µl Zytoperm permeabilisiert
IFN γ	anti-IFN γ (XMG1.2)-eFluor 660	1:40	20 min	4°C	Zellen für 30 min in 200 µl Zytoperm permeabilisiert
IFN α Rezeptor	anti-IFN α R (MAR15A3)-APC	1:100	20 min	4°C	-
IFN γ Rezeptor	anti-CD119/IFN γ R (2E2)-PE	1:100	20 min	4°C	-
	anti-Ly6G(1A8)-FITC	1:200	30 min		
MDSC	anti-CD11b (M1/70)-PE	1:10	10 min	4°C	-
	anti-Ly6C (HK1.4)-APC	1:10	10 min		
NKG2D	anti-NKG2D (CX5)-rat	1:200	20 min	4°C	-
	goat-anti-rat-AF647	1:500			
NKp46	anti-NKp46 (29A1)-FITC	1:10	10 min	4°C	-
S100A8/ S100A9	anti-S100A8-rabbit/ anti-S100A9-rabbit	1:100	30 min	4°C	Zellen für 30 min in 200 µl Zytoperm permeabilisiert
	goat-anti-rabbit-AF647	1:200	20 min		

3.7.2. Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der Immunfluoreszenzmikroskopie werden Oberflächenantigene mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern markiert. Allerdings werden die Zellen im Gegensatz zur Durchflusszytometrie in ihrem Zellverband im Rahmen eines Gewebeschnittes dargestellt. Für diese Darstellung wurden von den nativen bei -70°C gelagerten Herzen und Milzen mit einem

Gefriermikrotom (Leica) bei -18°C circa $6\ \mu\text{m}$ dicke Gewebeschnitte angefertigt. Nach einstündiger Trocknung wurden die Schnitte der Herzen in 80%igem Aceton für 5 Minuten bei RT fixiert. Die Milzschnitte wurden nach der Trocknung für 10 Minuten mit einem -20°C kalten 1:1 Gemisch aus Ethanol und Aceton fixiert. Alle Schnitte wurden im Anschluss 3 Mal mit PBS gewaschen. Die Färbung der Gefrierschnitte erfolgte nach folgendem Protokoll bei RT:

Tabelle 6: Färbung der Gefrierschnitte für Immunfluoreszenz

Schritt	Menge	Zeit	Waschen
5% BSA in PBS (Blockierung unspezifischer Bindungen)	100 μl	1 h	-
Antikörper	100 μl	4 h	-
Waschen mit PBS	100 μl	1 min	3x
DAPI [4',6-Diamidin-2-phenylindol] (Färbung der Zellkerne)	100 μl	15 sec	-
Waschen mit PBS	100 μl	1 min	3x

Anschließend wurden die Präparate mit „Mounting Medium IS“ (Dianova) eingedeckt.

Für die verschiedenen Färbungen wurden die Antikörper in folgenden Verdünnungen verwendet.

Tabelle 7: Verdünnungen der Immunfluoreszenzfärbungen

Färbung	Verdünnung
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	1:10.000
anti-CD11b (M1/70) – AlexaFluor 488	1:400
anti-Gr-1 (RB6-8C5) – AlexaFluor 647	1:100
anti-Ly6C (HK1.4) – AlexaFluor 647	1:200
anti-Ly6G (1A8) – AlexaFluor 647	1:200

Die Auswertung der Immunfluoreszenzschnitte erfolgte mit dem Programm AxioVision von Zeiss.

3.7.3. Histologische Färbungen

Für die Färbung der Gewebeschnitte mit Hämatoxilin-Eosin (HE) und Masson Trichrom wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Scientific Fisher) 4 µm dicke Schnitte von den in Paraffin eingebetteten Organen angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden 24 Stunden bei 37°C getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für die lichtmikroskopische Auswertung wurde ein Teil der Schnitte mit Hämatoxilin und Eosin G nach folgendem Protokoll behandelt:

1. 2 x 10 min Xylol
2. 2 x 3 min 99% Ethanol
3. 2 x 3 min 96% Ethanol
4. 3 x 3 min 70% Ethanol
5. 5 min destilliertes Wasser
6. 5 min Hämatoxilinlösung
7. 5 min fließendes Leitungswasser
8. 3 Sekunden Eosin Y Lösung
9. 1 min 70% Ethanol
10. 1 min 90% Ethanol
11. 2 min 100% Ethanol
12. 2 x 3 min Xylol

Anschließend wurden die Präparate mit Pertex eingedeckt.

Der andere Teil der Paraffinschnitte wurde mit folgendem Protokoll Masson Trichrom gefärbt:

1. 3 x 5 min Xylol
2. 2 x 3 min 96% Ethanol
3. 3 x 3 min 70% Ethanol
4. 5 min Weigert's Hämatoxilin, spülen in destilliertem Wasser
5. 5 min warmes Leitungswasser zum Bläuen
6. 10 min Biebrich Scharlachrot, spülen in destilliertem Wasser
7. 10 min Molybdätophosphorsäure, spülen in destilliertem Wasser
8. 1 min Anilinblau, spülen in destilliertem Wasser

9. 15 Sekunden 1 % Essigsäure
10. 1 min 96 % Alkohol
11. 2 min 100 % Alkohol
12. 3 min Xylol

Anschließend wurden die Präparate mit Pertex eingedeckt.

3.7.4. Auswertung histologischer Schnitte

Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurden die histologischen Schnitte auf einem Mirax Desk Scanner von Zeiss eingescannt und mit Hilfe der Software Definiens Tissue Studio® 3.5.1 (Definiens AG, München) analysiert und die Gesamtfläche des Schnittes ermittelt. Die Anzahl immunhistologisch gefärbter Zellen wurde bei 200x Vergrößerung mit Hilfe eines Gitters am Mikroskop gezählt. Die Zellzahl pro Gesamtfläche wurde dann auf 1 mm² Gewebefläche umgerechnet. Das Ausmaß der myokardialen Schädigung wurde durch eine semiquantitative Skala erhoben. Dabei wurden Bewertungen von 0 bis 4 angewendet. Die Auswertung 0 bedeutet die Abwesenheit inflammatorischer Infiltrate im Myokard; 1 wurde bei kleinen Ansammlungen von Entzündungszellen zwischen Myozyten vergeben; 2 bei Bereichen mit über 100 Entzündungszellen pro Lokalisation; 3 bei größeren Arealen mit Entzündungszellen, wobei ≤10% der Querschnittsfläche des Herzens betroffen waren; während bei der Auswertung 4 >10-30% der Querschnittsfläche des Herzens betroffen waren.

3.7.5. Immunhistochemie

Für die immunhistologische Färbung der Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Scientific Fisher) 4 µm dicke Schnitte von den in Paraffin eingebetteten Organen angefertigt. Die Paraffinschnitte wurden 24 Stunden bei 37°C getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Schnitte wurden nach folgenden Schritten bearbeitet:

1. 3 x 5 Minuten Xylol
2. 2 x 3 Minuten 100% Ethanol
3. 3 Minuten 70% Ethanol
4. 3 Minuten 40% Ethanol
5. 3 Minuten destilliertes Wasser

6. 20 Minuten 3% H₂O₂ und 0,1% Natriumazid in destilliertem Wasser (Blockierung endogene Peroxidase)
7. 4 Minuten kochen in Zitratpuffer (82 ml 0,1M NaCitrat + 18 ml 0,1M Zitronensäure ad 1 Liter dH₂O)
8. 5 Minuten fließendes Leitungswasser
9. 10 min Blocking Solution (Zytomed)
10. 3 min PBS

Die Antikörper wurden wie folgt verwendet:

Tabelle 8: Antikörper in der Immunhistochemie

Antikörper	Zeit	Verdünnung
Kaninchen-anti-CD3 (Thermo Scientific, rabbit monoclonal, clone SP7)	60 min	1:500
Kaninchen-anti-MRP8 (polyclonal rabbit ab, Biomedica)	60 min	1:50
Kaninchen-anti-MRP14 (polyclonal rabbit ab, Biomedica)	60 min	1:50
Ratte-anti-Mac3-Antikörper (BD Bioscience, clone M3/84)	60 min	1:300

Alle Schnitte wurden entsprechend weiterbearbeitet:

1. 3 x 5 Minuten PBS
2. 45 Minuten Rabbit-on-Rodent HRP-Polymer bzw.
20 Minuten Rat probe (Biocare Medical) +
20 Minuten Rat-on-Mouse HRP-Polymer (Biocare Medical)
3. 3 x 5 Minuten PBS

Danach folgte eine Färbung mit HistoGreen (Linaris) und Mayers Hämalaun, anschließend wurden die Präparate mit Pertex eingedeckt.

3.8. Virologische Methoden

3.8.1. CVB3 Infektion von HeLa-Zellen

Eine Stunde vor Infektion wurde das Medium der HeLa-Zellen, DMEM (Life Technologies) mit 1% Penicillin-Streptomycin sowie 10% FCS, ersetzt durch reines DMEM. Die Zellen wurden mit einer Multiplizität der Infektion (*Multiplicity of infection* (MOI)) von 10 mit CVB3 (Nancy Strain/Stamm) infiziert.

3.8.2. *In vitro* Untersuchung des Einflusses von MDSC auf NK Zellen

Für die *in vitro* Untersuchung des Einflusses von MDSC auf NK Zellen wurden zunächst NK Zellen aus Milzen nicht-infizierter C57BL/6J Mäuse isoliert. Damit eine für den Versuch ausreichende Zellmenge an MDSC erreicht werden konnte, wurden für die Isolierung der MDSC Milzen von CVB3-infizierten C57BL/6J Mäusen 4 Tage p.i. verwendet. Reine NK Zellen wurden in RPMI 1640 (Life Technologies) mit mIL-2 (250 U/ml) aufgenommen und zu nicht-infizierten bzw. CVB3-infizierten HeLa/RAW Zell-Ko-Kulturen gegeben (Verhältnis NK Zellen zu HeLa-Zellen: 10:1). Ebenso wurden NK Zellen zusammen mit MDSC im Verhältnis 1:1 in RPMI 1640 (Life Technologies) mit mIL-2 (250 U/ml) aufgenommen und zu nicht-infizierten bzw. CVB3-infizierten HeLa/RAW Zell-Ko-Kulturen gegeben (Verhältnis NK Zellen zu HeLa-Zellen: 10:1). Zur Darstellung der Degranulation der NK Zellen wurde der Antikörper CD107a direkt ab Beginn der gemeinsamen Inkubation mit der HeLa/RAW Zell-Ko-Kultur hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Zugabe von Brefeldin A (0,02 µg/µl), einem Proteintransport-Inhibitor, welcher die Darstellung intrazellulärer Zytokine verbessert. Nach weiteren 3 Stunden Inkubation wurden alle Zellen aufgenommen, mit den jeweiligen Markern nach Kap. 3.5.1 Tabelle 5 gekoppelt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Versuche wurden jeweils 3 Mal durchgeführt.

3.9. Tierversuche

3.9.1. Tierhaltung

Mäuse der Stämme C57BL/6J und A.BY/SnJ wurden in Gruppen zu 3-5 Tieren in 207 x 140 x 365 mm³ großen Käfigen des Typ II long auf Weichholzgranulat gehalten. Sie erhielten pelletiertes Futter (Mäuse-/Rattenstandarddiät) und Wasser ad libitum. Der Tierraum war beheizt (24°C) und mit geregelter Zu- und Abluft ausgestattet. Die Käfige wurden einmal die

Woche gewechselt und 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Es wurden ausschließlich männliche Tiere für die Versuche verwendet. Alle Versuche waren im Rahmen des Tierversuchsantrag PA2/10 vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

3.9.2. Infektion und Tötung der Versuchstiere

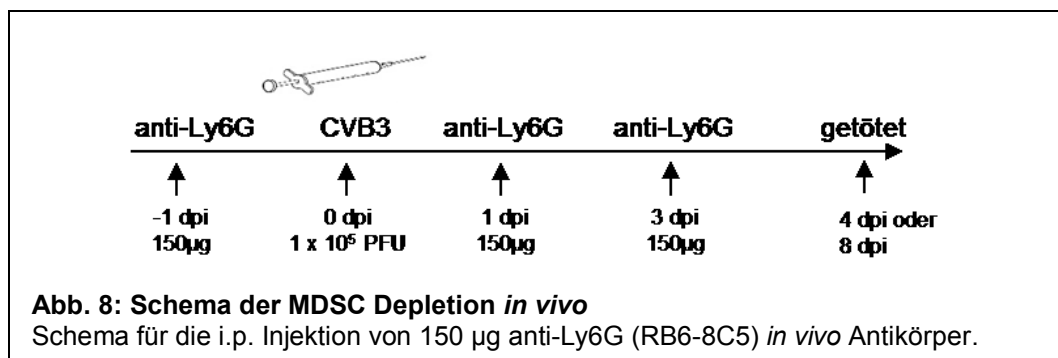
Zum Zeitpunkt der Infektion waren die Mäuse 4-5 Wochen alt. Die Infektion erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von 1×10^5 pfu CVB3 in 200 µl PBS pro Maus. Den Kontrolltieren wurde 200 µl PBS i.p. injiziert. Die Tötung erfolgte durch CO₂-Gas und zervikale Dislokation. Insgesamt wurden 95 Tiere pro Mausstamm für die Versuche verwendet.

3.9.3. Organentnahme und Fixierung der Organe

Direkt nach der Tötung der Tiere wurden Brustkorb und Abdomen eröffnet und die Organe Herz und Milz mit einem sterilen Besteck entnommen und mit einem sterilen Skalpell geteilt. Ein Teil des Herzens und der Milz wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Der andere Teil wurde in 4%igem, mit PBS gepuffertem Paraformaldehyd für 24 Stunden bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die fixierten Organe nochmals 24 Stunden bei 4°C in PBS gelagert, dann über eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte bei Raumtemperatur.

3.9.4. *In vivo* Depletion der MDSC

Für den Versuch 4.4 wurden C57BL/6J und A.BY/SnJ Mäusen 150 µg anti-Ly6G (Klon RB6-8C5) *in vivo* Antikörper (BioXCell) einen Tag vor der Infektion (-1 dpi), sowie an Tag 1 und 3 nach CVB3 Infektion (1 dpi, 3 dpi) intraperitoneal injiziert und somit MDSC depletiert. Kontrolltieren wurde zu den gleichen Zeitpunkten 150 µg PBS intraperitoneal injiziert und ebenfalls CVB3-infiziert. Der Antikörper wird von der Firma BioXCell als anti-Ly6G beschrieben, bindet als Klon von RB6-8C5 jedoch sowohl an Ly6G als auch Ly6C und depletiert somit die komplette Gr-1 Zellpopulation (Peranzoni, Zilio et al., 2010).



3.10. Statistische Auswertung der Daten

Die gewonnenen Daten wurden mit GraphPad InStat statistisch ausgewertet, um Aussagen über signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen, sowie zu den jeweiligen Infektionszeitpunkten zu erhalten. In allen Abbildungen und Tabellen sind die Ergebnisse in der Form Mittelwert ± SEM angegeben. „n“ gibt die Anzahl unabhängiger Messungen an. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des ungepaarten t-Tests bzw. dem Mann-Whitney Test durchgeführt. Dabei wurden p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant gewertet.

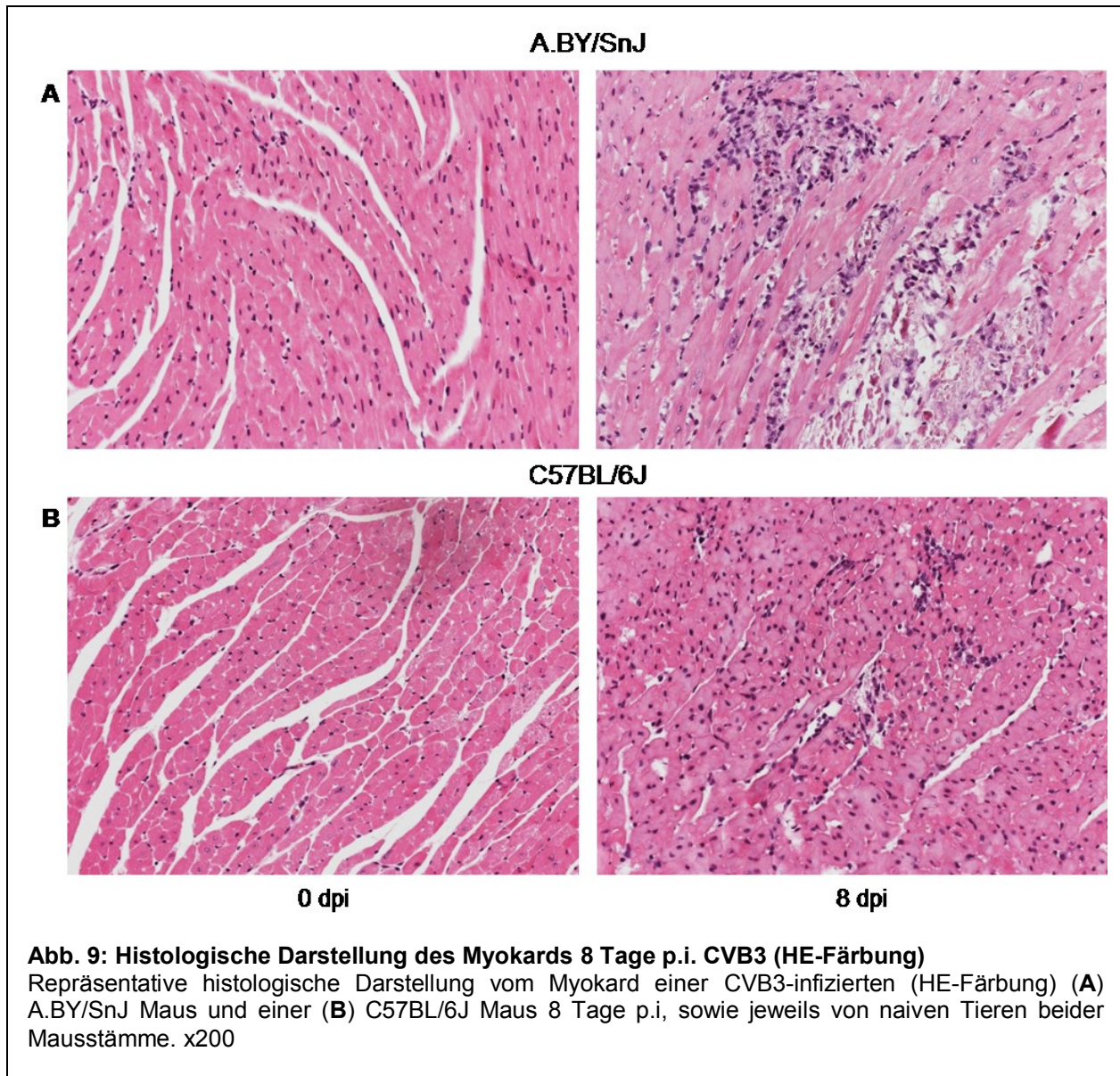
4. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es, die Rolle von Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in suszeptiblen A.BY/SnJ und resistenten C57BL/6J Mäusen im Hinblick auf den Verlauf der CVB3 Myokarditis zu evaluieren. Hierbei wurde die Wirkung der MDSC auf das Immunsystem, insbesondere auf Natürliche Killerzellen (NK Zellen), untersucht. Mittels funktioneller *in vitro* Analysen wurde der Einfluss von MDSC auf Reaktionen von NK Zellen auf CVB3-infizierte Zellen dargestellt. Veränderungen proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , IL-6 und TNF α , wurden im Rahmen der murinen CVB3 Myokarditis identifiziert und quantifiziert. Eine Quantifizierung von S100A8 und S100A9 auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie und auf mRNA Ebene durch quantitative real-time RT-PCR diente der Analyse MDSC relevanter Zytokine. Durch *in vivo* Depletion der MDSC wurden Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus der MDSC bei der CVB3 Myokarditis gewonnen.

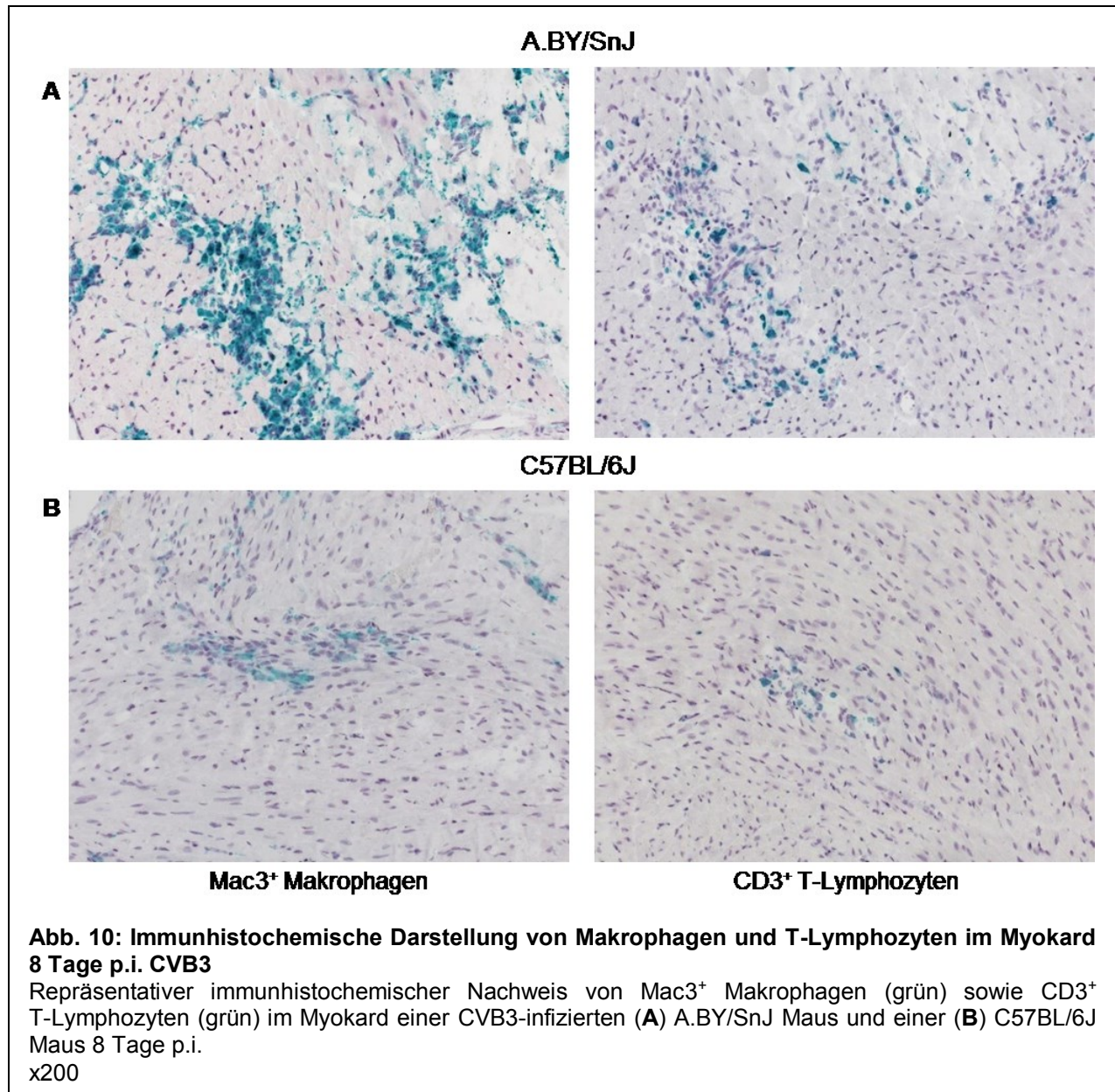
4.1. Das Mausmodell: CVB3 Myokarditis bei A.BY/SnJ und C57BL/6J Mäusen

Nach intraperitonealer Infektion mit CVB3 entwickeln alle bislang untersuchten Inzuchtmäuse unabhängig vom Mausstamm eine akute Myokarditis (Woodruff, 1980). Der Übergang zur Chronizität dieser Erkrankung erwies sich allerdings als abhängig vom Genotyp des Mausstammes. Der unterschiedliche Verlauf einer CVB3 Infektion bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen und resistenten C57BL/6J Mäusen ist in den Abbildungen 9 – 12 dargestellt. Abgebildet sind Untersuchungen im akuten (4 und 8 Tage p.i.), subakuten (16 Tage p.i.) und chronischen (28 und 64 Tage p.i.) Stadium der CVB3 Infektion.

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung gibt Hinweise auf Kernstrukturen und Zytoplasmabeschaffenheit der Myozyten und lässt unter anderem eine interstitielle Inflammation und Fibrose erkennen.



Acht Tage nach CVB3 Infektion sind im Myokard deutliche Unterschiede zwischen den Mausstämmen sichtbar (Abb. 9). Suszeptible A.BY/SnJ Mäuse (Abb. 9A) zeigen im Herzmuskel Herde mit ausgeprägten entzündlichen Zellinfiltraten und Myokardnekrosen. Diese Befunde treten bei resistenten C57BL/6J Mäusen (Abb. 9B) nur in geringem Maße auf.



Typisch für die akute CVB3 Myokarditis ist die Einwanderung mononukleärer Entzündungszellen in den Herzmuskel. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigen, dass diese Migration von Immunzellen 8 Tage nach CVB3 Infektion in das Myokard bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen (Abb. 10A) sehr viel stärker ist als bei resistenten C57BL/6J Mäusen (Abb. 10B). In der lichtmikroskopischen Auswertung fand sich bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen eine größere Anzahl an Mac3⁺ Makrophagen und CD3⁺ T-Lymphozyten im Myokard als bei resistenten C57BL/6J Mäusen.

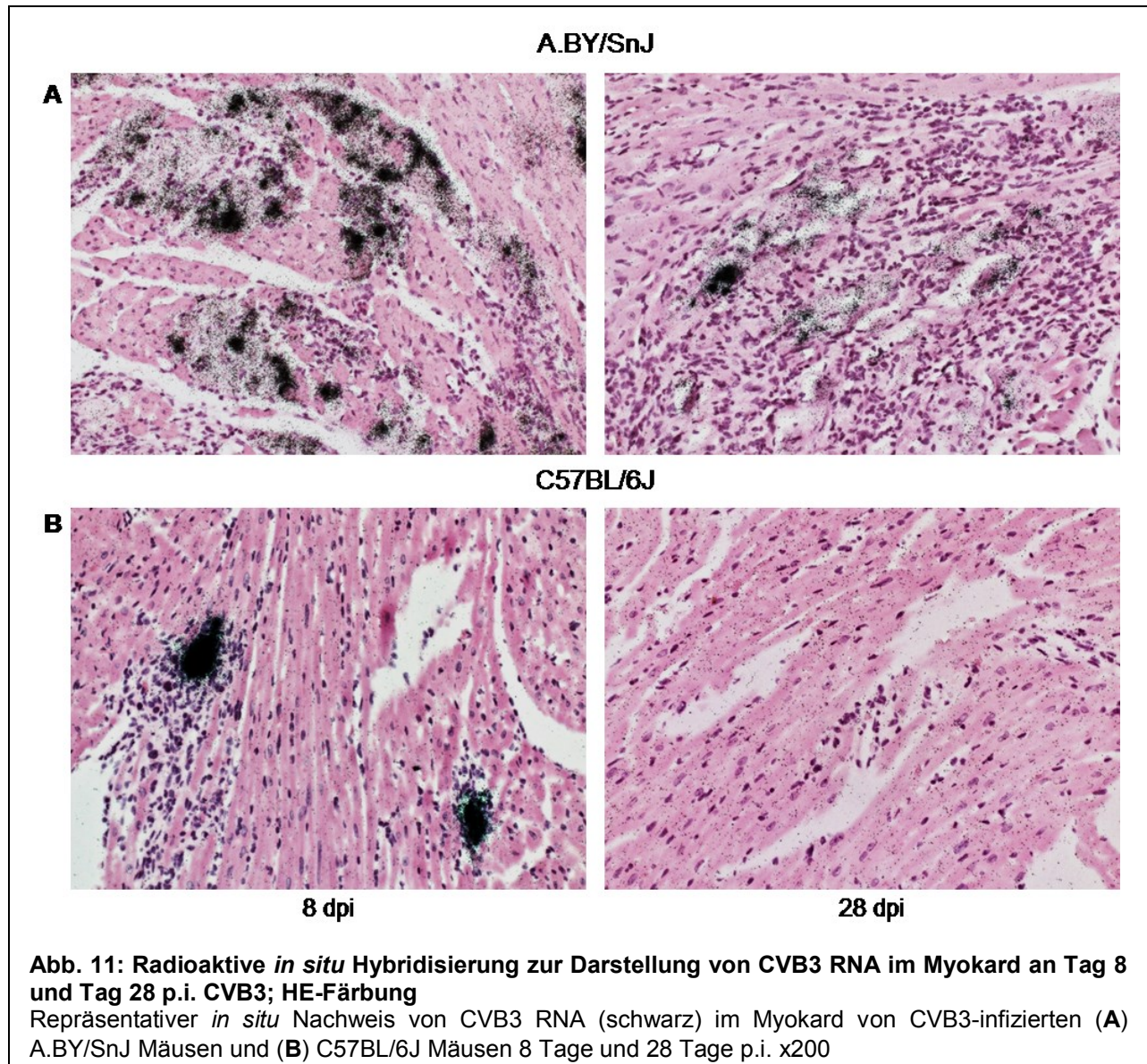
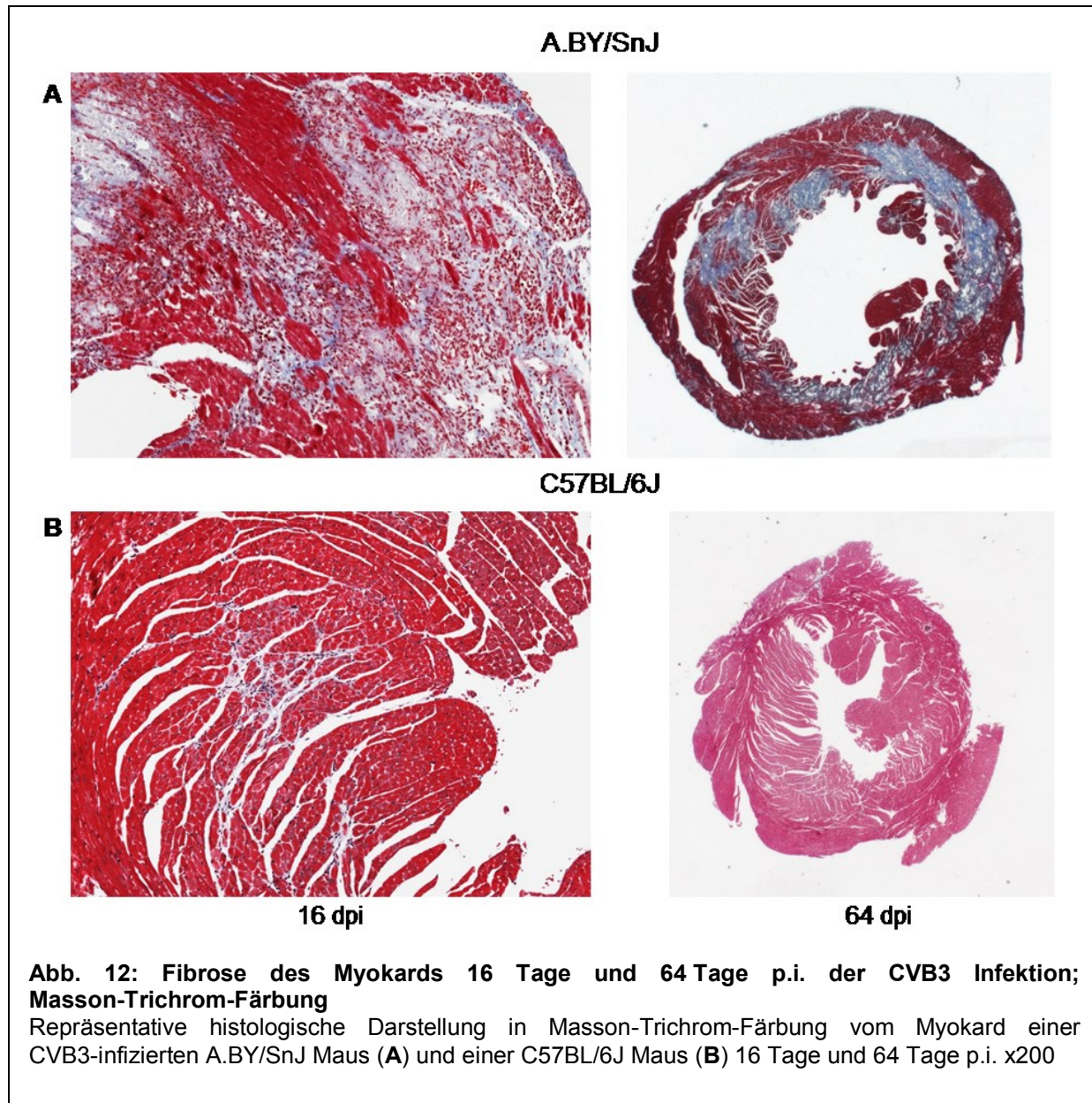


Abb. 11: Radioaktive *in situ* Hybridisierung zur Darstellung von CVB3 RNA im Myokard an Tag 8 und Tag 28 p.i. CVB3; HE-Färbung
 Repräsentativer *in situ* Nachweis von CVB3 RNA (schwarz) im Myokard von CVB3-infizierten (A) A.BY/SnJ Mäusen und (B) C57BL/6J Mäusen 8 Tage und 28 Tage p.i. x200

Trotz der Präsenz von T-Lymphozyten und Makrophagen gelingt es dem Immunsystem permissiver A.BY/SnJ Mäuse jedoch nicht, das Virus aus dem Myokard zu eliminieren.

Während 8 Tage nach CVB3 Infektion bei beiden Mausstämmen virale Replikation mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden kann (Abb. 11), war 28 Tage p.i. lediglich noch bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen CVB3 RNA nachweisbar (Abb. 11A). Die virale Persistenz führt im weiteren Verlauf der CVB3 Infektion bei A.BY/SnJ Mäusen zu einer chronischen Myokarditis, während die Myokarditis bei C57BL/6J Mäusen (Abb. 11B) ausheilt.



Die Masson-Trichrom-Färbung ermöglicht die Visualisierung von Bindegewebe (Fibrose, blau) im Myokard. Großflächige fibrotische Veränderungen des Myokards können bei permissiven A.BY/SnJ Mäusen ab Tag 16 nach CVB3 Infektion festgestellt werden (Abb. 12A). Im Vergleich dazu regeneriert sich der Herzmuskel resistenter C57BL/6J Mäuse nach der akuten Myokarditis vollständig, sodass keine Fibrose im späteren Verlauf der CVB3 Infektion (hier dargestellt 16 und 64 Tage p.i.) mehr nachweisbar war (Abb. 12B).

4.2. Nachweis von MDSC und ihre Wirkung im Verlauf der akuten CVB3 Infektion in C57BL/6J und A.BY/SnJ Mäusen

Grundlegend bei der Bekämpfung einer CVB3 Infektion ist die Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität. Wie unsere Arbeitsgruppe in Vorarbeiten zur murinen CVB3 Myokarditis zeigen konnte, finden in der Milz wichtige Zellinteraktionen, wie die T-Zell-Aktivierung, durch dendritische Zellen statt (Weinzierl, Szalay et al., 2008). Auch Zytokine spielen in der Milz eine große Rolle und wirken als Mediatoren zwischen verschiedenen Zellarten. Bei der CVB3 Myokarditis werden vor allem in den ersten Tagen nach Infektion NK Zellen in der Milz aktiviert und wirken auf den Verlauf der Erkrankung ein (Godeny und Gauntt, 1986; Klingel, Fabritius et al., 2014). Aus diesem Grund wurden im Folgenden die Zeitpunkte 4 und 8 Tage p.i. und somit die akute Phase der CVB3 Infektion untersucht.

Die Existenz von MDSC und ihr hemmender Einfluss auf Zellen des Immunsystems wurde in der Krebsforschung bereits umfangreich dargestellt (Ostrand-Rosenberg und Sinha, 2009). Über die Bedeutung und Wirkungsweise dieser Zellpopulation bei viralen Infektionskrankheiten ist jedoch bisher wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es, Kenntnisse über die Rolle von MDSC während der akuten CVB3 Myokarditis zu erlangen.

4.2.1. Nachweis von Subpopulationen der MDSC in der Milz CVB3-infizierter Mäuse mittels Durchflusszytometrie

Zunächst wurde eine Analyse der Präsenz von MDSC in der Milz während der akuten Phase der CVB3 Myokarditis bei suszeptiblen A.BY/SnJ und resistenten C57BL/6J Mäusen 4 und 8 Tage p.i. CVB3 durchgeführt. Die aus der Milz isolierten Immunzellen wurden mit Antikörpern gegen die Epitope CD11b, Ly6G und Ly6C markiert und am Durchflusszytometer analysiert.

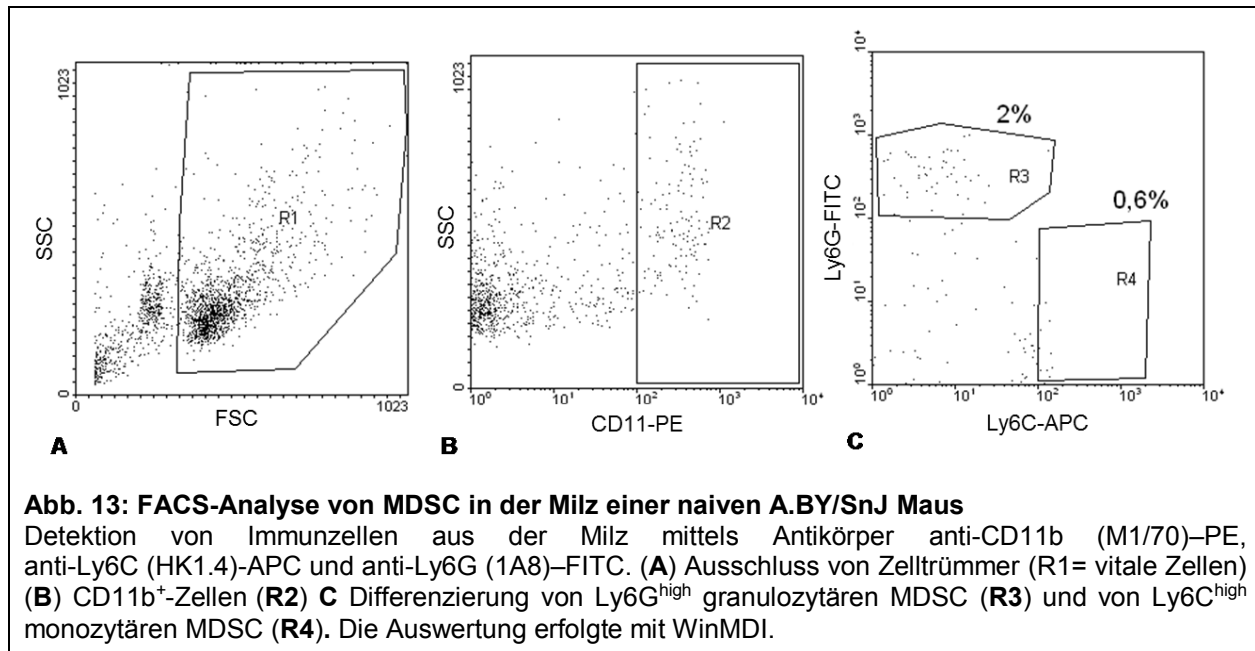
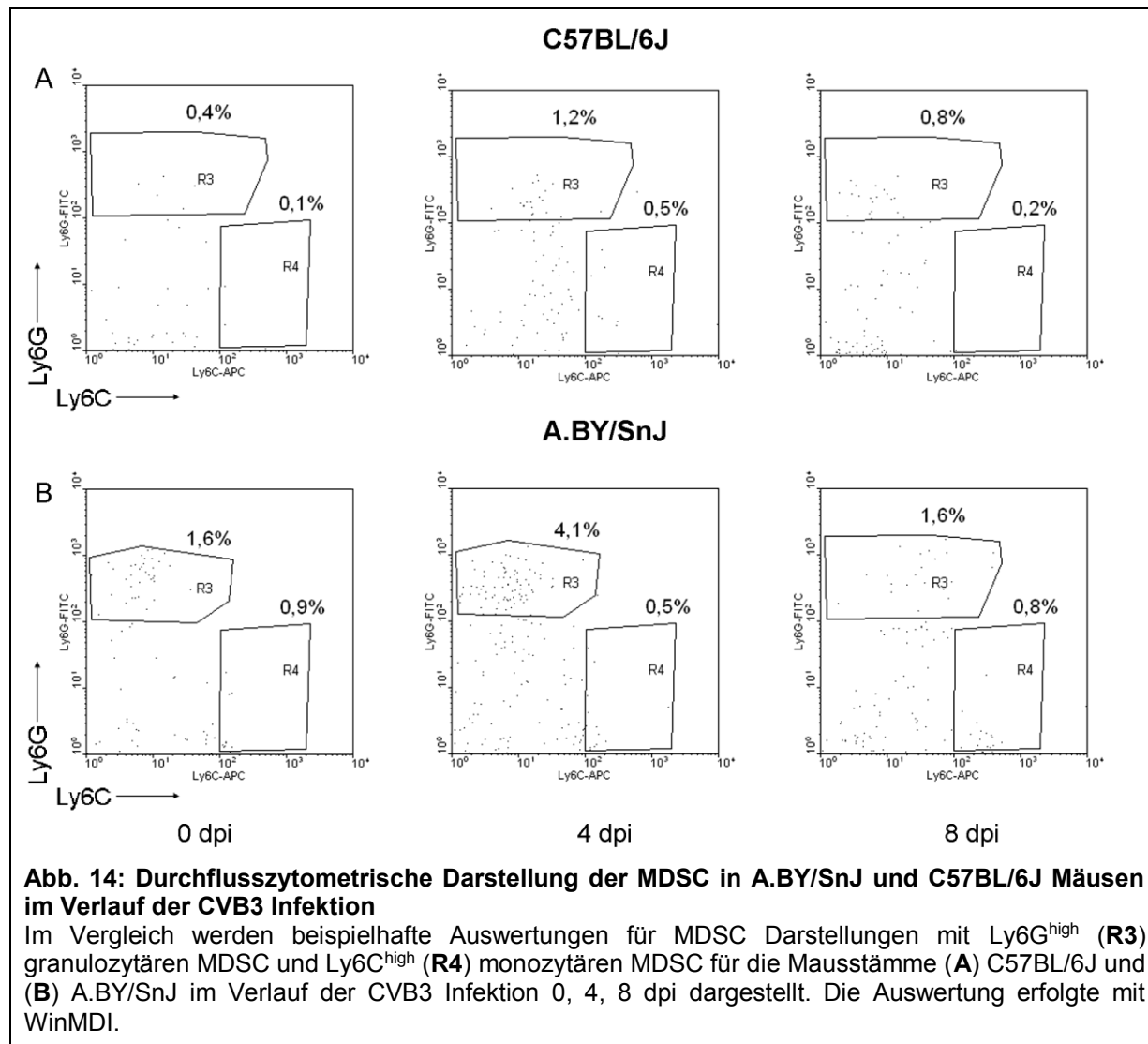


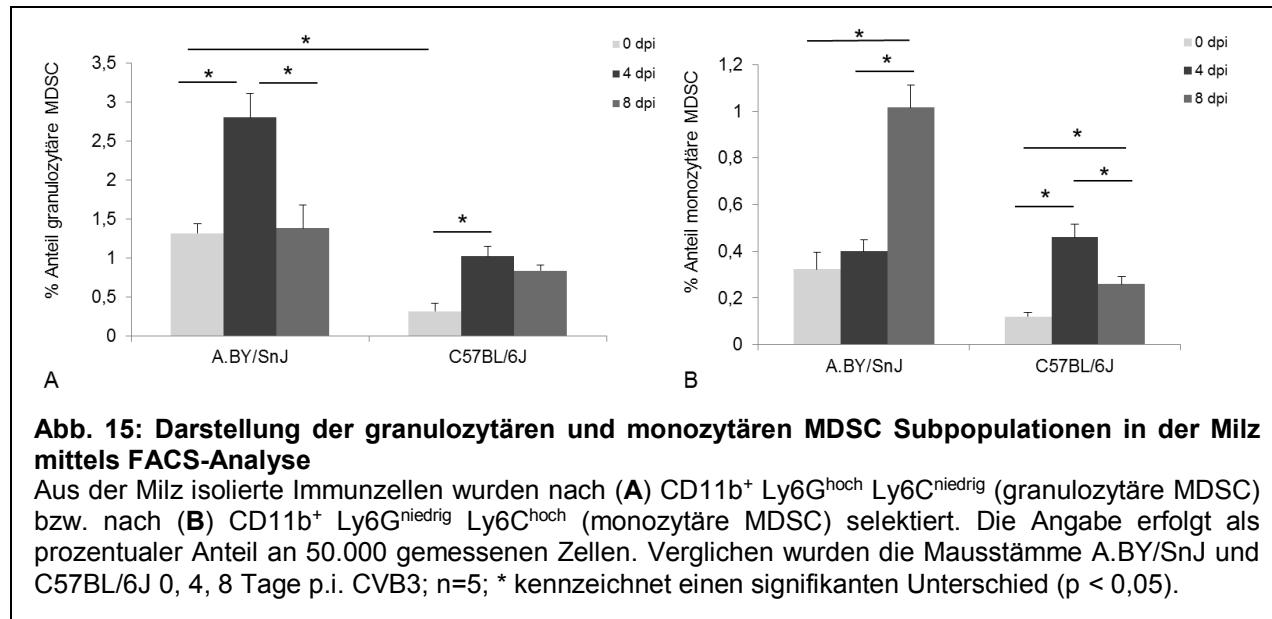
Abbildung 13 zeigt beispielhaft die Selektion und Messung von MDSC im Durchflusszytometer. Zunächst wurden nur Zellen mit hohem Vorwärtsstreulicht (FSC) für die Auswertung berücksichtigt (Abb. 13A), was den Ausschluss von Zelltrümmern garantiert. Aus dieser Auswahl wurden CD11b⁺ Zellen selektiert (Abb. 13B), da dieser Marker von MDSC exprimiert wird. Die CD11b⁺ Zellpopulation wurde in granulozytäre MDSC, welche viel Ly6G exprimieren (R3), und in monozytäre MDSC, die mehr Ly6C exprimieren (R4), differenziert (Abb. 13C). Die prozentuale Quantifizierung der beiden Subpopulationen erfolgte mit dem Programm WinMDI. Bei der hier beispielhaft dargestellten A.BY/SnJ Maus wurden 2% granulozytäre Ly6G MDSC und 0,6% monozytäre Ly6C MDSC anteilig an den aus der Milz isolierten Immunzellen detektiert (Abb. 13C).

In Abbildung 14 wird exemplarisch an einzelnen Mäusen gezeigt, wie sich die beiden MDSC Subpopulationen in der Milz in den Mausstämmen C57BL/6J (Abb. 14) und A.BY/SnJ (Abb. 14) im Verlauf einer CVB3 Infektion darstellen.



Dabei wies die naive C57BL/6J Maus 0,4% granulocytäre MDSC und 0,1% monozytäre MDSC in der Milz auf. Im Vergleich dazu wurde bei der C57BL/6J Maus 4 Tage p.i. CVB3 1,2% granulocytäre MDSC und 0,5% monozytäre MDSC und die C57BL/6J Maus 8 Tage p.i. CVB3 0,8% granulocytäre MDSC und 0,2% monozytäre MDSC in der Milz nachgewiesen (Abb. 14A). Bei den suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen stellte sich die naive Maus mit 1,6% granulocytäre MDSC und 0,9% monozytäre MDSC, die Maus 4 Tage p.i. CVB3 mit 4,1% granulocytäre MDSC und 0,5% monozytäre MDSC und die Maus 8 Tage p.i. CVB3 1,6% granulocytäre MDSC und

0,8% monozytäre MDSC in der Milz dar (Abb. 14B). Die zusammengefassten Ergebnisse dieser Untersuchung über eine größere Anzahl an Mäusen sind in Abbildung 15 dargestellt, sie zeigt die Anzahl an MDSC zu den jeweiligen Infektionszeitpunkten in Form eines Balkendiagramms.

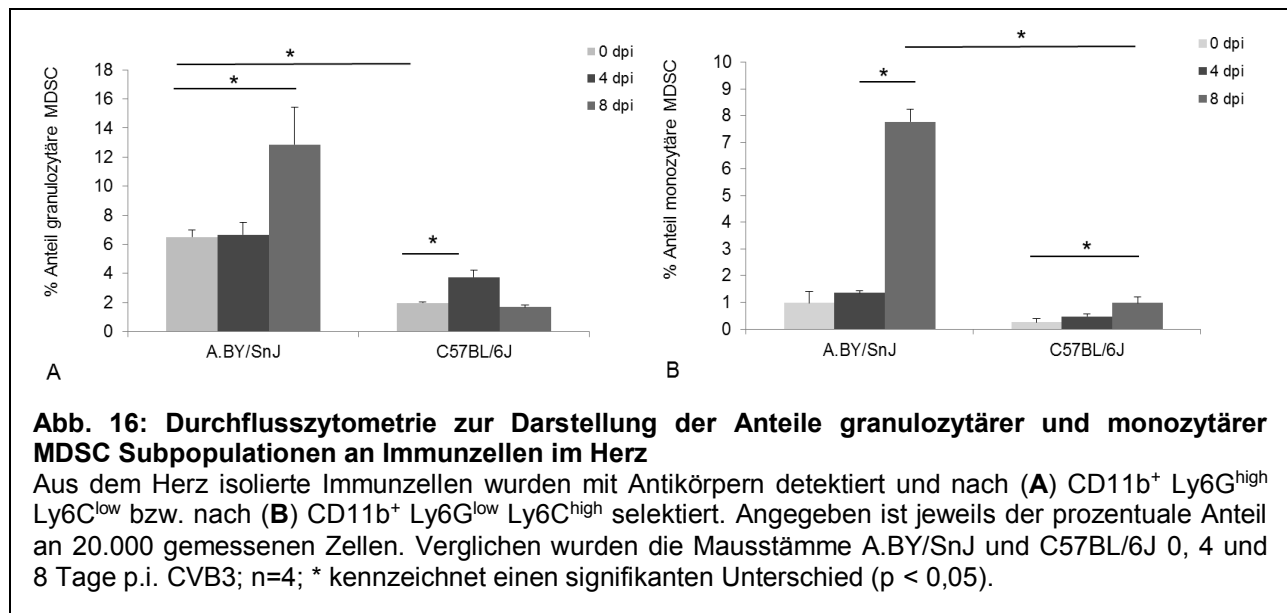


Bei der granulozytären Subpopulation von MDSC (CD11b⁺ Ly6G^{hoch} Ly6C^{niedrig}) in der Milz wurde bereits bei nicht-infizierten Mäusen ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Mausstämmen festgestellt (Abb. 15A). So wiesen suszeptible A.BY/SnJ Mäuse bereits basal eine signifikant größere Anzahl an granulozytären MDSC auf als resistente C57BL/6J Mäuse (A.BY/SnJ 0 dpi vs. C57BL/6J 0 dpi: 1,32 ± 0,12 vs. 0,32 ± 0,10; p < 0,05). Im Verlauf der CVB3 Infektion konnte bei beiden Mausstämmen 4 Tage p.i. eine vermehrte Anzahl an granulozytären MDSC nachgewiesen werden. Diese Zunahme war sowohl bei den A.BY/SnJ Mäusen (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: 1,32 ± 0,12 vs. 2,80 ± 0,31; p < 0,05) als auch bei C57BL/6J Mäusen (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi: 0,32 ± 0,10 vs. 1,02 ± 0,13; p < 0,05) signifikant. Die relative Zunahme an Zellen innerhalb eines Mausstammes von Tag 0 zu Tag 4 war bei C57BL/6J Mäusen (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi: 0,3 vs. 1) größer als bei A.BY/SnJ Mäusen (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: 1,3 vs. 2,8). In Folge der CVB3 Infektion (8 Tage p.i.) verminderte sich die Anzahl der Zellen der granulozytären Subpopulationen bei beiden Mausstämmen. Es zeigte sich bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen ein Rückgang der Zellzahlen fast auf das Ausgangsniveau (A.BY/SnJ 4 dpi vs. 8 dpi: 2,80 ± 0,31 vs. 1,38 ± 0,30; p < 0,05) und war damit deutlicher als bei resistenten C57BL/6J Mäusen (C57BL/6J 4 dpi vs. 8 dpi: 1,02 ± 0,13 vs. 0,84 ± 0,07; p = 0,29), bei denen die Verminderung der Zellzahl nicht signifikant war.

Die Zellzahlen der monozytären Subpopulation der MDSC (Abb. 15B) unterschieden sich bei naiven Tieren resistenter C57BL/6J Mäuse nicht signifikant von denen suszeptibler A.BY/SnJ Mäuse (C57BL/6J 0 dpi vs. A.BY/SnJ 0 dpi: $0,12 \pm 0,02$ vs. $0,32 \pm 0,07$; $p = 0,11$). Im Verlauf der Infektion (4 Tage p.i. CVB3) konnte bei A.BY/SnJ Mäusen eine nicht signifikante Zunahme der Anzahl monozytärer MDSC (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: $0,32 \pm 0,07$ vs. $0,40 \pm 0,05$; $p = 0,46$) nachgewiesen werden. Bei C57BL/6J Mäusen war die Zunahme der Anzahl monozytärer MDSC 4 Tage p.i. CVB3 ebenfalls deutlich (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi: $0,12 \pm 0,02$ vs. $0,46 \pm 0,06$; $p < 0,05$). Während bei resistenten C57BL/6J Mäusen 8 Tage p.i. CVB3 ein Rückgang der Zellzahlen fast auf das Ausgangsniveau gemessen wurde (C57BL/6J 4 dpi vs. 8 dpi: $0,46 \pm 0,06$ vs. $0,26 \pm 0,03$; $p < 0,05$), zeigten suszeptiblen A.BY/SnJ Mäuse eine signifikante Zunahme der Zellzahl der monozytären MDSC Subpopulation (A.BY/SnJ 4 dpi vs. 8 dpi: $0,40 \pm 0,05$ vs. $1,02 \pm 0,10$; $p < 0,05$). Sowohl bei C57BL/6J Mäusen (C57BL/6J 0 dpi vs. 8 dpi: $0,10 \pm 0,02$ vs. $0,26 \pm 0,03$; $p < 0,05$) als auch bei A.BY/SnJ Mäusen (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 8 dpi: $0,32 \pm 0,07$ vs. $1,02 \pm 0,10$; $p < 0,05$) war die Anzahl monozytärer MDSC 8 Tage p.i. CVB3 im Vergleich zu naiven Tieren desselben Mausstamms signifikant erhöht.

4.2.2. Nachweis der Verteilung von MDSC Subpopulationen in Herzen CVB3-infizierter Mäuse mittels Durchflusszytometrie

MDSC Subpopulationen wurden während der akuten CVB3 Infektion nicht nur in der Milz, sondern auch in den Herzen von C57BL/6J und A.BY/SnJ Mäusen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass MDSC eine sehr kleine Subpopulation von Immunzellen im Herzmuskel darstellen, sodass Veränderungen der Zellzahl von MDSC während der CVB3 Infektion nur anteilig an der Immunzellpopulation nachzuweisen waren. Aus diesem Grund wurde nach der Lyse des Myokardgewebes eine Isolierung von Immunzellen über eine Dichtezentrifugation durchgeführt (Abb. 16). Folglich wird in Abbildung 16 nur der Anteil der jeweiligen MDSC Subpopulation an den isolierten Immunzellen aus dem Herzen dargestellt.



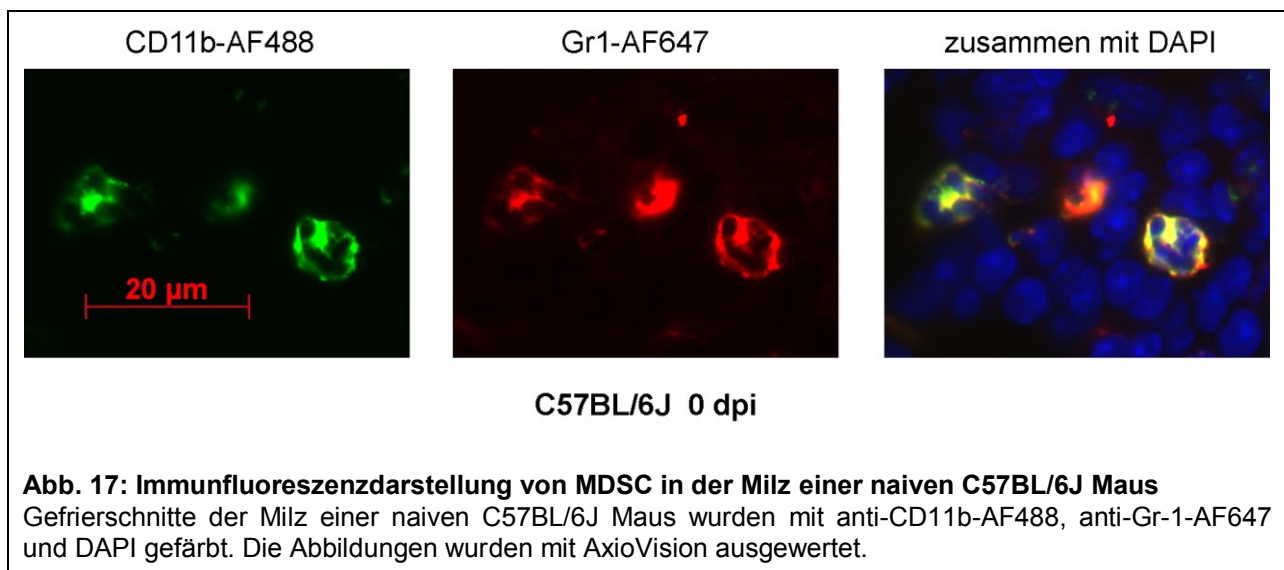
Bei der Quantifizierung granulozytärer MDSC (Abb. 16A) im Herz im Verlauf der akuten CVB3 Infektion zeigte sich, dass sich deren Anzahl bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. im Vergleich zu naiven Tieren zunächst kaum veränderte (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: $6,50 \pm 0,51$ vs. $6,65 \pm 0,85$; $p = 0,88$) jedoch 8 Tage p.i. signifikant zunahm (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 8 dpi: $6,50 \pm 0,51$ vs. $12,88 \pm 2,53$ $p < 0,05$). Bei resistenten C57BL/6J Mäusen wurden 4 Tage p.i. signifikant mehr granulozytäre MDSC als bei naiven Mäusen detektiert (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi: $1,98 \pm 0,05$ vs. $3,75 \pm 0,50$; $p < 0,05$) während 8 Tage p.i. die Zellzahl annähernd wieder derjenigen von naiven Mäusen entsprach (C57BL/6J 0 dpi vs. 8 dpi: $1,98 \pm 0,04$ vs. $1,68 \pm 0,16$; $p = 0,12$). Im direkten Vergleich beider Mausstämme fiel auf, dass die Anzahl granulozytärer MDSC bereits bei naiven C57BL/6J Mäusen dreifach geringer war als bei naiven A.BY/SnJ Mäusen (C57BL/6J 0 dpi vs. A.BY/SnJ 0 dpi: $1,98 \pm 0,04$ vs. $6,50 \pm 0,51$; $p < 0,05$) und zu keinem Zeitpunkt der CVB3 Infektion ein vergleichbares Niveau erreichte.

Bei den monozytären MDSC (Abb. 16B) waren ebenfalls Unterschiede in beiden Mausstämmen detektierbar. Suszeptible A.BY/SnJ Mäuse wiesen 4 Tage p.i. im Vergleich zu naiven Tieren keine signifikante Veränderung der Zellzahlen auf (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: $0,98 \pm 0,43$ vs. $1,35 \pm 0,10$; $p = 0,43$), 8 Tage p.i. konnte jedoch eine signifikante Zunahme der Anzahl monozytärer MDSC verzeichnet werden (A.BY/SnJ 4 dpi vs. 8 dpi: $1,35 \pm 0,10$ vs. $7,78 \pm 0,47$; $p < 0,05$). Bei resistenten C57BL/6J Mäusen wurde 4 Tage p.i. nur eine sehr geringe Zunahme (C57BL/6J 0dpi vs. 4 dpi: $0,25 \pm 0,15$ vs. $0,48 \pm 0,09$; $p = 0,24$), 8 Tage p.i. ebenfalls eine geringe aber

verglichen mit naiven Tieren signifikante Zunahme der Zellzahl (C57BL/6J 0 dpi vs. 8 dpi: $0,25 \pm 0,15$ vs. $0,98 \pm 0,23$; $p < 0,05$) bei der monozytären MDSC Subpopulation detektiert. Einen deutlichen Unterschied zeigte sich zwischen den Mausstämmen im direkten Vergleich. Hierbei unterschied sich 8 Tage p.i. CVB3 die Anzahl monozytärer MDSC von A.BY/SnJ Mäusen zu C57BL/6J Mäusen (A.BY/SnJ 8 dpi vs. C57BL/6J 8 dpi: $7,78 \pm 0,47$ vs. $0,98 \pm 0,23$; $p < 0,05$) fast um das Zehnfache.

4.2.3. Immunfluoreszenzdarstellung von MDSC in der Milz

MDSC sind sehr heterogene Zellen, die in geringer Anzahl vorkommen, was die bildliche Darstellung der Zellen erschwert. Zur Darstellung von MDSC in der Milz wurden Gefrierschnitte von Milzen angefertigt und diese nach dem unter Kap. 3.7.2 aufgeführten Protokoll gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop stellten sich CD11b⁺ Zellen grün und Gr-1⁺ Zellen rot dar. Als Nachweis einer CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC Zelle kann die gelbliche Farbgebung bei Überlagerung des grünen und roten Farbstoffes gewertet werden. Die Zellkerne wurden mittels DAPI blau markiert.



Bereits in Milzen nicht-infizierter Tiere finden sich einzelne MDSC mittels Immunfluoreszenz wie beispielhaft in Abbildung 17 an der Milz einer naiven C57BL/6J Maus gezeigt.

In Abbildung 18 wurden bei infizierten A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. CVB3 zusätzlich zur CD11b⁺ Gr-1⁺ Gesamtpopulation der MDSC (Abb. 18A) die beiden Subpopulationen, granulozytäre Ly6G^{hoch} MDSC (Abb. 18B) und monozytäre Ly6C^{hoch} MDSC (Abb. 18C), in der Milz dargestellt.

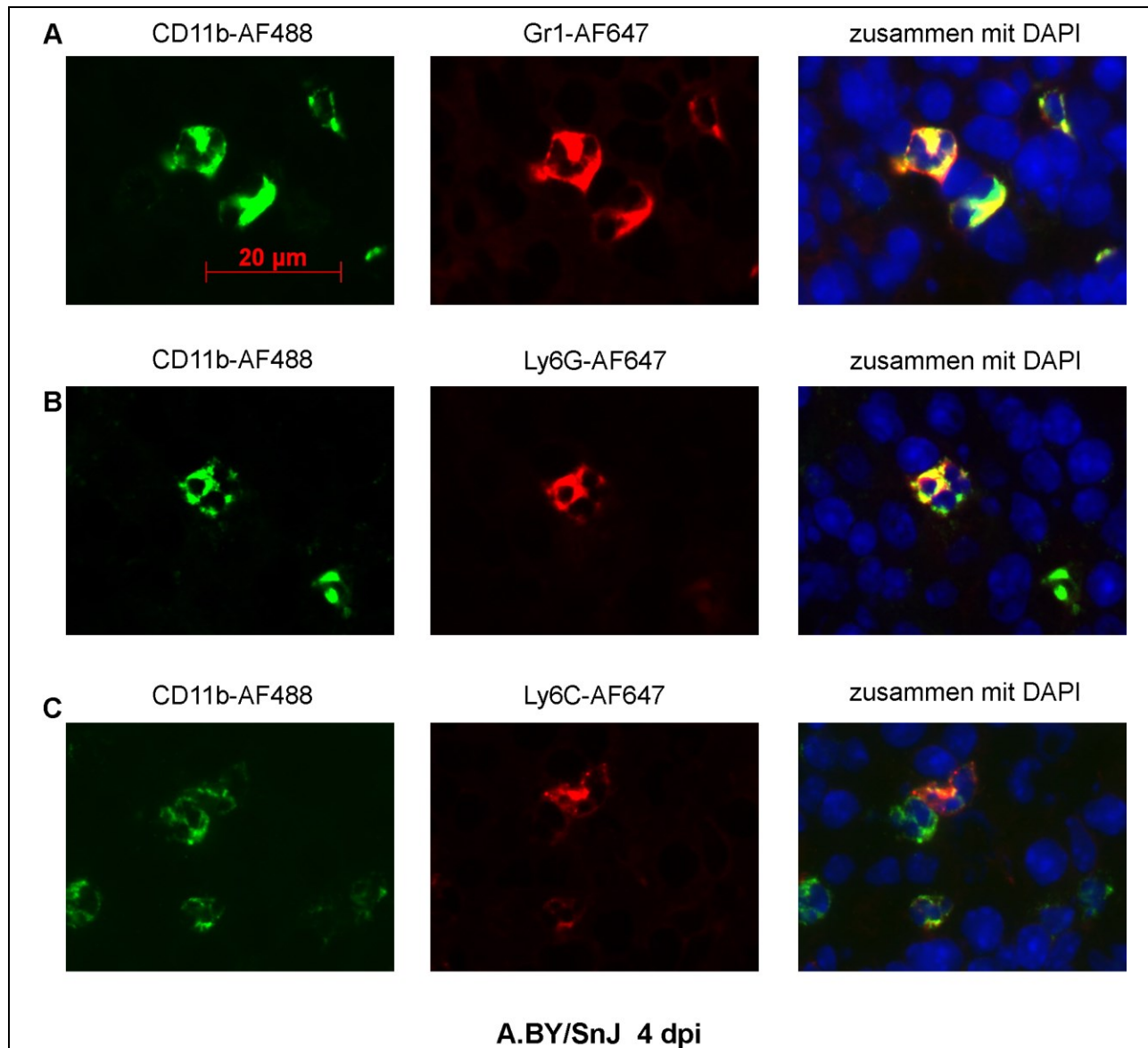


Abb. 18: Immunfluoreszenzdarstellung von MDSC in der Milz von A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. CVB3

Gefrierschnitte der Milz von A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. CVB3 wurden mit anti-CD11b-AF488 und (A) anti-Gr-1-AF647 (B) anti-Ly6G-AF647 (C) anti-Ly6C-AF647 sowie DAPI gefärbt.

Auch bei resistenten C57BL/6J Mäusen 4 Tage p.i. lassen sich CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC (Abb. 19A) sowie die beiden Subpopulationen granulozytäre Ly6G^{hoch} MDSC (Abb. 19B) und monozytäre Ly6C^{hoch} MDSC (Abb. 19C) in der Milz nachweisen.

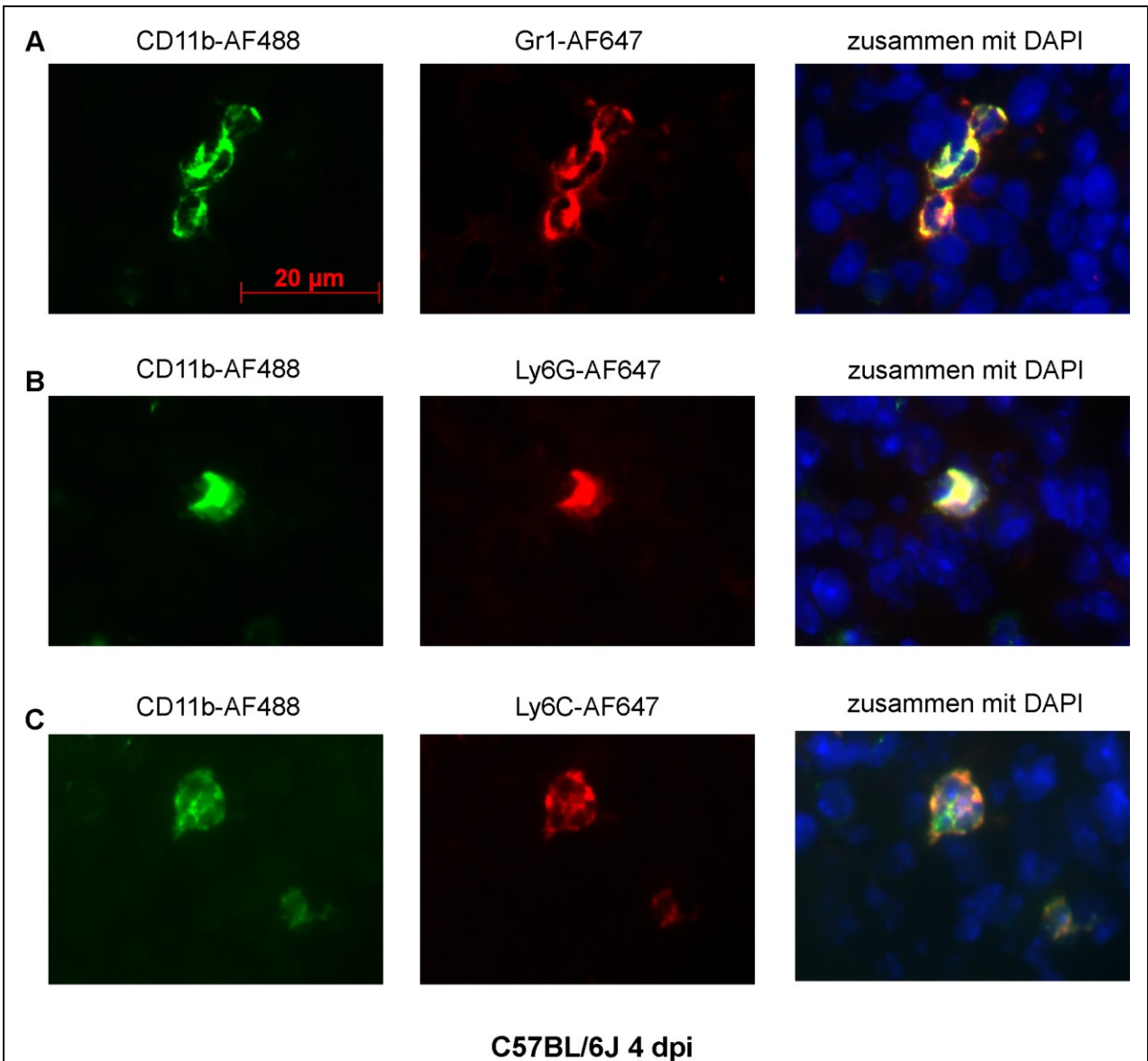


Abb. 19: Immunfluoreszenzdarstellung von MDSC in der Milz von C57BL/6J Mäusen 4 Tage p.i. CVB3

Gefrierschnitte der Milz von C57BL/6J Mäusen 4 Tage p.i. CVB3 wurden mit anti-CD11b-AF488 und (A) anti-Gr-1-AF647 (B) anti-Ly6G-AF647 (C) anti-Ly6C-AF647 sowie DAPI gefärbt.

4.2.4. Immunfluoreszenzdarstellung von MDSC im Herzen

Eine Darstellung von MDSC im Myokard war auf Grund des geringen Anteils dieser Zellen in diesem Organ schwieriger als in der Milz. Bei naiven Tieren ließen sich diese Zellen im Herzen nicht darstellen, wie an einer A.BY/SnJ Maus in Abbildung 20A gezeigt wird.

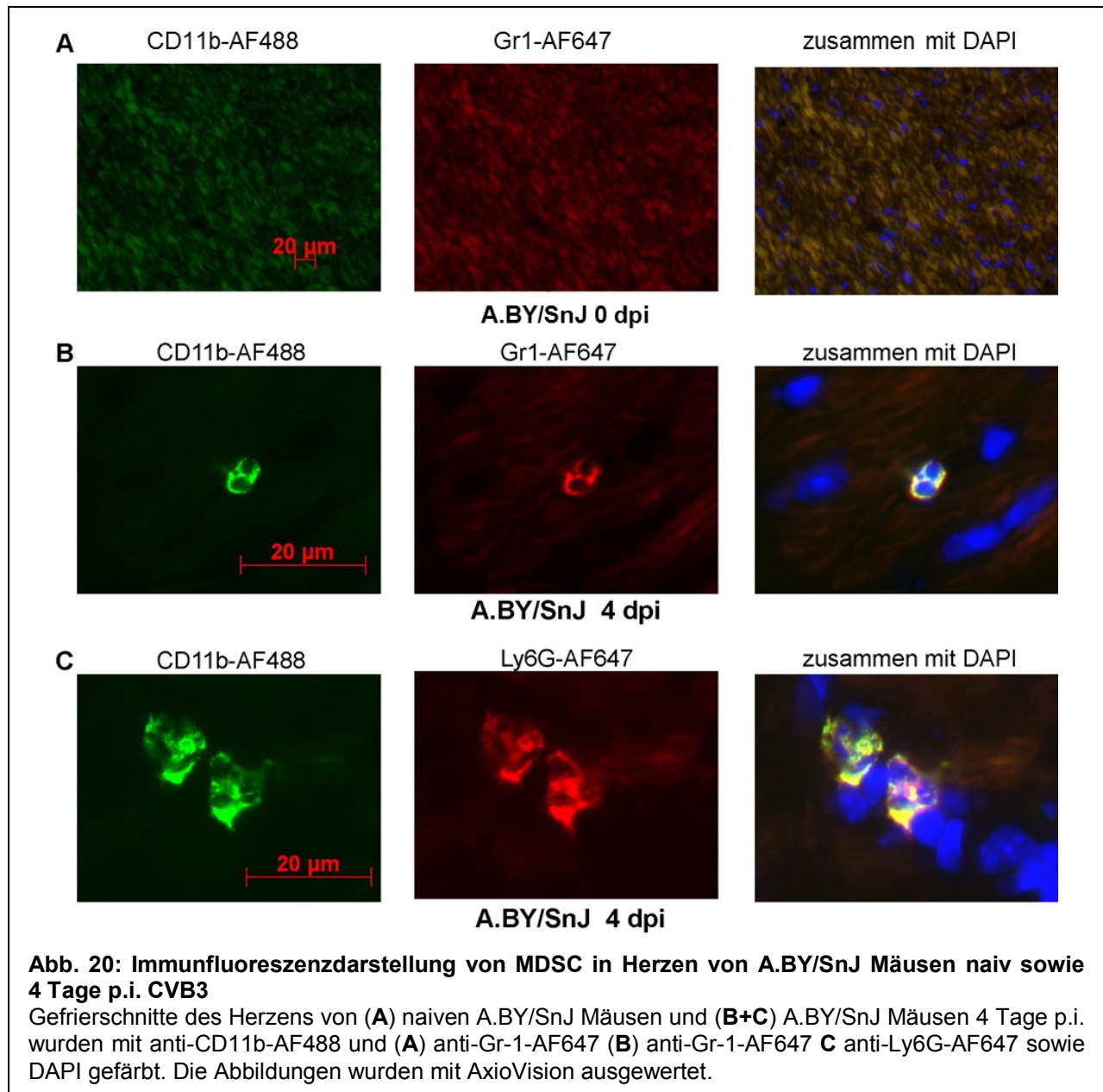


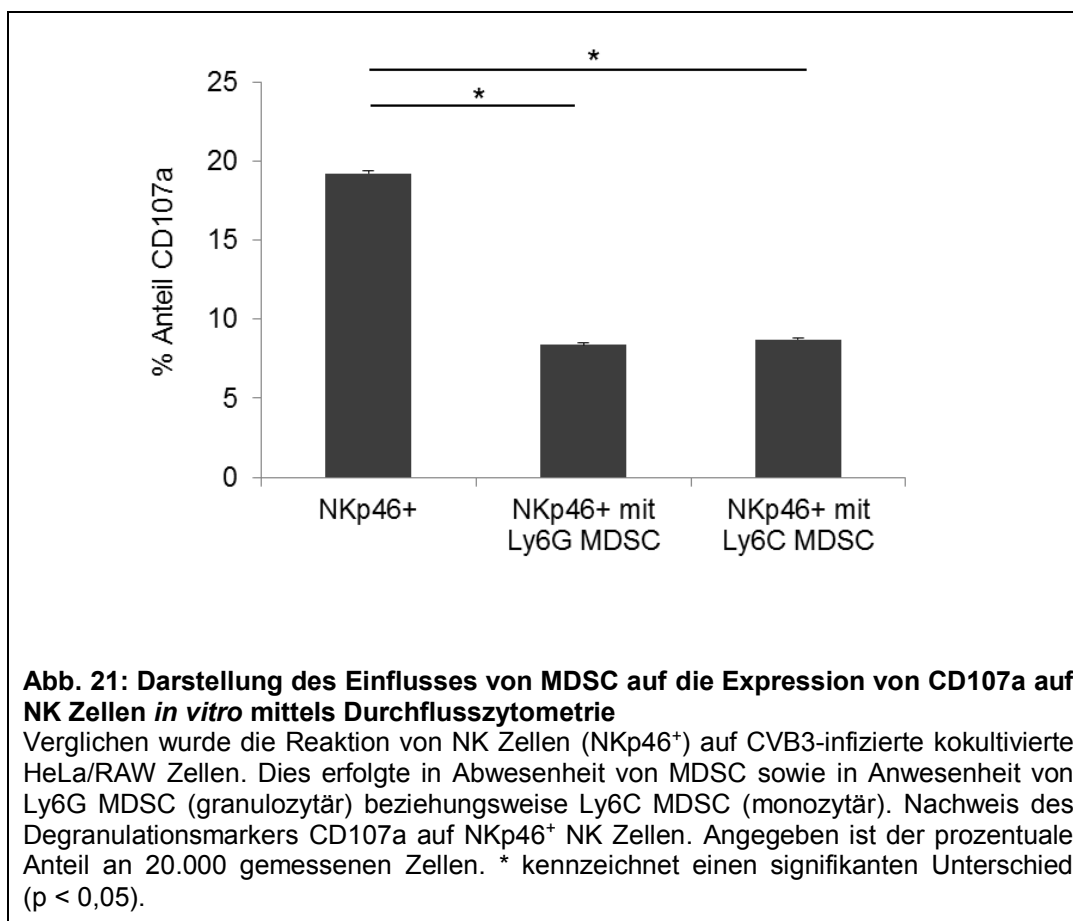
Abbildung 20B zeigt beispielhaft die Darstellung von CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC und der granulozytären Ly6G^{hoch} MDSC (Abb. 20C) im Myokard von einer A.BY/SnJ Maus 4 Tage p.i. CVB3.

4.2.5. Regulation von NK Zellen durch MDSC *in vitro*

Eine Hemmung von NK Zellen durch MDSC bei viralen Infektionen, wie z.B. bei einer Vaccinia Virus Infektion oder im Rahmen eines Adenovirus Gentransfers wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Fortin, Huang et al., 2012; Zhu, Huang et al., 2012). In dieser Arbeit sollte nun der Einfluss von MDSC auf NK Zellen im Rahmen der CVB3 Infektion untersucht werden.

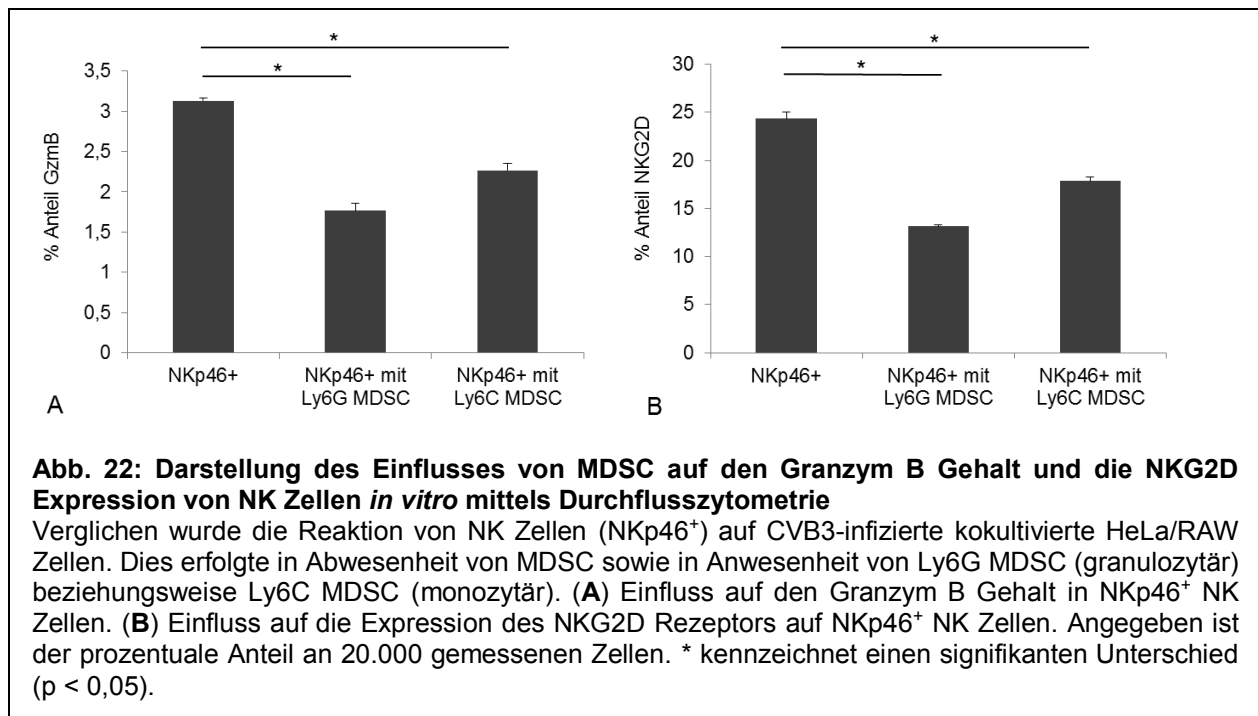
Hierzu wurden zunächst *in vitro* Veränderungen der Reaktionen von NK Zellen auf CVB3-infizierte kokultivierte HeLa/RAW (Makrophagen) Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit von MDSC analysiert. NK Zellen erhalten während einer viralen Infektion nicht nur von infizierten Zellen (in diesem Experiment CVB3-infizierte HeLa Zellen), sondern auch von Immunzellen, wie beispielsweise Makrophagen (Coombes, Han et al., 2012), aktivierende Signale. Damit die *in vivo* Situation möglichst optimal simuliert werden konnte, fanden in diesem Versuch HeLa/RAW Ko-Kulturen Verwendung. Die Expression des Proteins Granzym B in NK Zellen sowie die Oberflächenmarker CD107a und NKG2D auf NK Zellen aus den Milzen naiver C57BL/6J Mäuse, wurden im Durchflusszytometer gemessen (Abb.21 und 22). Die Messungen wurden durch mehrfache Wiederholung der Analyse verifiziert.

Zunächst wurde analysiert, ob sich die Expression des Oberflächenmarkers CD107a auf NK Zellen durch Ko-Kultur mit MDSC verändert (Abb. 21). CD107a befindet sich auf der Membran intrazellulärer Lysosomen in NK Zellen und wird bei der Degranulation im Rahmen der zytotoxischen Reaktion auf der Zelloberfläche exprimiert. NK Zellen reagieren damit auf Zielzellen, welche durch den ausgeschütteten Inhalt der Lysosome zerstört werden (Tacken, Ginter et al., 2011). Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl NK Zellen, welche mit granulozytären Ly6G^{hoch} MDSC kultiviert wurden (NKp46⁺ vs. NKp46⁺ mit Ly6G MDSC: $19,22 \pm 0,20$ vs. $8,37 \pm 0,15$; $p < 0,05$) als auch NK Zellen, die mit monozytären Ly6C^{hoch} MDSC kultiviert wurden (NKp46⁺ vs. NKp46⁺ mit Ly6C MDSC: $19,22 \pm 0,20$ vs. $8,73 \pm 0,09$; $p < 0,05$) eine signifikant verminderte Oberflächenexpression von CD107a aufwiesen. Dies ist ein Hinweis auf eine Reduktion der Degranulationsfähigkeit von NK Zellen durch MDSC bei der CVB3 Infektion.



Granzym B ist eine Protease, die nach der Aktivierung von NK Zellen aus intrazellulären Granula in den interzellulären Spalt ausgeschüttet wird, durch von Perforin geschaffene Poren in die Zielzelle eindringt und dort zur Apoptose führt. Die Messungen zeigten, dass sowohl die Kultivierung von NK Zellen mit granulozytären MDSC (NKp46⁺ vs. NKp46⁺ mit Ly6G MDSC: $3,13 \pm 0,03$ vs. $1,77 \pm 0,09$; $p < 0,05$) als auch mit monozytären MDSC (NKp46⁺ vs. NKp46⁺ mit Ly6C MDSC: $3,13 \pm 0,03$ vs. $2,27 \pm 0,09$; $p < 0,05$) den Gehalt an Granzym B in NK Zellen (NKp46⁺) signifikant vermindert (Abb. 22A).

Der Oberflächenrezeptor NKG2D dient zur Stimulation von NK Zellen durch Liganden, welche auf Zielzellen bei zellulärem Stress, wie zum Beispiel einer viralen Infektion, entstehen. Eine Verminderung der Expression von NKG2D auf NKp46⁺-Zellen wurde in der Ko-Kultur von NK Zellen mit granulozytären MDSC (NKp46⁺ vs. NKp46⁺ mit Ly6G MDSC: $24,33 \pm 0,68$ vs. $13,13 \pm 0,15$; $p < 0,05$) ebenso gemessen, wie mit monozytären MDSC (NKp46⁺ vs. NKp46⁺ mit Ly6C MDSC: $24,33 \pm 0,68$ vs. $17,87 \pm 0,44$; $p < 0,05$), wobei die Hemmung durch granulozytäre MDSC geringfügig stärker war (Abb. 22B).



Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl Ly6G als auch Ly6C MDSC *in vitro* eine Regulation des Oberflächenmarkers CD107a auf NK Zellen bewirken. Hierbei wurde eine 50%-ige Expressionsverminderung festgestellt. Auch die Expression des Rezeptors NKG2D auf NK Zellen sowie der Protease Granzym B in NK Zellen wurde durch die Kultivierung mit beiden MDSC Subpopulationen gleichermaßen fast um die Hälfte verringert.

4.3. Untersuchung des Einflusses proinflammatorischer Proteine in Zusammenhang mit MDSC während der CVB3 Myokarditis

4.3.1. Bedeutung und Verteilung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β und Interleukin-6 bei der CVB3 Myokarditis

Beim Menschen führt eine Infektion mit CVB3 zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β und IL-6 im Myokard (Seko, Takahashi et al., 1997). Diese Zytokine werden vor allem von Monozyten produziert und können neben einer Aktivierung des Immunsystems auch zu einer toxischen Schädigung am Myokard führen (Henke, Mohr et al., 1992). In Untersuchungen mit Krebspatienten sowie in Tumor-Mausmodellen wurde festgestellt, dass MDSC unter anderem durch IL-1 β und IL-6 aktiviert werden und proliferieren. IL-1 β verstärkt zudem die Interaktion von MDSC mit Makrophagen. Bei Infektionskrankheiten, wie zum Beispiel HIV, wurde gezeigt, dass IL-6 zu einer Expansion der MDSC führt (Garg und Spector, 2014).

Zur Abklärung eines möglichen Zusammenhangs der Zytokinexpression mit MDSC wurde zunächst die Verteilung von IL-1 β und IL-6 während der akuten murinen CVB3 Myokarditis durch *in situ* Hybridisierung von IL-1 β und immunhistochemische Färbungen von IL-6 an Herzgewebe CVB3-infizierter und naiver Mäuse analysiert. Ferner wurden Proben dieser Herzen mit quantitativer real-time RT-PCR auf den mRNA Gehalt der beiden Zytokine untersucht.

Bei der *in situ* Darstellung von IL-1 β mRNA in Herzgewebe während einer akuten CVB3 Myokarditis wurde deutlich, dass bei resistenten C57BL/6J Mäusen (Abb. 23) im Vergleich zu suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen nur sehr wenig IL-1 β mRNA positive Zellen nachweisbar waren und dies nur in einem sehr frühen Stadium der Infektion (4 Tage p.i.). Bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen zeigte die Untersuchung dagegen 8 Tage p.i. CVB3 eine größere Menge an IL-1 β mRNA exprimierende Immunzellen im Interstitium des Myokards (Abb. 24).

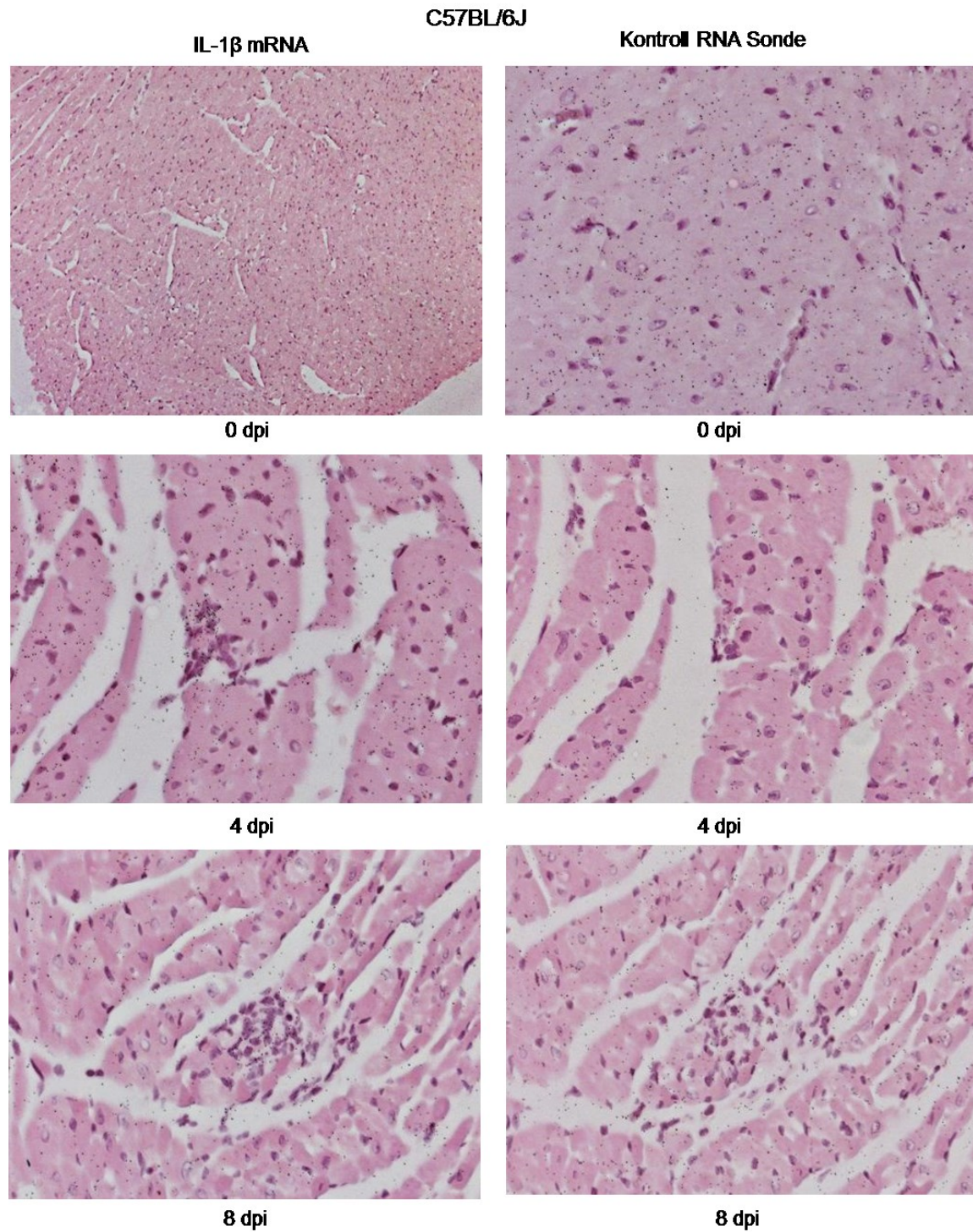
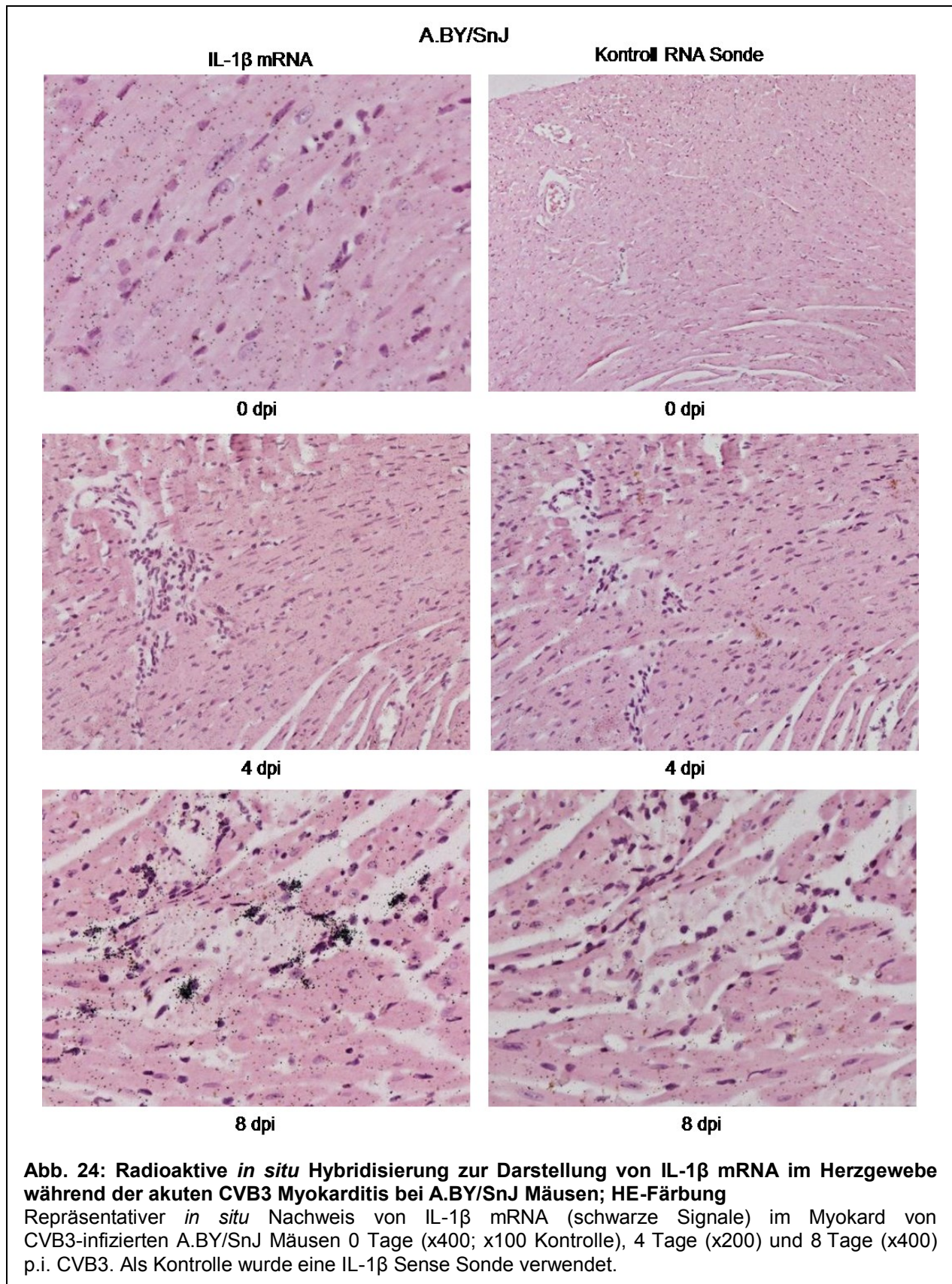


Abb. 23: Radioaktive *in situ* Hybridisierung zur Darstellung von IL-1 β mRNA im Herzgewebe während der akuten CVB3 Myokarditis bei C57BL/6J Mäusen; HE-Färbung

Repräsentativer *in situ* Nachweis von IL-1 β mRNA (schwarze Signale) im Myokard von CVB3-infizierten C57BL/6J Mäusen 0 Tage (x100; x400 Kontrolle), 4 Tage (x400) und 8 Tage (x400) p.i. CVB3. Als Kontrolle wurde eine IL-1 β Sense Sonde verwendet.



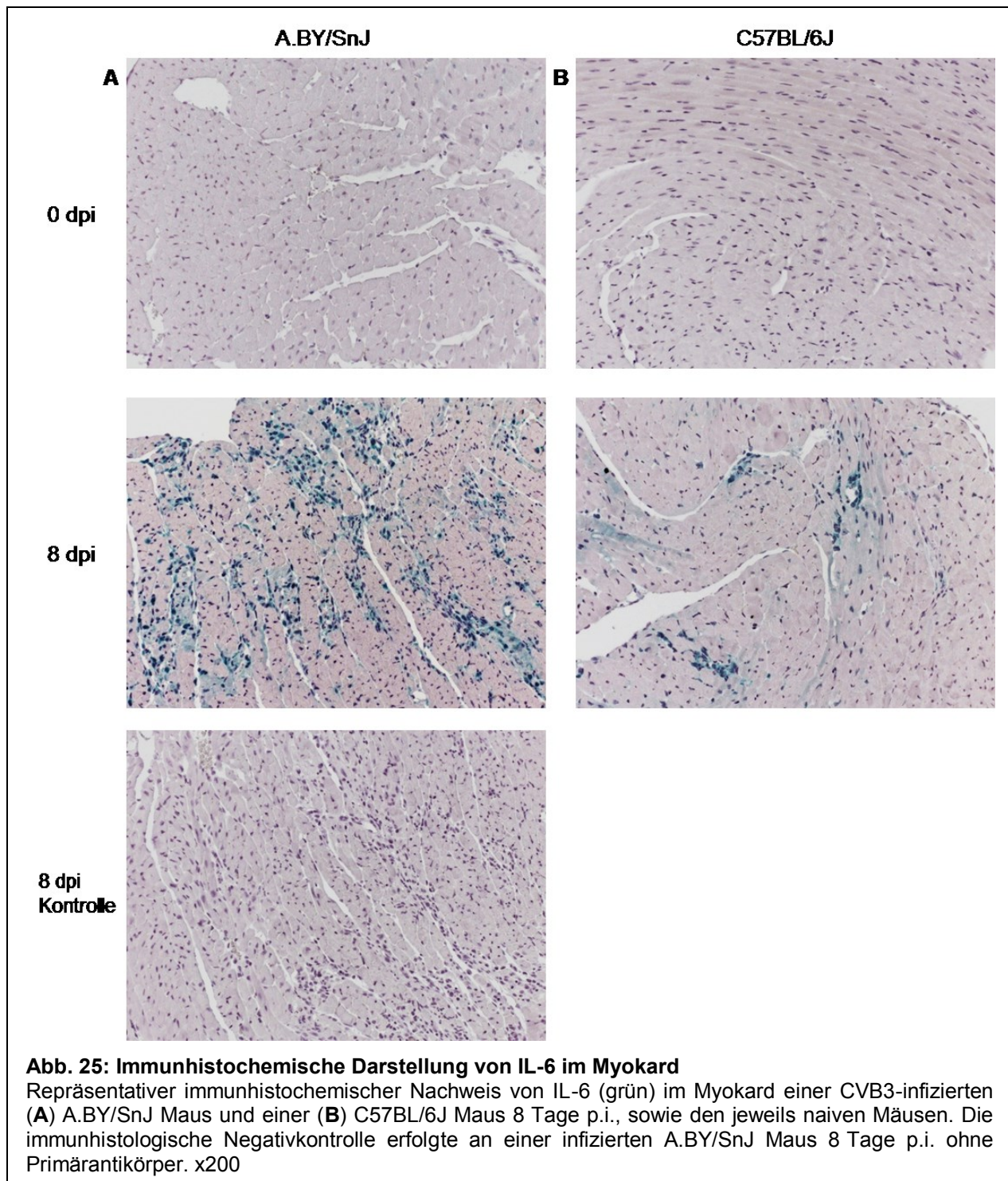
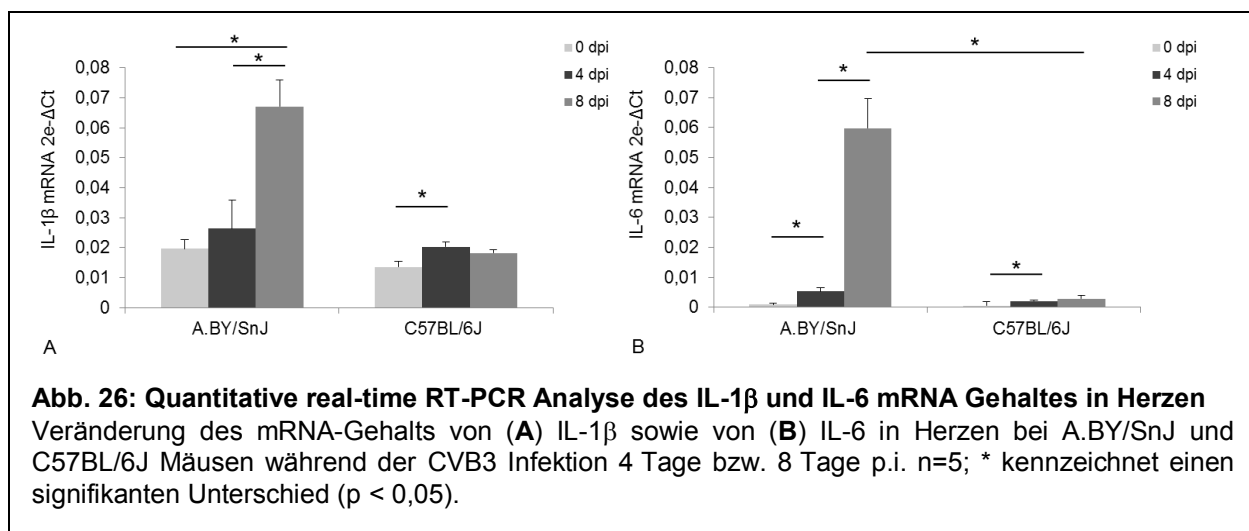


Abb. 25: Immunhistochemische Darstellung von IL-6 im Myokard

Repräsentativer immunhistochemischer Nachweis von IL-6 (grün) im Myokard einer CVB3-infizierten (A) A.BY/SnJ Maus und einer (B) C57BL/6J Maus 8 Tage p.i., sowie den jeweils naiven Mäusen. Die immunhistologische Negativkontrolle erfolgte an einer infizierten A.BY/SnJ Maus 8 Tage p.i. ohne Primärantikörper. x200

Zum Nachweis des Proteins IL-6 in Immunzellen im Myokard wurden immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten CVB3-infizierter und naiver Mäuse angefertigt. Das Maximum der IL-6 Expression in Immunzellen im Myokard fand sich 8 Tage p.i., wobei in suszeptiblen

A.BY/SnJ Mäusen (Abb. 25A) ein Vielfaches an IL-6 positiven Zellen detektiert wurden, als bei resistenten C57BL/6J Mäusen (Abb. 25B).



Bei der Untersuchung der mRNA des proinflammatorischen Zytokins IL-1β (Abb. 26A) während der akuten CVB3 Myokarditis wurde bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen bereits 4 Tage p.i. eine geringe (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: $0,0196 \pm 0,003$ vs. $0,0264 \pm 0,0094$; $p = 0,51$), 8 Tage p.i. sowohl im Vergleich zu naiven Tieren (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 8 dpi: $0,0196 \pm 0,003$ vs. $0,0671 \pm 0,0089$; $p < 0,05$) als auch zu Mäusen 4 Tage p.i. (A.BY/SnJ 4 dpi vs. 8 dpi: $0,0264 \pm 0,0094$ vs. $0,0671 \pm 0,0089$; $p < 0,05$) eine signifikant verstärkte Expression im Myokard gemessen. Die Expression von IL-1β mRNA im Myokard war bei resistenten C57BL/6J Mäusen lediglich 4 Tage p.i. signifikant erhöht (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi: $0,0136 \pm 0,0017$ vs. $0,0203 \pm 0,0016$; $p < 0,05$). Acht Tage p.i. erreichte die Expression von IL-1β mRNA bei resistenten C57BL/6J Mäusen annähernd wieder den Ausgangswert und war somit nicht signifikant verändert (C57BL/6J 0 dpi vs. 8 dpi: $0,0136 \pm 0,0017$ vs. $0,0182 \pm 0,0012$; $p = 0,06$).

Die Veränderungen der Expression des Zytokins IL-6 (Abb. 26B) während der akuten CVB3 Myokarditis waren mit der Expression von IL-1β vergleichbar. Bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen war sowohl 4 Tage p.i. (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: $0,001 \pm 0,0006$ vs. $0,005 \pm 0,001$; $p < 0,05$) als auch 8 Tage p.i. (A.BY/SnJ 4 dpi vs. 8 dpi: $0,005 \pm 0,001$ vs. $0,06 \pm 0,01$; $p < 0,05$) eine signifikant verstärkte Expression von IL-6 mRNA im Myokard detektierbar. Bei resistenten C57BL/6J Mäusen konnte 4 Tage p.i. CVB3 eine signifikant verstärkte (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi: $0,001 \pm 0,0002$ vs. $0,002 \pm 0,0002$; $p < 0,05$), sowie 8 Tage p.i. eine geringfügig verstärkte (C57BL/6J 4 dpi vs. 8 dpi: $0,002 \pm 0,0002$ vs. $0,003 \pm 0,001$; $p = 0,43$) Expression von IL-6

mRNA detektiert werden. Im Vergleich zwischen den beiden Mausstämmen konnte 8 Tage p.i. 20 Mal mehr IL-6 mRNA bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen im Myokard nachgewiesen werden als bei resistenten C57BL/6J Mäusen (A.BY/SnJ 8 dpi vs. C57BL/6J 8 dpi: $0,06 \pm 0,01$ vs. $0,003 \pm 0,001$; $p < 0,05$), in Bestätigung der immunhistologischen Ergebnisse.

4.3.2. Untersuchung der MDSC-Regulatoren S100A8 und S100A9 in der Milz

In der Literatur gibt es Hinweise dafür, dass eine Akkumulation von MDSC auch ohne das Vorhandensein von IL-1 β und IL-6 vorkommen kann. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es weitere Mediatoren gibt, die zu einer Migration dieser Zellen führen können. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass MDSC Rezeptoren für S100A8 und S100A9 auf ihrer Oberfläche aufweisen und diese Proteine auch selbst synthetisieren und sezernieren. Zusätzlich wirken die Proteine S100A8/9 chemotaktisch auf MDSC (Sinha, Okoro et al., 2008). Damit bilden die S100A8/9 Proteine einen autokrinen positiven Verstärkungsmechanismus für MDSC. Die Proteine S100A8 und S100A9 bilden heterodimere Komplexe und gehören zu einer großen Familie von inflammatorischen und nicht-inflammatorischen Molekülen. S100A8 wird auch als Calgranulin A oder *myeloid-related protein* (MRP) 8 bezeichnet, S100A9 ist auch als Calgranulin B und MRP14 bekannt (Foell, Wittkowski et al., 2007).

Mittels quantitativer real-time RT-PCR wurde zunächst in der Milz untersucht, ob S100A8 mRNA und S100A9 mRNA während der CVB3 Infektion vermehrt exprimiert werden (Abb. 27).

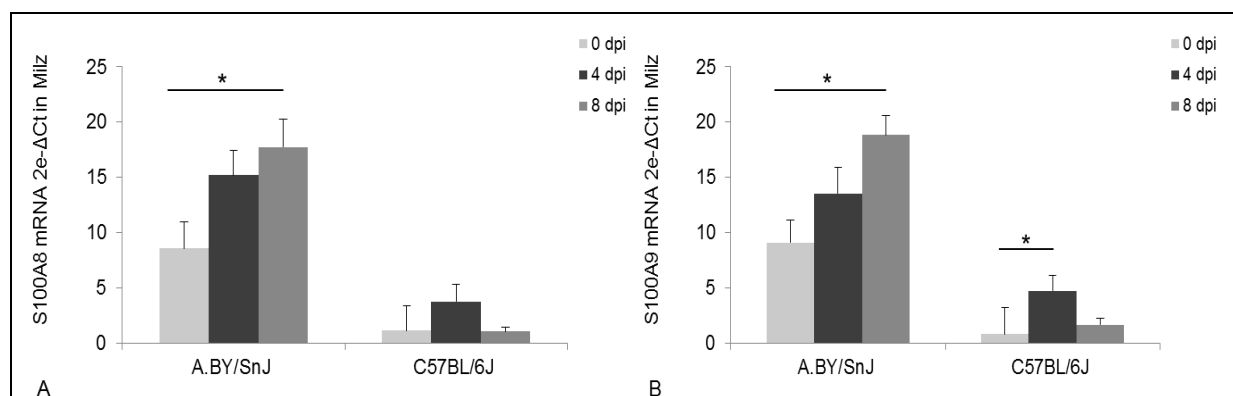


Abb. 27: Quantitative real-time RT-PCR Analyse des S100A8 und S100A9 mRNA Gehaltes in der Milz

Die Veränderungen des Gehalts an (A) S100A8 mRNA sowie (B) S100A9 mRNA in der Milz von A.BY/SnJ und C57BL/6J Mäusen während der CVB3 Infektion wurde 4 Tage p.i. und 8 Tage p.i. durch quantitative real-time RT-PCR erfasst und im Balkendiagramm dargestellt. n=4; * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

Während S100A8 mRNA (Abb. 27A) bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. geringfügig (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: $8,58 \pm 2,42$ vs. $15,18 \pm 2,24$; $p = 0,09$) und 8 Tage p.i. signifikant erhöht (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 8 dpi: $8,58 \pm 2,42$ vs. $17,73 \pm 2,51$; $p < 0,05$) in der Milz exprimiert wurde, zeigte sich bei resistenten C57BL/6J Mäusen zunächst eine verstärkte, jedoch nicht signifikante Expression von S100A8 mRNA 4 Tage p.i. CVB3 (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi: $1,15 \pm 0,58$ vs. $3,76 \pm 1,55$; $p = 0,17$). Acht Tage p.i. CVB3 glich die Expression von S100A8 mRNA in der Milz fast derjenigen von naiven C57BL/6J Mäusen (C57BL/6J 0 dpi vs. 8 dpi: $1,15 \pm 0,58$ vs. $1,07 \pm 0,33$; $p = 0,91$).

Ähnliche Veränderungen konnten hinsichtlich der S100A9 mRNA Expression beobachtet werden (Abb. 27B). Suszeptible A.BY/SnJ Mäuse wiesen 4 Tage p.i. CVB3 in der Milz eine geringfügig höhere Expression an S100A9 mRNA auf als naive Mäuse (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: $9,11 \pm 2,02$ vs. $13,52 \pm 2,42$; $p = 0,21$). Acht Tage p.i. CVB3 war bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen eine im Vergleich zu naiven Tieren signifikant verstärkte Expression von S100A9 mRNA in der Milz zu verzeichnen (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 8 dpi: $9,11 \pm 2,02$ vs. $18,86 \pm 1,72$ $p < 0,05$). Bei resistenten C57BL/6J Mäusen konnte 4 Tage p.i. eine signifikant verstärkte Expression von S100A9 mRNA in der Milz gemessen werden (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi: $0,81 \pm 0,36$ vs. $4,75 \pm 1,39$; $p < 0,05$). Wie bereits bei S100A8 konnte bei C57BL/6J Mäusen 8 Tage p.i. im Vergleich zu naiven Tieren dieses Mausstammes keine signifikant erhöhten Expressionswerte von S100A9 mRNA in der Milz gemessen werden (C57BL/6J 0 dpi vs. 8 dpi: $0,81 \pm 0,36$ vs. $1,64 \pm 0,64$; $p = 0,30$).

4.3.3. Nachweis der MDSC-Regulatoren S100A8 und S100A9 im Herzen

Parallel zu den Untersuchungen in der Milz wurde auch im Myokard der Gehalt an S100A8 mRNA und S100A9 mRNA während einer akuten CVB3 Myokarditis mittels quantitativer real-time RT-PCR-Analyse bestimmt (Abb. 28).

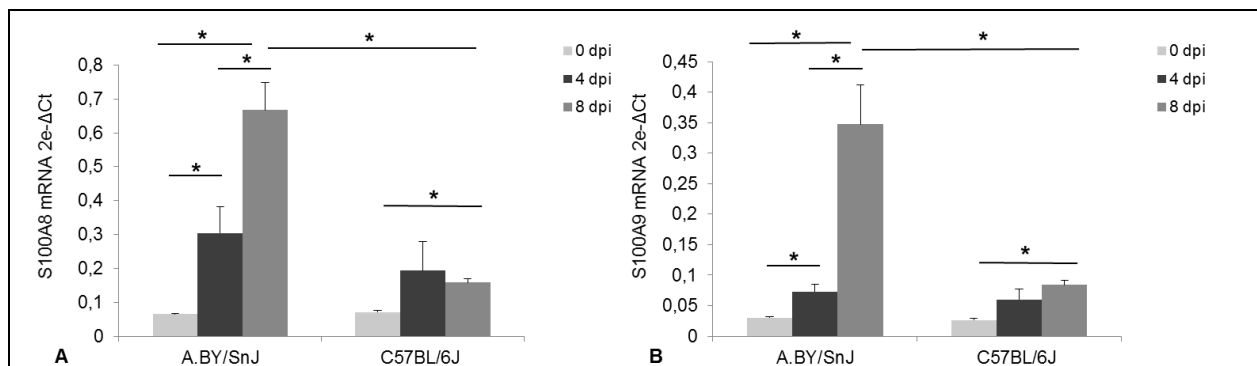


Abb. 28: Quantitative real-time RT-PCR Analyse der Menge S100A8 und S100A9 mRNA im Myokard

Die Veränderungen der Menge an (A) S100A8 mRNA sowie (B) S100A9 mRNA in Herzen von A.BY/SnJ und C57BL/6J Mäusen während der CVB3 Infektion wurde 4 Tage p.i. und 8 Tage p.i. mittels quantitativer real-time RT-PCR erfasst und im Balkendiagramm dargestellt. n=4; * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied (p < 0,05).

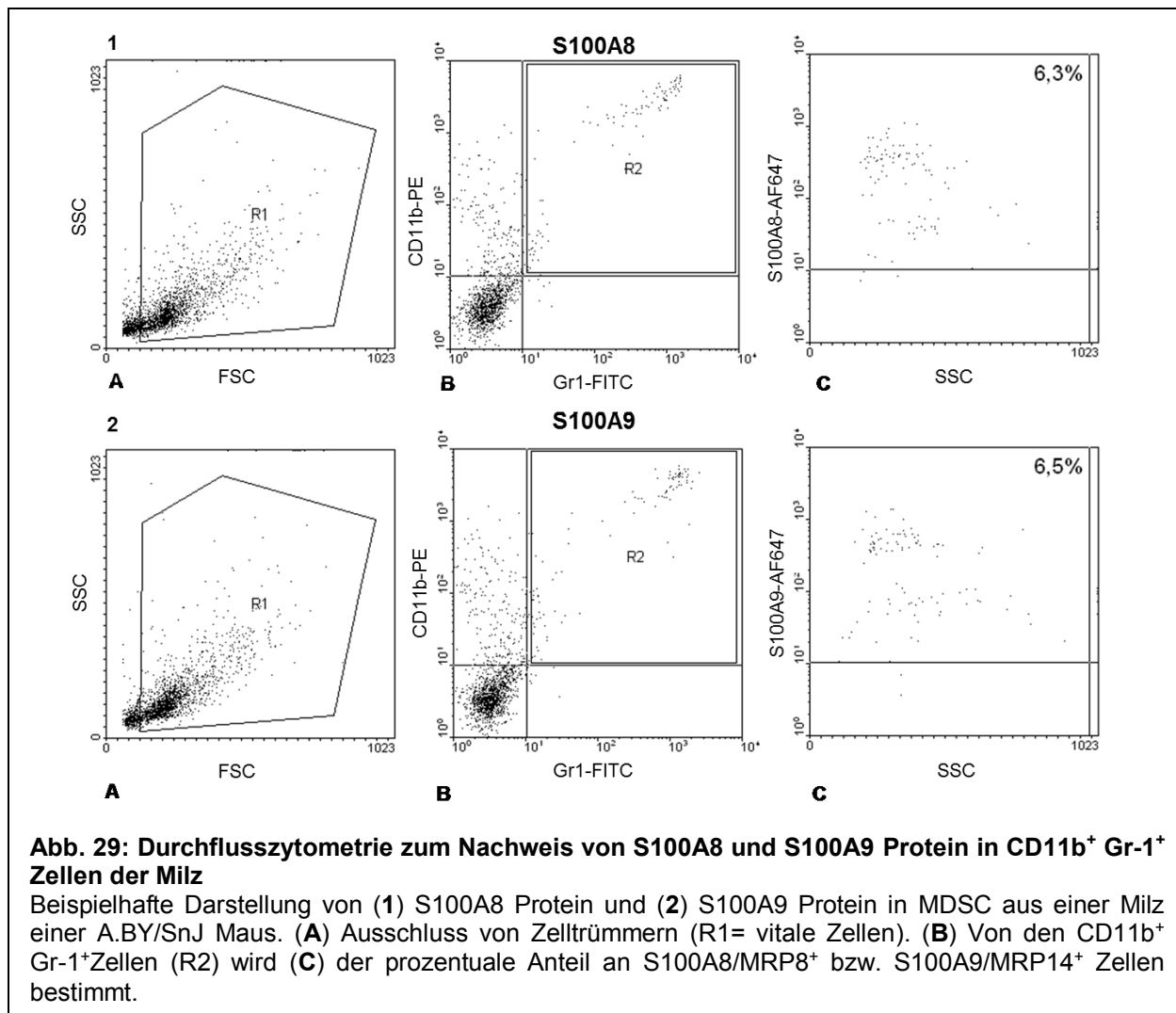
In Herzen suszeptibler A.BY/SnJ Mäusen wurde sowohl 4 Tage p.i. CVB3 (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: $0,07 \pm 0,002$ vs. $0,30 \pm 0,08$; p < 0,05) als auch 8 Tage p.i. (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 8 dpi: $0,07 \pm 0,0002$ vs. $0,67 \pm 0,08$; p < 0,05) verglichen mit naiven Tieren eine signifikant verstärkte Expression von S100A8 mRNA gemessen. Auch der Vergleich von A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. mit Tieren 8 Tage p.i. zeigte eine signifikant verstärkte Expression von S100A8 mRNA (A.BY/SnJ 4 dpi vs. 8 dpi: $0,30 \pm 0,08$ vs. $0,67 \pm 0,08$; p < 0,05) (Abb. 28A). Resistente C57BL/6J Mäuse wiesen lediglich 8 Tage p.i. (C57BL/6J 0 dpi vs. 8 dpi: $0,07 \pm 0,006$ vs. $0,16 \pm 0,01$; p < 0,05) eine signifikant verstärkte Expression von S100A8 mRNA im Myokard auf, 4 Tage p.i. war die Veränderung nicht signifikant (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi: $0,07 \pm 0,006$ vs. $0,19 \pm 0,09$; p = 0,19) (Abb. 28A). Beim Vergleich der beiden Mausstämme konnte bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen gegenüber resistenten C57BL/6J Mäusen 8 Tage p.i. eine ca. 4-fach erhöhte Expression von S100A8 mRNA im Myokard gemessen werden (A.BY/SnJ 8 dpi vs. C57BL/6J 8 dpi: $0,67 \pm 0,08$ vs. $0,16 \pm 0,01$; p < 0,05).

Bei der Untersuchung von S100A9 mRNA im Myokard (Abb. 26B) konnte bei A.BY/SnJ Mäusen ebenfalls sowohl 4 Tage p.i. (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: $0,03 \pm 0,002$ vs. $0,07 \pm 0,01$; p < 0,05) als auch 8 Tage p.i. (A.BY/SnJ 4 dpi vs. 8 dpi: $0,03 \pm 0,002$ vs. $0,35 \pm 0,06$; p < 0,05) eine signifikant verstärkte Expression im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren gemessen werden. Acht Tage p.i. war die Expression von S100A9 mRNA bei A.BY/SnJ Mäusen verglichen mit Tieren 4 Tage p.i. ebenfalls signifikant verstärkt (A.BY/SnJ 4 dpi vs. 8 dpi: $0,07 \pm 0,01$ vs. $0,35 \pm 0,06$; p < 0,05). Bei C57BL/6J Mäusen war 4 Tage p.i. CVB3 zunächst eine geringe (C57BL/6J 0 dpi

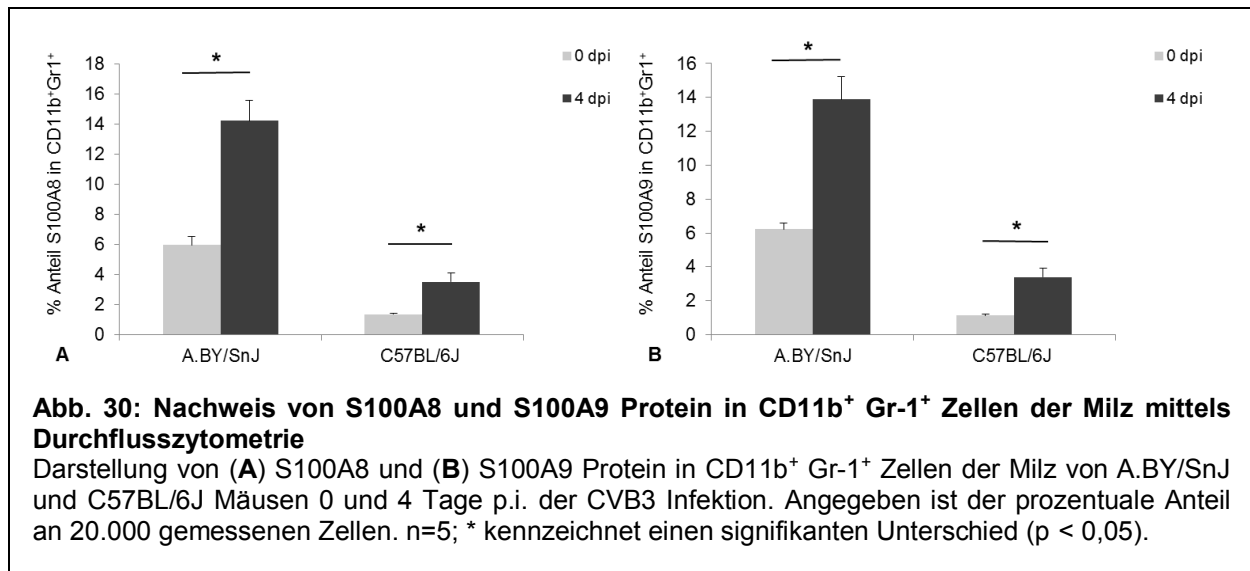
vs. 4 dpi: $0,03 \pm 0,003$ vs. $0,06 \pm 0,02$; $p = 0,09$), 8 Tage p.i. allerdings eine signifikante Zunahme der Expression (C57BL/6J 0 dpi vs. 8 dpi: $0,03 \pm 0,003$ vs. $0,08 \pm 0,007$; $p < 0,05$) von S100A9 mRNA nachweisbar (Abb. 28B). Bei dem Vergleich der beiden Mausstämme konnte bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen gegenüber resistenten C57BL/6J Mäusen 8 Tage p.i. auch eine ca. 4-fach erhöhte Expression von S100A9 mRNA im Myokard gemessen werden (A.BY/SnJ 8 dpi vs. C57BL/6J 8 dpi: $0,35 \pm 0,06$ vs. $0,08 \pm 0,007$; $p < 0,05$).

4.3.4. Untersuchung von MDSC auf die Expression von S100A8/9

Die Proteine S100A8 und S100A9 werden unter anderem auch von MDSC direkt produziert (Sinha, Okoro et al., 2008). Mittels FACS Analysen wurde die Proteinexpression von S100A8 und S100A9 in CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC aus der Milz in der frühen Phase der CVB3 Infektion untersucht. In Abbildung 29 ist dies beispielhaft an Zellen aus der Milz einer A.BY/SnJ Maus dargestellt. Für die Analyse wurden die vitalen Zellen definiert (Abb. 29-1A und 2A), um dann hieraus CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen zu selektieren (Abb. 29-1B und 2B). Aus dieser definierten Zellmenge wurde die Anzahl an S100A8⁺ Zellen, in diesem Beispiel 6,3%, (Abb. 29-1C) bzw. S100A9⁺ Zellen, hier 6,5%, (Abb. 29-2C) bestimmt.



Wie in Abbildung 30 gezeigt, ist die Proteinexpression von S100A8 und S100A9 in MDSC aus Milzen 0 und 4 Tage p.i. der CVB3 Infektion innerhalb des jeweiligen Mausstammes vergleichbar.



Bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen wurde 4 Tage p.i. CVB3 eine signifikant verstärkte Expression von S100A8 Protein (Abb. 30A) in CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC aus der Milz gemessen (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: 5,96 ± 0,55 vs. 14,20 ± 1,34; p < 0,05). Bei resistenten C57BL/6J Mäusen wurde 4 Tage p.i. CVB3 Infektion ebenfalls eine signifikante Zunahme der S100A8 Proteinexpression in MDSC aus der Milz gemessen (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi: 1,36 ± 0,05 vs. 3,50 ± 0,58; p < 0,05).

Vergleichbar der Befunde bei S100A8 war bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. der CVB3 Infektion auch eine signifikant verstärkte Expression des Proteins S100A9 (Abb. 30B) in CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC aus der Milz zu messen (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi: 6,22 ± 0,39 vs. 13,88 ± 1,34; p < 0,05). Resistente C57BL/6J Mäuse wiesen 4 Tage p.i. (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi: 1,14 ± 0,10 vs. 3,40 ± 0,53; p < 0,05) ebenfalls eine signifikant vermehrte Proteinexpression von S100A9 in MDSC aus der Milz auf.

Insgesamt exprimieren MDSC aus der Milz infizierter A.BY/SnJ Mäuse in der frühen Phase der Infektion ca. 4 Mal mehr S100A8/9 als C57BL/6J Mäuse.

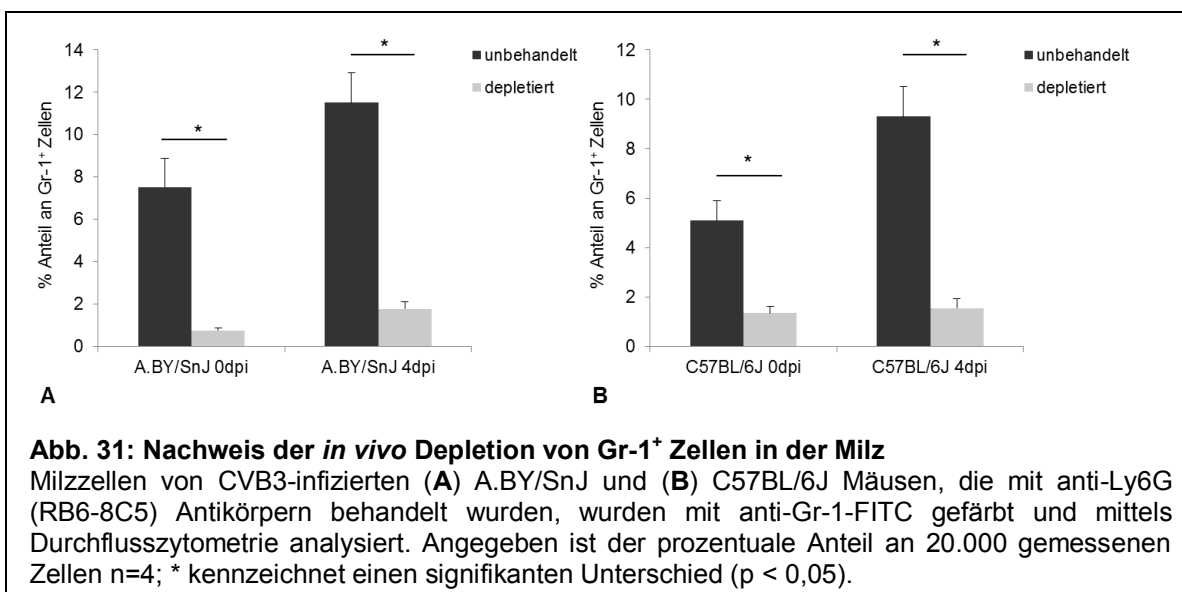
4.4. *In vivo* Depletion der MDSC

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist die Fragestellung, inwieweit MDSC den Verlauf der CVB3 Myokarditis beeinflussen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden MDSC *in vivo* in permissiven und resistenten CVB3-infizierten Mäusen depletiert, um festzustellen, welchen direkten und indirekten Einfluss die Abwesenheit dieser Zellen auf den Fortgang der Erkrankung hat. Hierzu wurde unter anderem die Replikation des Virus in der Maus und Veränderungen des Immunsystems untersucht. Dabei wurden Auswirkungen auf die Reaktionsfähigkeit von NK Zellen (TNF α , MIP-1 α und IFN γ Produktion dieser Zellen) analysiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine Depletion von MDSC Einfluss auf die Expression von IL-1 β , IL-6, TNF α und S100A8/9 im Myokard einer CVB3-infizierten Maus hat.

4.4.1. Nachweis der Depletion von Gr-1⁺ Zellen

Die Kontrolle der Depletion wurde mittels Durchflusszytometer durchgeführt. In Abbildung 31 wird gezeigt, dass bei A.BY/SnJ Mäusen (Abb. 31A) sowohl bei naiven Tieren (A.BY/SnJ 0 dpi undepletiert vs. 0 dpi depletiert: $7,5 \pm 1,37$ vs. $0,8 \times 0,13 \pm$; $p < 0,05$) als auch bei infizierten Tieren 4 Tage p.i. CVB3 (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $11,5 \pm 1,40$ vs. $1,8 \pm 0,33$; $p < 0,05$) nach MDSC Depletion nur noch eine geringe Anzahl an Gr-1⁺ Zellen in der Milz nachweisbar war.

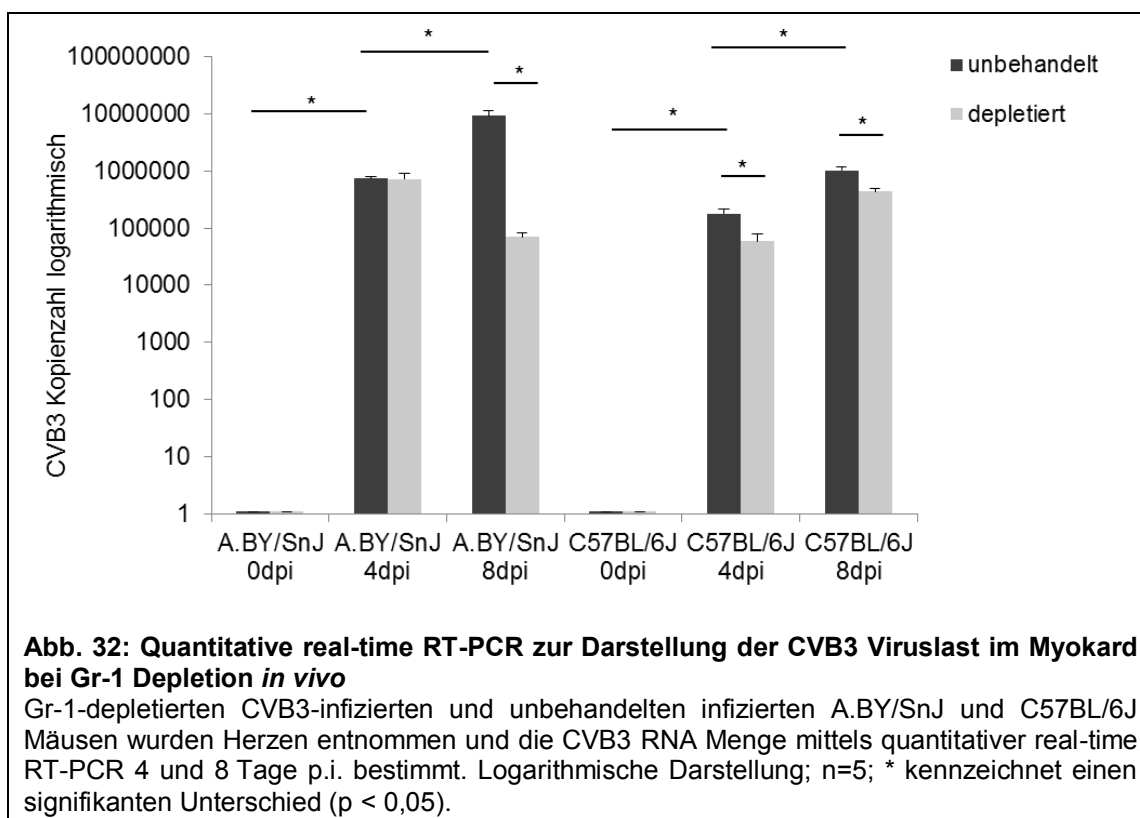


Ebenso konnte bei C57BL/6J Mäusen (Abb. 31B) bei naiven Tieren (C57BL/6J 0 dpi undepletiert vs. 0 dpi depletiert: $5,1 \pm 0,81$ vs. $1,4 \times 0,26 \pm$; $p < 0,05$) und auch bei infizierten Tieren 4 Tage

p.i. CVB3 (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $9,3 \pm 1,21$ vs. $1,6 \pm 0,38$; $p < 0,05$) nach MDSC Depletion nur noch eine geringe Anzahl an Gr-1⁺ Zellen in der Milz nachgewiesen werden.

4.4.2. Veränderung der CVB3 Viruslast nach Depletion der MDSC

Die Virusreplikation von CVB3 spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese einer akuten Myokarditis (Klingel und Kandolf, 1996). Der Einfluss von MDSC auf die Entwicklung der CVB3 Myokarditis wurde durch Messungen der Veränderungen der Viruslast im Myokard nach Gr-1 Depletion mittels quantitativer real-time RT-PCR erfasst (Abb. 32).

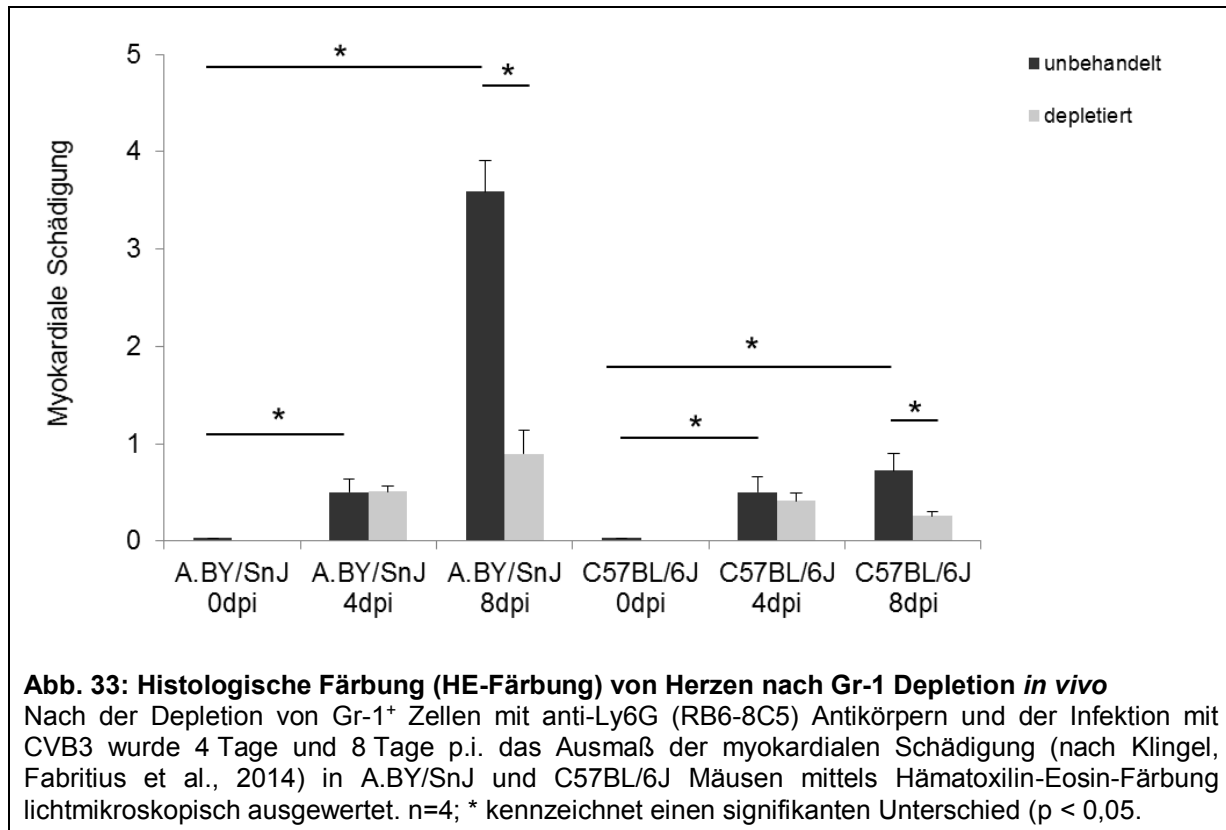


Bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen (Abb. 32) konnte 4 Tage p.i. $7,4 \times 10^5 \pm 4,6 \times 10^4$ CVB3 RNA Kopien im Myokard nachgewiesen werden. Durch die Gr-1 Depletion konnte 4 Tage p.i. bei A.BY/SnJ Mäusen keine Veränderung des CVB3 RNA Gehalts festgestellt werden (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $7,4 \times 10^5 \pm 4,6 \times 10^4$ vs. $7,3 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$; $p = 0,09$). Im Vergleich zu 4 Tage p.i. war 8 Tage p.i. der Gehalt an CVB3 RNA bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen signifikant vermehrt (A.BY/SnJ 4 dpi vs. 8 dpi undepletiert: $7,4 \times 10^5 \pm 4,6 \times 10^4$ vs. $9,2 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^6$; $p < 0,05$). Acht Tage p.i. führte die MDSC Depletion zu einer signifikanten Verminderung des CVB3 RNA Gehalts verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren

(A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $9,2 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^6$ vs. $0,7 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^4$; $p < 0,05$). In resistenten C57BL/6J Mäusen konnten 4 Tage p.i. $1,8 \times 10^5 \pm 3,6 \times 10^4$ CVB3 RNA Kopien im Myokard detektiert werden. Bei C57BL/6J Mäusen führte die Gr-1 Depletion bereits 4 Tage p.i. zu einer signifikanten Verminderung des Gehalts an CVB3 RNA im Herzen verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $1,8 \times 10^5 \pm 3,6 \times 10^4$ vs. $0,6 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^4$; $p < 0,05$). Acht Tage p.i. konnte bei resistenten C57BL/6J Mäusen ebenso eine signifikante Zunahme von CVB3 RNA im Vergleich zu 4 Tage p.i. nachgewiesen werden (C57BL/6J 4 dpi vs. 8 dpi undepletiert: $1,8 \times 10^5 \pm 3,6 \times 10^4$ vs. $1,0 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^5$; $p < 0,05$). Die Depletion der MDSC verglichen mit unbehandelten infizierten Mäusen führte 8 Tage p.i. ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung des CVB3 RNA Gehalts im Myokard (C57BL/6J 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $1,0 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^5$ vs. $4,4 \times 10^5 \pm 4,7 \times 10^4$; $p < 0,05$). (Abb.32).

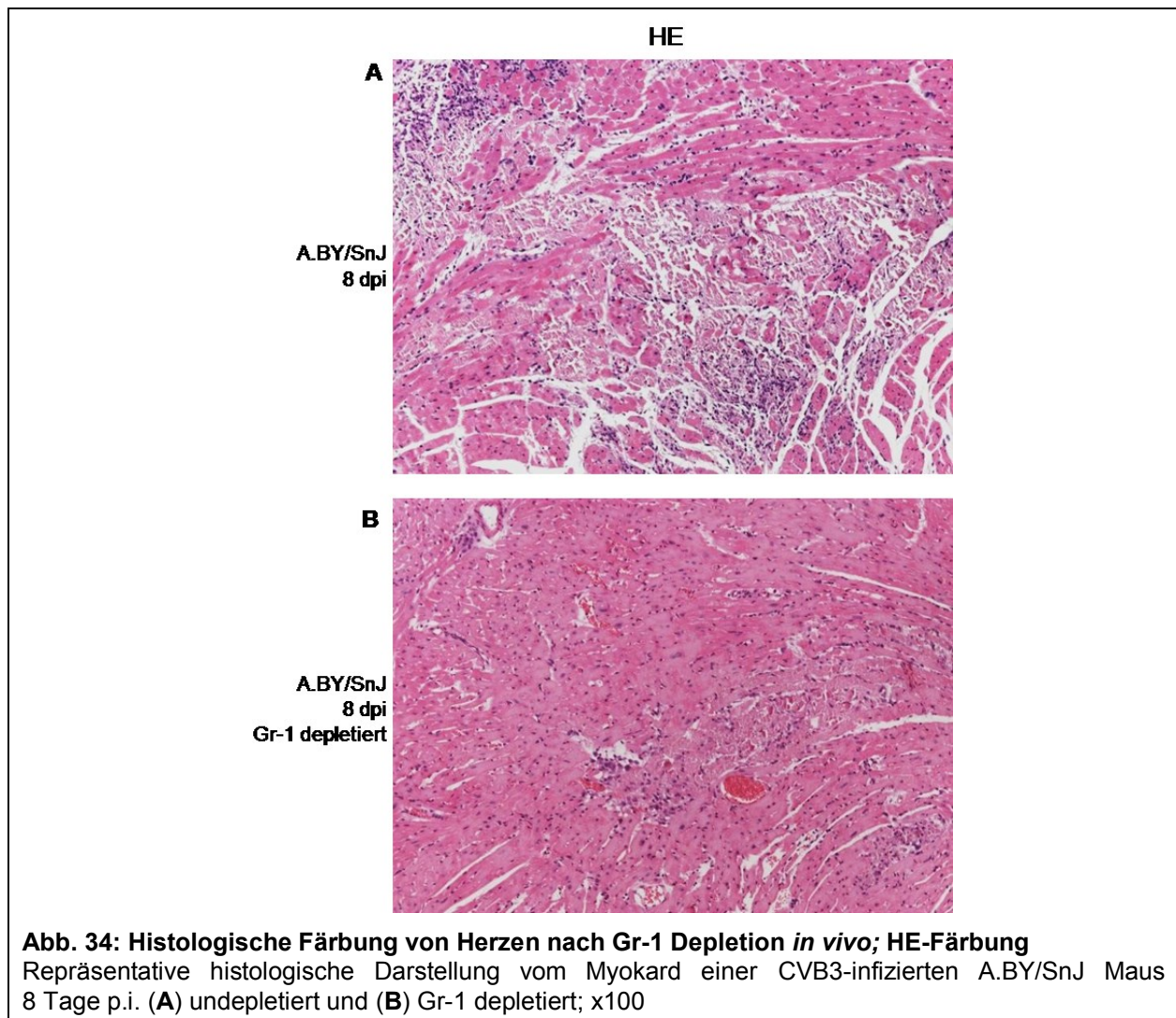
4.4.3. Histologische Untersuchung des Myokards nach MDSC Depletion

Die Charakterisierung der akuten Myokarditis erfolgte durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Hiermit können Myozytenschäden und Myokardnekrosen sowie inflammatorische Infiltrate nachgewiesen werden. Durch Quantifizierung inflammatorischer Herde depletierter und undepletierter Tiere 4 und 8 Tage p.i. innerhalb des jeweiligen Mausstamms wurde der Einfluss von MDSC auf die Entwicklung der akuten CVB3 Myokarditis analysiert.



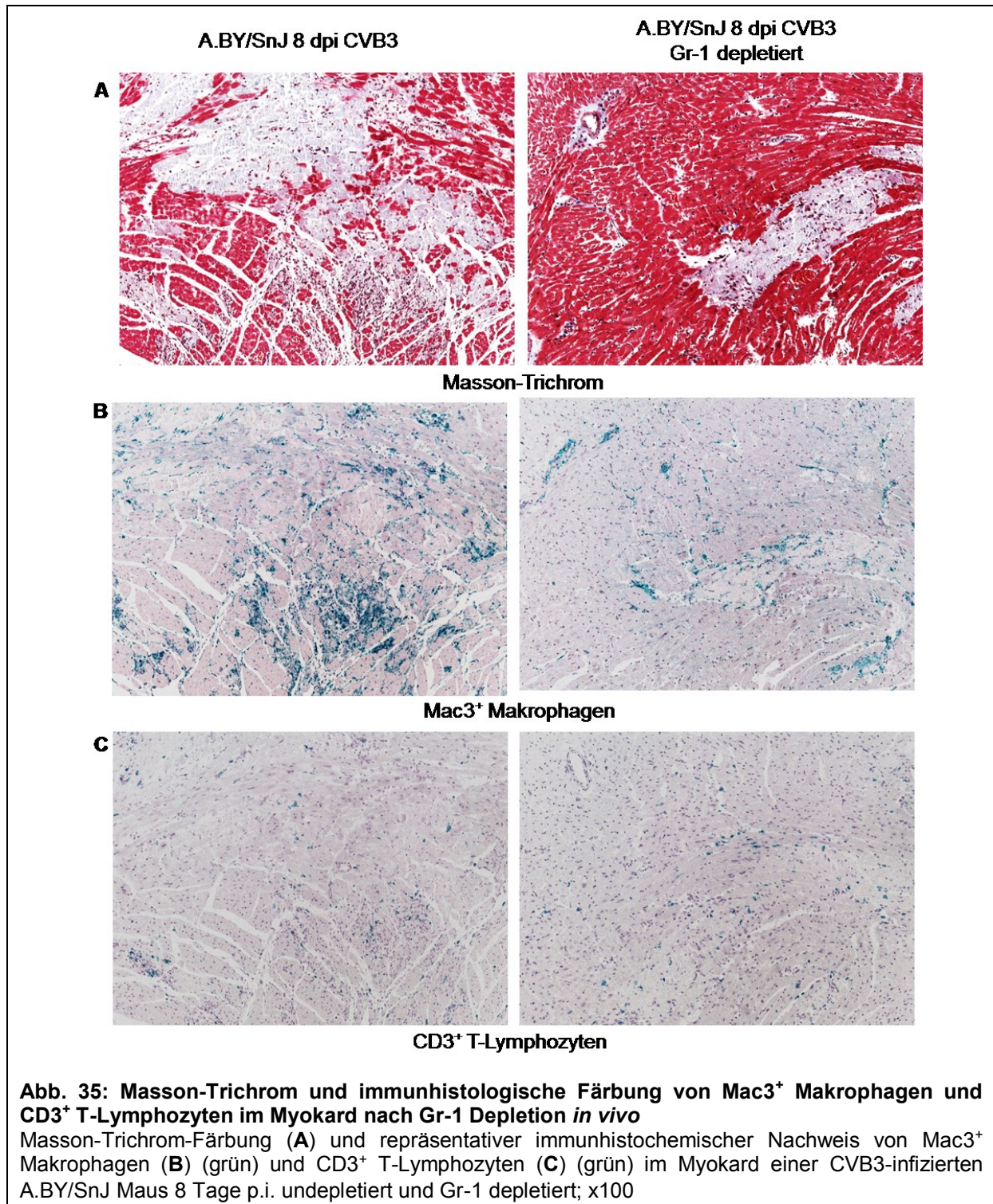
An Tag 4 p.i. (Abb. 33) war in suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen im Vergleich zu naiven Mäusen desselben Mausstammes bereits eine deutliche myokardiale Schädigung nachweisbar (A.BY/SnJ Mäuse 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: 0 ± 0 vs. $0,5 \pm 0,13$; $p < 0,05$), in resistenten C57BL/6J Mäusen konnte zu diesem Zeitpunkt nur eine geringgradige Schädigung des Myokards festgestellt werden (C57BL/6J Mäuse 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: 0 ± 0 vs. $0,5 \pm 0,15$; $p = 0,07$). Ein signifikanter Unterschied von depletierten zu nicht-depletierten Mäusen fand sich 4 Tage p.i. CVB3 in keinem der beiden Mausstämme (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,50 \pm 0,13$ vs. $0,51 \pm 0,06$; $p = 0,97$; C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,50 \pm 0,15$ vs. $0,41 \pm 0,08$; $p = 0,61$).

Das Ausmaß der myokardialen Schädigung an Tag 8 p.i. war bei depletierten und nicht-depletierten A.BY/SnJ Mäusen jedoch signifikant unterschiedlich (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $3,59 \pm 0,32$ vs. $0,89 \pm 0,24$; $p < 0,05$). Gr-1 depletierte CVB3-infizierte A.BY/SnJ Mäuse zeigten eine 4-fach geringere Schädigung des Myokards als CVB3-infizierte Tiere, wie exemplarisch in Abbildung 34 dargestellt. Auch in resistenten C57BL/6J Mäusen war 8 Tage p.i. eine signifikante Reduktion der kardialen Schädigung zu verzeichnen, wenn Gr-1⁺ Zellen depletiert waren (C57BL/6J 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,72 \pm 0,17$ vs. $0,25 \pm 0,05$; $p < 0,05$) (Abb. 33). Die Depletion von MDSC in der frühen Phase der CVB3 Infektion hatte bei permissiven A.BY/SnJ Mäusen einen sehr viel stärkeren Effekt als in resistenten C57BL/6J Mäusen.



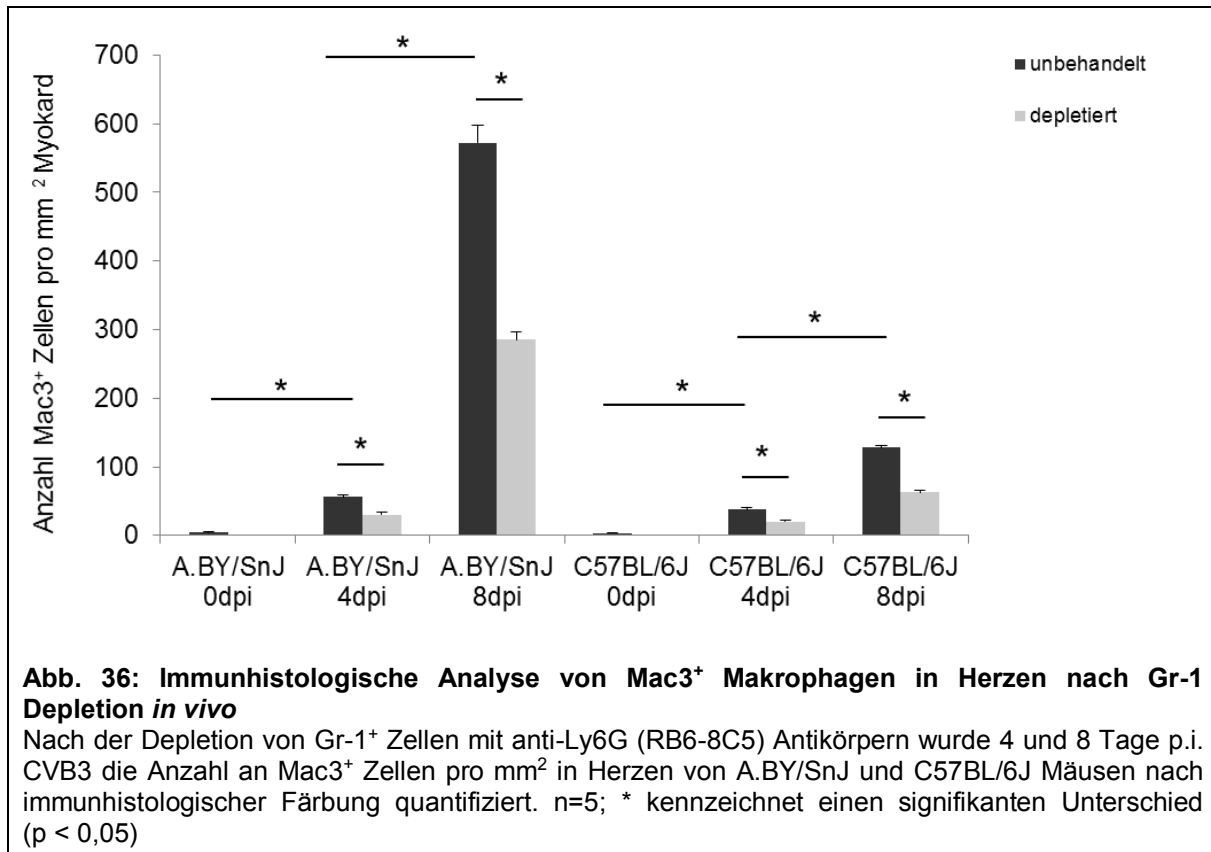
4.4.4. Immunhistochemische Darstellung von Mac3⁺ Makrophagen und CD3⁺ T-Lymphozyten im Herzen nach MDSC Depletion

Durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF α und IFN γ (Seko, Takahashi et al., 1997) wandern Makrophagen und T-Lymphozyten bei der CVB3 Infektion in das Myokard ein (Yajima, 2011). Diese Immunzellen haben protektive Aufgaben, wie die Eindämmung der Virusreplikation (Kawai, 1999), können bei übermäßiger Aktivierung aber auch schädigenden Einfluss auf das Myokard haben (Szalay, Sauter et al., 2006). Wie auch in früheren Arbeiten gezeigt, ist die vermehrte Virusreplikation in suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen assoziiert mit einer massiven Infiltration des Myokards durch Makrophagen (Abb. 35B) und T-Lymphozyten (Abb. 35C). Der Einfluss der Depletion von MDSC auf die Inflammation wurde durch die Quantifizierung der Anzahl von Mac3⁺ Makrophagen und CD3⁺ T-Lymphozyten in CVB3-infizierten und teilweise MDSC-depletierten A.BY/SnJ und C57BL/6J Mäusen in der akuten Phase der Myokarditis quantifiziert (Abb. 36 und 37).



In Abbildung 35A zeigen sich in der Masson-Trichrom-Färbung deutlich die in bläulicher Farbe dargestellten Nekroseherde bei einer akuten Myokarditis im Myokard einer suszeptiblen A.BY/SnJ Maus 8 Tage p.i. CVB3. Gleichzeitig ist die Reduktion dieser Nekroseherde durch die

Depletion von MDSC dargestellt. Beispielhaft wird in den gleichen Bereichen, in denen sich die Nekroseherde befinden, mittels immunhistologischer Färbungen von Mac3⁺ Makrophagen gezeigt, dass eine Gr-1 depletierte A.BY/SnJ Maus 8 Tage p.i. CVB3 deutlich weniger Makrophagen (grün) im Myokard aufweist als das unbehandelte infizierte Tier des gleichen Stammes (Abb. 35B). Ebenso ist die Anzahl von CD3⁺ T-Lymphozyten durch die MDSC Depletion vermindert (Abb. 35C).



Erwartungsgemäß zeigten CVB3-infizierte A.BY/SnJ Mäuse 4 Tage p.i. mehr Makrophagen im Myokard als nicht-infizierte Tiere (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi unbehandelt: $4,4 \pm 0,68$ vs. $56,2 \pm 3,56$; $p < 0,05$) (Abb. 36). Vergleicht man Gr-1 depletierte A.BY/SnJ Mäuse mit unbehandelten infizierten Tieren 4 Tage p.i. CVB3, so zeigt sich eine signifikante Reduktion der Makrophagen nach der Depletion (A.BY/SnJ 4 dpi unbehandelt vs. 4 dpi depletiert: $56,2 \pm 3,56$ vs. $30,2 \pm 3,97$; $p < 0,05$). Im Verlauf der Infektion war eine starke Zunahme der Makrophagen in infizierten Tieren zu verzeichnen (A.BY/SnJ 4 dpi unbehandelt vs. 8 dpi unbehandelt: $56,2 \pm 3,56$ vs. $572,6 \pm 25,58$; $p < 0,05$). Acht Tage p.i. wiesen MDSC-depletierte A.BY/SnJ Mäuse signifikant weniger

Makrophagen im Myokard auf als nicht-depletierte infizierte Tiere (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $572,6 \pm 25,58$ vs. $285,2 \pm 10,75$; $p < 0,05$).

Bei resistenten C57BL/6J Mäusen (Abb. 36) konnten 4 Tage p.i. ebenfalls signifikant mehr Makrophagen im Myokard im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren festgestellt werden (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $3,6 \pm 0,68$ vs. $37,8 \pm 2,27$; $p < 0,05$) (Abb. 36). Gr-1 depletierte infizierte C57BL/6J Mäuse zeigten verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren 4 Tage p.i. CVB3 eine signifikante Reduktion der Makrophagen nach der Depletion (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $37,8 \pm 2,27$ vs. $20,6 \pm 1,29$; $p < 0,05$). Acht Tage p.i. CVB3 waren auch bei C57BL/6J Mäusen verglichen mit Mäusen 4 Tagen p.i. signifikant mehr Makrophagen im Myokard nachweisbar (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $37,8 \pm 2,27$ vs. $128,0 \pm 3,51$; $p < 0,05$). Ebenso wiesen MDSC-depletierte C57BL/6J Mäuse 8 Tage p.i. signifikant weniger Makrophagen im Myokard auf als nicht-depletierte infizierte Tiere (C57BL/6J 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $128,0 \pm 3,51$ vs. $63,4 \pm 2,62$; $p < 0,05$).

Auch bei T-Lymphozyten zeigten CVB3-infizierte A.BY/SnJ Mäuse 4 Tage p.i. eine Zunahme der Zellzahl im Myokard im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $1,8 \pm 0,37$ vs. $10,6 \pm 1,21$; $p < 0,05$) (Abb. 37). Vergleicht man Gr-1 depletierte A.BY/SnJ Mäuse mit unbehandelten infizierten Tieren 4 Tage p.i. CVB3, so zeigt sich eine signifikante Reduktion der T-Lymphozyten nach der Depletion (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $10,6 \pm 1,21$ vs. $4,8 \pm 0,58$; $p < 0,05$). Entsprechend des Anstiegs von Makrophagen fanden sich 8 Tage p.i. im Vergleich zu 4 Tage p.i. auch signifikant mehr T-Lymphozyten im Myokard (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $10,6 \pm 1,21$ vs. $176,6 \pm 8,07$; $p < 0,05$). Acht Tage p.i. wiesen MDSC-depletierte A.BY/SnJ Mäuse signifikant weniger T-Lymphozyten im Myokard auf als nicht-depletierte infizierte Tiere (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $176,6 \pm 8,07$ vs. $89,2 \pm 4,37$; $p < 0,05$). Desgleichen fand sich bei resistenten C57BL/6J Mäusen (Abb. 37) 4 Tage p.i. CVB3 eine Infiltration von T-Lymphozyten im Myokard verglichen mit nicht-infizierten Tieren (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $1,2 \pm 0,37$ vs. $14,4 \pm 2,16$; $p < 0,05$). Gr-1 depletierte C57BL/6J Mäuse zeigten im Vergleich mit unbehandelten infizierten Tieren 4 Tage p.i. CVB3 eine signifikante Reduktion der T-Lymphozyten nach der Depletion (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $14,4 \pm 2,16$ vs. $5,6 \pm 0,51$; $p < 0,05$). Verglichen mit 4 Tagen p.i. war auch bei C57BL/6J Mäusen 8 Tage p.i. CVB3 eine signifikante aber mäßiggradige Zunahme der Anzahl von T-Lymphozyten im Myokard nachweisbar (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $14,4 \pm 2,16$ vs. $26,2 \pm 1,98$; $p < 0,05$). MDSC-depletierte C57BL/6J Mäuse wiesen 8 Tage p.i. signifikant weniger

T-Lymphozyten im Myokard auf als nicht-depletierte infizierte Tiere (C57BL/6J 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $26,2 \pm 1,98$ vs. $11,8 \pm 1,16$; $p < 0,05$).

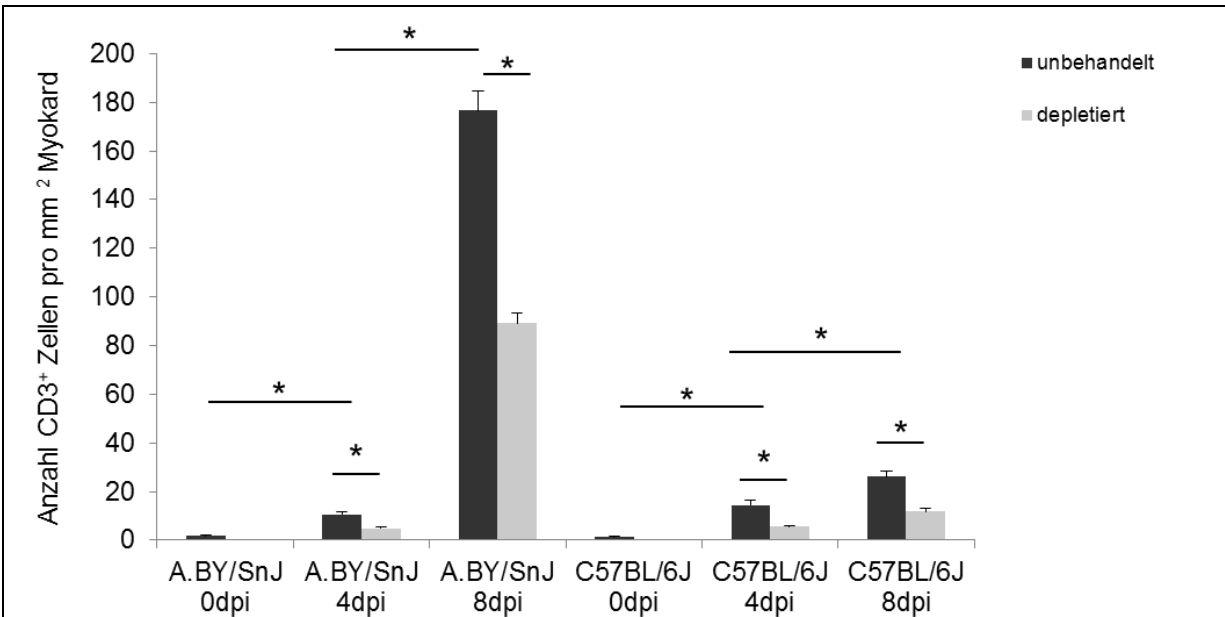


Abb. 37: Immunhistologische Analyse von CD3⁺ T-Lymphozyten in Herzen nach Gr-1 Depletion *in vivo*

Nach der Depletion von Gr-1⁺ Zellen mit anti-Ly6G (RB6-8C5) Antikörpern wurde 4 und 8 Tage p.i. CVB3 die Anzahl an CD3⁺ Zellen pro mm² in Herzen von A.BY/SnJ und C57BL/6J Mäusen nach immunhistologischer Färbung quantifiziert. n=4; * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$)

4.4.5. Untersuchung von S100A8/9 im Herzen nach MDSC Depletion

Bei viralen Infektionen wurde im Zusammenhang mit MDSC eine erhöhte Proteinexpression von S100A8 und S100A9 im Serum beschrieben (Nelson, Chauhan et al., 2012). Da die proinflammatorischen Proteine S100A8 und S100A9 unter anderem von MDSC produziert werden und chemotaktisch auf diese Zellen wirken wurde analysiert, inwiefern sich die Depletion der MDSC auf die Expression von S100A8/9 auswirkt. Dafür wurde in Herzen 4 und 8 Tage p.i. CVB3 und nach Gr-1 Depletion die Menge an S100A8/9 mRNA mittels quantitativer real-time RT-PCR sowie die Anzahl S100A8⁺ Zellen anhand von immunhistochemischen Färbungen bestimmt.

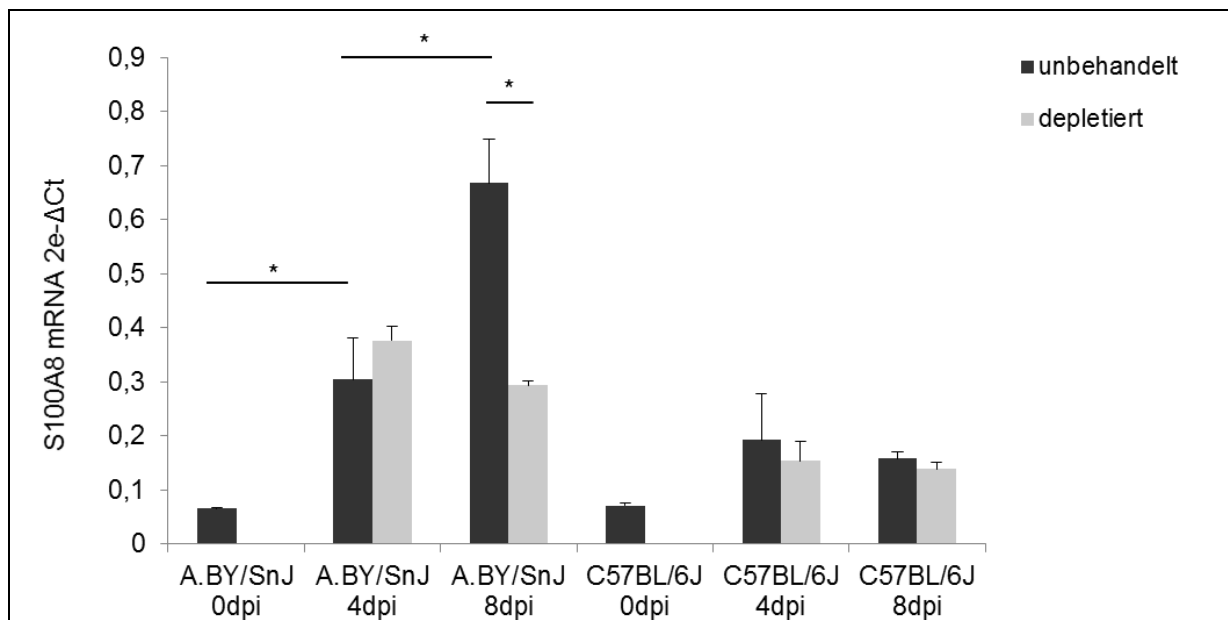


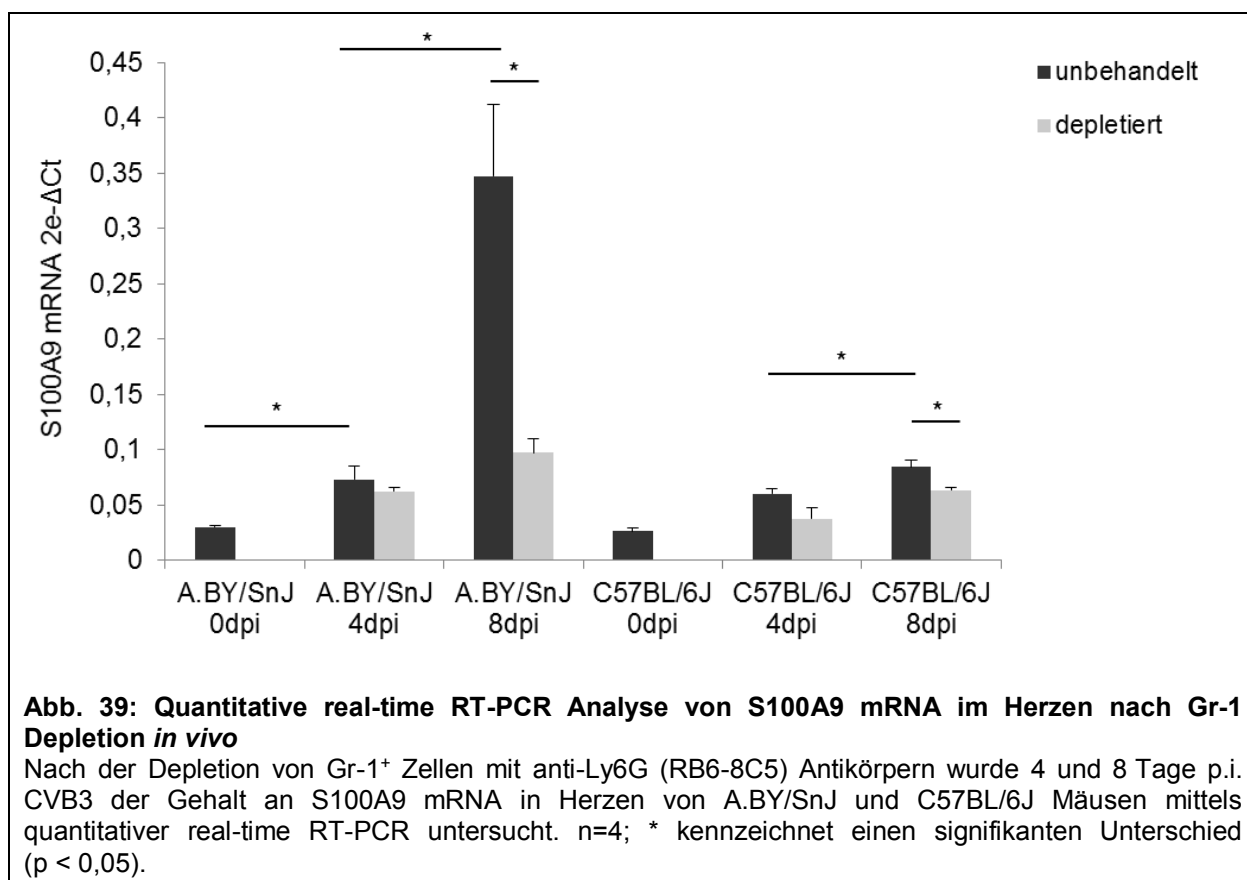
Abb. 38: Quantitative real-time RT-PCR Analyse von S100A8 mRNA im Herzen nach Gr-1 Depletion *in vivo*

Nach der Depletion von Gr-1⁺ Zellen mit anti-Ly6G (RB6-8C5) Antikörpern wurde 4 und 8 Tage p.i. CVB3 der Gehalt an S100A8 mRNA in Herzen von A.BY/SnJ und C57BL/6J Mäusen mittels quantitativer real-time RT-PCR untersucht. n=4; * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied (p < 0,05).

Die Untersuchungen zeigten, dass bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. CVB3 verglichen mit nicht-infizierten Tieren eine signifikante Zunahme der mRNA Expression von S100A8 (Abb.38) zu verzeichnen ist (A.BY/SnJ 0 dpi. vs. 4 dpi undepletiert: $0,07 \pm 0,002$ vs. $0,30 \pm 0,08$; p < 0,05). Durch die Depletion von MDSC ließ sich 4 Tage p.i. CVB3 kein signifikanter Unterschied der Menge an S100A8 mRNA im Vergleich zu nicht-behandelten infizierten Tieren feststellen (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,30 \pm 0,08$ vs. $0,38 \pm 0,03$; p = 0,41). Acht Tage p.i. CVB3 zeigten A.BY/SnJ im Vergleich zu 4 Tage p.i. eine signifikante Zunahme der S100A8 mRNA Expression (A.BY/SnJ 4 dpi. undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $0,30 \pm 0,08$ vs. $0,67 \pm 0,08$; p < 0,05). Bei Gr-1 depletierten Tieren war die Expression von S100A8 mRNA im Vergleich zu unbehandelten A.BY/SnJ Mäusen 8 Tage p.i. signifikant reduziert (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,67 \pm 0,08$ vs. $0,29 \pm 0,01$; p < 0,05).

Bei resistenten C57BL/6J Mäusen war die Zunahme der Expression von S100A8 mRNA 4 Tage p.i. CVB3 nicht signifikant im Vergleich zu naiven Tieren (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,07 \pm 0,01$ vs. $0,19 \pm 0,09$; p = 0,19). Auch 4 Tage p.i. konnte keine signifikante Veränderung

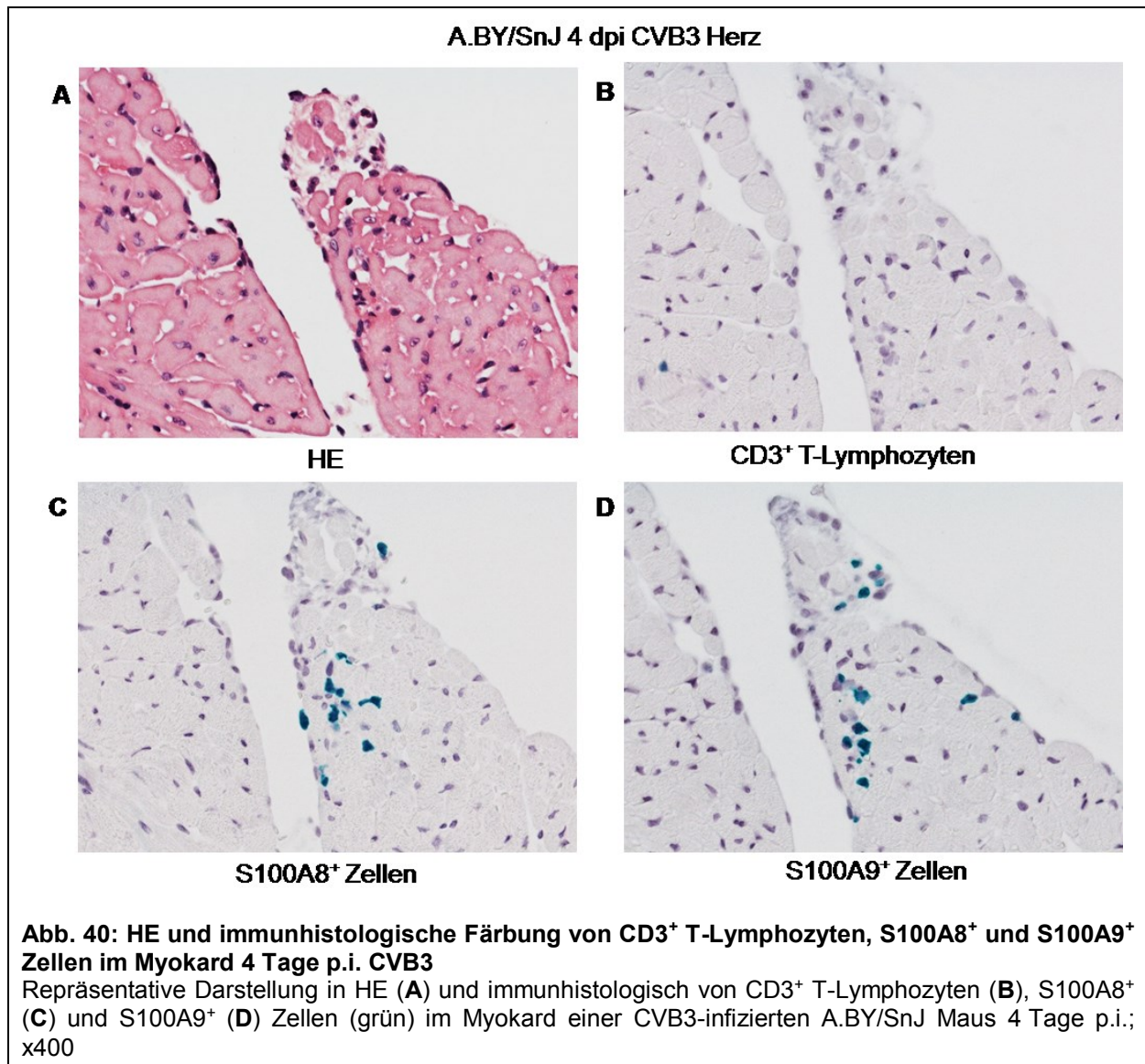
der S100A8 mRNA Expression durch die Gr-1 Depletion nachgewiesen werden (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,19 \pm 0,09$ vs. $0,15 \pm 0,04$; $p = 0,69$). Die Expression von S100A8 mRNA war 8 Tage p.i. kaum verändert verglichen mit 4 Tage p.i. (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $0,19 \pm 0,09$ vs. $0,16 \pm 0,01$; $p = 0,70$). Acht Tage p.i. fand sich keine signifikante Veränderung der S100A8 mRNA Expression im Vergleich zu unbehandelten infizierten Tieren (C57BL/6J 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,16 \pm 0,01$ vs. $0,14 \pm 0,01$; $p = 0,28$) (Abb. 38).



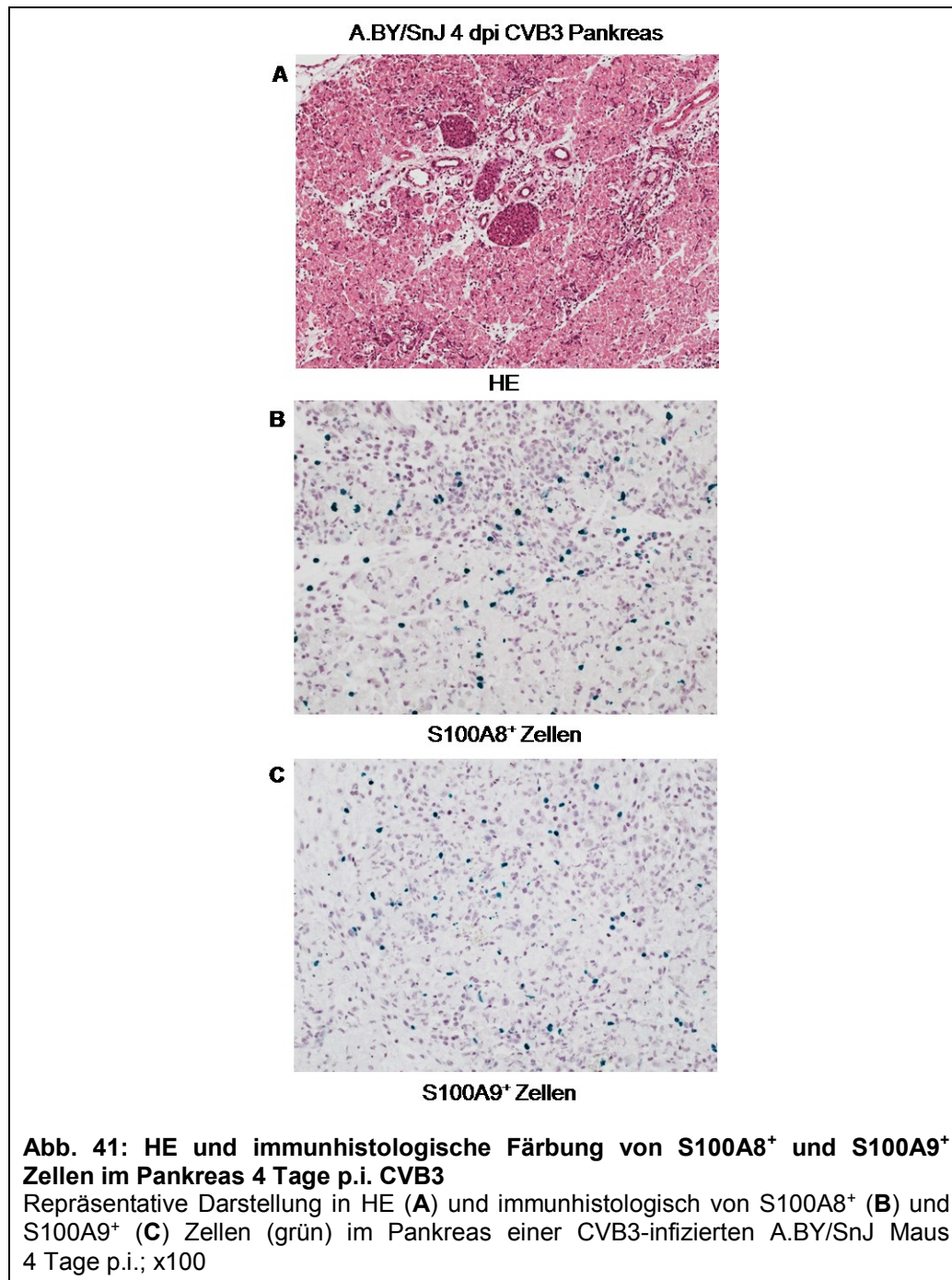
Ähnlich wie bei S100A8 konnte bei A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. verglichen mit naiven Tieren eine vermehrte S100A9 mRNA Expression (Abb. 39) im Myokard nachgewiesen werden (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,03 \pm 0,002$ vs. $0,07 \pm 0,02$; $p < 0,05$). Durch die Depletion von MDSC konnte keine signifikante Veränderung dieser Expression 4 Tage p.i. CVB3 festgestellt werden (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,07 \pm 0,02$ vs. $0,06 \pm 0,004$; $p = 0,42$). Acht Tage p.i. zeigten susceptible A.BY/SnJ Mäuse im Vergleich zu 4 Tage p.i. eine deutlich vermehrte S100A9 mRNA Expression im Myokard (A.BY/SnJ 4 dpi vs. 8 dpi undepletiert: $0,07 \pm 0,02$ vs. $0,35 \pm 0,06$; $p < 0,05$). Die Expression von S100A9 mRNA war

8 Tage p.i. bei Gr-1 depletierten Mäusen verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren signifikant vermindert (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,35 \pm 0,06$ vs. $0,10 \pm 0,01$; $p < 0,05$).

Bei resistenten C57BL/6J Mäusen (Abb. 39) konnte im Gegensatz zu A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. CVB3 keine signifikante Veränderung der S100A9 mRNA Expression im Vergleich zu naiven Tieren festgestellt werden (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,03 \pm 0,003$ vs. $0,06 \pm 0,017$; $p = 0,09$). Ebenso wiesen Gr-1 depletierte C57BL/6J Mäuse 4 Tage p.i. verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren keine signifikante Veränderung der S100A9 mRNA Expression auf (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,06 \pm 0,017$ vs. $0,04 \pm 0,01$; $p = 0,29$). Acht Tage p.i. CVB3 konnte im Vergleich zu 4 Tage p.i. bei C57BL/6J Mäusen wie auch bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen ein Anstieg der S100A9 mRNA Expression im Myokard nachgewiesen werden (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $0,06 \pm 0,017$ vs. $0,08 \pm 0,007$; $p < 0,05$). Die Expression von S100A9 mRNA 8 Tage p.i. war bei C57BL/6J Mäusen nach MDSC Depletion verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren ebenfalls signifikant vermindert (C57BL/6J 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,08 \pm 0,007$ vs. $0,06 \pm 0,002$; $p < 0,05$) (Abb.39).

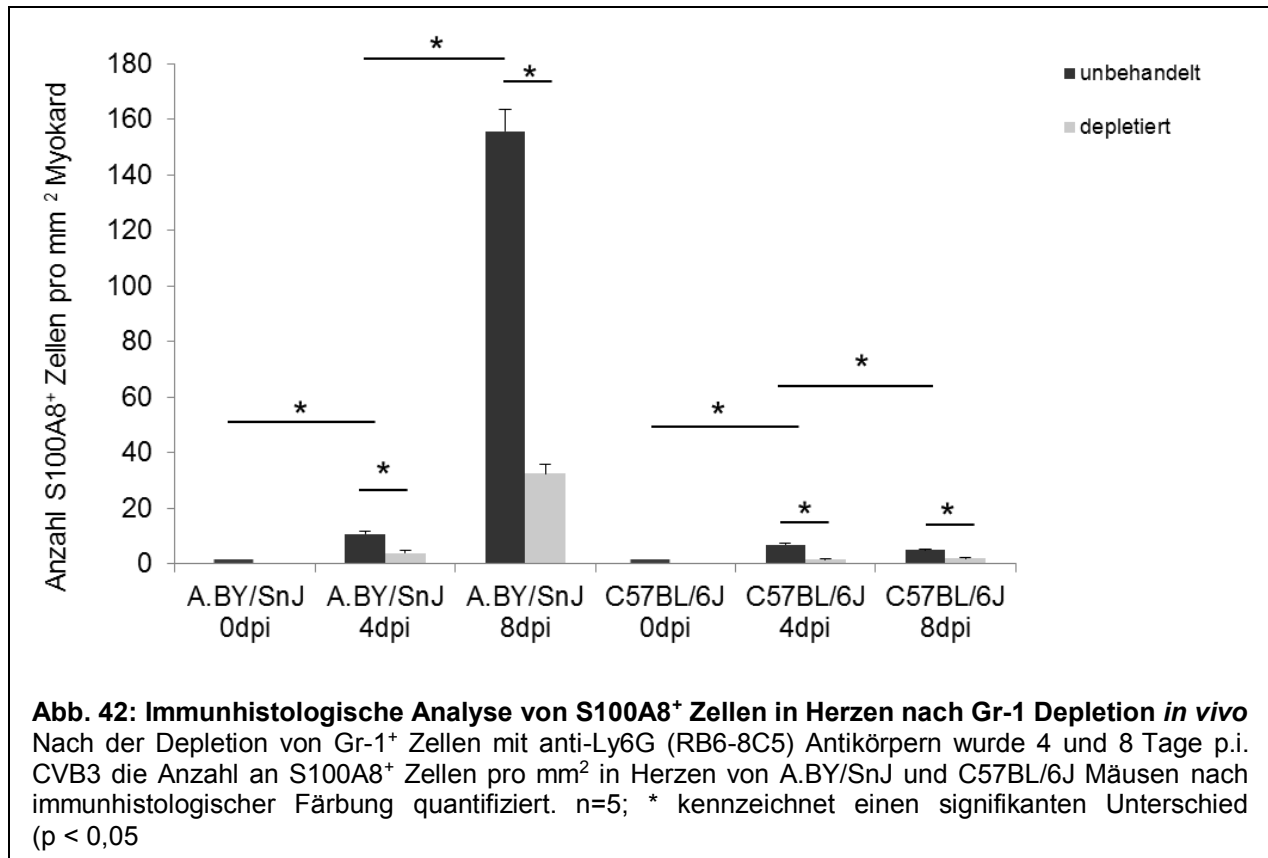


Die Analyse von immunhistologisch gefärbten Serienschnitten von Herzen zeigt, dass S100A8 (Abb. 40C) und S100A9 (Abb. 40D) exprimierende Zellen bereits 4 Tage p.i. CVB3 in vergleichbarer Anzahl auftreten, noch bevor CD3⁺ T-Lymphozyten (Abb. 40B) das Myokard infiltrieren.



Im Rahmen der CVB3 Infektion wird nicht nur das Myokard, sondern auch das Pankreas infiziert. Um herauszufinden, ob S100A8⁺ und S100A9⁺ Immunzellen auch in diesen Organen vorhanden sind, wurden immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von S100A8 und S100A9 durchgeführt. In Abbildung 41 erkennt man, dass 4 Tage p.i. CVB3 auch im Pankreas eine Vielzahl von S100A8 (Abb. 41B) und S100A9 (Abb. 41C) exprimierenden Zellen vorhanden

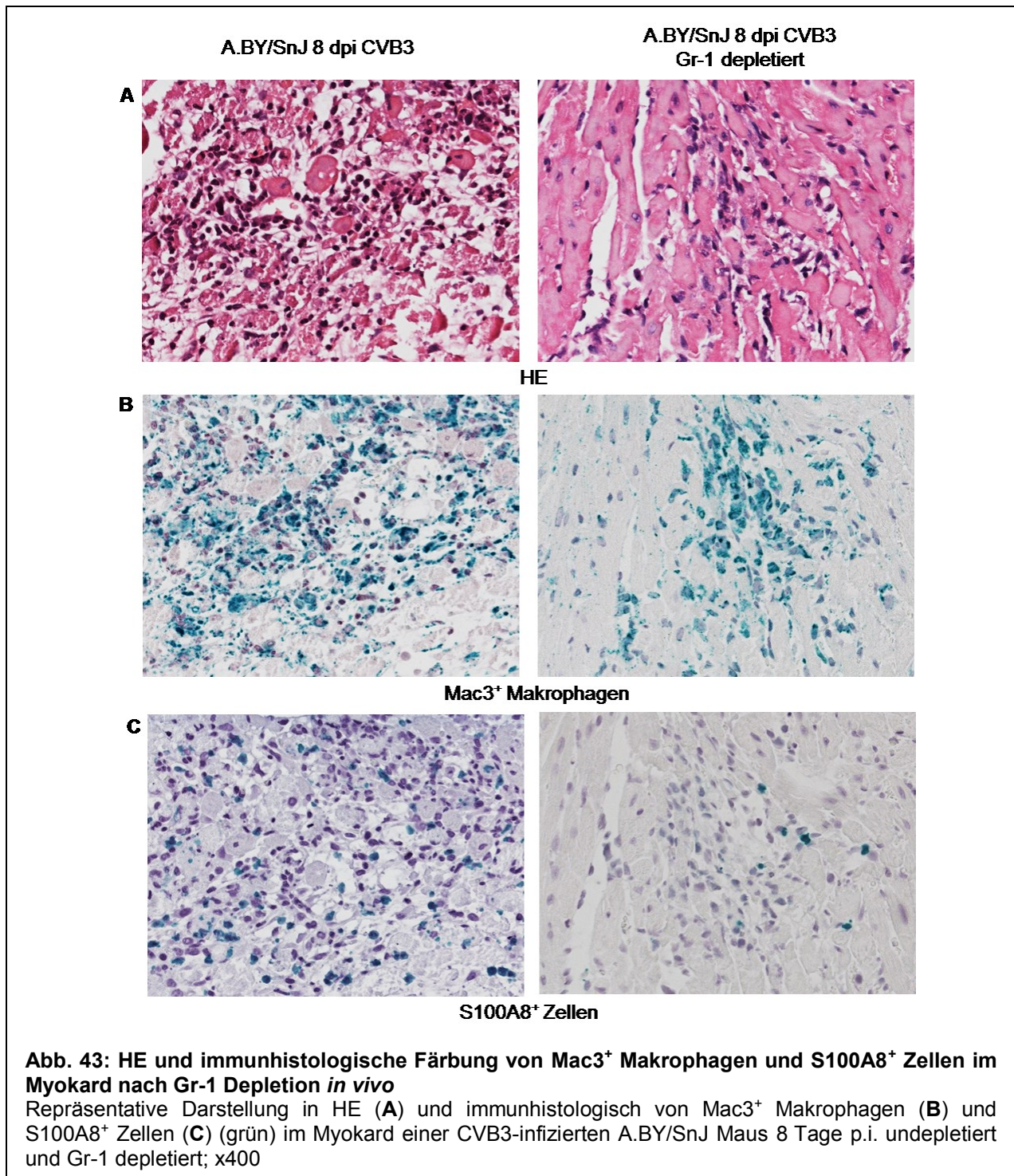
sind. Wie in immunhistologischen Voruntersuchungen belegt, entspricht die Anzahl von S100A8⁺ derjenigen von S100A9⁺ Zellen. Daher wurden die Myokardschnitte von A.BY/SnJ und C57BL/6J Mäusen 0, 4 und 8 Tage p.i. CVB3 nur für S100A8⁺ Zellen quantifiziert (Abb. 42).



Hinsichtlich der Quantität S100A8 exprimierender Zellen (Abb. 42) im Myokard konnte gezeigt werden, dass permissive A.BY/SnJ Mäuse 4 Tage p.i. CVB3 verglichen mit naiven Tieren einen signifikanten Anstieg dieser Zellen aufweisen (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,4 \pm 0,24$ vs. $10,8 \pm 0,80$; $p < 0,05$). Die Anzahl an S100A8⁺ Zellen war 4 Tage p.i. nach der MDSC Depletion im Vergleich zu unbehandelten infizierten Tieren signifikant vermindert (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $10,8 \pm 0,80$ vs. $4,0 \pm 0,89$; $p < 0,05$). Acht Tage p.i. konnten verglichen mit 4 Tage p.i. deutlich mehr S100A8⁺ Zellen im Myokard suszeptibler A.BY/SnJ Mäusen beobachtet werden (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $10,8 \pm 0,80$ vs. $155,8 \pm 7,97$; $p < 0,05$). Die Anzahl dieser Zellen war bei Gr-1 depletierten Tieren verglichen mit unbehandelten infizierten Mäusen 8 Tage p.i. wiederum signifikant vermindert (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $155,8 \pm 7,97$ vs. $32,6 \pm 3,06$; $p < 0,05$).

Bei resistenten C57BL/6J Mäusen konnten 4 Tage p.i. CVB3 im Vergleich zu naiven Tieren ebenfalls signifikant mehr von S100A8 exprimierende Zellen (Abb. 42) im Myokard detektiert werden (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,2 \pm 0,20$ vs. $7,0 \pm 0,32$; $p < 0,05$). Durch die Depletion von MDSC war die Anzahl an S100A8⁺ Zellen verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren 4 Tage p.i. signifikant vermindert (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $7,0 \pm 0,32$ vs. $1,6 \pm 0,40$; $p < 0,05$). Acht Tage p.i. CVB3 war bei resistenten C57BL/6J Mäusen die Anzahl an S100A8⁺ Zellen im Myokard verglichen mit 4 Tage p.i. signifikant vermindert (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $7,0 \pm 0,32$ vs. $5,0 \pm 0,55$; $p < 0,05$). Die Depletion von MDSC führt zu einer signifikanten Verminderung der Anzahl an S100A8⁺ Zellen verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren 8 Tage p.i. (C57BL/6J 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $5,0 \pm 0,55$ vs. $2,0 \pm 0,32$; $p < 0,05$) (Abb.42).

In Abbildung 43 sind beispielhaft immunhistologische Färbungen von Mac3⁺ Makrophagen und S100A8⁺ Zellen im Myokard einer unbehandelten CVB3-infizierten A.BY/SnJ Maus und einer Gr-1 depletierten und CVB3-infizierten Maus des gleichen Stammes 8 Tage p.i. in konsekutiven Schnitten dargestellt. MDSC-depletierte Mäuse zeigen deutlich weniger Mac3⁺ Makrophagen (Abb. 43B) und S100A8⁺ Immunzellen (Abb. 43C) im Myokard als unbehandelte Tiere. Auch in der HE-Färbung (Abb. 43A) wird ersichtlich, dass Gr-1 depletierte infizierte Tiere viel weniger Myokardnekrosen und infiltrierende Zellen aufweisen als CVB3-infizierte Tiere ohne Behandlung.



4.4.6. Analyse der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α in CVB3-infizierten Herzen nach MDSC Depletion

Wie in Abschnitt 4.3 erläutert, können MDSC durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 aktiviert und dadurch zur Proliferation angeregt werden. Ebenso führt das Zytokin TNF α über die Produktion von S100A8/9 zu einer Blockade der Ausreifung myeloider Vorläuferzellen und somit zu einer Akkumulation von MDSC (Sade-Feldman, Kanterman et al., 2013). Unklar ist, welchen Einfluss die Depletion von MDSC auf diese Zytokine hat. In diesem Experiment wurde daher untersucht, ob eine Depletion der MDSC den Gehalt an IL-1 β , IL-6 oder TNF α im Herz verändert. Wie in Abbildung 44, 45 und 46 dargestellt, wurde der mRNA Gehalt der Zytokine in Myokardgewebe durch real-time RT-PCR quantitativ analysiert.

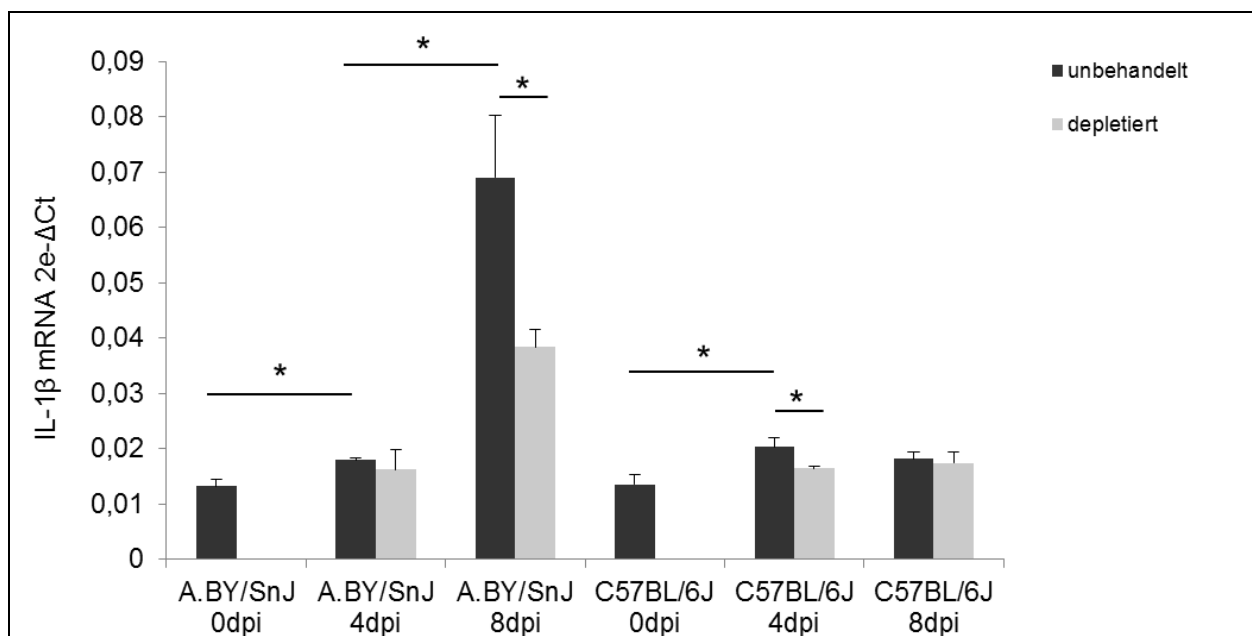


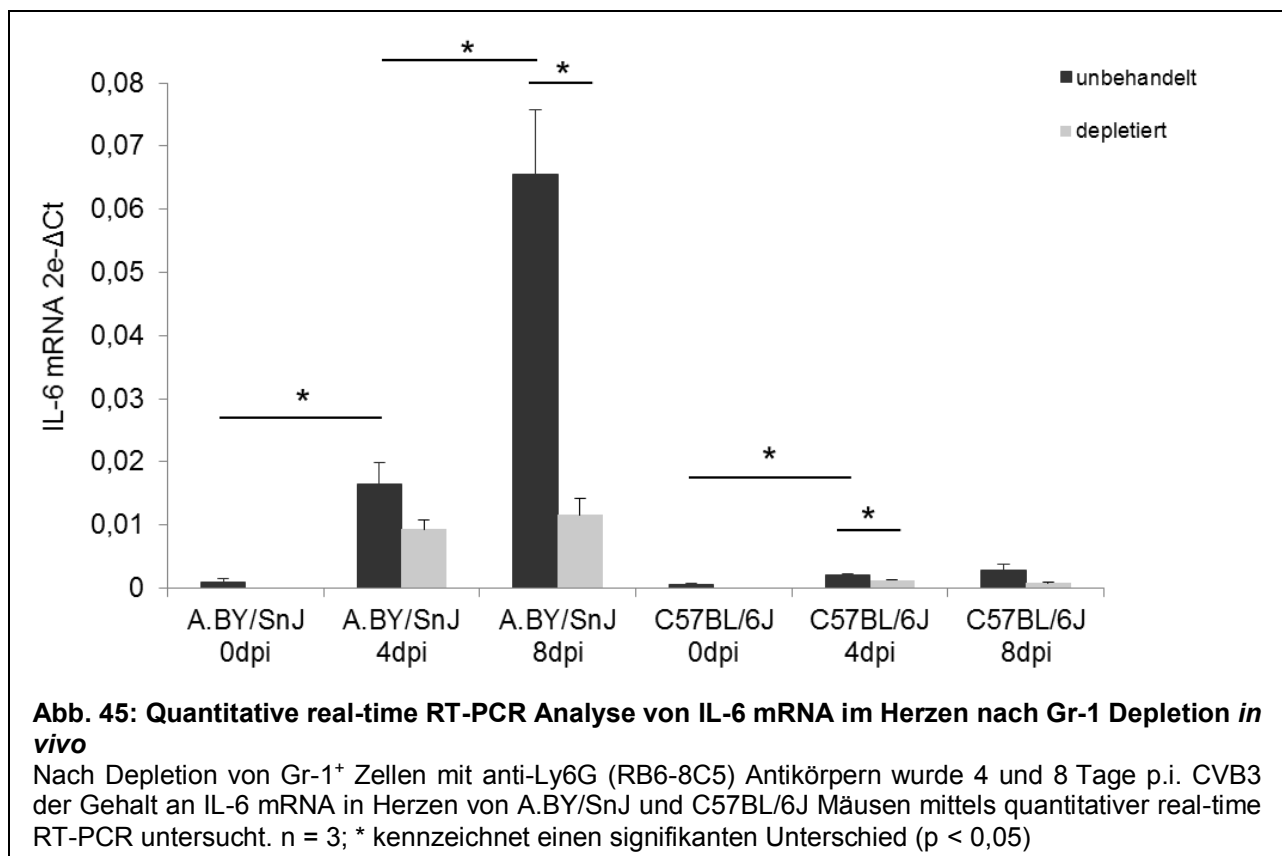
Abb. 44: Quantitative real-time RT-PCR Analyse von IL-1 β mRNA im Herzen nach Gr-1 Depletion *in vivo*

Nach Depletion von Gr-1⁺ Zellen mit anti-Ly6G (RB6-8C5) Antikörpern wurde 4 und 8 Tage p.i. CVB3 der Gehalt an IL-1 β mRNA in Herzen von A.BY/SnJ und C57BL/6J Mäusen mittels quantitativer real-time RT-PCR untersucht. n=4; * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied (p < 0,05)

Während bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen die Expression von IL-1 β mRNA (Abb. 44) im Myokard 4 Tage p.i. CVB3 zunächst gering aber signifikant zunahm (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: 0,013 \pm 0,0013 vs. 0,018 \pm 0,0004; p < 0,05) und sich nach der Depletion von Gr-1⁺ Zellen nicht signifikant änderte (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: 0,018 \pm 0,0004 vs. 0,016 \pm 0,0037; p = 0,80), fand sich 8 Tage p.i. CVB3 eine signifikante

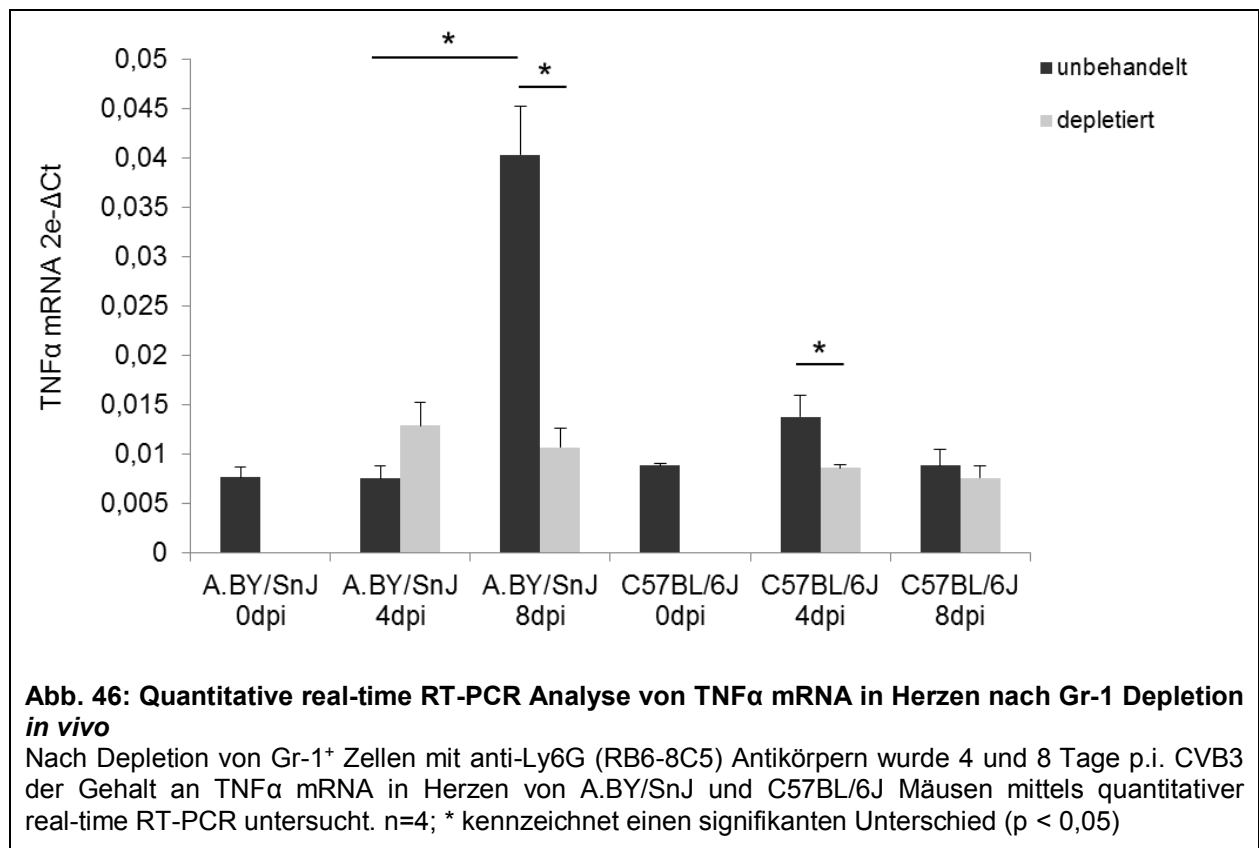
Zunahme der IL-1 β mRNA Expression verglichen mit 4 Tage p.i. (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $0,018 \pm 0,0004$ vs. $0,069 \pm 0,0112$; $p < 0,05$). Durch die Depletion der MDSC war die IL-1 β mRNA Expression signifikant vermindert verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren 8 Tage p.i. (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,069 \pm 0,0112$ vs. $0,038 \pm 0,0031$; $p < 0,05$).

Bei resistenten C57BL/6J Mäusen konnte 4 Tage p.i. CVB3 signifikant mehr IL-1 β mRNA im Myokard nachgewiesen werden als bei nicht infizierten Tieren (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,014 \pm 0,0017$ vs. $0,020 \pm 0,0016$; $p < 0,05$). Nach Gr-1 Depletion wurde 4 Tage p.i. verglichen mit unbehandelten infizierten Mäusen die IL-1 β mRNA Expression signifikant vermindert (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,020 \pm 0,0016$ vs. $0,016 \pm 0,0004$; $p < 0,05$). Während 8 Tage p.i. verglichen mit 4 Tage p.i. keine signifikanten Veränderungen des IL-1 β mRNA Gehaltes im Herz festgestellt werden konnten (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $0,020 \pm 0,0016$ vs. $0,018 \pm 0,0012$; $p = 0,32$). Ebenso führte die Depletion von MDSC 8 Tage p.i. zu keiner signifikanten Veränderung der IL-1 β mRNA Expression im Vergleich zu unbehandelten infizierten Tieren (C57BL/6J 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,018 \pm 0,0012$ vs. $0,017 \pm 0,0021$; $p = 0,74$).



Eine quantitative real-time RT-PCR Messung der mRNA des proinflammatorischen Zytokins IL-6 im Myokard (Abb.45) zeigte, dass bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. CVB3 eine signifikante Zunahme der Expression verglichen mit nicht-infizierten Tieren vorhanden war (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,0009 \pm 0,0006$ vs. $0,0165 \pm 0,0034$; $p < 0,05$). Die Gr-1 Depletion verursachte zu diesem Zeitpunkt keine signifikante Veränderung der IL-6 mRNA Expression im Vergleich zu unbehandelten infizierten Tieren (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,0165 \pm 0,0034$ vs. $0,0093 \pm 0,0014$; $p = 0,05$). Acht Tage p.i. zeigten A.BY/SnJ Mäuse jedoch deutlich mehr IL-6 mRNA im Myokard verglichen mit 4 Tage p.i. (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $0,0165 \pm 0,0034$ vs. $0,066 \pm 0,0103$; $p < 0,05$), welche durch die MDSC Depletion signifikant vermindert wurde, verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,066 \pm 0,0103$ vs. $0,012 \pm 0,0026$; $p < 0,05$).

Bei resistenten C57BL/6J Mäusen (Abb. 45) konnte 4 Tage p.i. CVB3 im Vergleich zu naiven Tieren eine signifikant vermehrte Expression von IL-6 mRNA im Myokard nachgewiesen werden (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,0006 \pm 0,00015$ vs. $0,0021 \pm 0,00023$; $p < 0,05$). Die Depletion von MDSC führte bei C57BL/6J Mäusen 4 Tage p.i. zu einer signifikanten Reduktion von IL-6 mRNA im Herz (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,0021 \pm 0,00023$ vs. $0,0013 \pm 0,0001$; $p < 0,05$). Im Vergleich von 4 zu 8 Tagen p.i. änderte sich die Expression von IL-6 mRNA bei C57BL/6J Mäusen nicht signifikant (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $0,0021 \pm 0,00023$ vs. $0,0029 \pm 0,0009$; $p = 0,43$). Durch die Depletion von Gr-1⁺ Zellen konnte 8 Tage p.i. ebenfalls keine signifikante Veränderung der IL-6 mRNA Expression festgestellt werden (C57BL/6J 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,0029 \pm 0,0009$ vs. $0,0008 \pm 0,00017$; $p = 0,06$).



Bei der Analyse des Zytokins TNFα (Abb. 46) zeigten susceptible A.BY/SnJ Mäuse 4 Tage p.i. CVB3 keine signifikanten Veränderungen der mRNA Expression im Myokard im Vergleich zu naiven Tieren (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,0077 \pm 0,0011$ vs. $0,0076 \pm 0,0012$; $p = 0,96$). Ebenso führte die Gr-1 Depletion 4 Tage p.i. zu keiner signifikanten Veränderung der TNFα mRNA Expression verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,0076 \pm 0,0012$ vs. $0,0129 \pm 0,0024$; $p = 0,10$). Acht Tage p.i. wurde im Vergleich zu 4 Tage p.i. signifikant mehr TNFα mRNA bei A.BY/SnJ Mäusen gemessen (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $0,0076 \pm 0,0012$ vs. $0,0403 \pm 0,0049$, $p < 0,05$). Durch die Depletion von MDSC war die Expression von TNFα mRNA im Myokard 8 Tage p.i. signifikant reduziert (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,0403 \pm 0,0049$ vs. $0,0107 \pm 0,0020$; $p < 0,05$).

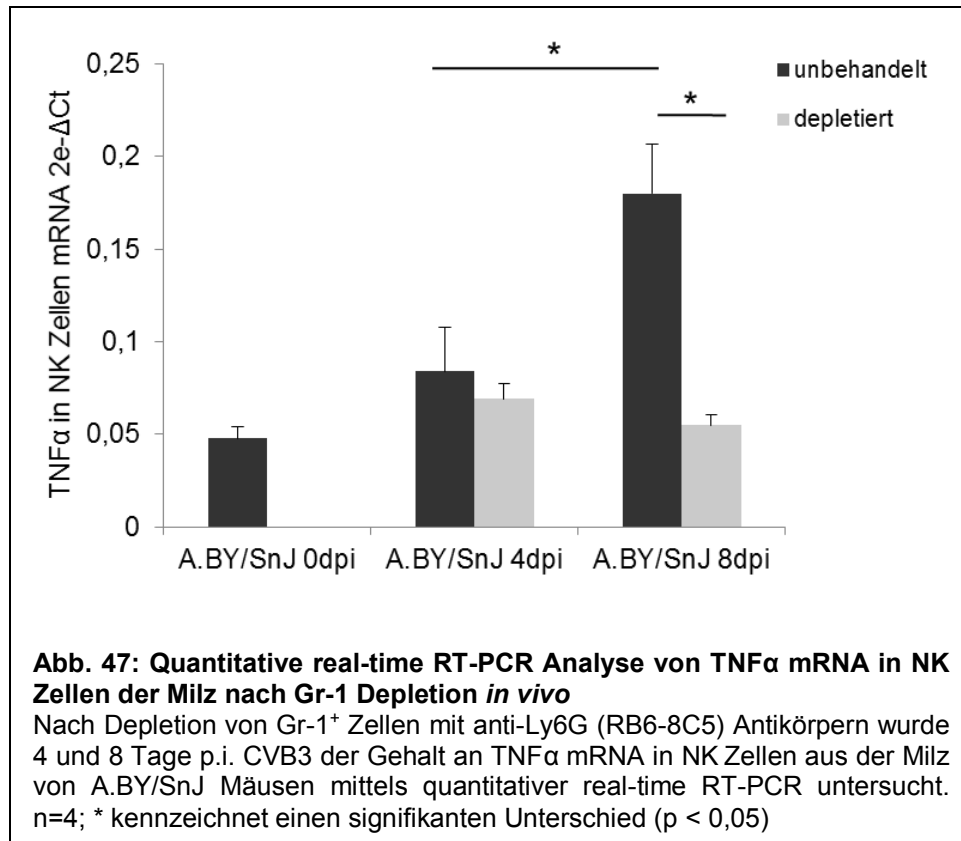
Bei resistenten C57BL/6J Mäusen (Abb. 46) konnte 4 Tage p.i. CVB3 verglichen mit naiven Tieren keine signifikante Veränderung der TNFα mRNA Expression im Myokard nachgewiesen werden (C57BL/6J 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,0089 \pm 0,0002$ vs. $0,0138 \pm 0,0021$; $p = 0,05$).

Die Depletion der MDSC führte jedoch 4 Tage p.i. zu einer signifikanten Reduktion der TNF α mRNA Expression verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,0138 \pm 0,0021$ vs. $0,0086 \pm 0,0004$; $p < 0,05$). Im Vergleich von 4 Tagen zu 8 Tagen p.i. CVB3 konnte keine signifikante Veränderung der TNF α mRNA Expression im Myokard bei C57BL/6J Mäusen festgestellt werden (C57BL/6J 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $0,0138 \pm 0,0021$ vs. $0,0089 \pm 0,0016$; $p = 0,10$). Ebenso konnte durch MDSC Depletion 8 Tage p.i. keine signifikante Veränderung der TNF α mRNA Expression nachgewiesen werden (C57BL/6J 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,0089 \pm 0,0016$ vs. $0,0076 \pm 0,0012$; $p = 0,57$).

4.4.7. Wirkung der MDSC Depletion auf die Zytokinexpression in NK Zellen

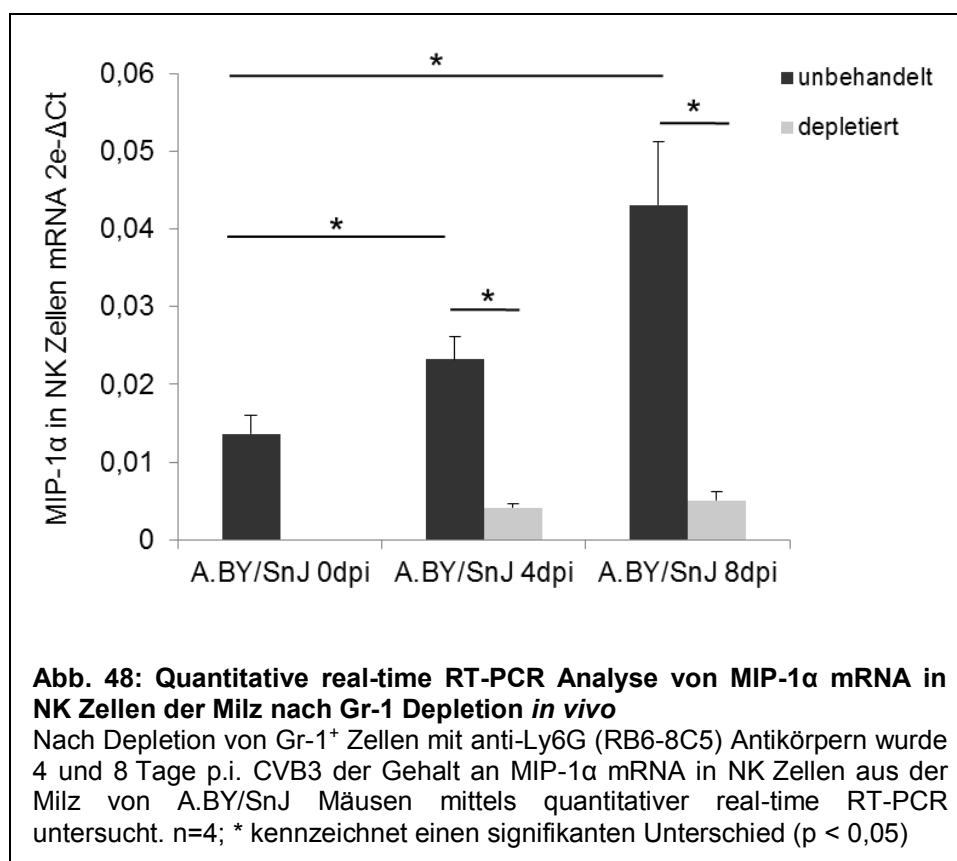
NK Zellen können durch reziproke Interaktionen mit DC und Makrophagen sowie mit T-Zellen und B-Zellen das angeborene und das erworbene Immunsystem modulieren (Lünemann, Lünemann et al., 2009). Aus diesem Grund wurde die Wirkung einer MDSC Depletion auf NK Zellen hinsichtlich der Zytokinproduktion untersucht. TNF α und MIP-1 α werden zu einem Großteil von NK Zellen produziert und fördern die verstärkte Immigration von Immunzellen in das Gewebe (Roda, Parihar et al., 2006; Reefman, Kay et al., 2010). Ebenso aktiviert das in NK Zellen produzierte Zytokin IFN γ verschiedene Immunzellen und fördert die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine.

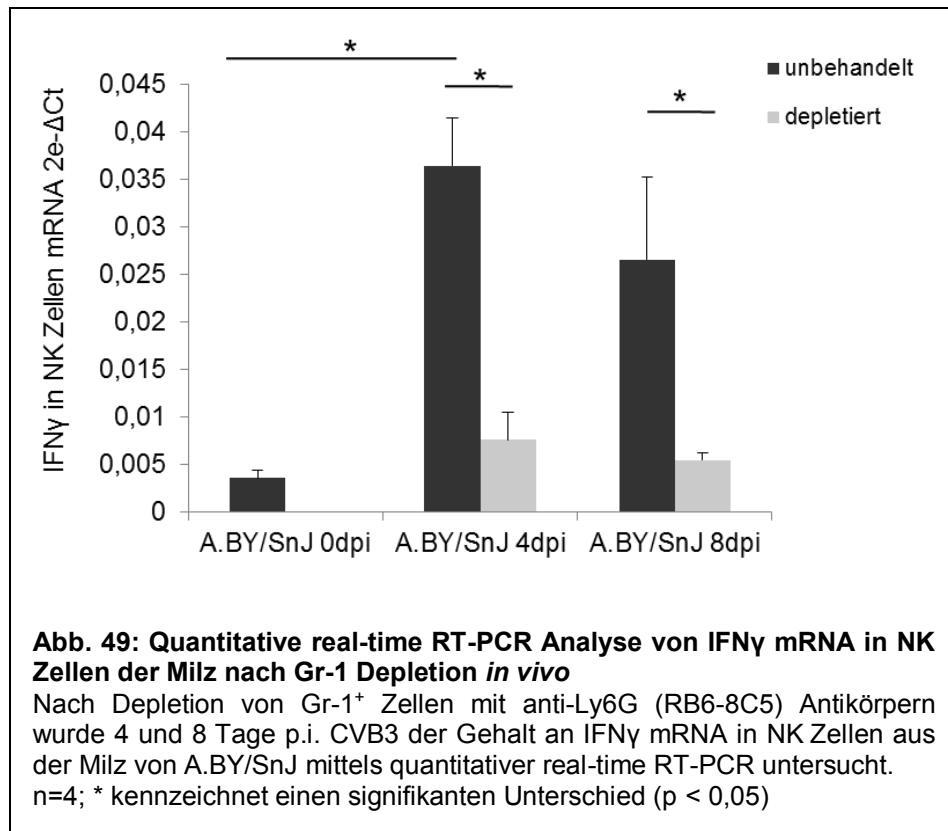
Da A.BY/SnJ Mäuse, aber nicht C57BL/6J Mäuse, durch Defizite in der NK Zellfunktion aufgefallen sind (Klingel, Fabritius et al., 2014), wurde aus Milzen Gr-1 depletierter A.BY/SnJ Mäuse 4 und 8 Tage p.i. CVB3 NK Zellen isoliert und mittels quantitativer real-time RT-PCR auf ihren Gehalt an TNF α , MIP-1 α und IFN γ mRNA untersucht und mit unbehandelten CVB3-infizierten Tieren verglichen.



Eine Analyse von TNF α mRNA in NK Zellen suszeptibler A.BY/SnJ Mäuse (Abb. 47) zeigte 4 Tage p.i. zunächst keine signifikante Veränderung verglichen mit naiven Tieren (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,048 \pm 0,0063$ vs. $0,084 \pm 0,024$; $p = 0,14$). Auch die MDSC Depletion führte 4 Tage p.i. zu keiner signifikanten Veränderung der TNF α mRNA Expression in NK Zellen (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,084 \pm 0,024$ vs. $0,069 \pm 0,008$; $p = 0,58$). Acht Tage p.i. fand sich verglichen mit 4 Tage p.i. CVB3 eine signifikant vermehrte Produktion von TNF α mRNA in NK Zellen suszeptibler A.BY/SnJ Mäuse (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $0,084 \pm 0,024$ vs. $0,180 \pm 0,026$; $p < 0,05$). Durch die Depletion von Gr-1 wurde die Produktion von TNF α mRNA verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren signifikant vermindert (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,180 \pm 0,026$ vs. $0,055 \pm 0,006$; $p < 0,05$).

In Untersuchungen des proinflammatorischen Proteins MIP-1 α in NK Zellen susceptibler A.BY/SnJ Mäuse (Abb. 48) ließ sich 4 Tage p.i. CVB3 verglichen mit naiven Tieren eine signifikant vermehrte Expression der MIP-1 α mRNA nachweisen (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,014 \pm 0,0023$ vs. $0,023 \pm 0,0029$; $p < 0,05$). Durch die Depletion von MDSC war 4 Tage p.i. die Produktion von MIP-1 α in NK Zellen im Vergleich zu unbehandelten infizierten Tieren signifikant vermindert (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,023 \pm 0,0029$ vs. $0,004 \pm 0,0005$; $p < 0,05$). Gleichfalls wurde 8 Tage p.i. verglichen mit naiven Tieren eine vermehrte Produktion von MIP-1 α in NK Zellen nachgewiesen (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 8 dpi undepletiert: $0,014 \pm 0,0023$ vs. $0,043 \pm 0,0081$; $p < 0,05$). Nach Gr-1 Depletion war auch 8 Tage p.i. im Vergleich zu unbehandelten infizierten Tieren die Expression von MIP-1 α mRNA in NK Zellen signifikant vermindert (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,043 \pm 0,0081$ vs. $0,005 \pm 0,0012$; $p < 0,05$).





Bei Analysen zum quantitativen Nachweis von IFN γ mRNA in NK Zellen susceptibler A.BY/SnJ Mäuse (Abb. 49) konnte 4 Tage p.i. CVB3 verglichen mit naiven Tieren eine signifikant vermehrte Expression nachgewiesen werden (A.BY/SnJ 0 dpi vs. 4 dpi undepletiert: $0,0036 \pm 0,0009$ vs. $0,0365 \pm 0,0051$; $p < 0,05$). Durch die Depletion von MDSC wurde 4 Tage p.i. im Vergleich zu unbehandelten infizierten Mäusen eine signifikant reduzierte Expression von IFN γ mRNA in NK Zellen festgestellt (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 4 dpi depletiert: $0,0365 \pm 0,0051$ vs. $0,0076 \pm 0,0029$; $p < 0,05$). Acht Tage p.i. konnte im Vergleich zu 4 Tagen p.i. keine signifikante Veränderung der IFN γ mRNA Expression in NK Zellen nachgewiesen werden (A.BY/SnJ 4 dpi undepletiert vs. 8 dpi undepletiert: $0,0365 \pm 0,0051$ vs. $0,0266 \pm 0,0087$; $p = 0,39$). Gr-1 depletierte A.BY/SnJ Mäuse verglichen mit unbehandelten infizierten Tieren wiesen auch 8 Tage p.i. eine signifikante Reduktion der IFN γ mRNA Expression in NK Zellen auf (A.BY/SnJ 8 dpi undepletiert vs. 8 dpi depletiert: $0,0266 \pm 0,0087$ vs. $0,0055 \pm 0,0007$; $p < 0,05$).

5. Diskussion

Eine Infektion mit Coxsackievirus B3 (CVB3) ist eine der häufigsten Ursachen für die Entstehung einer Myokarditis (Cooper, 2009; Kawai, 1999). Der unterschiedliche Schweregrad der Verläufe einer CVB3 Infektion in Abhängigkeit von Alter, Immunstatus und Geschlecht des Wirts weisen darauf hin, dass neben der direkten Schädigung durch die Virusreplikation das Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer CVB3 Myokarditis spielt (Woodruff, 1980; Esfandiari und McManus, 2008). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass die Wirtsgenetik über eine Eliminierung des Virus mit Ausheilung oder eine Viruspersistenz und anschließende chronische inflammatorische Herzerkrankung entscheiden kann (Klingel, Hohenadl et al., 1992; Kandolf, Sauter et al., 1999). In diesem Zusammenhang wurden bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen und resistenten C57BL/6J Mäusen sowohl Unterschiede bei der proinflammatorischen Zytokinexpression (Szalay, Sauter et al., 2006) als auch in der zellulären Immunantwort beschrieben (Weinzierl, Szalay et al., 2008).

Obwohl einige Einflussfaktoren der angeborenen und erworbenen Immunabwehr bei der CVB3 Myokarditis bekannt sind, bleiben viele Pathomechanismen noch ungeklärt. Zahlreiche Arbeiten weisen darauf hin, dass eine ausgeglichene Balance in der Immunreaktion entscheidend für den Verlauf der CVB3 Myokarditis ist. Im Mausmodell zeigten immunoregulative Zytokine wie IFN γ und IL-10 eine protektive Wirkung, die sich in einer verminderten Viruslast und geringgradigen Myokardschäden äußert (Henke, Zell et al., 2001). Während die Abwesenheit von IFN α und IFN β sich negativ auf die Entwicklung einer CVB3 Myokarditis auswirkt und die Viruselimination gehemmt ist (Althof, Harkins et al., 2014), führen infiltrierende T-Zellen sowie IL-1 β -produzierende Makrophagen eher zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und Fibrose im Herz (Opavsky, Penninger et al., 1999; Fairweather, Frisancho-Kiss et al., 2006). Seit kurzem weiß man, dass eine effiziente antivirale Abwehr notwendig ist, um schwere akute und dann auch chronische Myokarditiden zu verhindern (Liu und Mason, 2001; Jarasch, Martin et al., 2005; Magnani und Dec, 2006). Eine besondere Bedeutung kommt hierbei den NK Zellen zu (Klingel, Fabritius et al., 2014). Erst seit wenigen Jahren weiß man, dass die Funktionalität von NK Zellen durch MDSC beeinflusst werden kann. *In vitro* Versuche zeigten, dass MDSC die Expression des NKG2D Rezeptors auf NK Zellen unterdrücken können (Elkabets, Ribeiro et al., 2010). In CVB3-infizierten C57BL/6J Mäusen wurde gezeigt, dass eine Neutralisation des NKG2D Rezeptors zu einer deutlicheren myokardialen Schädigung und vermehrten Virusreplikation, verglichen mit unbehandelten Mäusen führt (Klingel, Fabritius et al., 2014).

Beim Adenovirus Gentransfer in Mäusen ebenso wie bei *in vitro* Versuchen mit Vaccinia Virus hemmen MDSC die NK Zellaktivierung und führen somit zu einer Verminderung der Ausschüttung von IFN γ aus NK Zellen in der Milz und der Leber (Zhu, Huang et al., 2012; Fortin, Huang et al., 2012). Vor allem in der akuten Phase der CVB3 Myokarditis ist eine koordinierte Expression des Zytokins IFN γ notwendig, um die Virusinfektion zu limitieren, wie bei resistenten C57BL/6J Mäusen im Vergleich zu suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen gezeigt wurde (Szalay, Sauter et al., 2006). Die bislang unklare Rolle der MDSC bei der CVB3 Infektion wurde in dieser Arbeit untersucht. Da in manchen Versuchen zum Teil nur geringe Tierzahlen untersucht werden konnten, müssen diese Ergebnisse in weiteren Analysen validiert werden.

5.1. Akkumulation von MDSC im Verlauf der CVB3 Infektion in A.BY/SnJ Mäusen

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass granulozytäre und monozytäre MDSC in Milzen suszeptibler A.BY/SnJ Mäuse nicht nur bei naiven Tieren bereits in größerer Anzahl vorliegen, sondern auch bei einer CVB3 Infektion 4 beziehungsweise 8 Tage p.i. signifikant häufiger vorkommen als bei resistenten C57BL/6J Mäusen. Die Akkumulation von MDSC konnte bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Virusinfektionen, wie z.B. dem Hepatitis C Virus (Tacke, Lee et al., 2012) oder HIV (Vollbrecht, Stirner et al., 2012) belegt werden. Dabei wurde gezeigt, dass bei einer Infektion mit Hepatitis C Virus die vermehrte Anzahl von MDSC im Blut zu einer Unterdrückung der Funktion von T-Lymphozyten und somit zu einer Viruspersistenz bei Menschen führt (Tacke, Lee et al., 2012). Ebenso korrelierte bei HIV Patienten eine größere Anzahl an MDSC mit einer höheren Viruslast und einer verminderten Anzahl an CD4⁺ T-Lymphozyten (Vollbrecht, Stirner et al., 2012). Initiiert durch eine Vaccinia Virus Infektion konnte bei C57BL/6J Mäusen eine Zunahme der Anzahl von MDSC in der Peritonealflüssigkeit beobachtet werden, welche *in vitro* die Produktion von IFN γ und Granzym B und somit die Funktion von NK Zellen unterdrückten (Fortin, Huang et al., 2012). In den genannten Untersuchungen mit Virusinfektionen wurden bislang keine MDSC im Myokard, sondern ausschließlich im Blut (Ostrand-Rosenberg und Sinha, 2009; Tacke, Lee et al., 2012), in Peritonealflüssigkeit und vor allem in der Milz (Fortin, Huang et al., 2012; Zhu, Huang et al., 2012) beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von MDSC bei der CVB3 Myokarditis untersucht. Während bei resistenten C57BL/6J Mäusen lediglich eine geringfügige Zunahme der Anzahl granulozytärer MDSC 4 Tage p.i. der CVB3 Infektion beobachtet werden konnte, war die Anzahl beider MDSC Subpopulationen im Myokard suszeptibler A.BY/SnJ Mäusen 8 Tage p.i. deutlich erhöht. Die vermehrte Anzahl von MDSC in

Milz und Myokard bei CVB3-infizierten suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen könnte Einfluss haben auf die verminderte Fähigkeit dieser Tiere das Virus zu eliminieren und durch die Viruspersistenz und myokardiale Schädigung eine chronische inflammatorische Herzmuskelerkrankung zu entwickeln (Klingel, McManus et al., 1995; Kandolf, Sauter et al., 1999). Durch eine Depletion der MDSC *in vivo* konnte gezeigt werden, dass die Elimination dieser Zellpopulation den Verlauf der CVB3 Myokarditis beeinflusst. Für die Depletion wurden permissive und resistente Mäuse mit dem *in vivo* Antikörper anti-Ly6G (RB6 8C5) von BioXCell behandelt. Dieser Antikörper wird als anti-Ly6G betitelt, bindet als Klon von RB6 8C5 jedoch an das Oberflächenprotein Gr-1 und depletiert somit sowohl granulozytäre als auch monozytäre MDSC (Li, Han et al., 2009; Elkabets, Ribeiro et al., 2010). Untersucht wurde hier die Wirkung von MDSC auf die frühe Immunantwort, daher wurden die Mäuse nur in den ersten 4 Tagen der CVB3 Infektion depletiert. Die Befunde am Herzen wurden 4 Tage p.i. und 8 Tage p.i. erhoben, um Veränderungen im Verlauf der akuten Phase der CVB3 Myokarditis vergleichsweise zu untersuchen. In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, dass eine Depletion von MDSC *in vivo* bei A.BY/SnJ Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der myokardialen Schädigung führt.

5.2. *In vivo* Depletion von MDSC vermindert die verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine im Myokard bei der CVB3 Infektion

Zytokine und Chemokine tragen wesentlich zu Entwicklung und Fortschreiten einer Myokarditis bei (Matsumori, Yamada et al., 1994; Seko, Takahashi et al., 1997). Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β wurde bei vielen entzündlichen Prozessen als wichtiger Mediator identifiziert (Dinarello, 2011) und spielt sowohl bei bakteriellen (Sahoo, Ceballos-Olvera et al., 2011) als auch viralen (Morales-Garcia, Falfan-Valencia et al., 2012) Infektionen eine entscheidende Rolle. Verschiedene Untersuchungen am Mausmodell der CVB3 Myokarditis legen nahe, dass die Eliminierung des Virus und der Übergang der akuten Enterovirusmyokarditis in eine chronische Verlaufsform durch eine unterschiedlich ausgeprägte Immunkontrolle bestimmt werden (Klingel, Schnorr et al., 2003), wobei IL-1 β hierbei als ein entscheidendes Zytokin gilt (Matsumori, Yamada et al., 1994). Diverse Studien lassen vermuten, dass eine Inhibierung von IL-1 β , welches von verschiedenen Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen, NK Zellen und B-Lymphozyten produziert wird, den Entzündungsprozess im Myokard eindämmen kann (Fairweather, Yujung et al., 2003; Liu, Hanawa et al., 2005).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Expression von IL-1 β mRNA in Herzen CVB3-infizierter suszeptibler A.BY/SnJ Mäuse während der akuten

CVB3 Infektion nicht nur quantitativ vermehrt ist, sondern auch länger im Verlauf der Infektion exprimiert wird als bei resistenten C57BL/6J Mäusen, wie bereits von Henke et al. (1992) *in vitro* postuliert. In Influenza Virus-infizierten Mäusen wurde gezeigt, dass IL-1 β die Viruseliminierung durch Aktivierung von CD4⁺ T-Lymphozyten fördert und somit die virusinduzierte Sterblichkeitsrate der Tiere senkt (Schmitz, Kurrer et al., 2005). Hier erhobene Befunde an resistenten C57BL/6J Mäusen lassen vermuten, dass eine frühe IL-1 β Expression für die Induktion einer frühen milden, aber effektiven Immunantwort wichtig sein könnte, welche dazu beiträgt, die Ausbreitung der Virusinfektion in resistenten Tieren rasch einzudämmen. Im Gegensatz dazu wurde die Expression von IL-1 β in der chronischen Phase der murinen Enzephalomyokarditisvirusmyokarditis in Korrelation mit myokardialen Schäden und Fibrose gebracht (Shioi, Matsumori et al., 1996). Somit könnte der starke Anstieg von IL-1 β bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen in der akuten Phase der CVB3 Infektion ein Hinweis darauf sein, dass die spätere und andauernde IL-1 β Expression entscheidend für die Progression der kardialen Inflammation bei diesen Tieren ist.

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass IL-1 β Einfluss auf MDSC hat. Mehrfach wurde neben einer aktivierenden und mobilisierenden auch eine akkumulierende Wirkung von IL-1 β auf MDSC beschrieben (Song, Krelin et al., 2005; Tu, Bhagat et al., 2008). Die Tatsache, dass bei suszeptiblen Mäusen in der akuten Infektion neben einer höheren kardialen IL-1 β Expression auch eine größere Anzahl von MDSC im Herz nachgewiesen werden konnte, legt nahe, dass bei der CVB3 Myokarditis ein Zusammenhang zwischen diesem proinflammatorischen Zytokin und MDSC besteht. Die Expression von IL-1 β bei Infektion mit rekombinantem murinen Leukämie Virus führte bei Mäusen zur Akkumulation von MDSC in der Milz sowie einer verlängerten Virusreplikation mit andauernder zellulärer Immunreaktion in der Milz (Browne, 2015). Es ist wahrscheinlich, dass auch bei CVB3-infizierten A.BY/SnJ Mäusen die verstärkte Expression von IL-1 β die Einwanderung von MDSC ins Herz fördert, die Viruseliminierung behindert und somit die Entwicklung einer chronischen Myokarditis gefördert wird. Diese Annahme wird untermauert durch die Tatsache, dass die Depletion von MDSC *in vivo* bei A.BY/SnJ Mäusen zu einer Reduktion der IL-1 β Expression zusammen mit einer Verminderung der Anzahl an CD3⁺ Lymphozyten sowie Mac3⁺ Makrophagen im Herzmuskel führt und diese Tiere signifikant weniger myokardiale Schäden aufwiesen.

Eine Aktivierung und Vermehrung von IL-1 β bei entzündlichen Prozessen führt konsekutiv zu einer Induktion weiterer Immunmodulatoren (O'Neill und Greene, 1998). Unter anderem wird in

Fibroblasten und Makrophagen durch IL-1 β vermehrt das Signalmolekül IL-6 produziert (Fibbe, van Damme et al., 1986; Seelentag, Mermoud et al., 1989). In dieser Arbeit konnte sowohl auf Proteinebene (immunhistochemisch) als auch auf mRNA Ebene (mittels quantitativer real-time RT-PCR) eine verstärkte kardiale Expression von IL-6 bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen im Vergleich zu resistenten C57BL/6J Mäusen gezeigt werden. Dieses unterschiedliche Expressionsmuster von IL-6 bei beiden Mausstämmen lässt sich unter anderem durch die unterschiedliche Expression von IL-1 β erklären, da IL-1 β bei suszeptiblen Tieren stärker und auch noch zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert wird als bei resistenten Tieren, kann es konsekutiv unter anderem zu einer vermehrten myokardialen Expression von IL-6 führen. Der für IL-6 beschriebene anti-apoptotische Effekt auf Immunzellen (Hodge, Hurt et al., 2005) könnte bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen zu der verlängerten kardialen Inflammation führen und folglich zur Entwicklung einer chronischen Myokarditis beitragen. Ebenso unterstützt die starke kardiale Expression von IL-6 bei A.BY/SnJ Mäusen die These, dass in diesen permissiven Tieren eine vermehrte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und IL-1 β , ursächlich für eine gesteigerte Anzahl an MDSC im Vergleich zu resistenten Mäusen ist. In Mäusen mit kutaner *Staphylococcus aureus* Infektion führt eine vermehrte Expression von IL-6 zu einer Zunahme der Anzahl von MDSC im Blut (Skabytska, Biedermann et al., 2015). Gleichwohl gibt es Hinweise dafür, dass MDSC wiederum die Ausschüttung von IL-6 anregen. In einem Mausmodell mit akutem Myokardinfarkt steigerte sich mit der Anzahl der einwandernden MDSC auch die Expression von IL-6 mRNA im Herzmuskel (Yao, Lu et al., 2015). Dieser Befund wird untermauert durch unsere Ergebnisse, die zeigen, dass die *in vivo* Depletion von MDSC zu einer signifikanten Reduktion nicht nur von IL-1 β mRNA, sondern auch von IL-6 mRNA im Myokard führte.

Die erhobenen Befunde lassen die Vermutung zu, dass auch die direkte Produktion von IL-1 β und IL-6 durch MDSC (Hoechst, Ormandy et al., 2008; Umemura, Saio et al., 2008) eine elementare Rolle für den Verlauf einer CVB3 Infektion spielen. Vermutlich wird durch die Depletion von MDSC und die dadurch verminderte Produktion von IL-1 β und IL-6 die Infiltration von Immunzellen in das Myokard in der frühen Phase der CVB3 Infektion gehemmt und die Schäden am Herzmuskelgewebe reduziert. Da IL-1 β und IL-6 auch wiederum aktivierend auf MDSC wirken (Elkabets, Ribeiro et al., 2010; Sade-Feldman, Kanterman et al., 2013; Fang, Li et al., 2015) wäre es interessant in fortführenden Untersuchungen zu analysieren, ob durch eine Inhibition der Interaktion dieser Zytokine mit ihren Rezeptoren beispielsweise bei IL-1 β durch den monoklonalen Antikörper *Canakinumab* oder bei IL-6 durch den monoklonalen Antikörper

Tocilizumab, die Anzahl und Aktivität von MDSC reduziert werden könnte und welchen Einfluss dies auf den Verlauf der CVB3 Myokarditis hätte.

5.3. Die Interaktion von MDSC mit S100A8 und S100A9 in Milz und Herz

Im Zusammenhang mit der Aktivierung, Akkumulation und Migration von MDSC sind besonders die proinflammatorischen Mediatoren S100A8 und S100A9 zu erwähnen. Sie werden in Zellen myeloiden Ursprungs, wie Granulozyten, Monozyten und frühen Stadien von Makrophagen, aber auch von MDSC direkt exprimiert (Odink, Cerletti et al., 1987; Zwadlo, Bruggen et al., 1988; Sinha, Okoro et al., 2008). Verschiedene Studien legen eine autokrine Feedback Schleife von S100A8/9 in MDSC nahe, welche eine Reifung von myeloiden Vorläuferzellen verhindert und so zu einer Anhäufung von MDSC führt (Cheng, Corzo et al., 2008). Die Analysen in dieser Arbeit zeigen, dass die Expression von S100A8 und S100A9 mRNA in der Milz bei permissiven A.BY/SnJ Mäusen im Verlauf der CVB3 Infektion sowohl 4 als auch 8 Tage p.i. erhöht ist, während in resistenten C57BL/6J Mäusen nur wenig S100A8/9 mRNA detektiert werden kann. Die Expressionsprofile von S100A8/9 in beiden Mausstämmen spiegeln sich auch in der jeweiligen Anzahl der MDSC in der Milz im Verlauf der CVB3 Infektion wider. Ähnliche Befunde fanden sich auch in *Trypanosoma cruzi*-infizierten Mäusen, die eine gesteigerte Expression von S100A8/9 in Zusammenhang mit einer vermehrten Anzahl von MDSC im Herz aufwiesen (Cuervo, Guerrero et al., 2011). Bei unseren Untersuchungen fiel auf, dass bei permissiven A.BY/SnJ Mäusen die Steigerung der kardialen Expression von S100A8 und S100A9 mRNA im Verlauf der CVB3 Infektion sehr viel höher war als bei resistenten C57BL/6J Mäusen. Dies erhöhte Expression von S100A8/9, welche mit einer chemotaktischen Wirkung auf MDSC bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen einhergeht, vermag die erhöhte Anzahl von MDSC im Myokard dieser Tiere gegenüber resistenten C57BL/6J Mäusen bei der CVB3 Infektion zu erklären. In einem Brustkrebsmodell von Mäusen wurde nachgewiesen, dass MDSC sowohl den Rezeptor für S100A8/9 exprimieren als auch diese Proteine direkt sezernieren können. (Sinha, Okoro et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch FACS Analysen gezeigt werden, dass MDSC auch im Verlauf der akuten CVB3 Infektion S100A8/9 generieren. Der Befund, dass permissive A.BY/SnJ Mäuse zu jedem Zeitpunkt der Infektion eine vergleichsweise stärkere Expression von S100A8/9 in MDSC aufweisen sowie, dass bei ihnen eine höhere Anzahl von MDSC in Milzen und im Herzen nachweisbar ist, könnte ein Hinweis dafür sein, dass MDSC zur kardialen Schädigung bei der CVB3 Myokarditis beitragen. In konsekutiven histologischen Schnitten des Herzgewebes fanden sich Myokardnekrosen sowie Mac3⁺ Makrophagen in denselben Bereichen des Myokards wie S100A8/9⁺ Zellen.

Diese Befunde werden unterstützt durch unsere Untersuchungen nach *in vivo* Depletion der MDSC. In permissiven A.BY/SnJ Mäusen führte die Depletion von MDSC 8 Tage p.i. CVB3 zu einer signifikanten Reduktion von S100A8/9 mRNA und S100A8/9⁺ Zellen im Myokard sowie konsekutiv zu einer reduzierten Entzündungsreaktion durch mononukleäre Zellen und demzufolge zu einer milderen Form der Myokarditis. Eine durch Virusinfektion verursachte erhöhte Anzahl von MDSC in verschiedenen Organen infolge einer vermehrten Expression von S100A8/9, wie sie bei mit murinem Gammaherpesvirus 68-infizierten Mäusen bereits gezeigt wurde (Nelson, Chauhan et al., 2012), ist somit für die CVB3 Infektion ebenfalls wahrscheinlich.

5.4. MDSC supprimieren die Funktion von NK Zellen bei der CVB3 Infektion

Als Effektorzellen der angeborenen Immunantwort und als Verbindungsglied zum erworbenen Immunsystem (Vivier, Raulet et al., 2011) kommt den NK Zellen bei der Bekämpfung viraler Infektionen insbesondere in der frühen Phase der Infektion eine besondere Bedeutung zu (Welsh, Biron et al., 1984; French und Yokoyama, 2003). Auch bei der CVB3 Myokarditis spielen NK Zellen eine entscheidende Rolle in der frühen Virusabwehr. So führt eine Depletion von NK Zellen bei resistenten Mäusen zu einer vermehrten und verlängerten CVB3 Replikation im Herz (Godeny und Gauntt, 1986). Des Weiteren unterscheiden sich NK Zellen suszeptibler A.BY/SnJ Mäuse von denen resistenter C57BL/6J Mäuse hinsichtlich ihres Reifegrades sowie ihrer zytotoxischen Eigenschaften. Resistente C57BL/6J Mäuse weisen im naiven Zustand wie auch während der CVB3 Infektion eine größere Anzahl reifer NK Zellen (CD11b^{hoch} CD27^{niedrig}) auf als suszeptible A.BY/SnJ Mäuse. Zusätzlich reagieren NK Zellen suszeptibler A.BY/SnJ Mäuse schlechter auf infizierte Zielzellen und exprimieren weniger Degranulationsmarker CD107a auf ihrer Oberfläche (Klingel, Fabritius et al., 2014). In der Literatur wurde mehrfach neben dem bereits bekannten supprimierenden Einfluss der MDSC auf T-Lymphozyten (Song, Krelin et al., 2005) eine Hemmung von NK Zellen durch MDSC gezeigt (Li, Han et al., 2009; Fortin, Huang et al., 2012; Zhu, Huang et al., 2012). Die genauen Mechanismen, durch welche diese Suppression der NK Zellen erfolgt, wurden noch nicht identifiziert (Goh, Narayanan et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde u.a. der Einfluss von MDSC auf NK Zellen *in vitro* anhand CVB3-infizierter HeLa/RAW Ko-Kulturen untersucht. Der Oberflächenmarker CD107a befindet sich auf der Membran intrazellulärer Lysosomen in den NK Zellen und wird bei der Degranulation im Rahmen der Zytotoxizität auf der Zelloberfläche exprimiert. NK Zellen reagieren auf Zielzellen durch die Ausschüttung von Perforin sowie der Protease Granzym B aus Lysosomen (Alter,

Malenfant et al., 2004; Tacke, Ginter et al., 2011); Granzym B dringt durch von Perforin geschaffene Poren in die Zielzelle ein und führt zur Apoptose. CD107a und Granzym B sind somit Marker für die zytotoxische Reaktionsfähigkeit von NK Zellen auf Virus-infizierte Zielzellen. Wir konnten zeigen, dass CD107a und Granzym B sowohl in der Ko-Kultur mit granulozytären als auch mit monozytären MDSC auf bzw. in NK Zellen vermindert waren. Die Reduktion dieser beiden Marker ist auch eine mögliche Erklärung für die Verminderung der Zytotoxizität von NK Zellen nach Ko-Kultivierung mit splenalen MDSC in einem Tumormodell (Liu, Yu et al., 2007). Die hier *in vitro* gezeigte Reduktion von CD107a auf und von Granzym B in NK Zellen durch MDSC könnte Hinweis auf eine verminderte Zytotoxizität sein und erklären, warum *in vivo* bei A.BY/SnJ Mäusen keine Viruselimination gelingt. Ein stärker hemmender Einfluss von granulozytären MDSC auf NK Zellen (Fortin, Huang et al., 2012; Zhu, Huang et al., 2012) konnte in unseren Arbeiten nicht bestätigt werden, die Hemmung der Moleküle war durch beide MDSC Subpopulationen vergleichbar.

Hinsichtlich des supprimierenden Effekts der MDSC auf NK Zellen *in vitro* wurden verschiedene Mechanismen postuliert, welche die direkte Wirkung von MDSC auf Zielzellen erklären sollen. (Li, Han et al., 2009; Tacke, Lee et al., 2012). Eine Wirkung von granulozytären MDSC auf NK Zellen und T-Zellen wird häufig durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erklärt, wobei vor allem durch H₂O₂ die Produktion von IFN γ und somit die Proliferation von NK Zellen sowie die Expression der CD3 ζ Kette des T-Zellrezeptors gehemmt wird (Schmielau und Finn, 2001). Im Vergleich dazu wird bei monozytären MDSC verstärkt eine supprimierende Wirkung auf NK Zellen und T-Zellen durch *i*NOS (induzierbare NO Synthase) und Arginase beschrieben. Beiden Zellpopulationen dient L-Arginin als Substrat. Aufgrund des hohen Umsatzes durch MDSC ist weniger L-Arginin vorhanden, so dass die T-Zellen durch eine Hemmung von CDK4 nicht proliferieren können. Zusätzlich inhibiert das durch *i*NOS gebildete NO über JAK3 und STAT5 die Expression von MHC-II auf T-Zellen. Ähnliche Mechanismen sind auch für NK Zellen denkbar (Gabrilovich und Nagaraj, 2009). Somit könnten weiterführende Experimente zur Identifikation der Mechanismen bezüglich der Hemmung von NK Zellen durch MDSC erfolgen, die auf Zugabe von Katalasen zur Verminderung der Produktion von ROS (Nishikawa, Hashida et al., 2009) sowie von Methylarginin zur *i*NOS Inhibierung (Toutouzas, Riga et al., 2008) basieren.

Ein wichtiger Prozess in der Viruseliminierung bei einer CVB3 Infektion ist die Identifizierung infizierter Zellen durch das Immunsystem. Dies erfolgt bei NK Zellen vor allem durch den

aktivierenden Rezeptor NKG2D (Yokoyama, 1998; Jamieson, Diefenbach et al., 2002). Die elementare Rolle der NKG2D Expression auf NK Zellen bei der CVB3 Myokarditis konnte bereits *in vivo* für A.BY/SnJ und C57BL/6J Mäusen dargestellt werden. Sowohl vor als auch im Verlauf der CVB3 Infektion zeigten resistente C57BL/6J Mäuse verglichen mit suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen eine deutlich höhere NKG2D Expression in NK Zellen aus Milz und Herz. Die *in vivo* Neutralisation von NKG2D mittels Antikörper führte in C57BL/6J Mäusen zu einer verstärkten Virusreplikation und mehr inflammatorischen Läsionen im Herzen. CVB3-infizierte NKG2D *knock out* Mäuse wiesen eine im Vergleich zu Wildtyp Mäusen hohe kardiale Virusreplikation und vermehrte Infiltration inflammatorischer Zellen wie Mac3⁺ Makrophagen und CD3⁺ T-Lymphozyten auf (Klingel, Fabritius et al., 2014). Hieraus lässt sich schließen, dass NKG2D-aktivierte NK Zellen maßgeblich an der Viruseliminierung bei der CVB3 Myokarditis beteiligt sind. Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus für diese Beobachtung wurde in dieser Arbeit diskutiert. Wir fanden, dass die Ko-Kultivierung vor allem mit granulozytären MDSC, aber auch mit monozytären MDSC mit einer signifikant verminderten Expression von NKG2D auf splenalen NK Zellen einherging. Im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen wurde *in vitro* ebenfalls eine Unterdrückung des NKG2D Rezeptors auf NK Zellen durch MDSC beschrieben (Elkabets, Ribeiro et al., 2010).

Stimuliert durch Zytokine wie TNF α und IL-1 β produzieren NK Zellen u.a. das proinflammatorische Zytokin MIP-1 α (Macrophage inflammatory protein 1 α); dieses fördert die antivirale Aktivität durch verstärkte Immigration von Immunzellen (Roda, Parihar et al., 2006; Reefman, Kay et al., 2010; Salazar-Mather, Lewis et al., 2002; Baschuk, Wang et al., 2014). Im Zusammenhang mit einer CVB3 Infektion zeigten MIP-1 α *knock out* Mäuse keine Anzeichen einer Myokarditis (Cook, Beck et al., 1995). Bei *in vitro* Versuchen mit Mastzellen führte die Ko-Kultivierung mit MDSC zu einer Zunahme der MIP-1 α Expression (Saleem, Martin et al., 2012). Eine *in vivo* Depletion von MDSC in CVB3-infizierten A.BY/SnJ Mäusen unterstützt diese Ergebnisse, da die MIP-1 α Produktion in NK Zellen signifikant vermindert war. Somit könnte die bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen vorhandene vermehrte Anzahl von MDSC in Milz und Myokard während der CVB3 Infektion zu einer verstärkten Produktion von MIP-1 α in NK Zellen führen und damit in einer erhöhten Einwanderung von Immunzellen wie Makrophagen und T-Zellen resultieren, wodurch es zur Progression der kardialen Inflammation kommt.

Als fördernd für die Expression von S100A8 und S100A9 und damit auch von MDSC wurde im Zusammenhang mit chronischen, durch wiederholte Gaben von Mykobakterium tuberculosis im

Mausmodell stimulierten Entzündungen, das Zytokin TNF α beschrieben (Sade-Feldman, Kanterman et al., 2013). Dieses pleiotrope Zytokin, welches proinflammatorische und immunoregulatorische Wirkung haben kann, wurde bereits beim Menschen und im Mausmodell auch im Zusammenhang mit einer CVB3 Myokarditis beschrieben (Henke, Mohr et al., 1992; Fairweather, Frisancho-Kiss et al., 2004). Ebenso wie IL-1 β und IL-6 steigt die Expression von TNF α während der akuten CVB3 Myokarditis im Herzmuskel an, was zur Aktivierung und Einwanderung von Immunzellen in das Myokard führt (Seko, Takahashi et al., 1997). MDSC-depletierte Mäuse wiesen nicht nur signifikant weniger TNF α mRNA im Myokard auf, auch die Immigration inflammatorischer Zellen wie Mac3⁺ Makrophagen, CD3⁺ T-Lymphozyten sowie S100A8/9⁺ Zellen war deutlich reduziert. Ursächlich für die Verminderung der TNF α Expression durch MDSC Depletion könnte die Interaktion mit NK Zellen sein. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass NK Zellen insbesondere bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen während der akuten CVB3 Infektion nach einer MDSC Depletion signifikant weniger TNF α produzieren als unbehandelte Tiere. Da TNF α ebenso aktivierend auf MDSC wirken kann (Elkabets, Ribeiro et al., 2010; Sade-Feldman, Kanterman et al., 2013), könnten weiterführende Untersuchungen eruieren, ob durch die kompetitive Bindung von TNF α durch das Protein Etanercept die Anzahl und Aktivität von MDSC reduziert werden könnte und inwieweit dies Einfluss auf den Verlauf der CVB3 Myokarditis hätte.

Über TNF α , MIP-1 α und IFN γ können NK Zellen regulierend auf das Immunsystem wirken (Lünemann, Lünemann et al., 2009). In Arbeiten mit Vaccinia Virus-infizierten Mäusen wurde gezeigt, dass eine *in vivo* Depletion von MDSC zu einer Proliferation von NK Zellen in der Milz führt sowie mit einer vermehrten Produktion von IFN γ und Granzym B korreliert (Fortin, Huang et al., 2012). Bei der hier untersuchten CVB3 Infektion wiesen Gr-1 depletierte suszeptible A.BY/SnJ Mäuse 8 Tage p.i. jedoch einen signifikant verminderten Gehalt an IFN γ in NK Zellen aus der Milz auf. Die Rolle des proinflammatorischen Zytokins IFN γ ist bei Untersuchungen von CVB3 Infektionen bisher unterschiedlich gewichtet worden (Henke, Zell et al., 2001). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass suszeptible A.BY/SnJ Mäuse einen deutlich niedrigeren und im Verlauf der CVB3 Infektion später ansteigenden Level an IFN γ im Myokard aufweisen als resistente C57BL/6J Mäuse, was zur Entstehung einer chronischen Myokarditis beiträgt (Szalay, Sauter et al., 2006). Gleichzeitig weist die CVB3 Infektion IFN Rezeptor-defizienter Mäuse eher auf eine große Relevanz von IFN α und β hin, da die Abwesenheit von IFN Typ 1 Rezeptoren, im Gegensatz zu IFN Typ 2 Rezeptoren, mit einer hohen Mortalität korreliert ist (Wessely, Klingel et al., 2001).

Andererseits zeigen unsere *in vivo* Analysen, dass MDSC die Zytokinproduktion von IFN γ , TNF α und MIP-1 α in NK Zellen eher stimulieren. Hinsichtlich ihrer Funktion lassen sich humane NK Zellen in verschiedene Subpopulationen unterteilen. Während ein Teil der NK Zellen unter anderem durch Granzym B und Perforin zytotoxisch gegenüber Zielzellen agiert, wirkt ein Teil der NK Zellen auch durch Zytokine wie IFN γ , MIP-1 α und TNF α regulierend auf das Immunsystem (Lünemann, Lünemann et al., 2009). Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass MDSC diese beiden Subpopulationen von NK Zellen bei der CVB3 Infektion unterschiedlich beeinflussen. Die Anwesenheit von MDSC führt einerseits zu einer Verminderung zytotoxischer NK Zellen mit Granzym B und NKG2D, wie sowohl von uns als auch in anderen Arbeiten *in vitro* gezeigt wurde (Fortin, Huang et al., 2012; Elkabets, Ribeiro et al., 2010). Auch in einem Lymphommausmodell fand sich bei *in vitro* Ko-Kultivierung von NK Zellen mit MDSC eine vermehrte Expression von IFN γ in NK Zellen (Nausch, Galani et al., 2008). Unter anderem durch FACS Analysen, in denen NK Zellen vor und nach MDSC Depletion analysiert und durch ihre Oberflächenrezeptoren in zytotoxisch und regulatorisch wirkende Subpopulationen differenziert werden, könnte weitergehend untersucht werden, inwiefern MDSC unterschiedlich auf NK Zellen wirken.

Während TNF α und MIP-1 α eher als fördernd für die Virusreplikation und Inflammation bei der CVB3 Infektion bekannt sind (Cook, Beck et al., 1995; Huber, 2010), wurde bei der CVB3 Infektion für IFN γ zunächst eine protektive Wirkung beschrieben (Jarasch, Martin et al., 2005; Henke, Zell et al., 2001). Die reduzierte Produktion von TNF α und MIP-1 α in NK Zellen nach *in vivo* Depletion von MDSC steht in direktem Zusammenhang mit der Reduktion einwandernder Makrophagen und T-Lymphozyten, insbesondere in permissiven CVB3-infizierten A.BY/SnJ Mäusen. Sowohl in suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen als auch in resistenten C57BL/6J Mäusen konnte 8 Tage p.i. nach einer MDSC Depletion signifikant weniger CVB3 RNA-positive Zellen detektiert werden als bei unbehandelten Tieren zu diesem Zeitpunkt der Infektion. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch Untersuchungen, die zeigen, dass eine *in vivo* Depletion von MDSC auch in Vaccinia Virus-infizierten Mäusen mit einem reduzierten Virustiter einhergeht (Fortin, Huang et al., 2012). In unseren Untersuchungen fand sich nach Depletion von MDSC trotz einer Reduktion von IFN γ eine verminderte Virusreplikation und Immigration von Immunzellen und damit verbunden eine geringere Schädigung des Myokards in der frühen Phase der CVB3 Infektion. Somit ist es wahrscheinlich, dass MDSC durch ihr Einwirken auf das Immunsystem, nicht jedoch über die IFN γ Expression, eine Viruseliminierung von CVB3 hemmen.

Zusammenfassend führt eine Depletion von MDSC zu einer verminderten Progression der kardialen Inflammation durch eine limitierte Einwanderung von Immunzellen in das Myokard. Zudem geht die Depletion von MDSC mit einer reduzierten Expression proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , IL-6, TNF α und S100A8/9 im Myokard einher. Überdies ist die Virusinfektion in ihrer Ausbreitung messbar eingedämmt und die Virusreplikation vermindert. Somit legen die vorliegenden Ergebnisse nahe, dass die Abwesenheit von MDSC in suszeptiblen Mäusen einen positiven Einfluss auf die Schwere des Verlaufs einer CVB3 Myokarditis hat.

5.5. Ausblick

In diese Arbeit wurde erstmals im Mausmodell die Rolle von Myeloid-derived suppressor cells in der akuten Phase der CVB3 Myokarditis untersucht. Suszeptible AB.Y/SnJ Mäuse, die mit Viruspersistenz und progredienter kardialer Inflammation den chronischen Verlauf der humanen Myokarditis imitieren, wiesen dabei eine größere Anzahl an MDSC sowie größere Mengen an proinflammatorischen Zytokinen auf. Die hier erhaltenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass bei suszeptiblen Tieren in der akuten Phase der CVB3 Infektion MDSC funktionell Einfluss auf die NK Zellen nehmen, was mit einer reduzierten Zytotoxizität der NK Zellen einhergeht und hierdurch die Eindämmung der Virusinfektion beeinträchtigt ist. Zusätzlich wird bei suszeptiblen A.BY/SnJ Mäusen durch die verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine, welche unter anderem von MDSC exprimiert werden, die Entwicklung einer exzessiven Entzündung mit Myokardschädigung gefördert. Somit deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen kausalen Zusammenhang zwischen MDSC und der Entwicklung einer chronischen Virusmyokarditis durch Beeinflussung der frühen angeborenen Immunantwort hin. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, die Pathogenese dieser Erkrankung besser zu verstehen und neue therapeutische Ansätze zu entwickeln. Sowohl der Versuch die Bildung von MDSC durch TNF α Antagonisten (Sade-Feldman, Kanterman et al., 2013) wie auch die verstärkte Ausreifung von MDSC zu Makrophagen und dendritischen Zellen durch Paclitaxel (Michels, Shurin et al., 2012) zu verhindern, wäre hierbei als ein Therapieansatz denkbar.

6. Erklärung

Die Untersuchung der Zytokine nach einer MDSC Depletion (Kap.4.4.6 und 4.4.7) erfolgten mit Unterstützung von Frau Dr. M. Sauter (AG Prof. Dr. Klingel). Zur Bestätigung einzelner Ergebnisse wurden unabhängige Experimente von Frau S. Bundschuh (AG Prof. Dr. Klingel) durchgeführt und die Ergebnisse in die Auswertung mit einbezogen.

7. Zusammenfassung

Das Mausmodell der Coxsackievirus B3 (CVB3) Myokarditis spiegelt die unterschiedlichen Krankheitsverläufe der humanen Infektion von subklinischen Verläufen bis hin zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz infolge einer chronischen Myokarditis wider. Hierbei gelingt es resistenten C57BL/6J Mäusen das Virus in der akuten Phase zu eliminieren, bei permissiven A.BY/SnJ Mäusen entwickelt sich jedoch eine chronische kardiale Inflammation auf Basis einer Viruspersistenz. In früheren Arbeiten konnten wir zeigen, dass Natürliche Killerzellen (NK Zellen) den Verlauf der murinen CVB3 Myokarditis positiv beeinflussen. Bei verschiedenen Virusinfektionen wurden Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) als potente Inhibitoren der angeborenen und erworbenen Immunantwort identifiziert. Da sich CVB3-infizierte susceptible A.BY/SnJ Mäuse von resistenten C57BL/6J Mäusen in Reifungsgrad und Funktionsfähigkeit der NK Zellen unterscheiden, wurde die Interaktion zwischen MDSC und NK Zellen untersucht.

In der Ko-Kultur CVB3-infizierter RAW Zellen mit NK Zellen und MDSC konnte eine signifikante Reduktion der CD107a und NKG2D Rezeptorexpression sowie der Expression von Granzym B in NK Zellen beobachtet werden, was auf eine durch MDSC verminderte Degranulationsfähigkeit der NK Zellen und folglich gestörte zytotoxische NK Zellfunktion hinweist. *In vivo* konnten wir in Milzen und Herzen susceptibler A.BY/SnJ Mäuse sowohl im naiven Zustand als auch 4 und 8 Tage p.i. signifikant mehr MDSC nachweisen als bei C57BL/6J Mäusen, die keine chronische CVB3 Myokarditis entwickeln. Weiterhin konnte bei A.BY/SnJ Mäusen im Verlauf der CVB3 Infektion im Myokard eine große Anzahl S100A8 und S100A9 exprimierender MDSC verbunden mit einer signifikanten Expressionszunahme von IL-1 β und IL-6 mRNA beobachtet werden. Diese proinflammatorischen Zytokine fördern die Akkumulation und Aktivierung von MDSC und begünstigen gleichzeitig die Entstehung kardialer entzündlicher Läsionen. Eine *in vivo* Depletion von MDSC durch anti-Ly6G Antikörper führte im Myokard CVB3-infizierter A.BY/SnJ Mäuse während der akuten Myokarditis zur Reduktion von S100A8, S100A9, IL-1 β , IL-6 und TNF α , verbunden mit einer reduzierten Einwanderung von inflammatorischen CD3⁺ T-Lymphozyten und Mac3⁺ Makrophagen sowie einer Verminderung der Viruslast. Hieraus lässt sich folgern, dass MDSC sowohl die zytotoxischen als auch die immunregulatorischen Funktionen von NK Zellen während der Enterovirusinfektion beeinflussen. Im Mausmodell der CVB3 Myokarditis hemmen MDSC in der frühen Phase der Infektion NK Zellen und tragen damit bei permissiven A.BY/SnJ Mäusen zu einem schwereren akuten Verlauf sowie der Entwicklung einer chronischen Myokarditis bei. Diese Erkenntnisse könnten durch die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien helfen Ansätze zu finden eine chronische Myokarditis und deren Konsequenz, die dilatative Kardiomyopathie, zu verhindern.

8. Summary

Myeloid-derived suppressor cells restrain Natural Killer cell activity in CVB3 myocarditis

Murine models of coxsackievirus B3 (CVB3) induced myocarditis (with host specific outcomes), represent different outcome of myocarditis, ranging from virus elimination and complete recovery in resistant C57BL/6J mice to virus persistence and chronic myocarditis in susceptible A.BY/SnJ mice. In previous experiments, we found that Natural Killer cells (NK cells) positively influence the outcome of CVB3 myocarditis in mice. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are potent inhibitors of the innate and adaptive immune response in different viral infections. Based on the findings that CVB3 infected susceptible A.BY/SnJ mice differ from C57BL/6 mice being resistant to chronic myocarditis, in their NK maturation profile, function and activation of NK cells, we investigated the molecular interplay between MDSC and NK cells.

Co culturing experiments of CVB3 infected RAW cells, NK cells and MDSC revealed a significant decrease of CD107a and NKG2D receptor expression as well as granzyme B expression on NK cells suggesting a disturbed cytotoxic NK cell function with reduction of NK degranulation by MDSC. *In vivo*, we observed significantly higher cell numbers of MDSC in spleens and hearts of A.BY/SnJ mice susceptible to chronic myocarditis compared to resistant C57BL/6 mice not only in naïve mice, but also day 4 and day 8 post infection (pi). Regarding the underlying mechanisms of MDSC attraction to the infected heart we identified S100 proteins, as well as IL-1 β and IL-6, as important proinflammatory factors. The numbers of S100A8 and S100A9 expressing MDSC in the heart as well as the levels of cardiac IL-1 β and IL6 mRNA were significantly higher in A.BY/SnJ mice than in resistant C57BL/6 mice. Depletion of MDSC by anti-Ly6G antibodies in CVB3 infected mice resulted in a downregulation of S100A8, S100A9, IL-1 β , IL-6 and TNF α in the heart which was accompanied by a significant decrease of infiltrating inflammatory CD3⁺ T lymphocytes and Mac3⁺ macrophages as well as a reduced viral load in A.BY/SnJ mice during acute myocarditis.

Here, we show that MDSC influence the cytotoxic activity along with the immune regulatory function of NK cells in enterovirus infection. In the murine model of CVB3 myocarditis MDSC obviously contribute to the suppression of NK cell function early in infection, thus leading to a severe acute CVB3 myocarditis and chronic course in ABY/SnJ mice. By developing new therapeutic strategies these observations might help to prevent chronic myocarditis and, thus dilated cardiomyopathy as a consequence of ongoing inflammation.

9. Literaturverzeichnis

Alter, G.; Malenfant, J. M.; Altfeld, M. (2004): CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 294(1-2), 15-22.

Althof, N.; Harkins, S.; Kembell, C. C.; Flynn, C. T.; Alirezai, M.; Whitton, J. L. (2014): In vivo ablation of type I interferon receptor from cardiomyocytes delays coxsackieviral clearance and accelerates myocardial disease. *J Virol*. 88(9), 5087-99.

Adams, M.J.; King, A.M.; Carstens, E.B. (2013): Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Arch Virol*. 158(9), 2023-30.

Atkinson, W.; Hamborsky, J.; Wolfe, S., (2012): Centers for Disease Control and Prevention. Poliomyelitis. In *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. Public Health Foundation: Washington DC. Volume 12, S. 249-261.

Baboonian, C.; Davies, M.J., Booth; J.C., McKenna, W.J. (1997): Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr Top Microbiol Immunol*. 223, 31-52.

Baschuk, N.; Wang, N.; Watt, S. V.; Halse, H.; House, C.; Bird, P. I.; Strugnell, R.; Trapani, J. A.; Smyth, M. J.; Andrews, D. M. (2014). NK cell intrinsic regulation of MIP-1alpha by granzyme M. *Cell Death Dis*. 5(2014), e11155.

Biron, C. A.; Brossay, L. (2001): NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol*. 13(4), 458-64.

Biron, C. A.; Nguyen, K. B.; Pien, G. C.; Cousens, L. P.; Salazar-Mather, T. P. (1999): Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*. 17, 189-220.

Bluman, E. M.; Bartynski, K. J.; Avalos, B. R.; Caligiuri, M. A. (1996): Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J Clin Invest*. 97(12), 2722-7.

Bowen, J. L.; Olson, J. K. (2009): Innate immune CD11b+Gr-1+ cells, suppressor cells, affect the immune response during Theiler's virus-induced demyelinating disease. *J Immunol*. 183(11), 6971-80.

Bowles, N. E.; Ni, J.; Kearney, D. L.; Pauschinger, M.; Schultheiss, H. P.; McCarthy, R.; Hare, J.; Bricker, J. T.; Bowles, K. R.; Towbin, J. A. (2003): Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol*. 42(3), 466-72.

Bowles, N. E.; Richardson, P. J.; Olsen, E. G.; Archard, L. C. (1986): Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 1(8490), 1120-3.

Brooksby, J. B. (1958): The virus of foot-and-mouth disease. *Adv Virus Res*. 5, 1-37.

- Browne E.P.** (2015): An interleukin-1 beta-encoding retrovirus exhibits enhanced replication in vivo. *J Virol.* 89(1), 155-64.
- Byrum, S. D.; Taverna, S. D.; Tackett, A. J.** (2011): Quantitative analysis of histone exchange for transcriptionally active chromatin. *J Clin Bioinforma.* 1(1), 17.
- Caforio, A.L.; Pankuweit, S.; Arbustini, E.; Basso, C.; Gimeno-Blanes, J.; Felix, S.B.; Fu, M.; Heliö, T.; Heymans, S.; Jahns, R.; Klingel, K.; Linhart, A.; Maisch, B.; McKenna, W.; Mogensen, J.; Pinto, Y.M.; Ristic, A.; Schultheiss, H.P.; Seggewiss, H.; Tavazzi, L.; Thiene, G.; Yilmaz, A.; Charron, P.; Elliott, P.M.; European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases** (2013): Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 34(33), 2636-2648.
- Calnek, B. W.** (1998): Control of avian encephalomyelitis: a historical account. *Avian Dis.* 42(4), 632-47.
- Carayannopoulos, L. N.; Naidenko, O. V.; Fremont, D. H.; Yokoyama, W. M.** (2002): Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol.* 169(8), 4079-83.
- Carocci, M.; Bakkali-Kassimi, L.** (2012): The encephalomyocarditis virus. *Virulence.* 3(4), 351-67.
- Cerwenka, A.; Bakker, A. B.; McClanahan, T.; Wagner, J.; Wu, J.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L.** (2000): Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity.* 12(6), 721-7.
- Champsaur, M.; Lanier, L. L.** (2010): Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev.* 235(1), 267-85.
- Cheng, P.; Corzo, C. A.; Luetsteke, N.; Yu, B.; Nagaraj, S.; Bui, M. M.; Ortiz, M.; Nacken, W.; Sorg, C.; Vogl, T.; Roth, J.; Gabrilovich, D. I.** (2008): Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med.* 205(10), 2235-49.
- Chiu, S. C.; Hu, S. C.; Chang, C. C.; Chang, C. Y.; Huang, C. C.; Pang, V. F.; Wang, F. I.** (2012): The role of porcine teschovirus in causing diseases in endemically infected pigs. *Vet Microbiol.* 161(1-2), 88-95.
- Chow, L. H.; Gauntt, C. J.; McManus, B. M.** (1991): Differential effects of myocarditic variants of Coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage. *Lab Invest.* 64(1), 55-64.
- Cohen, I. S.; Anderson, D. W.; Virmani, R.; Reen, B. M.; Macher, A. M.; Sennesh, J.; DiLorenzo, P.; Redfield, R. R.** (1986): Congestive cardiomyopathy in association with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 315(10), 628-30.

- Cook, D.N.; Beck, M.A., Coffman T.M.; Kirby, S.L.; Sheridan, J.F.; Pragnell, I.B.; Smithies, O.** (1995): Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science*. 269(5230), 1583-5.
- Coombes, J. L.; Han, S. J.; van Rooijen, N.; Raulet, D. H.; Robey, E. A.** (2012): Infection-induced regulation of natural killer cells by macrophages and collagen at the lymph node subcapsular sinus. *Cell Rep*. 2(1), 124-35.
- Cooper, L. T., Jr.** (2009): Myocarditis. *N Engl J Med*. 360(15), 1526-38.
- Cooper, L. T., Jr.; Berry, G. J.; Shabetai, R.** (1997): Idiopathic giant-cell myocarditis--natural history and treatment. Multicenter Giant Cell Myocarditis Study Group Investigators. *N Engl J Med*. 336(26), 1860-6.
- Coppieters, K.T., Boettler, T., von Herrath, M.** (2012): Virus infections in type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2(1), a007682.
- Coyne, C. B.; Bergelson, J. M.** (2006): Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*. 124(1), 119-31.
- Cuervo, H.; Guerrero, N.A.; Carbajosa, S.; Beschin, A.; De Baetselier, P.; Gironès, N.; Fresno, M.** (2011): Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the heart in acute Trypanosoma cruzi infection. *J Immunol*. 187(5), 2656-65.
- De Santo, C.; Salio, M.; Masri, S. H.; Lee, L. Y.; Dong, T.; Speak, A. O.; Porubsky, S.; Booth, S.; Veerapen, N.; Besra, G. S.; Grone, H. J.; Platt, F. M.; Zambon, M.; Cerundolo, V.** (2008): Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. *J Clin Invest*. 118(12), 4036-48.
- Dinarello, C. A.** (2011): A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol*. 41(5), 1203-17.
- Donato, R.** (2001): S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 33(7), 637-68.
- Elkabets, M.; Ribeiro, V. S.; Dinarello, C. A.; Ostrand-Rosenberg, S.; Di Santo, J. P.; Apte, R. N.; Vosshenrich, C. A.** (2010): IL-1beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur J Immunol*. 40(12), 3347-57.
- Esfandiarei, M.; McManus, B. M.** (2008): Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol*. 3, 127-55.
- Fairweather, D.; Frisancho-Kiss, S.; Gatewood, S.; Njoku, D.; Steele, R.; Barrett, M.; Rose, N. R.** (2004): Mast cells and innate cytokines are associated with susceptibility to autoimmune heart disease following coxsackievirus B3 infection. *Autoimmunity*. 37(2), 131-45.
- Fairweather, D.; Frisancho-Kiss, S.; Njoku, D. B.; Nyland, J. F.; Kaya, Z.; Yusing, S. A.; Davis, S. E.; Frisancho, J. A.; Barrett, M. A.; Rose, N. R.** (2006): Complement receptor 1 and 2 deficiency increases coxsackievirus B3-induced myocarditis, dilated cardiomyopathy, and heart failure by increasing macrophages, IL-1beta, and immune complex deposition in the heart. *J Immunol*. 176(6), 3516-24.

- Fairweather, D.; Yusung, S.; Frisancho, S.; Barrett, M.; Gatewood, S.; Steele, R.; Rose, N. R.** (2003): IL-12 receptor beta 1 and Toll-like receptor 4 increase IL-1 beta- and IL-18-associated myocarditis and coxsackievirus replication. *J Immunol.* 170(9), 4731-7.
- Fang, Z.; Li, J.; Yu, X.; Zhang, D.; Ren, G.; Shi, B.; Wang, C.; Kosinska, A.D.; Wang, S.; Zhou, X.; Kozlowski, M.; Hu, Y.; Yuan, Z.** (2015): Polarization of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells by Hepatitis B Surface Antigen Is Mediated via ERK/IL-6/STAT3 Signaling Feedback and Restrains the Activation of T Cells in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J Immunol.* 195(10), 4873-83.
- Feldman, A. M.; McNamara, D.** (2000): Myocarditis. *N Engl J Med.* 343(19), 1388-98.
- Fibbe, W. E.; van Damme, J.; Billiau, A.; Voogt, P. J.; Duinkerken, N.; Kluck, P. M.; Falkenburg, J. H.** (1986): Interleukin-1 (22-K factor) induces release of granulocyte-macrophage colony-stimulating activity from human mononuclear phagocytes. *Blood.* 68(6), 1316-21.
- Foell, D.; Wittkowski, H.; Vogl, T.; Roth, J.** (2007): S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol.* 81(1), 28-37.
- Fortin, C.; Huang, X.; Yang, Y.** (2012): NK cell response to vaccinia virus is regulated by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 189(4), 1843-9.
- Foti, E.; Ferrandina, G.; Martucci, R.; Romanini, M. E.; Benedetti Panici, P.; Testa, U.; Mancuso, S.; Scambia, G.** (1999): IL-6, M-CSF and IAP cytokines in ovarian cancer: simultaneous assessment of serum levels. *Oncology.* 57(3), 211-5.
- French, A. R.; Yokoyama, W. M.** (2003): Natural killer cells and viral infections. *Curr Opin Immunol.* 15(1), 45-51.
- Gaaloul, I., Riabi, S., Harrath, R., Evans, M., Huber, S., Aouni, M.** (2011): Coxsackie B3 myocarditis in a case of sudden unexpected death in young athlete: histopathological, immunohistochemical and molecularpathological for diagnosis. *Forensic Sci Int.* 208(1-3), e10–e14.
- Gabrilovich, D. I.; Nagaraj, S.** (2009): Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 9(3), 162-74.
- Garcia-Sastre, A.; Biron, C. A.** (2006): Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science.* 312(5775), 879-82.
- Garg, A.; Spector, S. A.** (2014): HIV type 1 gp120-induced expansion of myeloid derived suppressor cells is dependent on interleukin 6 and suppresses immunity. *J Infect Dis.* 209(3), 441-51.
- Gasser, S.; Orsulic, S.; Brown, E. J.; Raulet, D. H.** (2005): The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature.* 436(7054), 1186-90.
- Gauntt, C. J.; Godeny, E. K.; Lutton, C. W.; Fernandes, G.** (1989): Role of natural killer cells in experimental murine myocarditis. *Springer Semin Immunopathol.* 11(1), 51-9.

- Gifford, R.; Dalldorf, G.** (1951): The morbid anatomy of experimental Coxsackie virus infection. *Am J Pathol.* 27(6), 1047-63.
- Godeny, E. K.; Gauntt, C. J.** (1986): Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis. *J Immunol.* 137(5), 1695-702.
- Godeny, E. K.; Gauntt, C. J.** (1987): Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol.* 139(3), 913-8.
- Goh, C.; Narayanan, S.; Hahn, Y. S.** (2013): Myeloid-derived suppressor cells: the dark knight or the joker in viral infections? *Immunol Rev.* 255(1), 210-21.
- Grist, N. R.; Reid, D.** (1997): Organisms in myocarditis/endocarditis viruses. *J Infect.* 34(2), 155.
- Guidotti, L. G.; Chisari, F. V.** (2001): Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol.* 19, 65-91.
- Heizmann, C. W.; Fritz, G.; Schafer, B. W.** (2002): S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci.* 7, d1356-68.
- Henke, A.; Huber, S.; Stelzner, A.; Whitton, J.L.** (1995): The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol.* 69(11), 6720-8.
- Henke, A.; Mohr, C.; Sprenger, H.; Graebner, C.; Stelzner, A.; Nain, M.; Gemsa, D.** (1992): Coxsackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 in human monocytes. *J Immunol.* 148(7), 2270-7.
- Henke, A.; Zell, R.; Ehrlich, G.; Stelzner, A.** (2001): Expression of immunoregulatory cytokines by recombinant coxsackievirus B3 variants confers protection against virus-caused myocarditis. *J Virol.* 75(17), 8187-94.
- Hia, C. P.; Yip, W. C.; Tai, B. C.; Quek, S. C.** (2004): Immunosuppressive therapy in acute myocarditis: an 18 year systematic review. *Arch Dis Child.* 89(6), 580-4.
- Hodge, D. R.; Hurt, E. M.; Farrar, W. L.** (2005): The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer.* 41(16), 2502-12.
- Hoechst, B.; Ormandy, L. A.; Ballmaier, M.; Lehner, F.; Kruger, C.; Manns, M. P.; Greten, T. F.; Korangy, F.** (2008): A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology.* 135(1), 234-43.
- Hogle, J. M.; Chow, M.; Filman, D. J.** (1985): Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 A resolution. *Science.* 229(4720), 1358-65.
- Hohenadl, C.; Klingel, K.; Mertsching, J.; Hofschneider, P. H.; Kandolf, R.** (1991): Strand-specific detection of enteroviral RNA in myocardial tissue by in situ hybridization. *Mol Cell Probes.* 5(1), 11-20.

- Hollyoake, M.; Campbell, R. D.; Aguado, B.** (2005): NKp30 (NCR3) is a pseudogene in 12 inbred and wild mouse strains, but an expressed gene in *Mus caroli*. *Mol Biol Evol.* 22(8), 1661-72.
- Huber S.** (2010): Tumor necrosis factor-alpha promotes myocarditis in female mice infected with coxsackievirus B3 through upregulation of CD1d on hematopoietic cells. *Viral Immunol.* 23(1), 79-86.
- Jamal, S. M.; Belsham, G. J.** (2013): Foot-and-mouth disease: past, present and future. *Vet Res.* 44, 116.
- Jamieson, A.M.; Diefenbach, A., McMahon, C.W.; Xiong, N.; Carlyle, J.R.; Raulet, D.H.** (2002): The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity.* 17(1), 19-29.
- Jarasch, N.; Martin, U.; Kamphausen, E.; Zell, R.; Wutzler, P.; Henke, A.** (2005): Interferon-gamma-induced activation of nitric oxide-mediated antiviral activity of macrophages caused by a recombinant coxsackievirus B3. *Viral Immunol.* 18(2), 355-64.
- Kaisho, T.; Akira, S.** (2003): Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr Mol Med.* 3(4), 373-85.
- Kakalacheva, K.; Maurer, M. A.; Tackenberg, B.; Munz, C.; Willcox, N.; Lünemann, J. D.** (2011): Intrathymic Epstein-Barr virus infection is not a prominent feature of myasthenia gravis. *Ann Neurol.* 70(3), 508-14.
- Kandolf, R.** (2004): Virus etiology of inflammatory cardiomyopathy. *Dtsch Med Wochenschr.* 129(41), 2187-92.
- Kandolf, R.** (2011): Diagnosis of myocarditis. *Dtsch Med Wochenschr.* 136(16), 829-35.
- Kandolf, R.; Hofschneider, P. H.** (1989): Viral heart disease. *Springer Semin Immunopathol.* 11(1), 1-13.
- Kandolf, R.; Sauter, M.; Aepinus, C.; Schnorr, J. J.; Selinka, H. C.; Klingel, K.** (1999): Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus Res.* 62(2), 149-58.
- Kawai, C.** (1999): From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation.* 99(8), 1091-100.
- Kim, K. S.; Hufnagel, G.; Chapman, N. M.; Tracy, S.** (2001): The group B coxsackieviruses and myocarditis. *Rev Med Virol.* 11(6), 355-68.
- Kindermann, I.; Kindermann, M.; Kandolf, R.; Klingel, K.; Bültmann, B.; Müller, T.; Lindinger, A.; Böhm, M.** (2008): Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation.* 118(6), 639-48.
- Klingel, K.; Fabritius, C.; Sauter, M.; Goldner, K.; Stauch, D.; Kandolf, R.; Ettischer, N.; Gahlen, S.; Schonberger, T.; Ebner, S.; Makrigiannis, A. P.; Belanger, S.; Diefenbach, A.; Polic, B.; Pratschke, J.; Kotsch, K.** (2014): The activating receptor NKG2D of natural killer

cells promotes resistance against enterovirus-mediated inflammatory cardiomyopathy. *J Pathol.* 234(2), 164-77.

Klingel, K.; Hohenadl, C.; Canu, A.; Albrecht, M.; Seemann, M.; Mall, G.; Kandolf, R. (1992): Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(1), 314-8.

Klingel, K.; Kandolf, R. (1996): Molecular in situ localization techniques in diagnosis and pathogenicity studies of enteroviral heart disease. *Clin Diagn Virol.* 5(2-3), 157-66.

Klingel, K.; Lang, N.; Kandolf, R.; Netz, H. (2010): Lymphofollicular myocarditis: an unknown cause of terminal heart failure. *Eur Heart J.* 31(7), 892.

Klingel, K.; McManus, B. M.; Kandolf, R. (1995): Enterovirus-infected immune cells of spleen and lymph nodes in the murine model of chronic myocarditis: a role in pathogenesis? *Eur Heart J.* 16(suppl O), 42-45.

Klingel, K.; Schnorr, J. J.; Sauter, M.; Szalay, G.; Kandolf, R. (2003): beta2-microglobulin-associated regulation of interferon-gamma and virus-specific immunoglobulin G confer resistance against the development of chronic coxsackievirus myocarditis. *Am J Pathol.* 162(5), 1709-20.

Klingel, K.; Stephan, S.; Sauter, M.; Zell, R.; McManus, B. M.; Bültmann, B.; Kandolf, R. (1996): Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J Virol.* 70(12), 8888-95.

Krupitza, G.; Fritsche, R.; Dittrich, E.; Harant, H.; Huber, H.; Grunt, T.; Dittrich, C. (1995): Macrophage colony-stimulating factor is expressed by an ovarian carcinoma subline and stimulates the c-myc proto-oncogene. *Br J Cancer.* 72(1), 35-40.

Kühl, U.; Pauschinger, M.; Noutsias, M.; Seeberg, B.; Bock, T.; Lassner, D.; Poller, W.; Kandolf, R.; Schultheiss, H. P. (2005): High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation.* 111(7), 887-93.

Lanier, L. L. (2005): NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 23, 225-74.

Lanier, L. L. (2005): NKG2D in innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol.* 560, 51-6.

Lapaque, N.; Walzer, T.; Meresse, S.; Vivier, E.; Trowsdale, J. (2009): Interactions between human NK cells and macrophages in response to *Salmonella* infection. *J Immunol.* 182(7), 4339-48.

Lavender, K. J.; Kane, K. P. (2010): Determining ligand specificity of Ly49 receptors. *Methods Mol Biol.* 612, 299-311.

Lee, S. H.; Miyagi, T.; Biron, C. A. (2007): Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol.* 28(6), 252-9.

- Lehmann, C.; Zeis, M.; Uharek, L.** (2001): Activation of natural killer cells with interleukin 2 (IL-2) and IL-12 increases perforin binding and subsequent lysis of tumour cells. *Br J Haematol.* 114(3), 660-5.
- Li, H.; Han, Y.; Guo, Q.; Zhang, M.; Cao, X.** (2009): Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol.* 182(1), 240-9.
- Liu, C.; Zhang, C.; Lu, H.; Cai, J.; Wang, Z.; Chen, J.; Liu, F.; Wu, Z.; Liu, X.; Sun, W.** (2011): Poly(I:C) induce bone marrow precursor cells into myeloid-derived suppressor cells. *Mol Cell Biochem.* 358(1-2), 317-23.
- Liu, H.; Hanawa, H.; Yoshida, T.; Elnaggar, R.; Hayashi, M.; Watanabe, R.; Toba, K.; Yoshida, K.; Chang, H.; Okura, Y.; Kato, K.; Kodama, M.; Maruyama, H.; Miyazaki, J.; Nakazawa, M.; Aizawa, Y.** (2005): Effect of hydrodynamics-based gene delivery of plasmid DNA encoding interleukin-1 receptor antagonist-Ig for treatment of rat autoimmune myocarditis: possible mechanism for lymphocytes and noncardiac cells. *Circulation.* 111(13), 1593-600.
- Liu, P.; Martino, T.; Opavsky, M. A.; Penninger, J.** (1996): Viral myocarditis: balance between viral infection and immune response. *Can J Cardiol.* 12(10), 935-43.
- Liu, P. P.; Mason, J. W.** (2001): Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation.* 104(9), 1076-82.
- Liu, C.; Yu, S.; Kappes, J.; Wang, J.; Grizzle, W.E.; Zinn, K.R., Zhang, H.G.** (2007): Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood.* 109(10), 4336-42.
- Loh, J.; Chu, D. T.; O'Guin, A. K.; Yokoyama, W. M.; Virgin, H. W. t.** (2005): Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. *J Virol.* 79(1), 661-7.
- Lünemann, A.; Lünemann, J. D.; Munz, C.** (2009): Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med.* 15(9-10), 352-8.
- Macatangay, B. J.; Landay, A. L.; Rinaldo, C. R.** (2012): MDSC: a new player in HIV immunopathogenesis. *AIDS.* 26(12), 1567-9.
- Magnani, J. W.; Dec, G. W.** (2006): Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. *Circulation.* 113(6), 876-90.
- Maisch, B.; Portig, I.; Ristic, A.; Hufnagel, G.; Pankuweit, S.** (2000): Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report. *Herz.* 25(3), 200-9.
- Malarkannan, S.; Shih, P. P.; Eden, P. A.; Horng, T.; Zuberi, A. R.; Christianson, G.; Roopenian, D.; Shastri, N.** (1998): The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J Immunol.* 161(7), 3501-9.
- Mann, D. L.** (2001): Interleukin-6 and viral myocarditis: the Yin-Yang of cardiac innate immune responses. *J Mol Cell Cardiol.* 33(9), 1551-3.

- Mao, Q.; Wang, Y.; Yao, X.; Bian, L.; Wu, X.; Xu, M.; Liang, Z.** (2014): Coxsackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine. *Hum Vaccin Immunother.* 10(2), 360-7.
- Martino, A.; Badell, E.; Abadie, V.; Balloy, V.; Chignard, M.; Mistou, M. Y.; Combadiere, B.; Combadiere, C.; Winter, N.** (2010): Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin vaccination mobilizes innate myeloid-derived suppressor cells restraining in vivo T cell priming via IL-1R-dependent nitric oxide production. *J Immunol.* 184(4), 2038-47.
- Mason, J. W.** (2003): Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res.* 60(1), 5-10.
- Matsumori, A.** (2005): Hepatitis C virus infection and cardiomyopathies. *Circ Res.* 96(2), 144-7.
- Matsumori, A.; Yamada, T.; Suzuki, H.; Matoba, Y.; Sasayama, S.** (1994): Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J.* 72(6), 561-6.
- Mayr, A.; Rolle, M.** (2006): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Auflage - 8. Stuttgart: Enke Verlag. –ISBN: 978-3830410607. 324-338.
- Melnick, J. L.** (1996): Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: *Fields virology.* ed. 3 B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. –ISBN: 978-0781702539. 655–712.
- Melnick, J. L.; Godman, G. C.** (1951): Pathogenesis of coxsackie virus infection; multiplication of virus and evolution of the muscle lesion in mice. *J Exp Med.* 93(3), 247-66.
- Michels, T.; Shurin, G. V.; Naiditch, H.; Sevko, A.; Umansky, V.; Shurin, M. R.** (2012): Paclitaxel promotes differentiation of myeloid-derived suppressor cells into dendritic cells in vitro in a TLR4-independent manner. *J Immunotoxicol.* 9(3), 292-300.
- Mirandola, P.; Ponti, C.; Gobbi, G.; Sponzilli, I.; Vaccarezza, M.; Cocco, L.; Zauli, G.; Secchiero, P.; Manzoli, F. A.; Vitale, M.** (2004): Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood.* 104(8), 2418-24.
- Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U.; Schätzl, H.** (2010): *Molekulare Virologie.* Auflage -3. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. –ISBN: 978-3827418333. 145-175.
- Moore, B. W.** (1965): A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 19(6), 739-44.
- Morales-Garcia, G.; Falfan-Valencia, R.; Garcia-Ramirez, R. A.; Camarena, A.; Ramirez-Venegas, A.; Castillejos-Lopez, M.; Perez-Rodriguez, M.; Gonzalez-Bonilla, C.; Grajales-Muniz, C.; Borja-Aburto, V.; Mejia-Arangure, J. M.** (2012): Pandemic influenza A/H1N1 virus infection and TNF, LTA, IL1B, IL6, IL8, and CCL polymorphisms in Mexican population: a case-control study. *BMC Infect Dis.* 12, 299.
- Nausch, N.; Cerwenka, A.** (2008): NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene.* 27(45), 5944-58.

- Nausch, N.; Galani, I.E.; Schlecker, E.; Cerwenka, A.** (2008): Mononuclear myeloid-derived "suppressor" cells express RAE-1 and activate natural killer cells. *Blood*. 112(10), 4080-9.
- Nelson, D. A.; Chauhan, V. S.; Tolbert, M. D.; Bost, K. L.** (2012): Murine gammaherpesvirus-68 expands, but does not activate, CD11b+ gr-1+ splenocytes in vivo. *J Inflamm (Lond)*. 9, 14.
- Nishikawa, M.; Hashida, M.; Takakura, Y.** (2009): Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. *Adv Drug Deliv Rev*. 61(4), 319-26.
- Nishio, R.; Matsumori, A.; Shioi, T.; Ishida, H.; Sasayama, S.** (1999): Treatment of experimental viral myocarditis with interleukin-10. *Circulation*. 100(10), 1102-8.
- O'Neill, L. A.; Greene, C.** (1998): Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol*. 63(6), 650-7.
- Obermajer, N.; Muthuswamy, R.; Lesnock, J.; Edwards, R. P.; Kalinski, P.** (2011): Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood*. 118(20), 5498-505.
- Odink, K.; Cerletti, N.; Bruggen, J.; Clerc, R. G.; Tarcsay, L.; Zwadlo, G.; Gerhards, G.; Schlegel, R.; Sorg, C.** (1987): Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature*. 330(6143), 80-2.
- Opavsky, M. A.; Penninger, J.; Aitken, K.; Wen, W. H.; Dawood, F.; Mak, T.; Liu, P.** (1999): Susceptibility to myocarditis is dependent on the response of alphabeta T lymphocytes to coxsackieviral infection. *Circ Res*. 85(6), 551-8.
- Oppenheim, J. J.; Yang, D.** (2005): Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 17(4), 359-65.
- Orange, J. S.** (2002): Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect*. 4(15), 1545-58.
- Orange, J. S.** (2006): Human natural killer cell deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 6(6), 399-409.
- Orange, J. S.; Wang, B.; Terhorst, C.; Biron, C. A.** (1995): Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med*. 182(4), 1045-56.
- Ostrand-Rosenberg, S.; Sinha, P.** (2009): Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*. 182(8), 4499-506.
- Pan, P. Y.; Wang, G. X.; Yin, B.; Ozao, J.; Ku, T.; Divino, C. M.; Chen, S. H.** (2008): Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood*. 111(1), 219-28.
- Pankuweit, S.; Klingel, K.** (2013): Viral myocarditis: from experimental models to molecular diagnosis in patients. *Heart Fail Rev*. 18(6), 683-702.

- Paul, A. V.; van Boom, J. H.; Filippov, D.; Wimmer, E.** (1998): Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*. 393(6682), 280-4.
- Peranzoni, E.; Zilio, S.; Marigo, I.; Dolcetti, L.; Zanovello, P.; Mandruzzato, S.; Bronte, V.** (2010): Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol*. 22(2), 238-44.
- Phillip, J. I.; Darbyshire, J. H.** (1971): Respiratory viruses of cattle. *Adv Vet Sci Comp Med*. 15, 159-99.
- Poffenberger, M. C.; Straka, N.; El Warry, N.; Fang, D.; Shanina, I.; Horwitz, M. S.** (2009): Lack of IL-6 during coxsackievirus infection heightens the early immune response resulting in increased severity of chronic autoimmune myocarditis. *PLoS One*. 4(7), e6207.
- Racaniello, V.** (2001): Picornaviridae; the viruses and their replication. In: *Field's Virology*. ed.4. D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, S. E. Straus. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, –ISBN: 978-0781718325. 685-722.
- Raulet, D. H.** (2003): Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 3(10), 781-90.
- Reefman, E.; Kay, J. G.; Wood, S. M.; Offenhauser, C.; Brown, D. L.; Roy, S.; Stanley, A. C.; Low, P. C.; Manderson, A. P.; Stow, J. L.** (2010): Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. *J Immunol*. 184(9), 4852-62.
- Roda, J. M.; Parihar, R.; Magro, C.; Nuovo, G. J.; Tridandapani, S.; Carson, W. E. 3rd** (2006): Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Res*. 66(1), 517-26.
- Roth, J.; Teigelkamp, S.; Wilke, M.; Grun, L.; Tummler, B.; Sorg, C.** (1992): Complex pattern of the myelo-monocytic differentiation antigens MRP8 and MRP14 during chronic airway inflammation. *Immunobiology*. 186(3-4), 304-14.
- Roth, J.; Vogl, T.; Sorg, C.; Sunderkotter, C.** (2003): Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol*. 24(4), 155-8.
- Sade-Feldman, M.; Kanterman, J.; Ish-Shalom, E.; Elnekave, M.; Horwitz, E.; Baniyash, M.** (2013): Tumor necrosis factor-alpha blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity*. 38(3), 541-54.
- Sahoo, M.; Ceballos-Olvera, I.; del Barrio, L.; Re, F.** (2011): Role of the inflammasome, IL-1beta, and IL-18 in bacterial infections. *ScientificWorldJournal*. 11, 2037-50.
- Salazar-Mather, T. P.; Lewis, C. A.; Biron, C. A.** (2002): Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1alpha delivery to the liver. *J Clin Invest*. 110(3), 321-30.
- Saleem, S.J.; Martin, R.K.; Morales, J.K.; Sturgill, J.L.; Gibb, D.R.; Graham, L.; Bear, H.D.; Manjili, M.H.; Ryan, J.J.; Conrad, D.H.** (2012): Cutting edge: mast cells critically augment myeloid-derived suppressor cell activity. *J Immunol*. 189(2), 511-5.

- Sander, L. E.; Sackett, S. D.; Dierssen, U.; Beraza, N.; Linke, R. P.; Müller, M.; Blander, J. M.; Tacke, F.; Trautwein, C.** (2010): Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med.* 207(7), 1453-64.
- Saraste, A.; Arola, A.; Vuorinen, T.; Kyto, V.; Kallajoki, M.; Pulkki, K.; Voipio-Pulkki, L. M.; Hyypia, T.** (2003): Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc Pathol.* 12(5), 255-62.
- Sato, K.; Hida, S.; Takayanagi, H.; Yokochi, T.; Kayagaki, N.; Takeda, K.; Yagita, H.; Okumura, K.; Tanaka, N.; Taniguchi, T.; Ogasawara, K.** (2001): Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol.* 31(11), 3138-46.
- Schmielau, J.; Finn, O. J.** (2001): Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 61(12), 4756-60.
- Schmitz, N.; Kurrer, M.; Bachmann, M.F.; Kopf, M.** (2005): Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection. *J Virol.* 79(10), 6441-8.
- Schwimmbeck, P. L.; Badorff, C.; Rohn, G.; Schulze, K.; Schultheiss, H. P.** (1996): The role of sensitized T-cells in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 54(2), 117-25.
- Seelentag, W.; Mermod, J. J.; Vassalli, P.** (1989): Interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha additively increase the levels of granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factor (CSF) mRNA in human fibroblasts. *Eur J Immunol.* 19(1), 209-12.
- Seko, Y.; Matsuda, H.; Kato, K.; Hashimoto, Y.; Yagita, H.; Okumura, K.; Yazaki, Y.** (1993): Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J Clin Invest.* 91(4), 1327-36.
- Seko, Y.; Takahashi, N.; Yagita, H.; Okumura, K.; Yazaki, Y.** (1997): Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus b3. *J Pathol.* 183(1), 105-8.
- Seko, Y.; Tsuchimochi, H.; Nakamura, T.; Okumura, K.; Naito, S.; Imataka, K.; Fujii, J.; Takaku, F.; Yazaki, Y.** (1990): Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3. *Circ Res.* 67(2), 360-7.
- Serafini, P.; Carbley, R.; Noonan, K. A.; Tan, G.; Bronte, V.; Borrello, I.** (2004): High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 64(17), 6337-43.
- Shioi, T.; Matsumori, A.; Sasayama, S.** (1996): Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation.* 94(11), 2930-7.
- Sica, A.; Bronte, V.** (2007): Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest.* 117(5), 1155-66.

- Sinha, P.; Clements, V. K.; Ostrand-Rosenberg, S.** (2005): Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res.* 65(24), 11743-51.
- Sinha, P.; Okoro, C.; Foell, D.; Freeze, H. H.; Ostrand-Rosenberg, S.; Srikrishna, G.** (2008): Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 181(7), 4666-75.
- Sivori, S.; Vitale, M.; Morelli, L.; Sanseverino, L.; Augugliaro, R.; Bottino, C.; Moretta, L.; Moretta, A.** (1997): p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med.* 186(7), 1129-36.
- Skabytska, Y.; Biedermann, T.** (2015): Cutaneous bacteria induce immunosuppression. *Oncotarget.* 6(31), 30441-2.
- Song, X.; Krelin, Y.; Dvorkin, T.; Bjorkdahl, O.; Segal, S.; Dinarello, C. A.; Voronov, E.; Apte, R. N.** (2005): CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *J Immunol.* 175(12), 8200-8.
- Srivastava, M. K.; Bosch, J. J.; Thompson, J. A.; Ksander, B. R.; Edelman, M. J.; Ostrand-Rosenberg, S.** (2008): Lung cancer patients' CD4(+) T cells are activated in vitro by MHC II cell-based vaccines despite the presence of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother.* 57(10), 1493-504.
- Swain, R. H.; Mitchell, R. G.** (1953): The isolation of a Coxsackievirus from two cases of Bornholm disease. *Br Med J.* 1(4824), 1354-6.
- Szalay, G.; Sauter, M.; Hald, J.; Weinzierl, A.; Kandolf, R.; Klingel, K.** (2006): Sustained nitric oxide synthesis contributes to immunopathology in ongoing myocarditis attributable to interleukin-10 disorders. *Am J Pathol.* 169(6), 2085-93.
- Tacke, R. S.; Lee, H. C.; Goh, C.; Courtney, J.; Polyak, S. J.; Rosen, H. R.; Hahn, Y. S.** (2012): Myeloid suppressor cells induced by hepatitis C virus suppress T-cell responses through the production of reactive oxygen species. *Hepatology.* 55(2), 343-53.
- Tacken, P. J.; Ginter, W.; Berod, L.; Cruz, L. J.; Joosten, B.; Sparwasser, T.; Figdor, C. G.; Cambi, A.** (2011): Targeting DC-SIGN via its neck region leads to prolonged antigen residence in early endosomes, delayed lysosomal degradation, and cross-presentation. *Blood.* 118(15), 4111-9.
- Talmadge, J. E.; Gabilovich, D. I.** (2013): History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer.* 13(10), 739-52.
- Tapparel, C.; Siegrist, F.; Petty, T. J.; Kaiser, L.** (2013): Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol.* 14, 282-93.
- Tomko, R. P.; Xu, R.; Philipson, L.** (1997): HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(7), 3352-6.

Toutouzas, K.; Riga, M.; Stefanadi, E.; Stefanadis, C. (2008): Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other endogenous nitric oxide synthase (NOS) inhibitors as an important cause of vascular insulin resistance. *Horm Metab Res.* 40(9), 655-9.

Tu, S.; Bhagat, G.; Cui, G.; Takaishi, S.; Kurt-Jones, E. A.; Rickman, B.; Betz, K. S.; Penz-Oesterreicher, M.; Bjorkdahl, O.; Fox, J. G.; Wang, T. C. (2008): Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell.* 14(5), 408-19.

Umemura, N.; Saio, M.; Suwa, T.; Kitoh, Y.; Bai, J.; Nonaka, K.; Ouyang, G. F.; Okada, M.; Balazs, M.; Adany, R.; Shibata, T.; Takami, T. (2008): Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J Leukoc Biol.* 83(5), 1136-44.

Van der Linden, L., Wolthers, K.C., van Kuppeveld, F.J. (2015): Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses.* 7(8), 4529-62.

Van Ginderachter, J. A.; Beschin, A.; De Baetselier, P.; Raes, G. (2010): Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections. *Eur J Immunol.* 40(11), 2976-85.

Verma, N.A.; Zheng, X.T., Harris, M.U.; Cadichon, S.B.; Melin-Aldana, H.; Khetsuriani, N.; Oberste, M.S.; Shulman, S.T. (2009): Outbreak of life-threatening coxsackievirus B1 myocarditis in neonates. *Clin Infect Dis.* 49(5), 759-63.

Vidal, S. M.; Lanier, L. L. (2006): NK cell recognition of mouse cytomegalovirus-infected cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 298, 183-206.

Vivier, E.; Raulet, D. H.; Moretta, A.; Caligiuri, M. A.; Zitvogel, L.; Lanier, L. L.; Yokoyama, W. M.; Ugolini, S. (2011): Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 331(6013), 44-9.

Vollbrecht, T.; Stirner, R.; Tufman, A.; Roeder, J.; Huber, R.M.; Bogner, J.R.; Lechner, A.; Bourquin, C.; Draenert, R. (2012): Chronic progressive HIV-1 infection is associated with elevated levels of myeloid-derived suppressor cells. *AIDS.* 26(12), F31-7

Wang, X.; Bergelson, J. M. (1999): Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J Virol.* 73(3), 2559-62.

Weinzierl, A. O.; Szalay, G.; Wolburg, H.; Sauter, M.; Rammensee, H. G.; Kandolf, R.; Stevanovic, S.; Klingel, K. (2008): Effective chemokine secretion by dendritic cells and expansion of cross-presenting CD4-/CD8+ dendritic cells define a protective phenotype in the mouse model of coxsackievirus myocarditis. *J Virol.* 82(16), 8149-60.

Welsh, R. M.; Biron, C. A.; Bukowski, J. F.; McIntyre, K. W.; Yang, H. (1984): Role of natural killer cells in virus infections of mice. *Surv Synth Pathol Res.* 3(5), 409-31.

Wessely, R.; Klingel, K.; Knowlton, K. U.; Kandolf, R. (2001): Cardiospecific infection with coxsackievirus B3 requires intact type I interferon signaling: implications for mortality and early viral replication. *Circulation.* 103(5), 756-61.

- Whitton, J. L.; Cornell, C. T.; Feuer, R.** (2005): Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol.* 3(10), 765-76.
- Wolff, P. G.; Kühl, U.; Schultheiss, H. P.** (1989): Laminin distribution and autoantibodies to laminin in dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Am Heart J.* 117(6), 1303-9.
- Woodruff, J. F.** (1980): Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol.* 101(2), 425-84.
- Woodruff, J. F.; Woodruff, J. J.** (1974): Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackie virus B3 heart disease. *J Immunol.* 113(6), 1726-34.
- Yajima, T.** (2011): Viral myocarditis: potential defense mechanisms within the cardiomyocyte against virus infection. *Future Microbiol.* 6(5), 551-66.
- Yao, T.; Lu, W.; Zhu, J.; Jin, X.; Ma, G.; Wang, Y.; Meng, S.; Zhang, Y.; Li, Y.; Shen, C.** (2015): Role of CD11b+Gr-1+ myeloid cells in AGEs-induced myocardial injury in a mice model of acute myocardial infarction. *Int J Clin Exp Pathol.* 8(3), 3238-49.
- Yilmaz, A.; Kindermann, I.; Kindermann, M.; Mahfoud, F.; Ukena, C.; Athanasiadis, A.; Hill, S.; Mahrholdt, H.; Voehringer, M.; Schieber, M.; Klingel, K.; Kandolf, R.; Böhm, M.; Sechtem, U.** (2010): Comparative evaluation of left and right ventricular endomyocardial biopsy: differences in complication rate and diagnostic performance. *Circulation.* 122(9), 900-9.
- Yokoyama W.M.** (1998): Natural killer cell receptors. *Curr Opin Immunol.* 10(3), 298-305.
- Youn, J. I.; Nagaraj, S.; Collazo, M.; Gabilovich, D. I.** (2008): Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 181(8), 5791-802.
- Young, M. R.; Newby, M.; Wepsic, H. T.** (1987): Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res.* 47(1), 100-5.
- Zea, A. H.; Rodriguez, P. C.; Atkins, M. B.; Hernandez, C.; Signoretti, S.; Zabaleta, J.; McDermott, D.; Quiceno, D.; Youmans, A.; O'Neill, A.; Mier, J.; Ochoa, A. C.** (2005): Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 65(8), 3044-8.
- Zhu, B.; Bando, Y.; Xiao, S.; Yang, K.; Anderson, A. C.; Kuchroo, V. K.; Khoury, S. J.** (2007): CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 179(8), 5228-37.
- Zhu, J.; Huang, X.; Yang, Y.** (2012): Myeloid-derived suppressor cells regulate natural killer cell response to adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol.* 86(24), 13689-96.
- Zwadlo, G.; Bruggen, J.; Gerhards, G.; Schlegel, R.; Sorg, C.** (1988): Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin Exp Immunol.* 72(3), 510-5.

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Klassifikation der Virusfamilie Picornaviridae	7
Abb. 2: Schematische Darstellung des Enterovirusgenoms	11
Abb. 3: Replikationszyklus der Enteroviren	12
Abb. 4: Histologische Darstellung der chronischen Myokarditis und dilatativen Kardiomyopathie	13
Abb. 5: Reifungsgrad und Funktionalität der NK Zellen von A.BY/SnJ und C57BL/6J	19
Abb. 6: Entstehung von MDSC	19
Abb. 7: Delta-Ct-Methode zur relativen Quantifizierung von DNA/RNA	34
Abb. 8: Schema der MDSC Depletion in vivo	49
Abb. 9: Histologische Darstellung des Myokards 8 Tage p.i. CVB3 (HE-Färbung).....	51
Abb. 10: Immunhistochemische Darstellung von Makrophagen und T-Lymphozyten im Myokard 8 Tage p.i. CVB3	52
Abb. 11: Radioaktive in situ Hybridisierung zur Darstellung von CVB3 RNA im Myokard an Tag 8 und Tag 28 p.i. CVB3; HE-Färbung.....	53
Abb. 12: Fibrose des Myokards 16 Tage und 64 Tage p.i. der CVB3 Infektion; Masson-Trichrom-Färbung.....	54
Abb. 13: FACS-Analyse von MDSC in der Milz einer naiven A.BY/SnJ Maus	56
Abb. 14: Durchflusszytometrische Darstellung der MDSC in A.BY/SnJ und C57BL/6J Mäusen im Verlauf der CVB3 Infektion.....	57
Abb. 15: Darstellung der granulozytären und monozytären MDSC Subpopulationen in der Milz mittels FACS-Analyse	58
Abb. 16: Durchflusszytometrie zur Darstellung der Anteile granulozytärer und monozytärer MDSC Subpopulationen an Immunzellen im Herz	60
Abb. 17: Immunfluoreszenzdarstellung von MDSC in der Milz einer naiven C57BL/6J Maus.....	61
Abb. 18: Immunfluoreszenzdarstellung von MDSC in der Milz von A.BY/SnJ Mäusen 4 Tage p.i. CVB3	62
Abb. 19: Immunfluoreszenzdarstellung von MDSC in der Milz von C57BL/6J Mäusen 4 Tage p.i. CVB3	63
Abb. 20: Immunfluoreszenzdarstellung von MDSC in Herzen von A.BY/SnJ Mäusen naiv sowie 4 Tage p.i. CVB3	64
Abb. 21: Darstellung des Einflusses von MDSC auf die Expression von CD107a auf NK Zellen in vitro mittels Durchflusszytometrie	66

Abb. 22: Darstellung des Einflusses von MDSC auf den Granzym B Gehalt und die NKG2D Expression von NK Zellen in vitro mittels Durchflusszytometrie	67
Abb. 23: Radioaktive in situ Hybridisierung zur Darstellung von IL-1 β mRNA im Herzgewebe während der akuten CVB3 Myokarditis bei C57BL/6J Mäusen; HE-Färbung	69
Abb. 24: Radioaktive in situ Hybridisierung zur Darstellung von IL-1 β mRNA im Herzgewebe während der akuten CVB3 Myokarditis bei A.BY/SnJ Mäusen; HE-Färbung.....	70
Abb. 25: Immunhistochemische Darstellung von IL-6 im Myokard	71
Abb. 26: Quantitative real-time RT-PCR Analyse des IL-1 β und IL-6 mRNA Gehaltes in Herzen	72
Abb. 27: Quantitative real-time RT-PCR Analyse des S100A8 und S100A9 mRNA Gehaltes in der Milz	73
Abb. 28: Quantitative real-time RT-PCR Analyse der Menge S100A8 und S100A9 mRNA im Myokard.....	75
Abb. 29: Durchflusszytometrie zum Nachweis von S100A8 und S100A9 Protein in CD11b ⁺ Gr-1 ⁺ Zellen der Milz	77
Abb. 30: Nachweis von S100A8 und S100A9 Protein in CD11b ⁺ Gr-1 ⁺ Zellen der Milz mittels Durchflusszytometrie.....	78
Abb. 31: Nachweis der in vivo Depletion von Gr-1 ⁺ Zellen in der Milz.....	79
Abb. 32: Quantitative real-time RT-PCR zur Darstellung der CVB3 Viruslast im Myokard bei Gr-1 Depletion in vivo	80
Abb. 33: Histologische Färbung (HE-Färbung) von Herzen nach Gr-1 Depletion in vivo	82
Abb. 34: Histologische Färbung von Herzen nach Gr-1 Depletion in vivo; HE-Färbung.....	83
Abb. 35: Masson-Trichrom und immunhistologische Färbung von Mac3 ⁺ Makrophagen und CD3 ⁺ T-Lymphozyten im Myokard nach Gr-1 Depletion in vivo.....	85
Abb. 36: Immunhistologische Analyse von Mac3 ⁺ Makrophagen in Herzen nach Gr-1 Depletion in vivo.....	86
Abb. 37: Immunhistologische Analyse von CD3 ⁺ T-Lymphozyten in Herzen nach Gr-1 Depletion in vivo.....	88
Abb. 38: Quantitative real-time RT-PCR Analyse von S100A8 mRNA im Herzen nach Gr-1 Depletion in vivo	89
Abb. 39: Quantitative real-time RT-PCR Analyse von S100A9 mRNA im Herzen nach Gr-1 Depletion in vivo	90
Abb. 40: HE und immunhistologische Färbung von CD3 ⁺ T-Lymphozyten, S100A8 ⁺ und S100A9 ⁺ Zellen im Myokard 4 Tage p.i. CVB3	92

Abb. 41: HE und immunhistologische Färbung von S100A8 ⁺ und S100A9 ⁺ Zellen im Pankreas 4 Tage p.i. CVB3	93
Abb. 42: Immunhistologische Analyse von S100A8 ⁺ Zellen in Herzen nach Gr-1 Depletion in vivo	94
Abb. 43: HE und immunhistologische Färbung von Mac3 ⁺ Makrophagen und S100A8 ⁺ Zellen im Myokard nach Gr-1 Depletion in vivo.....	96
Abb. 44: Quantitative real-time RT-PCR Analyse von IL-1 β mRNA im Herzen nach Gr-1 Depletion in vivo	97
Abb. 45: Quantitative real-time RT-PCR Analyse von IL-6 mRNA im Herzen nach Gr-1 Depletion in vivo.....	98
Abb. 46: Quantitative real-time RT-PCR Analyse von TNF α mRNA in Herzen nach Gr-1 Depletion in vivo	100
Abb. 47: Quantitative real-time RT-PCR Analyse von TNF α mRNA in NK Zellen der Milz nach Gr-1 Depletion in vivo.....	102
Abb. 48: Quantitative real-time RT-PCR Analyse von MIP-1 α mRNA in NK Zellen der Milz nach Gr-1 Depletion in vivo.....	103
Abb. 49: Quantitative real-time RT-PCR Analyse von IFN γ mRNA in NK Zellen der Milz nach Gr-1 Depletion in vivo.....	104

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TaqMan® - RT-PCR Ansatz	33
Tabelle 2: Parameter der RT-PCR Reaktion	34
Tabelle 3: Sequenzen der eingesetzten Primer	35
Tabelle 4: Anregungslaser und Emmissionsmaximum der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe .	41
Tabelle 5: Färbungsprotokolle für die Durchflusszytometrie	42
Tabelle 6: Färbung der Gefrierschnitte für Immunfluoreszenz.....	43
Tabelle 7: Verdünnungen der Immunfluoreszenzfärbungen	43
Tabelle 8: Antikörper in der Immunhistochemie	46

III. Anhang

III.I. Publikationsverzeichnis

Teile der hier vorgelegten Ergebnisse wurden bereits an anderer Stelle präsentiert.

Poster

Lisa Holz, Martina Sauter, Nicole Ettischer, Katja Kotsch, Reinhard Kandolf, and Karin Klingel (2013)

Myeloid derived suppressor cells restrain Natural Killer cell activity in CVB3 myocarditis

15th International Congress of Immunology, Mailand

K. Klingel, L. Holz, M. Sauter, N. Ettischer, R. Kandolf (2015)

The myeloid derived suppressor cell- determined innate immunity is decisive for the chronic course of viral myocarditis.

European Society of Cardiology Congress 2015, London

Vorträge

Lisa Holz, Martina Sauter, Nicole Ettischer, Reinhard Kandolf, and Karin Klingel (2014)

Myeloid derived suppressor cells restrain Natural Killer cell activity in CVB3 myocarditis

80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim (gehalten von Prof. Dr. Karin Klingel)

III.II. Danksagung

Während meiner wissenschaftlichen Arbeit erhielt ich von vielen Seiten Hilfe und Unterstützung, sowohl auf fachlicher als auch auf menschlicher Ebene, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Aus diesem Grund gilt mein besonderer Dank folgenden Personen.

Diese Dissertation wurde am Uniklinikum Tübingen in der Abteilung Molekulare Pathologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Reinhard Kandolf angefertigt. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit möchte ich ihm danken.

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Karin Klingel, die mir mit der Überlassung des Themas, der freundlichen Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und ihrer ausdauernden Betreuung die Möglichkeit gegeben hat, die Dissertation durchzuführen.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. vet. Klaus Osterrieder danke ich für die Bereitschaft, die externe Promotion zu betreuen und meine Arbeit vor der Fakultät für Tiermedizin der Freien Universität Berlin zu vertreten.

Bei Dr. med. vet. Martina Sauter möchte ich mich besonders für die Hilfestellungen und die Durchführung der Tierversuche und der *in situ* Hybridisierung bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei Sandra Bundschuh für die Ausdauer und Hilfe bei der Einarbeitung sowie die Anfertigung der histologischen Schnitte und Färbungen.

Ferner danke ich Dr. rer. nat. Oana Ursu und Dr. rer. nat. Nicole Ettischer für die Einarbeitung in das wissenschaftlich-experimentelle Arbeiten, die hilfreichen Ratschläge und die ständige Bereitschaft zur Diskussion. Ich bedanke mich bei der ganzen Abteilung der Molekularen Pathologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft. Außerdem danke ich Dr. med. vet. Ursula Kohlhofer von der Abteilung Allgemeine Pathologie herzlich für die Unterstützung bei der Auswertung der histologischen Schnitte.

Ein ganz besonders großer Dank gilt Dr. rer. nat. Eva Brunner, ohne deren konsequente Ermutigungen und Hilfe diese Arbeit vermutlich nicht fertig gestellt worden wäre.

Großer Dank kommt auch meinen Freunden und Verwandten zu, die mich immer aufgebaut, ermutigt und unterstützt haben, durch Korrekturlesen ebenso, wie ein jederzeit offenes Ohr.

Martin Janson danke ich für die Geduld, die Ausdauer und die liebevolle Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern dafür, dass sie mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben. Ihnen bin ich für alles sehr dankbar. Und meiner Schwester, die mich stets begleitet hat.

III.III. Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Lisa Maria Holz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Myeloide Suppressorzellen vermindern die Aktivität Natürlicher Killerzellen bei der Coxsackievirus B3 Myokarditis.“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Lisa Maria Holz

Berlin, den 28.11.2016