

1. EINLEITUNG

Viren gehören neben Bakterien und Pilzen zu den häufigsten Pathogenen bei Mensch und Tier. Dabei kommt den Virusinfektionen in der heutigen Zeit eine immer größer werdende Bedeutung zu. Trotz großer Fortschritte bei der Identifizierung potentieller viraler Krankheitserreger mittels molekularbiologischer Methoden ist über die Pathogenese der unterschiedlichen Virus-induzierten Krankheitsbilder oft nur wenig bekannt und die Möglichkeiten einer Therapie sehr begrenzt. Der Verlauf einer Infektion wird beeinflusst von einer Vielzahl möglicher Virus-Wirt Interaktionen, wobei dem Immunsystem des Wirtes neben den viralen Pathogenitätsdeterminanten eine herausragende Rolle zukommt. Persistierende Virusinfektionen sind häufig assoziiert mit chronischen Entzündungsreaktionen, die zu erheblichen Organschädigungen führen können. Von zahlreichen persistierenden Virusinfektionen ist bekannt, daß es dem Wirt trotz der Präsenz immunologisch kompetenter Zellen nicht gelingt, den Infektionserreger aus dem Organismus zu eliminieren. Daher erscheint es sinnvoll, neben viralen Persistenzmechanismen auch die Reaktionen des Wirtes hinsichtlich möglicher Unterschiede seitens des Immunsystems zu untersuchen.

Enteroviren aus der Familie der Picornaviren, insbesondere Coxsackieviren der Gruppe B (CVB), sind die häufigste Ursache einer Myokarditis des Menschen (McManus & Kandolf, 1991). Durch die Klonierung und anschließende Sequenzierung einer vollständigen, revers-transkribierten, rekombinanten cDNA-Kopie des CVB3-RNA-Genoms wurde die Untersuchung des Verlaufs enteroviraler Infektionen mit molekularbiologischen Methoden möglich (Kandolf & Hofschneider, 1985). Unter Verwendung dieser CVB3-cDNA als enteroviruspezifische Sonde gelang es, enterovirale RNA mittels *in situ* Hybridisierung in Endomyokardbiopsien von Patienten mit akuter und chronischer Myokarditis sowie mit dilatativer Kardiomyopathie nachzuweisen (Kandolf et al., 1989; Kandolf et al., 1993). Dieser Untersuchungsbefund wird als Beleg für eine ätiologische Bedeutung enteroviraler Infektionen hinsichtlich der Pathogenese einer chronischen Herzmuskelerkrankung gewertet. Während die akute Enterovirus-Myokarditis primär durch Virus-induzierte Myozytolyse charakterisiert ist, sind die pathogenetisch relevanten Mechanismen bei der chronischen Myokarditis noch nicht eindeutig geklärt (Leslie et al., 1989; McManus et al., 1993).

Durch die Etablierung eines Tiermodells der Enterovirus-induzierten Myokarditis konnte gezeigt werden, daß die chronische Entzündungsreaktion des Herzmuskels durch eine persistierende Virusinfektion induziert und aufrecht erhalten werden kann (Klingel et al., 1992). Weiterhin wurde gezeigt, daß Immunzellen ebenfalls persistent infiziert sein können und ein wichtiges extrakardiales Reservoir für virale RNA darstellen (Klingel et al., 1996). Diese Befunde weisen auf eine bedeutsame Rolle des Immunsystems in der Pathogenese der Enterovirus-induzierten Myokarditis hin. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Klärung der zellulären Immunantwort im Verlauf der CVB3-induzierten Myokarditis im Mausmodell zu leisten.

1.1. TAXONOMIE

Coxsackieviren gehören zum Genus der Enteroviren innerhalb der Familie Picornaviridae (Matthews, 1982). Die Familie der Picornaviridae ist in sechs Genera eingeteilt: Enteroviren, Aphoviren, Rhinoviren, Cardioviren, Hepatoviren und Parechoviren, die sich aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften, Röntgenkristallstruktur, Säurestabilität und Dichte im Cäsiumchloridgradienten differenzieren lassen. Die Familie der Picornaviridae umfasst zahlreiche human- und tierpathogene Krankheitserreger. Der Erreger einer klassischen Tierseuche ist beispielsweise das zu den Aphoviren gehörende Maul- und Klauenseuche-Virus. Zu den Enteroviren gehören neben zahlreichen humanpathogenen Viren (Poliomyelitisvirus, ECHO-Viren, Coxsackieviren) auch die Erreger der Vesikulärkrankheit der Schweine und der ansteckenden Schweinelähme sowie einige aviäre Krankheitserreger (Rueckert, 1996).

1.1.1. Morphologie der Picornaviren

Die Picornaviren gehören zu den kleinsten bekannten RNA-Viren. Durch Röntgenstrukturanalyse kristallisierter Viruspartikel war es möglich, die Kapsid-Raumstrukturen von Polioviren, Rhinoviren, Mengoviren, dem Maul-und Klauenseuchevirus und Coxsackieviren aufzuklären (Hogle et al., 1985; Rossmann et al., 1985; Luo et al., 1987; Acharya et al., 1989; Muckelbauer et al., 1995). Die Picornaviren bilden circa 30 nm große, unbehüllte, ikosaedrische Partikel, die sich aus zwölf Pentameren zusammensetzen. Ein Pentamer besteht wiederum aus fünf Protomeren. Vier verschiedene virale Strukturproteine bilden ein Protomer: VP1, VP2 und VP3 bilden die Oberfläche des Virions, woraus mögliche antigene Determinanten resultieren, während VP4, das kleinste der Kapsidproteine, auf der Innenseite des Kapsids lokalisiert ist (Rueckert, 1996)

1.1.2. Genomstruktur und Replikationszyklus

Das Genom der Picornaviren hat eine Größe von 7,2 bis 8,5 Kilobasen und besteht aus einem einzelsträngigen RNA-Molekül positiver Polarität, welches am 3'-Ende polyadenyliert ist und am 5'-Ende kovalent mit dem viralen Protein VPg verbunden ist (Kitamura et al., 1981). Das Genom kodiert für ein Polyprotein, welches über mehrere Zwischenstufen proteolytisch in der Regel in elf Einzelproteine gespalten wird (Abb. 1), (Rueckert, 1996).

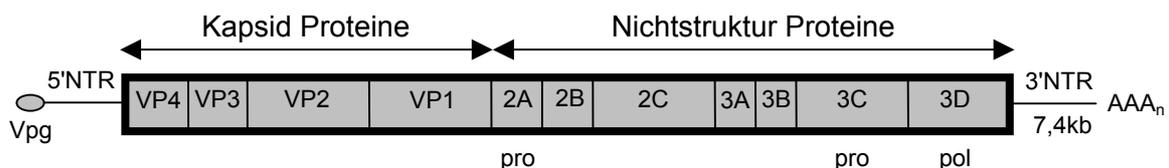


Abbildung 1: Genomstruktur der Enteroviren (nach Rueckert, 1996)

Einen Überblick über die Vorgänge während des picornaviralen Replikationszyklus gibt Abbildung 2. Die Infektion permissiver Zellen erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. Dabei wird in einem ersten Schritt das Viruspartikel an einen spezifischen zellulären Rezeptor gebunden (Adsorption), (Abb. 2/1). Vor der Internalisierung der viralen RNA steht die Umlagerung des Viruskapsids mit dem Verlust des Strukturproteins VP4 (Abb. 2/2) (Mendelson et al., 1989; Bergelson et al., 1997). Nachfolgend kommt es zur Freisetzung der viralen Nukleinsäure aus dem endosomalen Kompartiment in das Zytoplasma der Wirtszelle ("Uncoating", Abb. 2/3). Nach Abspaltung des 5'-terminal gebundenen VPg-Proteins durch ein zelluläres Enzym (Ambros et al., 1978) fungiert die nun im Zytoplasma vorliegende virale RNA unmittelbar als messenger-RNA. Die Translation des viralen Genoms wird von zellulären Polysomen durchgeführt (Abb. 2/4), wobei das entstehende Polyprotein durch virale Proteinasen prozessiert wird (Abb. 2/8). Nach der Synthese der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase 3D^{pol} beginnt mit Hilfe des VPg-Proteins die Replikation picornaviraler RNA mit der Transkription der Plusstrang-RNA in komplementäre Minusstrang-RNA (Abb. 2/5). Bei diesem Vorgang kommt es zur Bildung von doppelsträngigen RNA-Intermediaten (Larsen et al., 1980). Die Minusstrang-RNA dient im weiteren als Matrize für die Mehrfachsynthese von Plusstrang-RNA (Abb. 2/6), während die freigewordene Plusstrang-RNA entweder translatiert (Abb. 2/7) oder in Prokapside eingebaut wird (Abb. 2/9). Die detaillierten Mechanismen der Virusreifung sind noch nicht bekannt. Der terminale Reifungsschritt besteht in der autokatalytischen Spaltung des Kapsidvorläuferproteins VP0 in die beiden Kapsidproteine VP4 und VP2, wodurch die Virionstruktur geschlossen wird (Abb. 2/10), (Kräusslich et al., 1988). Die so gebildeten Nachkommenviren werden in der Regel durch Zellyse freigesetzt (Abb. 2/11).

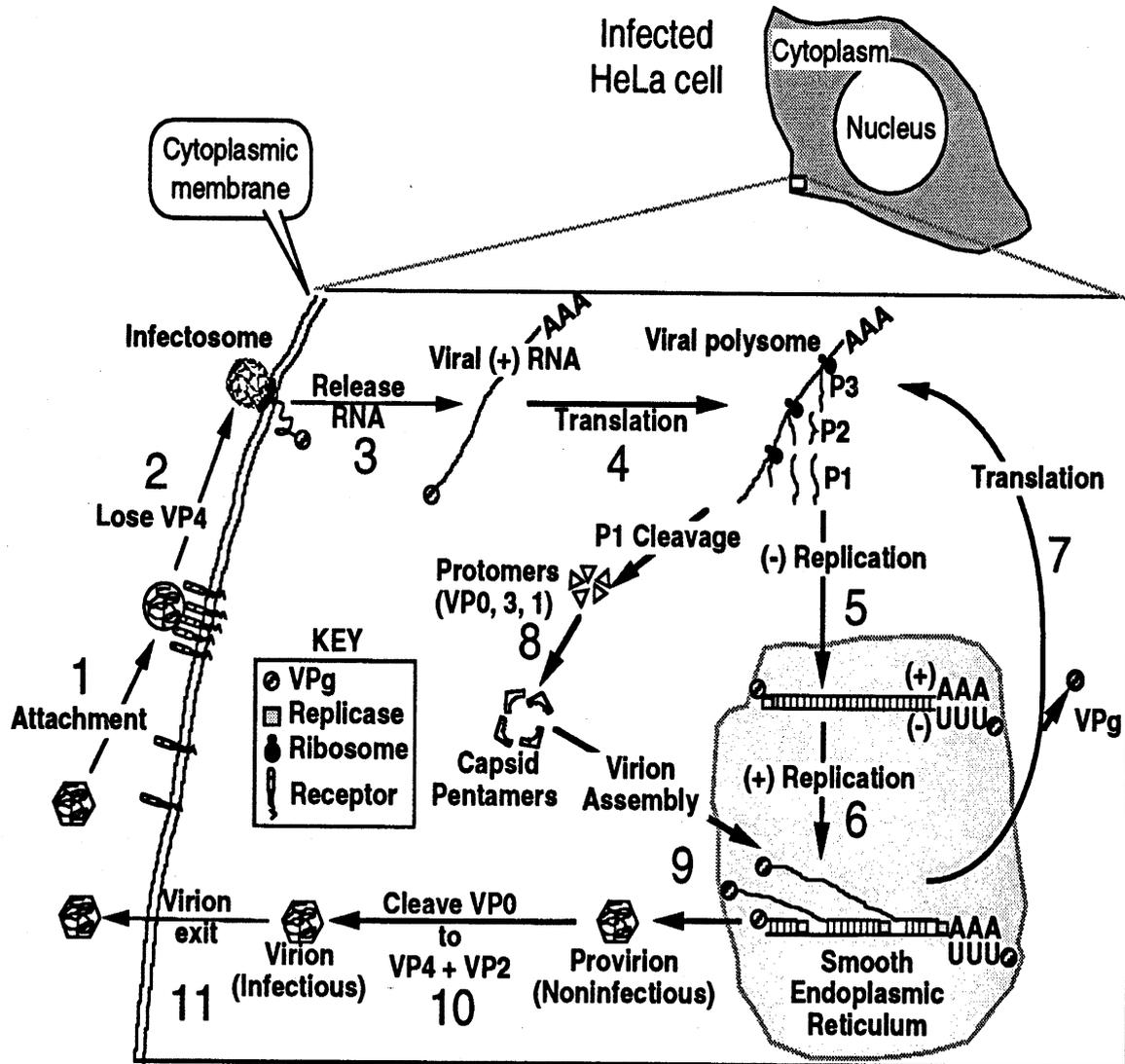


Abbildung 2: Picornaviraler Infektionszyklus in permissiven Wirtszellen (nach Rueckert, 1996).

1.2. HUMANPATHOGENE ENTEROVIREN

Zu den humanpathogenen Enteroviren zählen neben den Coxsackieviren der Gruppe A (Serotypen 1-22, 24) und B (Serotypen 1-6), die Polio- und Echoviren. Das Spektrum der von diesen Viren verursachten Krankheiten reicht von leichten Erkältungskrankheiten und fieberhaften Allgemeinerkrankungen bei Kindern über Myokarditis, Polymyositis und Meningoencephalitis bis hin zur Paralyse des Zentralnervensystems (Melnick, 1996).

Bei den Coxsackieviren der Gruppe B (CVB) werden 6 Serotypen unterschieden, wobei CVB6 den einzigen apathogenen Vertreter darstellt. CVB1-5, aber vor allem Coxsackievirus B3, sind bedeutende Erreger der Virus-induzierten Myokarditis (Longson et al., 1969; Kandolf & Hofschneider, 1989, Kandolf et al., 1993). Die virale Herzerkrankung kann sich in einer akuten Myokarditis sowie in chronischen Herzmuskelerkrankungen (chronische Myokarditis, dilatative Kardiomyopathie) äußern (McManus & Kandolf, 1991; Kandolf et al., 1993). Beim Säugling ist meist ein akuter Verlauf mit einer Mortalitätsrate von bis zu 50% zu beobachten (Woodruff, 1980). Beim Erwachsenen stellen Kardiomyopathien einen Hauptgrund zur Herztransplantation dar. CVB4 wird mit dem Krankheitsbild des juvenilen, insulinabhängigen Diabetes mellitus in Zusammenhang gebracht (Foulis et al., 1990; Toniolo et al., 1982; Yoon et al., 1979). Dies macht die klinische Relevanz der Coxsackievirusinfektionen deutlich.

1.2.1. Wirtsspektrum der Coxsackieviren

Der natürliche Wirt der Coxsackieviren ist der Mensch. Die Coxsackieviren werden aufgrund ihres unterschiedlichen Verhaltens nach intraperitonealer Infektion von Babymäusen den Gruppen A (CVA) und B (CVB) zugeteilt. CVA verursachen in der Babymaus eine generalisierte Myositis mit perakutem Verlauf, während CVB zu einer akut verlaufenden Infektion mit Multiorganbeteiligung führen (Gifford & Dalldorf, 1951). Im Zuge epidemiologischer Erhebungen wurde die Isolierung von Coxsackieviren auch aus

Fledermäusen, Ratten (Gregorio et al., 1972), Hunden (Lundgren et al., 1968) und Fliegen (Melnick et al., 1953) beschrieben. Experimentell infizierbar sind Mäuse, Hamster (Morita, 1981) und Schimpansen (Melnick, 1996).

1.2.2. Zellkulturspektrum der Coxsackie B Viren

Alle Coxsackieviren der Gruppe B vermehren sich in der Regel unter Ausbildung eines zytopathogenen Effekts (cpE) in Kulturen von Affen-, Schweine- und Hamsternierenzellen sowie in permanenten humanen Zelllinien (HeLa-Zellen, HEp-2-Zellen) (Mahy, 1988). Die Virusvermehrung in der Zellkultur geht bei den meisten Picornaviren mit einem typischen zytopathogenen Effekt einher: circa eine Stunde nach Infektion der Zellen kann eine Marginalisierung des Chromatins beobachtet werden, wobei das Chromatin seine homogene Struktur verliert und sich entlang der Kernmembran ansammelt (Franklin & Baltimore, 1962). Drei bis vier Stunden p.i. finden sich Vesikel im Zytoplasma, zunächst in unmittelbarer Umgebung der Kernmembran, dann auch im gesamten Zytoplasma (Dales et al., 1965). Das Erscheinen der Vesikel ist verbunden mit Veränderungen in der Permeabilität der Zellmembran, welches zur Abrundung der Zelle und letztendlich zur Zellyse führt (Cordell-Stewart & Taylor, 1971).

Coxsackieviren der Gruppe B sind jedoch auch in der Lage, in bestimmten Zellkulturen zu persistieren. So wurde die persistente Infektion von humanen myokardialen Bindegewebszellen (Kandolf et al., 1985), murinen Hautfibroblasten (Schnurr & Schmidt, 1984), humanen T- und B-Zelllinien (Gimenez et al., 1995; Vuorinen et al., 1994; Matteucci et al., 1985) und murinen T-Zelllinien (Hesse, 1997) beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine sogenannte "carrier-state" Infektion. Die "carrier-state" Infektion ist dadurch charakterisiert, daß nur ein Teil der Zellen einer Kultur für die Infektion empfänglich ist, so daß nicht alle Zellen gleichzeitig durch Zellyse zugrunde gehen (Ginsberg, 1985). Die persistente *in vitro* CVB3-Infektion zeichnet sich dadurch aus, daß nur limitiert infektiöses Nachkommenvirus produziert wird. Der zelluläre Mechanismus, der dieser Limitierung der Virusvermehrung zugrunde liegt, ist noch nicht bekannt.

1.2.3. Differenzierung der Serotypen

Die Differenzierung der verschiedenen Serotypen CVB1-6 erfolgt im Neutralisationstest durch serotypspezifische Antiseren nach der Methode von Lim und Benyesh-Melnick (Lim et al., 1960). Man kann die verschiedenen Serotypen jedoch auch mit Hilfe serotypspezifischer monoklonaler Antikörper, die in immer größerem Ausmaß zur Verfügung stehen, differenzieren (Yagi et al., 1992).

1.2.4. Pathogenese der Coxsackievirus - Infektion

Das säurestabile Coxsackievirus nimmt nach oraler Infektion, wie andere Enteroviren auch, seinen Weg über den Gastrointestinaltrakt. Eine primäre Virusvermehrung erfolgt in den Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Geweben von Pharynx und Darm. Nach einer Inkubationszeit von 7-14 Tagen kommt es abhängig von der Wirtsabwehr entweder zum Abbruch der Infektionsausbreitung, zum subklinischen Verlauf mit anschließender Rekonvaleszenz oder im Rahmen einer sekundären Virämie zur Generalisierung der Infektion mit Ausbreitung des Erregers in den Manifestationsorganen Herz, Zentralnervensystem oder endokrines Pankreas (Melnick, 1996). Der weitere Verlauf und auch das Ausmaß der Organbeteiligung hängt von der Virulenz und dem Tropismus des Virusstammes sowie von Wirtsfaktoren wie Alter und Immunstatus ab. Während bei Säuglingen die CVB3-Infektion unter dem Bild einer Multiorganbeteiligung in 50% der Fälle tödlich verläuft (Woodruff, 1980), kann beim Erwachsenen mit einem intakten Immunsystem die akute Infektion, die sich vor allem im Myokard manifestiert, ohne Folgeschäden ausheilen. Im Rahmen eines zunächst subklinischen Verlaufes der CVB3-Infektion kann es aber auch zu einer Organmanifestation mit Persistenz des Erregers kommen, die sich dann in einer chronisch-progredient verlaufenden Herzmuskelerkrankung (chronische Myokarditis, dilatative Kardiomyopathie) äußert (McManus & Kandolf, 1991). Für die im Zusammenhang mit der enteroviralen Infektion diskutierte Pathogenese der chronisch-progredienten Herzmuskelerkrankung ist sowohl die Aufklärung möglicher viraler Persistenzmechanismen als auch die Frage nach der durch die Virusinfektion induzierten Immunantwort des Wirtes von großer Bedeutung.

1.3. Aspekte der zellulären Zytotoxizität

Ein Organismus muß sich beständig mit pathogenen Agentien auseinandersetzen. Zu diesen gehören Infektionserreger wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten, aber auch unbelebte Materie, zum Beispiel Blütenpollen oder Staub. Das Immunsystem des Wirtsorganismus besitzt verschiedene unspezifische und spezifische Effektormechanismen gegen extra- und intrazellulär lokalisierte Infektionserreger. Wichtige Effektormechanismen der Immunabwehr umfassen die humorale (z.B. Antikörper, Komplement-vermittelte Zytolyse) und zelluläre Zytotoxizität. Die zelluläre Zytotoxizität, auf die im folgenden näher eingegangen wird, stellt einen wesentlichen Verteidigungsmechanismus gegen intrazellulär lokalisierte, virale Infektionserreger dar.

1.3.1. Effektorzellen der zellulären Zytotoxizität

Als Effektoren der zellulären Zytotoxizität fungieren T-Lymphozyten und Natural Killer Zellen. T-Lymphozyten sind ein Bestandteil der sogenannten erworbenen Immunität. Ihren Ursprung haben sie in hämatopoetischen Stammzellen, welche aus dem Knochenmark in den Thymus auswandern und dort die Reifung zu T-Lymphozyten erfahren (Austyn & Wood, 1993). Im Laufe ihrer Reifung im Thymus werden die Stammzellen unter anderem zu CD4⁺- oder CD8⁺ T-Lymphozyten geprägt, welche in der Lage sind, eigen und fremd zu unterscheiden. Mit der Abkürzung CD (clusters of differentiation) und einer entsprechenden Zahl werden zelluläre Proteine bezeichnet, welche charakteristischerweise auf der Oberfläche einer oder mehrerer definierter Zellpopulationen exprimiert sind. CD4- und CD8-Moleküle sind Glykoproteine, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören und als Ko-Rezeptoren fungieren. CD4 findet sich üblicherweise auf T-Helferzellen, während zytotoxische T-Lymphozyten durch die Expression des CD8-Proteins charakterisiert sind (Janeway & Travers, 1997). Die antiviralen Aktivitäten der T-Lymphozyten richten sich auf die Überwachung und Eliminierung infizierter Zellen. Aktivierte T-Lymphozyten erkennen mit Hilfe des T-Zellrezeptors (TCR) sowie verschiedener Ko-Rezeptoren infizierte Zellen durch deren Präsentation prozessierter Peptidantigene in Verbindung mit bestimmten zellulären Oberflächenproteinen, dem sogenannten

Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), weshalb die T-Zellantwort als MHC-restringiert bezeichnet wird (Zinkernagel & Doherty, 1974).

CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten erkennen virale Peptide in Verbindung mit MHC Klasse I Molekülen (Zinkernagel & Doherty, 1974). MHC Klasse I Moleküle können prinzipiell von jeder Zelle, die einen Zellkern besitzt, exprimiert werden. Eine wichtige Aufgabe aktivierter CD8⁺ T-Lymphozyten besteht in der Erkennung und Eliminierung virusinfizierter Zellen, welche MHC Klasse I in Verbindung mit viralen Peptiden an ihrer Oberfläche präsentieren. Es konnte gezeigt werden, daß transgene β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse, welche kein MHC Klasse I exprimieren können und somit über keine funktionellen CD8⁺ T-Lymphozyten verfügen, nicht in der Lage sind, Theiler's Virus, ein neurotropes Picornavirus, nach experimenteller Infektion aus dem Organismus zu eliminieren (Fiette et al., 1993). Auch die experimentelle Sendai Virus-Infektion der Maus kann von den Tieren bei fehlender Expression von MHC Klasse I nur schwer beherrscht werden (Hou et al., 1992). Neben ihrer zytotoxischen Funktion haben CD8⁺ T-Lymphozyten regulativen Charakter durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine. CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten sind in der Lage, Interferon- γ , in geringerem Umfang auch Tumor Nekrose Faktor (TNF) - α und - β sowie eine Reihe sogenannter Chemokine zu synthetisieren. Es konnte gezeigt werden, daß CD8⁺ T-Zellen die Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β synthetisieren, welche *in vitro* eine Supprimierung des Human Immunodeficiency Virus (HIV) bewirken können (Cocchi et al., 1995).

CD4⁺ T-Lymphozyten vom Helfertyp erkennen virale Peptide in Assoziation mit MHC Klasse II Molekülen (Konig et al., 1992). MHC Klasse II Moleküle werden ausschließlich von sogenannten "professionellen" Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Dazu gehören in erster Linie dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten. Aktivierte T-Helferzellen zeigen durch die Freisetzung verschiedener Zytokine regulativen Charakter. Sie werden anhand ihres unterschiedlichen Zytokinmusters in Th1 und Th2 Zellen eingeteilt. Th1 Zellen sind charakterisiert durch die Synthese von Interferon- γ , Interleukin-2 und Tumor Nekrose Faktor- α und - β . Sie induzieren eine zytotoxische Antwort durch die Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten und Makrophagen. Im Gegensatz dazu synthetisieren Th2 Zellen Interleukin -4, -5, -6, -10 und -13. Ihnen obliegt die Aktivierung von B-Lymphozyten (Parker, 1993; Mosmann & Coffman, 1989). Die Entwicklung unstimulierter T-Helferzellen zu Th1 bzw. Th2 Zellen ist reziprok reguliert. So konnte bei der murinen Leishmaniose gezeigt werden, daß die Resistenz gegenüber einer Infektion abhängig ist von der Differenzierung

der T-Helferzellen zu Th1 Zellen, während die Empfänglichkeit für die murine Leishmaniose mit der Entwicklung von Th2 Zellen einhergeht (Heinzel et al., 1989).

Natural Killer Zellen sind ein Bestandteil der sogenannten angeborenen Immunität. Sie werden im Knochenmark aus noch nicht bekannten Vorläuferzellen gebildet. Natural Killer Zellen werden auch als "large granular lymphocytes" bezeichnet und können ohne vorherige Aktivierung Zielzellen spontan töten (Timonen et al., 1981). Im Gegensatz zu zytotoxischen T-Lymphozyten töten Natural Killer Zellen nicht-MHC restringiert und benötigen keine Aktivierung, weshalb sie eine erste, sehr rasche, aber unspezifische Abwehr gegen extra- und intrazellulär lokalisierte Infektionserreger darstellen (Scott & Trinchieri, 1995). Eine weitere Aufgabe der Natural Killer Zellen liegt in der frühen Produktion großer Mengen Interferon- γ . Es konnte gezeigt werden, daß die frühe Freisetzung von Interferon- γ aus Natural Killer Zellen und die damit verbundene Aktivierung von Makrophagen, noch vor Aktivierung der T-Zellantwort, entscheidend ist für die erfolgreiche Abwehr verschiedener intrazellulärer Infektionserreger wie *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterium avium* (Tripp et al., 1993; Appelberg et al., 1994).

1.3.2. Mechanismen der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität

Aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten und Natural Killer Zellen töten infizierte Zielzellen durch die Freisetzung der zytotoxisch wirkenden Proteine Perforin und Granzyme. Dies resultiert im apoptotischen Zelltod der Zielzelle. Bei Perforin handelt es sich um ein 70 kD Protein, welches ausschließlich von Lymphozyten mit zytotoxischem Charakter exprimiert und in zytoplasmatischen Granula gespeichert wird (Podack et al., 1985). Nach Calcium-abhängiger Ausschüttung der Granula ist Perforin in der Lage, in der Zellmembran der Zielzelle Poren mit einem durchschnittlichen Durchmesser von circa 16 nm zu formen (Young et al., 1986). In den zytoplasmatischen Granula befinden sich neben Perforin verschiedene Serinproteasen, die sogenannten Granzyme (Jene & Tschopp, 1988). Die Granzyme, welche vermutlich durch die Perforin-Poren in die Zielzelle gelangen, werden verantwortlich gemacht für die Auslösung der Apoptose in der Zielzelle (Shiver & Henkart, 1992). Charakteristisch für die Apoptose, dem sogenannten programmierten Zelltod, ist die Fragmentierung der chromosomalen DNA in 180 bp lange Mono- und Multimere und diverse

Veränderungen der Zellmorphologie bei erhaltener Zellmembranintegrität. Im weiteren Verlauf der Apoptose kommt es zur Schrumpfung der betroffenen Zelle und Abschnürung membrangebundener Vesikel; dieser Vorgang hält an, bis sich die apoptotische Zelle vollständig aufgelöst hat. Im Gegensatz dazu steht der nekrotische Zelltod, welcher zum Beispiel durch Komplement-vermittelte Zytolyse ausgelöst wird. Die Nekrose führt zu einem Verlust der Zellmembranintegrität. Dies hat ein Anschwellen und letztendlich Platzen der betroffenen Zelle zur Folge (Stewart, 1994).

Die Perforin-Granzym vermittelte Zytotoxizität der zytotoxischen Effektorzellen spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr viraler Infektionserreger. Mit Hilfe Perforin-defizienter Mäuse konnte durch Infektionsversuche gezeigt werden, daß die Perforin-abhängige Zytotoxizität entscheidend zur Eliminierung des nicht-zytopathogenen lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV) der Maus beiträgt (Kägi et al., 1994). Bei zytopathogenen Viren scheint allerdings die Perforin-Granzym vermittelte Zytotoxizität von untergeordneter Bedeutung für die Eliminierung des Erregers aus dem Organismus zu sein. So ergaben sich im Verlauf der experimentellen Infektion von Perforin-defizienten Mäusen mit Vaccinia Virus und Influenza Virus keine Unterschiede im Vergleich zu den immunkompetenten Kontrolltieren (Kägi et al., 1995).

Ein weiterer Mechanismus der T-Zell vermitteltem Zytotoxizität wurde kürzlich in CD4⁺ T-Lymphozyten gefunden. Es konnte gezeigt werden, daß die CD4⁺ T-Lymphozyten zytotoxische Aktivitäten hauptsächlich über den Fas/FasLigand-Mechanismus vermitteln (Stalder et al., 1994). Fas ist ein Oberflächenprotein, welches von verschiedenen Zellpopulationen exprimiert werden kann. Hierzu gehören vor allem regenerative Zellpopulationen wie Immunzellen, Leberzellen, Fibroblasten und Epithelzellen. Der FasLigand ist ein Oberflächenprotein, welches ausschließlich von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Kommt es zur Wechselwirkung zwischen Fas und FasLigand, so führt dies zum apoptotischen Tod der Fas-exprimierenden Zelle (Itoh et al., 1991). Ob dieser Mechanismus *in vivo* in einem immunkompetenten Organismus bei der Eliminierung infizierter Zellen eine Rolle spielt, wird derzeit kontrovers diskutiert (Hahn et al., 1995, Vikingsson et al., 1996).

1.4. CVB3 - MYOKARDITIS IM MAUSMODELL

Enteroviren, vor allem Coxsackieviren der Gruppe B, sind die häufigste Ursache einer Myokarditis des Menschen (McManus & Kandolf, 1991). Durch Etablierung eines Tiermodells in der Maus konnten intensive Untersuchungen zur CVB3-induzierten Myokarditis durchgeführt werden. Während in der akuten Phase der Infektion eine Virusisolierung aus dem Myokard möglich ist, gelingt dies im weiteren Verlauf einer chronischen Myokarditis nicht mehr (Woodruff, 1980). Diese Befunde führten zum Konzept der postviralen Herzerkrankung: die CVB3-induzierte Herzerkrankung wird in zwei Phasen unterteilt, wobei die Schädigung des Myokards in der akuten Phase der Infektion direkt auf die lytischen Eigenschaften der Viren zurückgeführt wird, während in der chronischen Phase autoimmunologische Vorgänge für die fortschreitende Myokardschädigung verantwortlich gemacht werden (Huber & Lodge, 1984).

Erst durch die Anwendung hochsensitiver, molekularbiologischer Techniken wie der *in situ* Hybridisierung mittels virusspezifischen cDNA- oder RNA-Sonden war es möglich, virale RNA auf zellulärer Ebene nachzuweisen. Sowohl in Myokardbiopsien von Patienten mit chronischer Myokarditis oder dilatativer Kardiomyopathie als auch in Myokardproben CVB3-infizierter immunkompetenter Mäuse gelang der Nachweis persistent infizierter Herzmuskelzellen (Kandolf et al., 1987; Klingel et al., 1992). Diese Befunde legen nahe, daß die chronische Entzündungsreaktion des Herzmuskels durch eine persistierende Virusinfektion induziert und aufrecht erhalten wird (Klingel et al., 1992).

1.4.1. Abhängigkeit des Verlaufs der CVB3-Myokarditis von der Genetik des Mausstammes

Nach intraperitonealer Infektion mit CVB3 entwickeln alle bislang untersuchten Inzuchtmäuse unabhängig vom Mausstamm innerhalb von vier bis fünf Tagen eine akute Myokarditis (Woodruff, 1980). Die Entwicklung einer chronischen Herzerkrankung in Mäusen erwies sich allerdings als abhängig vom Genotyp des Mausstammes. A-congene Stämme wie A.CA/J (H-2^f), A.BY/J (H-2^b), A.SW/J (H-2^s) zeigen eine Disposition zur chronischen Myokarditis

(Wolfgram et al., 1986). Bei diesen congenen Stämmen handelt es sich um Inzuchtstämme, die sich vom Genotyp nur durch die auf Chromosom 17 liegenden Gene, welche für MHC kodieren, unterscheiden, während sowohl die verbleibenden Gene dieses Chromosoms als auch die restlichen 38 Chromosomen des Genoms identisch sind (Snell, 1978). Der vom MHC abhängige Genotyp wird als H-2 Haplotyp des Mausstammes bezeichnet und in folgender Schreibweise angegeben: H-2^x (Roitt et al., 1985). Unabhängig vom H-2 Haplotyp wurde im weiteren bei folgenden Mausstämmen die Disposition zur Entwicklung einer chronischen Herzerkrankung nach experimenteller Infektion mit CVB3 gefunden: A/J (H-2^a), SWR/J (H-2^q), DBA/2 (H-2^d), BALB/c (H-2^d), C3H/HeJ (H-2^k) (Klingel et al., 1992; Chow et al., 1991). Bei den A-congenen Stämmen A.CA/J (H-2^f), A.BY/J (H-2^b), A.SW/J (H-2^s) sowie den Stämmen SWR/J (H-2^q) und DBA/2 (H-2^d) konnte gezeigt werden, daß die chronische Myokarditis mit der Persistenz enteroviraler RNA im Myokard einhergeht (Klingel & Kandolf, 1993; Albrecht, 1992).

1.4.2. Pathogenese der CVB3-induzierten Myokarditis im Mausmodell

Nach intraperitonealer Infektion der Mäuse mit CVB3 findet man zwei bis drei Tage p.i. mittels *in situ* Hybridisierung einzelne infizierte Myozyten zufällig verteilt im linken und rechten Ventrikel. Dies deutet auf eine hämatogene Ausbreitung der Viren im Rahmen der Virämie hin. Die Infektion breitet sich innerhalb des Myokards durch Zell-zu-Zell-Infektion aus und erreicht ihren Höhepunkt an Tag 7-9 p.i. (Klingel et al., 1992). Während dieser akuten Phase der Infektion erfolgt die Schädigung des Myokards primär durch Virus-induzierte Myozytolyse (McManus et al., 1993; Klingel et al., 1993). Im weiteren Verlauf verringert sich die Zahl der infizierten Myozyten deutlich. In Abhängigkeit vom Mausstamm (siehe 1.4.1.) finden sich 30 bis 40 Tage p.i. noch einzelne infizierte Myozyten innerhalb von Myokardläsionen, welche aus Bindegewebe, degenerierten Myozyten und mononukleären Entzündungszellinfiltraten bestehen (Klingel et al., 1992).

Typisch für die akute CVB3-Infektion des Myokards ist die Einwanderung von mononukleären Entzündungszellen in den Herzmuskel. Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, daß heterogene Entzündungszellen ab dem vierten bis fünften Tag p.i. in das Myokard einwandern, wobei diese sich in der unmittelbaren Nachbarschaft

infizierter Myozyten sammeln. Die Zellinfiltrate setzen sich in der akuten Phase der Infektion hauptsächlich aus Makrophagen und Natural Killer Zellen und in geringerem Ausmaß aus T- und B-Lymphozyten zusammen (Godeny & Gauntt, 1987). Um den zwölften Tag p.i. läßt sich das Maximum der Anzahl an Entzündungszellen beobachten, wobei der relative Anteil an T- und B-Lymphozyten zugenommen hat (Deguchi et al., 1985). Gleichzeitig findet sich zu diesem Zeitpunkt eine deutlich verringerte Anzahl infizierter Myozyten (Klingel et al., 1992). Dies deutet auf eine protektive Rolle von lymphozytären Infiltratzellen während der akuten Phase der Infektion hin. Trotz der Anwesenheit von CD8⁺ T-Lymphozyten und Makrophagen gelingt es dem Immunsystem der permissiven Mausstämmen allerdings nicht, persistent infizierte Myozyten zu eliminieren. Hieraus resultiert im weiteren Verlauf der Infektion eine chronische Herzmuskelentzündung (Klingel et al., 1992).

1.4.3. Die Rolle von T- und B-Lymphozyten bei der CVB3-Myokarditis

Um die Bedeutung von T- und B-Lymphozyten für den Verlauf der CVB3-Myokarditis zu untersuchen, wurden verschiedene immundefiziente Mausstämmen mit CVB3 infiziert. Nacktmäuse (NFR nu/nu und NMRI nu/nu), welche bedingt durch das Fehlen des Thymus nur über T-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark verfügen, entwickeln nach Infektion mit CVB3 eine chronische Myokarditis in Verbindung mit Viruspersistenz. Die euthymischen Kontrolltiere (NFR +/nu und NMRI +/nu) weisen im Gegensatz zu den immundefizienten Nacktmäusen keine chronische Herzerkrankung auf und sind in der Lage, das Virus aus dem Organismus zu eliminieren (Schnurr & Schmidt, 1984; Kandolf et al., 1987). CVB3-infizierte severe combined immunodeficiency syndrome (scid) Mäuse, welche über keine funktionell intakten T- und B-Lymphozyten verfügen, zeigen das Bild einer schweren Myokarditis mit großflächigen Myokardläsionen, verursacht durch die Infektion einer Vielzahl von Myozyten bei einer Mortalität von 100% (Chow et al., 1992). Diese Befunde deuten auf eine überaus wichtige Funktion intakter T- und B-Lymphozyten bei der Eindämmung der Virusausbreitung und der Limitierung des Gewebes Schadens hin.

Während der frühen Phase der CVB3-Infektion stellen neutralisierende Antikörper einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen die noch nicht intrazellulär lokalisierten, frei zugänglichen Viruspartikel dar. Bereits 2-4 Tage p.i. lassen sich neutralisierende IgM

Antikörper im Serum immunkompetenter Mäuse nachweisen; erste antivirale IgG Antikörper finden sich ab dem 6. Tag p.i. (Woodruff, 1980). Es konnte gezeigt werden, daß Mausstämme mit sehr früher IgM-Antwort (2./3. Tag p.i.) weniger schwere Myokardläsionen entwickeln als Mausstämme mit leicht verzögerter IgM-Antwort (ab dem 4. Tag p.i.) (Herskowitz et al., 1985; Wolfgram et al., 1986). Allerdings reichen neutralisierende Antikörper alleine nicht aus, um CVB3 aus dem Organismus zu eliminieren: Obwohl athymische nu/nu C3H/HeN Mäuse und die euthymischen nu/+ C3H/HeN Kontrolltiere 40 Tage p.i. gleiche Titer an neutralisierenden Antikörpern aufweisen, sind die athymischen Tiere nicht in der Lage, das Virus zu eliminieren, während dies den euthymischen Mäusen gelingt (Sato et al., 1994). Diese Befunde weisen auf die Bedeutung der T-Lymphozyten im Verlauf der CVB3-Infektion hin. Die durch T-Lymphozyten induzierten Effekte bei der CVB3-Myokarditis werden jedoch kontrovers diskutiert. So wurde gezeigt, daß thymektomierte DBA/2 Mäuse nach Infektion mit CVB3 nur eine leichte Myokarditis entwickeln (Blay et al., 1989). Ein adoptiver Zelltransfer von CD4⁺ T-Lymphozyten aus CVB3-infizierten syngenen Mäusen in die thymektomierten Tiere führte jedoch zu einem schweren Verlauf der Myokarditis, der adoptive Zelltransfer von CD8⁺ T-Lymphozyten hingegen zeigte keine Auswirkungen auf den Verlauf der Infektion (Blay et al., 1989). Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Untersuchung berichtet, daß Thy 1.2⁺ Zellen aus der Milz infizierter Balb/c Mäuse sowohl nicht-infizierte als auch CVB3-infizierte Endothelzellen *in vitro* lysieren können (Huber et al., 1984). Die Thy 1.2⁺ Effektorzellen wurden als CD8⁺ T-Lymphozyten identifiziert, welche nach adoptivem Transfer in thymektomierte syngene Tiere eine Myokarditis auslösen konnten (Guthrie et al., 1984). Des weiteren wird vermutet, daß die Myozytolyse eine direkte Folge der Perforin-Granzym-vermittelten Zytotoxizität durch CD8⁺ T-Lymphozyten und Natural Killer Zellen darstellt, da während der akuten Phase der CVB3-induzierten Myokarditis sowohl zytotoxische CD8⁺ Effektorzellen als auch Perforin im Myokard der infizierten Tiere nachweisbar sind (Seko et al., 1992). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen die bereits geschilderten Befunde in T-Zell-defizienten scid- und Nacktmäusen, die zeigen, daß den T- und B-Lymphozyten eine protektive Rolle im Verlauf der CVB3-Infektion zukommt (Chow et al., 1992, Kandolf et al., 1987; Schnurr & Schmidt, 1984). Erklärungsmöglichkeiten für diese kontroversen Ergebnisse bestehen in der Verwendung von Mausstämmen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund, der divergierenden Kardiovirulenz verschiedener CVB3-Varianten und der nicht einheitlichen Interpretation histopathologischer Befunde. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bei den Untersuchungen mit adoptivem Zelltransfer bietet die Präsenz viraler RNA in den transferierten Lymphozyten. Durch überaus sensitive Methoden wie der RT-PCR

und der RNA-RNA *in situ* Hybridisierung zum Nachweis viraler RNA konnte kürzlich gezeigt werden, daß nicht nur Myozyten, sondern auch Lymphozyten während der akuten und chronischen Phase der CVB3-Myokarditis *in vivo* mit CVB3 infiziert sind (Anderson et al., 1996; Klingel et al., 1996). Dieser Befund befindet sich in Einklang mit *in vitro* Befunden, die gezeigt haben, daß sich in verschiedenen humanen und murinen T- und B-Zelllinien eine persistierende CVB3-Infektion etablieren kann (siehe 1.2.2. Zellkulturspektrum der Coxsackie B Viren: Matteucci et al., 1985; Gimenez et al., 1995; Vuorinen et al., 1994; Hesse, 1997). Unter diesem Gesichtspunkt sind manche Ergebnisse aus Experimenten mit adoptivem Zelltransfer nochmals zu überdenken (Blay et al., 1989; Huber et al., 1984; Guthrie et al., 1984), da durch die früher angewandten Kontrollmethoden nicht ausgeschlossen werden kann, daß virale RNA mit den Lymphozyten übertragen wurde.