

### 4.6. Qualitative und quantitative Differenzierung der Entzündungszellinfiltrate im Myokard CVB3-infizierter Mäuse

Die immunhistochemische Differenzierung der mononukleären Infiltratzellen erfolgte an schockgefrorenem Myokardgewebe infizierter und nicht infizierter C57BL/6J, Perforin knock out und  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse. Die Analyse der entzündlichen Infiltrate wurde 4, 8, 12 und 28 Tage p.i. qualitativ vorgenommen. Eine Quantifizierung der myokardialen Immunzellen erfolgte 12 Tage p.i., an jenem Zeitpunkt, an welchem das Maximum der mononukleären Entzündungszellinfiltrate im Myokard anzutreffen war.

#### 4.6.1. Differenzierung der mononukleären Entzündungszellinfiltrate

Da es sich, wie aus den histopathologischen Befunden deutlich wird, um mononukleäre Infiltratzellen handelt, kamen zu deren Differenzierung folgende monoklonale Antikörper zum Einsatz:

Zur Charakterisierung der lymphozytären Infiltrate wurden drei verschiedene immunhistochemische Markierungen durchgeführt: Mit dem Antikörper gegen das L3T4-Antigen wurden  $CD4^+$  T-Lymphozyten vom Helfertyp markiert. Die  $CD8^+$  zytotoxischen T-Lymphozyten wurden mit Hilfe des Anti-Ly2 Antikörpers differenziert. B-Lymphozyten wurden durch den B220/CD45R-Marker charakterisiert.

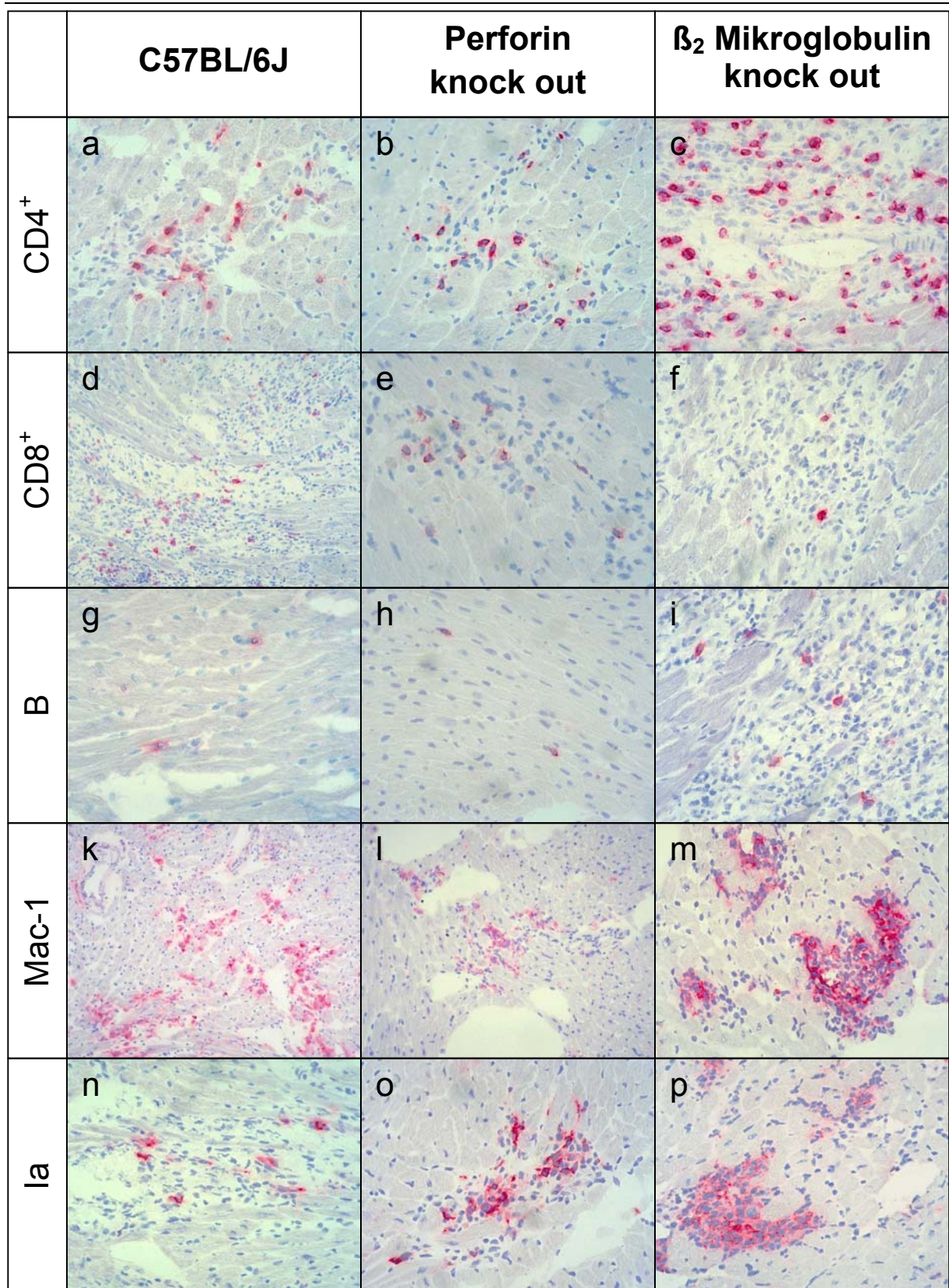
Die Infiltratzellen mit monozytärem Charakter wurden mit folgenden Antikörpern differenziert: Der Antikörper gegen das Mac-1 Antigen erkennt Makrophagen und Natural Killer Zellen. MHC Klasse II positive Zellen wurden mit dem Anti-Ia Marker charakterisiert. Zu den Zellen, die von dem Anti-Ia Antikörper erkannt werden, gehören als professionelle Antigen-präsentierende Zellen Makrophagen und B-Lymphozyten. Durch den Einsatz der Antikörper Anti-Mac-1, Anti-Ia und Anti-B220/CD45R kann zudem eine Aussage über das Vorkommen von Natural Killer Zellen in den Entzündungszellinfiltraten gemacht werden.

### 4.6.2. Qualitative Analyse der Infiltratzellen im Myokard nicht infizierter und CVB3-infizierter Mäuse

Bei den nicht infizierten C57BL/6J, Perforin knock out und  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Kontrolltieren wurden im Myokard vereinzelt Mac-1 und Ia positive Zellen gefunden. Diese Zellen stellen ortsständige Makrophagen dar und sind als physiologischer Befund zu werten. CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie B-Lymphozyten wurden in der Regel nicht nachgewiesen.

Bei den CVB3-infizierten C57BL/6J, Perforin knock out und  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen fanden sich 4 Tage p.i. im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrolltieren vermehrt mononukleäre Infiltratzellen im Myokard. Den Hauptteil stellten Mac-1 und Ia positive Zellen dar. Diese fanden sich sowohl innerhalb von Entzündungsherden als auch disseminiert im Myokard. T- und B-Lymphozyten konnten 4 Tage p.i. bei allen drei Mausstämmen vereinzelt im Myokard beobachten werden. 8 Tage p.i. hatte die Zahl der überwiegend herdförmig vorkommenden Infiltratzellen zugenommen. Die Hauptmasse der Infiltratzellen waren Mac-1 und Ia positiv, aber auch lymphozytäre Zellen, bei denen es sich in der Mehrzahl um CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten handelte, konnten beobachtet werden. 12 Tage p.i. fand sich bei allen drei Mausstämmen das Maximum an mononukleären Infiltratzellen im Myokard, wobei die  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse in Korrelation zum histopathologischen Befund deutlich mehr Entzündungszellen aufwiesen als die C57BL/6J und Perforin knock out Mäuse (Abb. 10). Wiederum stellten Mac-1 und Ia positive Zellen, sowie CD4<sup>+</sup> Zellen den überwiegenden Teil der Infiltratzellen dar. Dies trifft bei allen drei Mausstämmen zu. Erwartungsgemäß fanden sich im Myokard der  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse nur vereinzelte CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. 28 Tage p.i. konnten bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen neben Mac-1 und Ia positiven Zellen innerhalb der Myokardläsionen auch T- und B-Lymphozyten, insbesondere CD4<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden. Bei den C57BL/6J und Perforin knock out Mäusen fanden sich 28 Tage p.i. im Myokard einzelner Tiere innerhalb kleiner Fibroseareale einige wenige Mac-1 und Ia positive sowie CD4<sup>+</sup> Zellen. Der größere Teil der C57BL/6J und Perforin knock out Mäuse zeigte 28 Tage p.i. jedoch im Myokard das Bild der nicht-infizierten Kontrollmäuse mit dem Nachweis einzelner Mac-1 und Ia positiver Zellen. Abbildung 10 zeigt den Nachweis von Mac-1, Ia, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-Zellen sowie von B-Zellen im Myokard CVB3-infizierter C57BL/6J, Perforin knock out und  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse 12 Tage p. i..

4. Ergebnisse



**Abbildung 10:** Übersicht über immunhistochemische Differenzierung myokardialer Entzündungszellen in verschiedenen Mausstämmen 12 Tage p.i.. Hämatoxylin-Färbung; a-b, e-i, m-p 180-fache Vergrößerung, c 200-fache Vergrößerung, d, k-l 90-fache Vergrößerung.

### 4.6.3. Quantifizierung der Infiltratzellen im Myokard CVB3-infizierter Mäuse

Die Quantifizierung der myokardialen Infiltratzellen erfolgte mit Hilfe eines Meßgitters (Integrationsplatte II, Zeiss, Oberkochen, siehe 3.2.10.2) an HE- bzw. immunhistochemisch gefärbten Myokardpräparaten nicht-infizierter und infizierter C57BL/6J, Perforin knock out und  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse 12 Tage p.i..

Die Gesamtzahl der Infiltratzellen pro  $\text{mm}^2$  myokardialer Gesamtschnittfläche wurde an HE-gefärbten Herzmuskelpräparaten ermittelt. Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, wiesen C57BL/6J und Perforin knock out Mäuse mit 180 bzw. 191 Infiltratzellen pro  $\text{mm}^2$  myokardialer Gesamtschnittfläche eine ähnliche Dichte an Entzündungszellen auf, während bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse mit 795 Infiltratzellen pro  $\text{mm}^2$  myokardialer Gesamtschnittfläche die vierfache Anzahl an mononukleären Entzündungszellen im Vergleich zu den C57BL/6J und Perforin knock out Mäuse gemessen wurde.

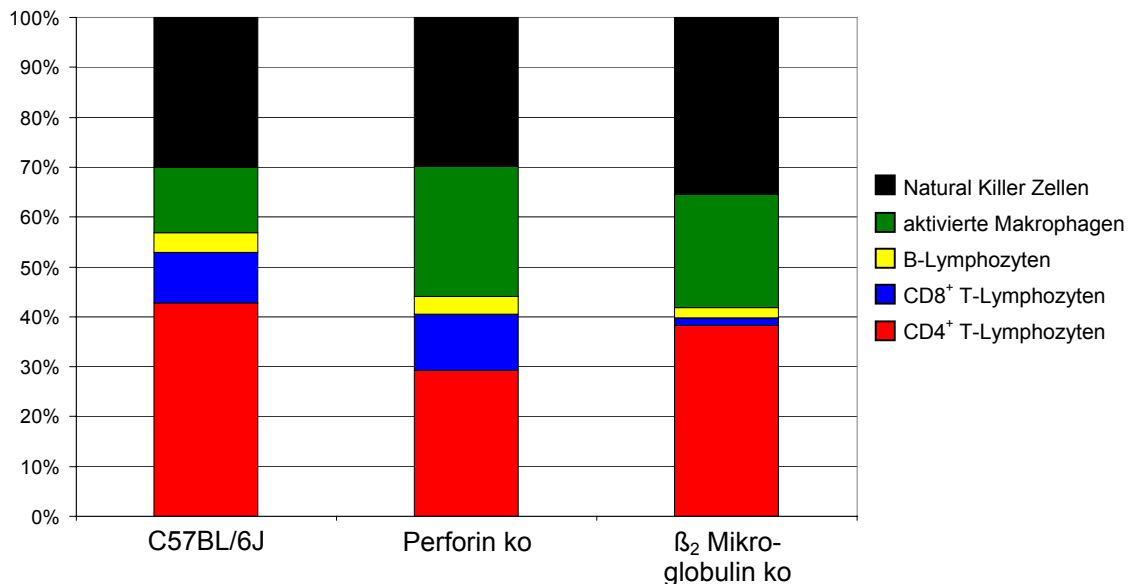
Anschließend wurde die Anzahl der immunhistochemisch differenzierten Zellpopulationen pro  $\text{mm}^2$  myokardialer Gesamtschnittfläche ermittelt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die ermittelten prozentualen Anteile der differenzierten Zellpopulationen bezogen auf die Gesamtzahl der Infiltratzellen. Geht man davon aus, daß B-Lymphozyten sowohl durch den B220/CD45R-Marker als auch mit dem Anti-Ia Antikörper markiert werden, so ergibt sich aus der Subtraktion des B220/CD45R-Anteils von dem Anteil der Ia positiven Zellen der Anteil der aktivierten Makrophagen. Subtrahiert man den Anteil der aktivierten Makrophagen von dem Anteil der Mac-1 positiven Zellen, so erhält man den Anteil der Natural Killer Zellen. Abb. 12 zeigt die auf diese Weise ermittelten Anteile der Zellpopulationen Makrophagen, Natural Killer Zellen,  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten,  $\text{CD4}^+$  T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Es zeigte sich, daß die Zusammensetzung des Infiltrats im Myokard der C57BL/6J und Perforin knock out Mäuse nahezu gleichgroße Anteile an Natural Killer Zellen,  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten und B-Lymphozyten aufwies. Der Anteil der Makrophagen war bei den Perforin knock out Mäusen im Vergleich zum Wildtyp doppelt so hoch, dahingegen fanden sich in den Perforin knock out Mäusen signifikant weniger  $\text{CD4}^+$  T-Lymphozyten als bei den Wildtypmäusen C57BL/6J. Erwartungsgemäß war der Anteil der  $\text{CD8}^+$  T-Lymphozyten bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6J-Kontrollmäusen gering. Die  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse wiesen im Vergleich zu den C57BL/6J-Kontrollmäusen erhöhte Anteile an Makrophagen und Natural Killer Zellen auf, wohingegen die Anteile an B-Lymphozyten und  $\text{CD4}^+$  T-Lymphozyten im Vergleich zum Wildtyp geringer ausfielen. Beide

#### 4. Ergebnisse

immundefizienten Stämme, vor allem die Perforin knock out Mäuse zeigten im Vergleich zu den C57BL/6J Kontrollmäusen einen erhöhten Makrophagenanteil und einen erniedrigten Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten.

	Zellen/ mm <sup>2</sup>	Mac-1	Ia	CD4	B	CD8
C57BL/6J	191± 63	43%±2%	17%±2%	42%±4%	3,9%±0,5%	10%±0,2%
Perforin knock out	180± 48	55%±2%	29%±2%	29%±4%	3,6%±0,5%	11%±1,4%
β <sub>2</sub> Mikroglobulin knock out	795± 115	56%±5%	25%±5%	38%±2%	2,2%±0,2%	1,4%±0,3%

**Tabelle 1:** Quantifizierung immunhistochemisch markierter Infiltratzellen im Myokard CVB3-infizierter C57BL/6J, Perforin knock out und β<sub>2</sub> Mikroglobulin knock out Mäuse 12 Tage p.i.



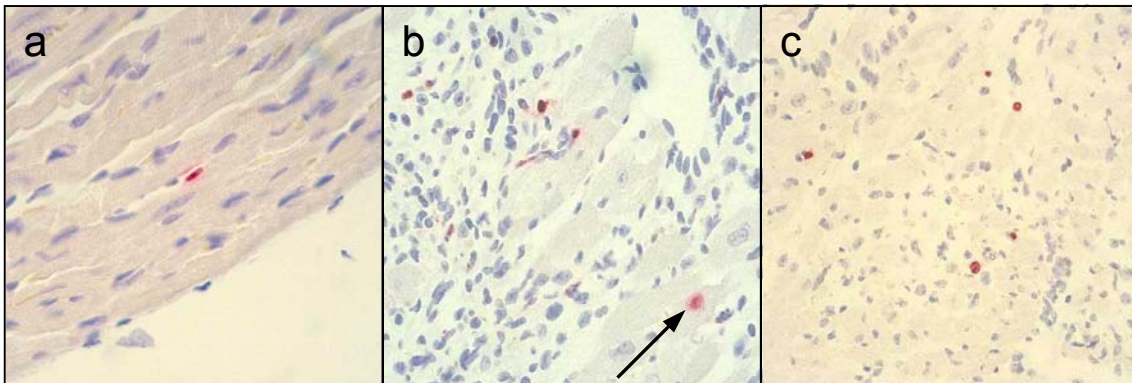
**Abbildung 11:** Prozentuale Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate im Myokard CVB3-infizierter C57BL/6J, Perforin knock out und β<sub>2</sub> Mikroglobulin knock out Mäuse 12 Tage p. i..

### 4.7. Nachweis apoptotischer Zellen im Myokard CVB3-infizierter Mäuse

Unter dem Begriff der Apoptose versteht man eine Art des Zelltodes, die durch festgelegte morphologische Parameter definiert ist. Im Gegensatz zur Nekrose, welche durch Schwellung und Vakuolisierung der Zelle sowie des Zellkerns gekennzeichnet ist, kann man bei der Apoptose ein Schrumpfen der Zelle einhergehend mit Zellkernpyknose und Karyorhexis beobachten. Die Ursachen des apoptotischen Zelltodes sind vielfältig. Ein wichtiger Mechanismus, welcher zur Apoptose einer Zielzelle führt, ist die Perforin-Granzym vermittelte Zytotoxizität durch CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten. Mit Hilfe des TUNEL-Assays soll untersucht werden, inwieweit CVB3 in der Lage ist, apoptotische Prozesse, welche zum Myozytenuntergang führen, zu induzieren. Da in beiden verwendeten immundefizienten Mausstämmen die zytotoxischen T-Lymphozyten in ihren Effektormechanismen eingeschränkt sind, ist die Frage hinsichtlich der Art und des Vorkommens apoptotischer Zellen im Verlauf der CVB3-induzierten Myokarditis im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen von Interesse. Die Darstellung apoptotischer Zellen im Myokard erfolgte mit Hilfe des TUNEL-Assays an Paraffinschnitten nicht infizierter sowie 4, 8, 12 und 28 Tage infizierter C57BL/6J, Perforin knock out und  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse.

Die Myokardproben der nicht-infizierten Kontrollmäuse zeigten keine TUNEL-positiven Zellen. Bei den CVB3-infizierten Tieren aller 3 Mausstämme konnten grundsätzlich gleichartige Befunde beobachtet werden. 4 Tage p.i. wurden disseminiert im Myokard einzelne apoptotische Endothelzellen nachgewiesen (Abb. 12a). Im weiteren Verlauf der Infektion (8 Tage p.i.) waren neben wenigen Endothelzellen im wesentlichen mononukleäre Entzündungszellen sowie einzelne Myozyten vom apoptotischen Zelltod betroffen (Abb. 12b). 12 Tage p.i. konnten TUNEL-positive Infiltratzellen beobachtet werden. 28 Tage p.i. wiesen nur noch die  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse vereinzelt apoptotische Entzündungszellen auf (Abb. 12c). Im Myokard der C57BL/6J- und Perforin knock out Mäuse stellten sich 28 Tage p.i. keine TUNEL-positiven Zellen dar.





**Abbildung 12:** Apoptotische Endothelzelle (a), Herzmuskelzelle (b, Pfeil) und Infiltratzellen (b, c) im Verlauf der CVB3-Infektion. Hämatoxylin-Färbung; a 300-fache Vergrößerung, b-c 200-fache Vergrößerung.

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß sowohl die Art als auch die Häufigkeit apoptotischer Zellen im Myokard 4, 8 und 12 Tage p.i. bei allen drei untersuchten Mausstämmen gleichartig ist. Das Vorkommen apoptotischer Zellen ist in der frühen Phase der Infektion (4 Tage p.i.) auf Endothelzellen und im weiteren Verlauf der Infektion im wesentlichen auf mononukleäre Infiltratzellen beschränkt. Es konnten in allen drei Mausstämmen sowohl 8 Tage p. i. als auch 12 Tage p. i. einzelne TUNEL-positive Myozyten nachgewiesen werden.

### **4.8. Verlauf der CVB3-Infektion in den verschiedenen Organen infizierter C57BL/6J, Perforin knock out und $\beta_2$ Mikroglobulin knock out Mäuse**

Frühere Untersuchungen im Mausmodell haben gezeigt, daß CVB3 trotz eines ausgeprägten Kardiotropismus auch andere Organe infizieren kann (Klingel et al., 1996). Hinsichtlich der Frage nach einem potentiellen extrakardialen Virusreservoir ist es von Interesse, auch andere Organe auf die Präsenz von CVB3 hin zu untersuchen. Deshalb wurden Gewebeproben verschiedener Organe (Lunge, Leber, Niere, Pankreas, Ileum, Milz, Skelettmuskulatur, Gehirn) aller drei Mausstämmen im Verlauf der Infektion (8 und 28 Tage p.i.) untersucht. Die Untersuchungen erfolgten am HE-gefärbten Präparat nach enteroviruspezifischer RNA-RNA *in situ* Hybridisierung.

### 4.8.1. Histologische Untersuchung verschiedener Organe CVB3-infizierter Mäuse während der akuten und chronischen Phase der CVB3-Myokarditis

Die Beurteilung der histopathologischen Veränderungen erfolgte lichtmikroskopisch bei 80-, 200- und 400-facher Vergrößerung an HE-gefärbten Präparaten nach erfolgter *in situ* Hybridisierung zum Nachweis von enteroviraler RNA. Die Untersuchung der Organgewebeproben ergab 8 Tage p.i. bei allen drei Mausstämmen eine schwere Pankreatitis, einhergehend mit massiver Infiltration des Pankreas mit überwiegend mononukleären sowie einigen polymorphkernigen Entzündungszellen bei großflächiger Zerstörung des Drüsengewebes (Abb. 13a-c). 28 Tage p.i. war bei den C57BL/6J und Perforin knock out Mäusen der Großteil des Pankreas fettig degeneriert. Einzelne Drüsenläppchen sowie die Langerhansschen Inseln waren erhalten geblieben und zeigten keine histopathologischen Veränderungen (Abb. 13d-e). Bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen war 28 Tage p.i. ebenfalls eine fettige Degeneration großer Teile des exokrinen Pankreas eingetreten, jedoch wiesen einzelne nekrotische Drüsenläppchen teilweise noch massive mononukleäre Entzündungszellinfiltrate auf (Abb. 13f). Die Langerhansschen Inseln waren von den histopathologischen Veränderungen nicht betroffen.

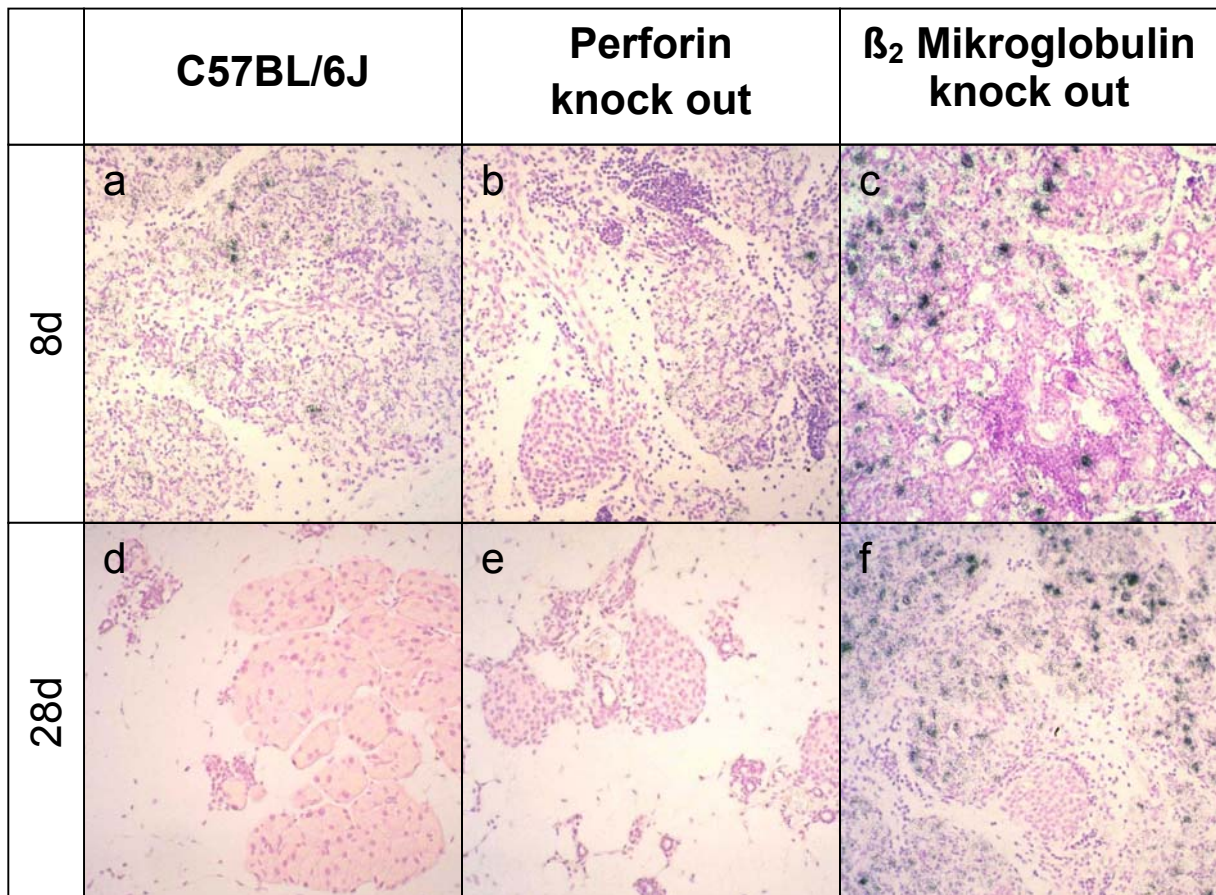
Die Milz stellte sich 8 Tage p.i. bei allen drei untersuchten Mausstämmen stark atrophisch dar. Hauptsächlich betroffen von der Atrophie war die gesamte weiße Milzpulpa (Abb. 14a-c). Während sich bei den C57BL/6J und Perforin knock out Mäusen eine Rekonstitution der Milz erkennen ließ (14d-e), hielt dieser Zustand bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen bis 28 Tage p.i. unverändert an (14f).

Die weiteren untersuchten Organe (Lunge, Leber, Niere, Ileum, Gehirn, Skelettmuskulatur) der drei Mausstämmen zeigten im Verlauf der Infektion keine histopathologischen Veränderungen.



4.8.2. Nachweis viraler RNA in verschiedenen Organen CVB3-infizierter Mäuse mittels *in situ* Hybridisierung

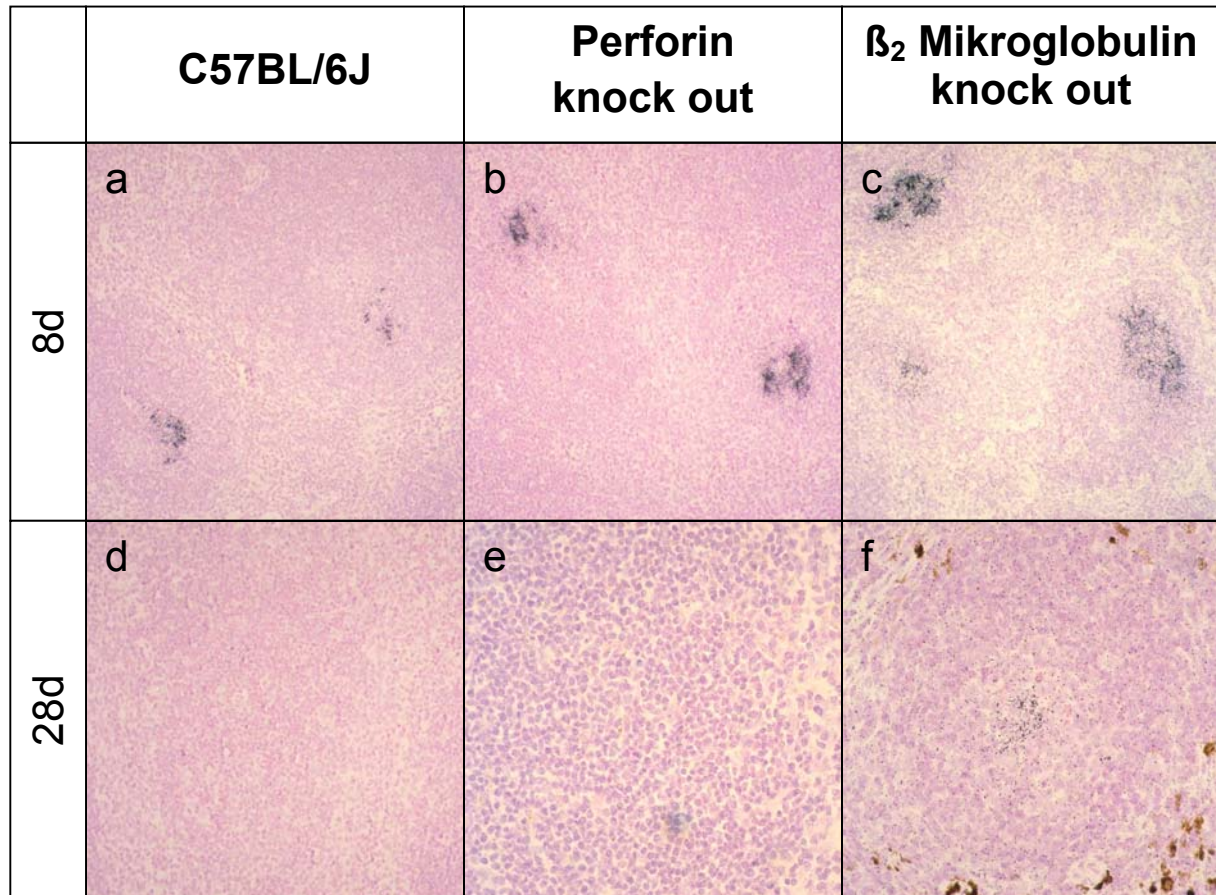
Während der akuten Phase der Infektion (8 Tage p.i.) konnte mittels enteroviruspezifischer RNA-RNA *in situ* Hybridisierung bei allen drei Mausstämmen neben der Infektion des Myokards eine Infektion von Pankreas und Milz beobachtet werden. Im Pankreas war ausschließlich der exokrine Anteil von der Infektion betroffen. In Korrelation zum histopathologischen Befund wiesen alle drei untersuchten Mausstämme 8 Tage p.i. eine massive Infektion des Pankreas auf (Abb. 13a-c). 28 Tage p.i. konnte bei den C57BL/6J und den Perforin knock out Mäusen keine enterovirale RNA mehr im Pankreas nachgewiesen werden (Abb. 13d-e) während die  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse noch zahlreiche autoradiographische Signale in den nekrotischen, mit Infiltratzellen durchsetzten Arealen des Pankreas aufwiesen (Abb. 13f).



**Abbildung 13:** Übersicht über die *in situ* Hybridisierungsbefunde im Pankreas im Verlauf der CVB3-Infektion. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, a-f 100-fache Vergrößerung

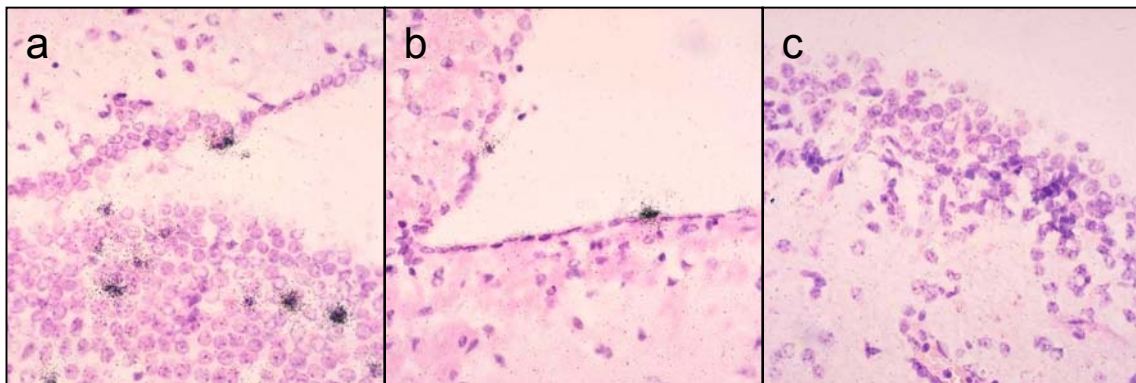
#### 4. Ergebnisse

8 Tage p.i. konnte bei allen drei Mausstämmen autoradiographische Signale auch in der Milz beobachtet werden. Die Enterovirus-RNA-positiven Zellen fanden sich vornehmlich in den Randbereichen der Sekundärfollikel, welche in der Regel aus B-Lymphozyten bestehen (Abb. 14a-c). 28 Tage p.i. konnte bei den C57BL/6J und den Perforin knock out Mäusen keine enterovirale RNA in der Milz nachgewiesen werden (Abb. 14d-e). Bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen ließ sich auch 28 Tage p.i. enterovirale RNA in der Milz nachweisen, wobei sich einzelne positive Zellen innerhalb der Germinalzentren befanden (Abb. 14f).



**Abbildung 14:** Übersicht über die *in situ* Hybridisierungsbefunde in der Milz im Verlauf der CVB3-Infektion. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, a-d 100-fache Vergrößerung, e-f 200-fache Vergrößerung.

Bei den  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäusen gelang 28 Tage p.i. zudem der Nachweis einer Infektion des Gehirns mit Persistenz enteroviraler RNA. Bei den infizierten Zellen handelt es sich vermutlich um sogenannte Kolmer-Zellen, die zu der Gruppe der ortsständigen Makrophagen gehören und mit dem Ependym assoziiert sind (Abb. 15a-b). In Abbildung 15c ist eine Hybridisierung mit der Kontrollsonde pSPT18-Neo dargestellt.



**Abbildung 15:** *In situ* Hybridisierungsbefunde im Gehirn infizierter  $\beta_2$  Mikroglobulin knock out Mäuse, 28 Tage p. i.. Hämatoxylin-Eosin-Färbung; a-c 200-fache Vergrößerung.

In den weiteren untersuchten Organen (Lunge, Leber, Niere, Ileum, Skelettmuskulatur) der drei Mausstämme konnte zu keinem Zeitpunkt der Infektion enterovirale RNA nachgewiesen werden.