

**T-Zell-Rezeptor V β (TRBV) Dominanz bei der
inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi).**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Maria Rohde

aus Salzwedel

Mai 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinz-Peter Schultheiss
2. Gutachter: Prof. Dr. Burkhard Kleuser

Disputation am: 24.09.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Dilatative Kardiomyopathie (DCM) und inflammatorische Kardiomyopathie (DCMi)	1
1.1.1 Pathogenese der inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi)	2
1.1.2 Pathogenese-Modelle der Myokarditis – Einsichten aus tierexperimentellen Ansätzen	5
1.2 T-Zellfunktionalität in der AMC/DCM	9
1.2.1 T-Zellen	9
1.2.2 T-Zellrezeptor (TCR)	13
1.2.3 T-Zell-Funktionalität und Marker-Genexpression	15
1.2.4 Datenlage zur TRBV Expression bei experimenteller und humaner Myokarditis und DCM / DCMi	16
1.3 Zielstellungen der Promotionsarbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Patienten- und Kontrollgruppen	19
2.2 Material	20
2.2.1 Geräte	20
2.2.2 Chemikalien und Enzyme	21
2.2.3 Oligodesoxynukleotide	21
2.3 Molekularbiologische Methoden	25
2.3.1 Präparation von RNA aus PBMCs und kultivierten Zellen	25
2.3.2 Präparation von RNA aus Herzmuskelgewebe und EMBs	25
2.3.3 Präparation von DNA aus Gewebe	26
2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
2.3.5 Reverse Transkription von RNA	27
2.3.6 Präamplifikation	29
2.3.7 Real-time RT-PCR	31
2.3.8 Quantifizierung der relativen Genexpression, Berechnung der Präamplifikationsuniformität, der Inter- und der Intra-Assay Varianz	32
2.3.9 Agarose-Gelelektrophorese	33
2.4 Zellbiologische Methoden	34

Inhaltsverzeichnis

2.4.1	Zellkultur	34
2.4.2	Interferon- γ Sekretions-Assay	36
2.4.3	Immunhistologische Färbung	36
2.5	Statistische Analyse	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Aufbau eines TRBV Nachweis-Systems	40
3.1.1	RNA-Extraktions-Optimierung	40
3.1.2	Entwicklung eines Real-time RT-PCR Systems zum Nachweis des TCR	43
3.1.3	Entwicklung von Präamplifikationsmethoden zum Nachweis des TCR	49
3.1.4	Differentielle Genexpressionsanalysen mittels T-PreAmp real-time RT-PCR in EMBs von Patienten mit immunhistologischem Nachweis einer DCMi	61
3.1.5	Murines SWR-Modell der akuten und chronischen Myokarditis	64
3.2	TRBV-Repertoire in expandierten T-Zellen	69
3.2.1	<i>In vitro</i> Expansion von humanen T-Zellen	69
3.2.2	TRBV Expression nach T-Zellexpansion	74
3.3	Analyse der Expression der funktionellen T-Zellmarker (FTZM) und des T-Zellrezeptor Vbeta (TRBV) in EMBs	76
3.3.1	Ergebnisse der immunhistologischen und virologischen EMB Diagnostik	76
3.3.2	Genexpression von CD3d, CD3z und TRBC	77
3.3.3	Immunhistologisch nachgewiesene DCMi und erhöhte Expression von CD3d, CD3z und TRBC	78
3.3.4	Expression von funktionellen T-Zellmarker (FTZM) in EMBs	80
3.3.5	TRBV Expression in EMBs	82
3.4	TRBV-Dominanz und funktionelle Charakterisierung von B19V-NS1-antigenspezifischen T-Zellen bei einem Patienten mit akuter B19V assoziierter inflammatorischer Kardiomyopathie und initialer B19V Virämie	85
3.4.1	Immunhistologischer Verlauf der DCMi	87
3.4.2	TRBV11 Dominanz der NS1-B19V-antigenspezifischen T-Zellen	90
4	Diskussion	92
4.1	RNA-Extraktionsoptimierungen an Herzmuskelgewebe	92
4.2	Entwicklung eines Real-time RT-PCR Systems zum Nachweis des TCR	94
4.2.1	Entwicklung einer Präamplifikation zum Nachweis des TCR	95
4.2.2	TRBV- und FTZM-Expression in der experimentellen CVB-induzierten Myokarditis bei SWR-Mäusen	100

Inhaltsverzeichnis

4.3	TRBV-Expression bei <i>in vitro</i> expandierten humanen T-Zellen unter Verwendung von feeder cells – Einflüsse von Zellkulturmedien	102
4.4	Analyse der Expression der funktionellen T-Zellmarker (FTZM) und des T-Zellrezeptor Vbeta (TRBV) in EMBs	105
4.4.1	Potentielle diagnostische Relevanz einer erhöhten Expression von CD3d, CD3z und TRBC in DCMi	106
4.4.2	Funktionelle Charakterisierung der T-Zell-Infiltrate bei DCMi	106
4.4.3	Virus-assoziierte differentielle TRBV-Expression	108
4.5	TRBV-Dominanz und funktionelle Charakterisierung von B19V-antigenspezifischen T-Zellen aus PBMCs bei B19V-assoziiierter DCMi	110
5	Zusammenfassung	113
6	Summary	116
7	Literatur	118
8	Publikationen	139
9	Danksagung	140
10	Lebenslauf	141
	Anhang	I
	Zusammensetzung von Medien, Puffern und Lösungen	I
	Abkürzungsverzeichnis	I
	Abbildungen	IV
	Abbildungsverzeichnis	XXI

Einleitung

1.1 Dilatative Kardiomyopathie (DCM) und inflammatorische Kardiomyopathie (DCMi)

Die Dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine Herzmuskelerkrankung, die durch eine Einschränkung der linksventrikulären (LV) und/oder rechtsventrikulären (RV) Funktion bei gleichzeitiger Dilatation des linken (LV) und/oder rechten Ventrikels (RV) charakterisiert ist und sich häufig in der 3. bis 5. Lebensdekade manifestiert. In den statistischen Erhebungen und Transplantationsregistern der letzten Dekade stellt die DCM neben der koronaren Herzkrankheit die häufigste Ursache der Herzinsuffizienz dar (1, 2). Bei ca. 30% der untersuchten Patienten entwickelt sich die Herzinsuffizienz auf dem Boden einer DCM. In der Bundesrepublik Deutschland liegt derzeit die Prävalenz der Herzinsuffizienz bei ca. 1,5 Millionen Patienten. Folglich ist davon auszugehen, dass mindestens 500.000 Patienten an einer DCM leiden.

Infolge der großen klinischen Relevanz dieses Krankheitsbildes besteht großer Handlungsbedarf zur Entwicklung neuer Diagnose- und Therapieverfahren. Die Bedeutung der DCM wird allein daran deutlich, dass diese Erkrankung neben der koronaren Herzkrankheit die Hauptindikation für eine Herztransplantation (HTX) darstellt. Nach der Definition der WHO/ISFC *Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies* ist eine myokardiale Entzündung und/oder Virusinfektion = *Inflammatorische Kardiomyopathie* (DCMi) die häufigste Ursache einer DCM (3). Trotz Fortschritten in der Herzinsuffizienztherapie ist die Prognose dieser Erkrankung bei einer 5-Jahres-Mortalität von mehr als 50% als sehr ernst einzuschätzen. Für die meisten DCM-Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz stellt die Herztransplantation bei Versagen der symptomatischen medikamentösen Herzinsuffizienztherapie die derzeit einzige akzeptierte palliative Therapieoption dar. Unter der Vorstellung durch kausale Therapieverfahren, zusätzlich zu der Herzinsuffizienztherapie, die Prognose der DCMi-Patienten zu verbessern, wurden immunmodulatorische Therapieregimes entwickelt. Derzeit werden vier immunmodulatorische Therapieverfahren in randomisierten, multizentrischen Studien evaluiert: die antivirale Interferon-Therapie (BICC-Trial: *Bioferon in Patients with Chronic Viral Cardiomyopathy*), die medikamentöse Immunsuppression (Kortikosteroide mit Azathioprin), die Immunglobulin-Therapie im Rahmen der ESETCID-Studie und die Immunadsorption (4-10).

Trotz der Häufigkeit der Erkrankung und der hierdurch bedingten gesundheits-ökonomischen Bedeutung gibt es bis heute, im Gegensatz zu den anderen häufigen Erkrankungen auf dem Herz-Kreislauf-Gebiet, noch keine allgemein akzeptierten Diagnose- und Therapierichtlinien, was dazu führt, dass derzeit noch von einer ausgesprochenen diagnostischen und therapeutischen Unterversorgung der Patienten, die an diesem Krankheitsbild leiden, ausgegangen wer-

den muss. Prinzipiell ist darauf hinzuweisen, dass aufgrund bis heute nicht allgemein etablierter diagnostischer Verfahren sowohl national als auch international der Großteil der Patienten mit Verdacht auf das Vorliegen einer DCM nicht umfassend im Sinne der WHO-Richtlinien untersucht wird, so dass von einer großen Dunkelziffer der Erkrankung ausgegangen werden muss.

1.1.1 Pathogenese der inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi)

Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass Virusätiologien bei der DCMi - als einer Subentität der DCM - eine wesentliche Rolle spielen. Neben den klassischen Myokarditis auslösenden Viren (Coxsackieviren; diese können auch in Mausmodellen eine experimentelle Myokarditis auslösen), die in etwa 5% der untersuchten AMC- und DCM-Patienten nachgewiesen werden, konnten umfangreichere Reihenuntersuchungen der letzten Dekade eine Assoziation von weiteren Viren (vor allem B19V, HHV6, ADV, EBV) mit der AMC und der DCM aufzeigen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch diese Viren, ähnlich wie für die Enteroviren (darunter auch CVB), mit einer schlechteren Prognose für DCM-Patienten und Viruspersistenz assoziiert sind (11-15). Aktuelle Daten zeigen eine Virusprävalenz bei bis zu 70% der DCM Patienten. Aufgrund fehlender epidemiologischer Daten werden Inzidenz und Prävalenz der DCMi wahrscheinlich deutlich unterschätzt. Hieraus ergibt sich, dass zurzeit auch keine verlässlichen Erkenntnisse bezüglich des natürlichen Verlaufes dieser Erkrankung in Abhängigkeit vom auslösenden Agens (z.B. Virus) und anderen Faktoren (z.B. Entzündung) vorliegen. Zu den am häufigsten in Endomyokardbiopsien (EMBs) von Myokarditis-Patienten nachgewiesenen Viren gehören insbesondere B19V, das humane HHV6, Enteroviren (EV, hier vor allem Coxsackieviren Typ B (CVB), Adenoviren (ADV), und das Epstein-Barr-Virus (EBV) (13, 16, 17). Abgeleitet von tierexperimentellen Einblicken der durch CVB induzierten murinen Myokarditis wird davon ausgegangen, dass eine initial starke zelluläre Immunantwort im Rahmen einer akuten Myokarditis zur schnellen Viruselimination und Ausheilung führt, während eine verlängerte oder abgeschwächte Immunantwort in einer Erregerpersistenz und Chronifizierung der Entzündung resultiert. Diese chronifizierte intramyokardiale Entzündung kann sich bei genetisch prädisponierten Individuen sekundär (z.B. durch molekulares Mimikry oder Bystander-Aktivität) auch gegen kryptische, myokardiale Antigene richten, was unabhängig von der Viruselimination oder -persistenz zu einer Chronifizierung der nunmehr auch antikardialen Immunantwort und zur Entwicklung einer inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi) beiträgt.

Eine chronische Aktivierung des Immunsystems, die sich gegen ein spezifisches (virales oder Auto-) Antigen richtet, kann zu einer deutlichen Einschränkung der Zahl spezifisch reaktiver T-Zellen in den Zielorganen führen (oligo/monoklonale Expansion), die mit modernen molekularbiologischen Methoden detektiert werden kann. Für die klonale Expansion der T-Zellen ist der T-Zellrezeptor von entscheidender Bedeutung, da über den Rezeptor die Antigene erkannt werden. Bei der experimentellen Myokarditis wurden bereits klonale T-Zellexpansionen mit Bevorzugung bestimmter T-Zell-Rezeptor Vbeta (TCR-V β ; TRBV) Familien festgestellt, mit möglichen

therapeutischen Ansätzen der Depletion der entsprechenden T-Zell-Klone. Mit Hilfe einer zum Nachweis von klonalen TRBV Genumlagerungen entwickelten familienspezifischen PCR und GeneScan-Analyse sowie Direktsequenzierung konnte in Vorarbeiten klonale T-Zellexpansionen bei ca. 50% der explantierten DCM-Herzen, aber nicht bei weiteren nicht-DCM-Kardiomyopathien und gesunden Spenderherzen nachweisen. Die erworbene DCM stellt neben genetischen Faktoren und weiteren selteneren Ursachen die häufigste Ursache der ursprünglich als "idiopathisch" klassifizierten Kardiomyopathien dar

Die DCM stellt den Endzustand eines dynamischen Prozesses nach einer stattgehabten, akuten Myokarditis dar. Während die Myokarditis bei der Mehrzahl der Patienten ohne klinisch relevante Folgen ausheilt, manifestieren 21% der Patienten innerhalb von 33 Monaten eine DCM (18). Des Weiteren kann sich eine transplantationspflichtige DCM mit terminaler Herzinsuffizienz entwickeln, und es kann zum Herzinsuffizienz-bedingten Tod, oder zum Ableben infolge ventrikulärer Tachykardien oder von Kammerflimmern kommen (Abbildung 1).

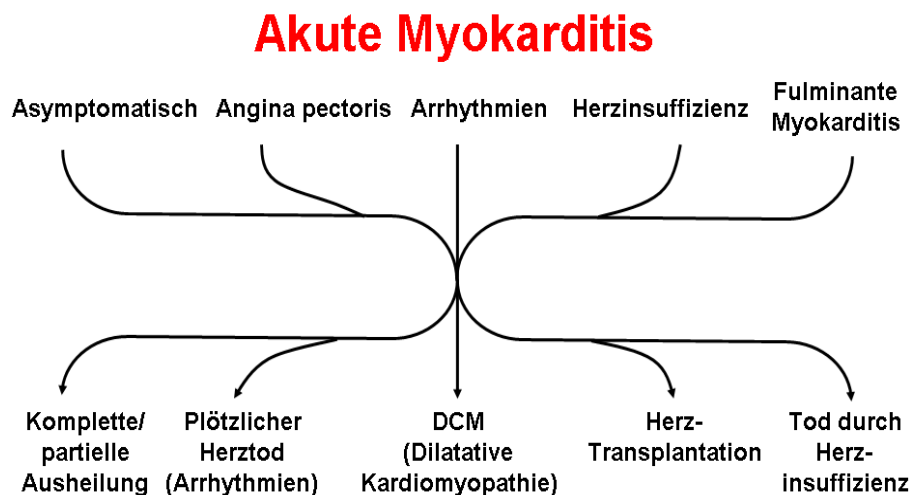


Abb. 1: Unterschiedliche klinische Präsentationen der akuten Myokarditis (AMC) und differente klinische Verläufe unter konventioneller Herzinsuffizienz-Therapie. Nach einer akuten Myokarditis, die unterschiedliche klinische Präsentationen zeigen kann, kann es unter konventioneller Herzinsuffizienz-Therapie zu einer weitestgehenden Ausheilung ohne weitere klinische Relevanz kommen. Derartige Verläufe treffen auch auf Fälle zu, die sich initial mit einer schwersten Herzinsuffizienz zeigen, bis hin zur fulminanten Myokarditis. Es kann aber auch im weiteren Verlauf zum Ableben infolge maligner Herzrhythmusstörungen, zur progredienten Herzinsuffizienz, und zur Manifestation einer dilatativen Kardiomyopathie kommen. Übersetzt und modifiziert aus (18).

Neben postulierten, (bislang nicht detailliert identifizierten) genetisch prädisponierenden Faktoren scheint die Effizienz der antiviralen Immunantwort im Hinblick auf die erzielte Viruseliminatio eine wesentliche prognostische Bedeutung für diesen dynamischen Prozess zu haben: Die deutlich bessere Prognose von Patienten nach einer fulminanten akuten Myokarditis verglichen mit den Patienten nach einem nicht-fulminanten Verlauf der Myokarditis (19) ist wahrscheinlich

Einleitung

darauf zurückzuführen, dass erstere zwar durch die fulminante, antivirale Immunantwort eine transiente, hochgradige Depression der Kontraktilität erleiden, langfristig aber durch die effektive Viruselimination nahezu eine Normalisierung der Herzfunktion ohne Langzeitschäden erzielen, während die Viruspersistenz und die daraus resultierende chronische Entzündung bei der letzteren Gruppe eine progrediente Verschlechterung der Herzfunktion und dadurch die Entwicklung einer Herzinsuffizienz im Sinne einer DCM begünstigt (20).

Diese bemerkenswert variablen Verläufe der AMC können durch konventionelle kardiologische Untersuchungsparameter nicht prognostiziert oder hinreichend erklärt werden, noch kann die konventionelle Herzinsuffizienz-Therapie den Progress der Erkrankung aufhalten. Die AMC und DCMi wird daher als besondere Herausforderung für die kardiologische, klinisch-experimentelle Forschung angesehen. Die übergeordnete Zielsetzung dieser Bestrebungen ist es, über die detaillierte Analyse der zugrundeliegenden Pathogenese, und einer gegen die hauptsächlich beteiligten Faktoren gerichtete, kausale immunmodulatorische Therapie (zusätzlich zu der konventionellen Herzinsuffizienz-Therapie), zu einer besseren Prognose selektierter Patienten nach einer AMC bzw. Patienten mit einer chronischen DCMi beizutragen (21-26). Die detaillierten pathogenetischen Mechanismen, die an der Transition von einer AMC zur DCMi beteiligt sind, sind weiterhin nur unvollständig verstanden. Ein Persistieren viraler Genome, immunologisches Mimikry und/oder eine persistierende extrakardiale Virusinfektion stellen entscheidende pathogenetische Mechanismen dar, die den Progress von der akuten Myokarditis zur chronischen DCMi begünstigen, wenn gleich klar ist, dass es sich um komplexe und multifaktoriell bedingten Mechanismen handelt (27, 28).

1.1.2 Pathogenese-Modelle der Myokarditis – Einsichten aus tierexperimentellen Ansätzen

Die experimentelle, virale Myokarditis bei Mäusen lässt sich in zwei verschiedene pathogenetische Mechanismen unterscheiden. Zum einen gibt es die direkte, virale und zum anderen die immunvermittelte Schädigung des Herzgewebes. Dabei bewirken Viren die Schädigung hauptsächlich in den ersten Tagen *post infectionem* (p.i.), während im späteren Verlauf die Auswirkungen der Immunaktivierung überwiegen. Im Grunde lässt sich der Verlauf der viralen Myokarditis bei der Maus in drei Phasen unterscheiden (27) (Abbildung 2).

Akute Phase der viralen Myokarditis

Nach einer vorangegangenen intraperitonealen Infektion mit kardiotropen Viren wie z.B. CVB3 lassen sich innerhalb der ersten drei Tage histologische Veränderungen finden.

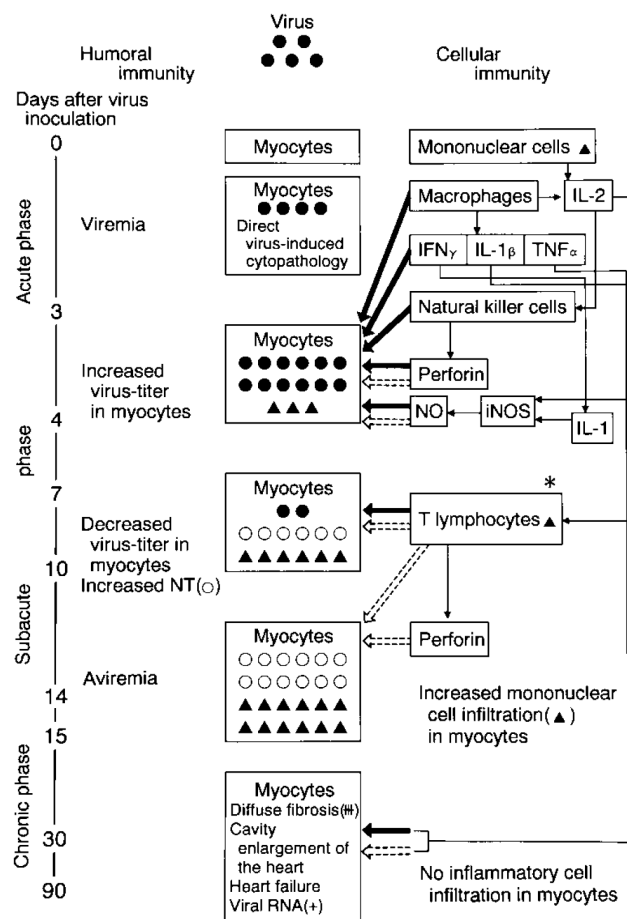


Abb. 2: Pathogenese und Phasen der Myokarditis. Angabe der zeitlichen Veränderungen in murinen Myozyten Tag 0 bis 90 (27).

Dabei tauchen trotz Abwesenheit eines zellulären Infiltrates einzelne nekrotische Kardiomyozyten auf (21, 29). Ab dem dritten Tag p.i. sind bereits erhöhte mRNA-Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , TNF α und IFN γ (30, 31), sowie vereinzelt zelluläre Infiltrationen von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen nachweisbar (32, 33). Somit können Myokardschädigungen in der frühen Phase der viralen Myokarditis nur direkt durch Viren bedingt sein (34-36). Für Enteroviren, neben vielen anderen Virusgruppen konnte im Rahmen ihres intrazellulären Replikationszyklus nachgewiesen werden, dass sie infizierte Zellen abtöten (37). Weiterhin wurde auch eine direkte Pathogenität für enterovirales Protein festgestellt (38). Bei *in vitro* Untersuchungen an isolierten nicht-infizierten Herzmuskelzellen kam es durch eine CVB3-Infektion zum Zelluntergang (39).

Subakute Phase der viralen Myokarditis

In der subakuten Phase stellt sich zunehmend ein entzündliches Infiltrat ein, welches sich hauptsächlich aus Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten zusammensetzt. Die Lymphozytenpopulation besteht vor allem aus NK-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wobei zu Beginn die NK-Zellen überwiegen, aber im Verlauf nehmen die CD8⁺ T-Zellen stark zu. B-Lymphozyten und Plasmazellen sind nur vereinzelt im Myokard nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt werden auch verschiedene Zytokine wie IL-1 β , TNF α , IFN γ und IL-2 ausgeschüttet (27).

Den durch IL-2 aktivierten NK-Zellen wird eine protektive Wirkung bei der viralen Infektion zugeschrieben, da sie die Virusreplikation limitieren (40, 41). Neben ihrer protektiven Funktion können sie auch Perforin ausschütten, wodurch virusinfizierte Kardiomyozyten abgetötet werden (40, 42). Die große Bedeutung der frühen Viruselimination durch NK-Zellen ist durch die deutlich schwerere Myokarditis beim NK-Zell-Defekt im Mausmodell belegt (40). Für den Pathomechanismus der Myokarditis scheinen die Art und der Umfang der Zytokinproduktion eine entscheidende Rolle zu spielen. Zytokine kontrollieren die T-Zellantwort in der Immunantwort und bei Autoimmunmechanismen und können die T-Helferzellpopulation in Richtung einer Th1- oder TH2-Antwort verschieben (43, 44) (siehe 1.2.1). Seko et al. (45) untersuchten die mRNA-Expression verschiedener Zytokine innerhalb der ersten 14 Tage nach der CVB3-Infektion in C3H/He-Mäusen und beobachteten eine erhöhte Expression von IL-1 β , IL-6 TNF α und IFN γ bis zum 7. Tag p.i. und schlossen daraus, dass diese proinflammatorischen Zytokine vorwiegend von herzständigen Fibroblasten, Kardiomyozyten und Endothelzellen ausgeschüttet wurden und ihre Expression zumindest teilweise durch die virale Infektion induziert war. Eine Vermehrung der inflammatorischen Zytokine IL-2, IL-4 und IL-10 wurde nur nach dem 5. oder 7. Tag p.i. beobachtet. Die Expression von IL-1 β , TNF α und IFN γ waren ebenso ab dem 5. Tag p.i. erhöht, aber auch noch am Tag 14 p.i. erhöht nachweisbar. Zum Zeitpunkt des Auftretens dieser Zytokine beginnt die massive zelluläre Infiltration des Myokards (29, 46). Es ist noch nicht sicher geklärt, ob der Anstieg der Expression dieser Zytokine in der akuten und subakuten Phase auf eine virus-bedingte Stimulation oder durch die erhöhte Zellzahl im Myokard zurückzuführen ist (45, 47). Mehrere Studien zeigten, dass IL-1 und IL-2 den Verlauf der Krankheit ver-

schlechtern können (48), während die Rezeptorblockade von IL-1 und IL-2 die Ausprägung einer Myokarditis und die Mortalität senken (49, 50).

Das antiinflammatorische Zytokin TGF β gilt als ein wichtiger Stimulator der Fibroblastenproduktion und seine Hemmung reduziert deutlich den Grad der kardialen Fibrose (51). Daneben hat TGF β auch Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation von T-Lymphozyten (52). IL-6 ist ein bedeutender Mediator der Makrophagenaktivierung (53), der Induktion von Proteinen der akuten Phase und der B-Zelldifferenzierung (54). Die Gabe von IL-6 in der frühen Phase einer Myokarditis reduzierte deutlich die zelluläre Infiltration, die Gewebsnekrose, den viralen Titer und die Mortalität (55), wohingegen die kontinuierliche Gabe zu stärkeren Gewebsschäden und einer verstärkten Virämie führte (56). Weiterhin haben Zytokine auch Effekte auf die Hämodynamik. IL-1 β , IL-6 und TNF α stimulieren die Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS) und wirken so indirekt negativ inotrop (Herabsenken der Kontraktilität des Herzmuskels) (57). TGF β erhöht den Blutdruck durch einen stimulierenden Effekt auf das vasokonstriktorische Endothelin (58, 59). Eine Blockade von TGF β verbessert die diastolische Funktion (51).

Der Einfluss einzelner Zytokine auf die Pathogenese ist jedoch schwer zu beurteilen, da Zytokine multiple biologische Effekte haben und die Expression anderer Zytokine beeinflussen können (27).

Die Viruskonzentration im Myokard steigt in der akuten Phase an und erreicht zum 4. Tag p.i. maximale Werte. Zu diesem Zeitpunkt sind noch keine neutralisierenden Antikörper nachweisbar. Die Antikörpertiter steigen zum 8. – 10. Tag rapide an und sind um den 14. Tag p.i. maximal. Der ansteigende Antikörpertiter korreliert mit der Elimination des Virus aus dem Herzgewebe, wo ab dem 10. Tag keine Viren mehr nachzuweisen sind (21, 60, 61). Neben den neutralisierenden Antikörpern sind auch infiltrierende mononukleäre Zellen an der Viruselimination beteiligt (21, 61). Demzufolge ist etwa ab dem 10. Tag p.i. keine wesentliche virus-bedingte Schädigung des Myokards mehr anzunehmen, da NK-Zellen, Antikörper und infiltrierende Makrophagen zur Beseitigung kardiotoxischer Viren geführt haben (27). Mit dem Einsetzen der T-Zellinfiltration zwischen dem 7. und 14. Tag p.i. kommt es jedoch zu den schwersten pathologischen Veränderungen im Myokard (62).

Verschiedene Studien zeigten, dass für die Ausbildung einer Myokarditis eine T-Zellantwort essentiell ist. So bildet sich in experimentell bzw. genetisch T-Lymphozyten-defizienten Mäusen die Krankheit nicht vollständig aus (63-66). Die Nekrosereduktion scheint dabei virusunabhängig zu sein, da sich die Virustiter im Vergleich zu immunkompetenten Tieren nicht unterscheiden (63, 64). So zeigten sich in T-Lymphozyten-defizienten BALB/c-Mäusen nach Infektion mit EMCV im Vergleich zum Wildtyp geringere pathologische Veränderungen, keine Dilatation der Ventrikel und eine deutlich erhöhte Überlebensrate bei Abwesenheit einer effektiven Immunantwort (63). Auch hier wird der Virustiter durch T-Lymphozyten-Suppression nicht beeinflusst. Daher scheint die Viruselimination vorwiegend durch die humorale und kaum durch die zelluläre Immunität zu geschehen. Letztere scheint dagegen nach Entfernung der Viren aus dem Myokardgewebe pathogenetisch ursächlich an der fortschreitenden Myokardschädigung zu sein. T-Lymphozyten

erkennen virale Antigene auf infizierten Myozyten, die ihnen an MHC-Klasse-I Proteinen präsentiert werden, woraufhin zytotoxische T-Zellen die Lyse der infizierten Myozyten einleiten. Dies geschieht entweder über die Ausschüttung von Lymphokinen (67, 68) oder über die Aktivierung anderer Entzündungszellen wie Makrophagen. Sie sind damit auch mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des zellulären Infiltrats (67, 69).

Chronische Phase der viralen Myokarditis

In der chronischen Phase der Myokarditis kommt es 90 Tage nach der Infektion in DBA/2-Mäusen zu einer Erhöhung des Herzgewichtes, Vergrößerung und Dilatation des linken Ventrikels und zum Auftreten von fibrotischen Veränderungen, während das entzündliche Infiltrat kaum noch nachzuweisen ist. Diese Veränderungen sollen mit IL-1 assoziiert sein (31) und ähneln den kardialen Läsionen in Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (70).

Mittels in-situ-Hybridisierung lässt sich noch drei Wochen p.i. im Myokard und vier Wochen im Gehirn virale RNA in EMCV-infizierten Mäusen nachweisen (71). Einer Hypothese zur Folge (72) sollen in der chronischen Phase T-Lymphozyten aufgrund der persistierenden viralen RNA als fortbestehender antigener Reiz ins Gewebe infiltrieren. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass drei verschiedene immunkompetente Mausstämme, in denen enterovirale RNA persistiert, eine chronische Myokarditis entwickeln, während sich bei DBA/1-Mäusen, bei denen die virale RNA in der Frühphase eliminiert wird, keine Chronifizierung zeigt (72). Die chronische Myokarditis ist jedoch nicht obligat mit der Viruspersistenz verknüpft. Schließlich führt die Depletion von T-Lymphozyten trotz fehlender Viruselimination zu einer effektiven Verhinderung sowohl der kardialen Entzündung als auch der Herzmuskelnekrose (66). Das Ausmaß der Erkrankung scheint daher vielmehr von der Art der Immunantwort auf das Virus abzuhängen (28). In verschiedenen Mausmodellen lässt sich eine der viralen Myokarditis ähnliche Autoimmun-Myokarditis auslösen. Dabei reagieren autoreaktive T-Lymphozyten auch mit normalen antigenen Strukturen nicht-infizierter Kardiomyozyten (68, 73-75). Als ein wichtiges Autoantigen wird kardiales Myosin angesehen (76-78), das im Sinne antigenen Mimikries zur Autoimmunität führen kann. Daneben könnten auch Makrophagen beteiligt sein, die nach dem Abbau lysierter Kardiomyozyten die Bestandteile an ihrer Oberfläche präsentieren und auf diesem Wege die Autoimmunität induzieren können. De facto gleicht die Myosin-induzierte Myokarditis histologisch der Virus-induzierten Myokarditis (76, 77). Nach dieser Theorie könnten sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität an dem Fortschreiten kardialer Läsionen in der chronischen Phase beteiligt sein. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich bei Mausstämmen, die normalerweise eine akute Myokarditis ausheilen, durch Gabe von IL-1 und TNF α eine chronische Myokarditis induzieren lässt (79).

Eine weitere Möglichkeit der Myokardschädigung könnte durch ein Persistieren der Virusinfektion in Milz, Lymphknoten, Leber und Pankreas als extrakardialen Kompartimenten bestehen (28, 80, 81). Eine kontinuierliche oder rezidivierende Freisetzung Virus-infizierter Immunzellen könnte demnach zu einer persistierenden viralen Infektion von Kardiomyozyten beitragen (82).

1.2 T-Zellfunktionalität in der AMC/DCM

Im Laufe der Evolution hat sich in höheren Wirbeltieren ein wirkungsvolles Immunsystem zum Schutz des Körpers gegen krankheitserregende Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze), Parasiten, Fremdstoffe und maligne Zellen entwickelt. Die Gesamtheit der Gewebe, Zellen und Moleküle, die an der Abwehrreaktion gegen pathogene Eindringlinge und karzinogene Veränderungen beteiligt sind, bezeichnet man als Immunsystem (83-85).

Grundlegende Charakteristika des Immunsystems sind seine hochgradige Spezifität und die Fähigkeit zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Die beiden funktionellen Einheiten des Immunsystems, die angeborene, unspezifische Immunität und die adaptive, spezifische Immunantwort arbeiten synergistisch zusammen (86). Signale des angeborenen Immunsystems, wie Zytokine, aktivierte dendritische Zellen, Makrophagen oder Signale von toll like receptors (TLR) sind für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems unabdingbar (87). Die verschiedenen Abwehrreaktionen der adaptiven Immunantwort lassen sich vereinfacht in zwei große Klassen von Immunreaktionen untergliedern: Die humorale Antikörper-vermittelte Antwort, für die die B-Lymphozyten verantwortlich sind und die zellvermittelte Immunantwort, die hauptsächlich mittels T-Lymphozyten (T-Zellen) erfolgt. Diese Einteilung basiert auf zwei unterschiedlichen Erkennungssystemen der Lymphozyten, die auf die Erfassung von extra- und intrazellulären Krankheitserregern spezialisiert sind.

Bei der humoralen Antwort werden die verschiedenen Abwehrreaktionen zur Eliminierung von extrazellulären Pathogenen, z.B. Komplementaktivierung, Phagozytose und Neutralisierung, größtenteils durch spezifische Immunglobuline (Antikörper) vermittelt, die von aktivierten B-Zellen sezerniert werden.

1.2.1 T-Zellen

Die Differenzierung von hämatopoetischen, pluripotenten Stammzellen zu reifen Lymphozyten findet in den primären, lymphatischen Organen, dem Thymus (T-Zellen) und dem Knochenmark statt. Hierfür wandern die T-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark durch das Blut in den Thymus und durchlaufen im Thymuskortex aufeinanderfolgende Stadien der T-Zell-Differenzierung (Thymopoese). Dabei entwickeln sich die unreifen T-Zellen von CD4⁻/CD8⁻-Thymozyten über mehrere Stufen der T-Zellrezeptor (TCR) Rekombination zu CD4⁺/CD8⁺-Thymozyten (88). Diese doppelt positiven Zellen werden jetzt einer strengen Selektion unterzogen (89). Der zweiteilige Selektionsprozess soll die Bindung an körpereigene MHC-Allele gewährleisten (positive Selektion) (90-93), aber Lymphozyten durch Apoptose eliminieren, die eine Autoreaktivität für körpereigene Strukturen aufweisen können (negative Selektion) (94-96). Die positive Selektion erlaubt nur ca. 1-2% aller Thymozyten nach Interaktion mit MHC Klasse I oder Klasse II Molekülen auf dem Epithel des Thymuscortex zu überleben und sich zu CD4⁺ oder CD8⁺ naiven T-Zellen zu entwickeln (97). Diese naiven T-Zellen wandern anschließend in die Peripherie und die

verschiedenen, sekundären lymphoiden Organe (z.B. Lymphknoten oder Milz) und das mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe aus (98, 99). Treffen die T-Zellen hier auf eine TCR-stimulierende Kombination aus MHC und Peptid werden die T-Zellen aktiviert, proliferieren und können dann als ausgereifte Effektor T-Zellen in der Peripherie beim wiederholten Zusammenreffen mit der gleichen MHC/Peptid Kombination das Pathogen wirksam bekämpfen (100). Ein Teil dieser aktivierten T-Zellen bleiben als Gedächtnis-T-Zellen über Jahre hinaus wirkungsvoll. Gedächtnis-T- und B-Zellen gewährleisten, dass beim Wiederauftreten eines Pathogens eine Immunantwort schneller und wirkungsvoller aktiviert werden kann (101). Es gibt zwei Klassen von Haupthistokompatibilitätskomplex- (major histocompatibility complex: MHC) Molekülen. Diese MHC-Komplexe werden durch humane Leukozytenantigen-Moleküle (HLA-Moleküle) genetisch kodiert und zeichnen sich durch einen ausgeprägten Polymorphismus aus (102), was u.a. eine große Herausforderung für Gewebe- oder Organtransplantationen darstellt. Der MHC-Komplex eines Menschen setzt sich aus der Kombination verschiedener HLA-Moleküle zusammen und diese ist so individuell wie ein Fingerabdruck.

Neben den $CD4^+$ und $CD8^+$ -T Zellen gibt es auch noch γ/δ -T Zellen, welche nicht an die MHC/Peptid-Restriktion gebunden sind und sich hauptsächlich im Epithelgewebe und dem Dünndarm befinden (103). $CD4^+$ T-Zellen bezeichnet man auch als T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) und $CD8^+$ T-Zellen werden als zytotoxische T-Zellen (CTL) bezeichnet. CTLs haben vor allem zytotoxische Effektoreigenschaften, können aber auch durch regulatorische Eigenschaften eine Immunantwort kontrollieren (104). Aktivierte Effektor T-Zellen werden als besonders wichtig für die Kontrolle von viralen Infektionen betrachtet (105), da sie infizierte Wirtszellen lysieren, bevor diese in der Lage sind, infektiöse Partikel zu produzieren (106). Die Lyse wird über die Ausschüttung von Zytotoxinen (Granzyme, Perforin) und durch Produktion von Zytokinen (Fas-Ligand, $IFN\gamma$, $TNF\alpha,\beta$) (107) vermittelt (Abbildung 3). $CD8^+$ T-Zellen werden nach ihrem Zytokinprofil neuerdings auch in T_{k1} ($IFN\gamma$ -produzierende) und T_{k2/0} (IL-4-produzierende) T-Zellen unterschieden (108).

$CD4^+$ T-Zellen sind die zentralen Regulationszellen des adaptiven Immunsystems, sind aber auch in der Lage infizierte Wirtszellen zu lysieren (109, 110). Die Bedeutung dieser Zellen wird durch angeborene Defekte, bei Infektionen oder bei Ausfall dieser Zellen (z.B. durch HIV) besonders deutlich. $CD4^+$ T-Zellen werden durch Antigene in MHC-II-Komplexen aktiviert. Diese MHC-II-Komplexe werden nur von professionell antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie dendritischen Zellen (DCs), aktivierten Makrophagen und B-Zellen exprimiert. Abhängig vom stimulierenden Antigen, den antigenpräsentierenden Zellen, der Lokalisierung des Antigens, der Dosis und der Stimulationszeitspanne, sowie von den Zytokinen der Umgebung, können sich aus Th0-Zellen Th1- oder Th2-Zellen entwickeln (94, 111, 112). Aufgrund der von ihnen sezernierten Zytokine erfolgt die Einteilung in Th1- und Th2-Subpopulationen (Abbildung 3). Diese Gliederung wurde erstmalig anhand der Analyse von Th-Zellklonen der Maus beschrieben, später wurden derartige Sekretionsmuster auch bei humanen Th-Zellklonen gefunden (44, 113, 114). Die Hauptfunktion der Th-Lymphozyten ist die Sezernierung von proinflammatorischen

Einleitung

Molekülen wie Interferon- γ (IFN γ), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Interleukin-2 (IL-2). Diese wirken sowohl lokal als auch systemisch und dienen zum Teil direkt der Virusbekämpfung, aber hauptsächlich zur Koordination der Immunantwort.

So genannte Th1-Zelllinien sezernieren nach Aktivierung IL-2, Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) und Interferon- γ (IFN- γ), während Th2-Zelllinien IL-4, IL-5 und IL-13 exprimieren.

Daneben gibt es auch Th-Zelllinien des Menschen und der Maus, die durch ein gemischtes, so genanntes Th0-Sekretionsmuster charakterisiert sind. Diese sezernieren sowohl Th1-Zytokine als auch Th2-Zytokine (115). Bei der Th-Zellpolarisierung von naiven Zellen spielen v.a. Zytokine eine zentrale Rolle. Das von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen produzierte Zytokin IL-12 induziert in naiven Th-Zellen die Sekretion von Th1-Zytokinen (116-119). Neben IL-12 und IFN γ bewirkt eine kräftige Bindung zwischen TCR und Ligand die Differenzierung von Th0-Zellen zu CD4⁺ Th1-Zellen (Abbildung 3) (120). Th1-Zellen produzieren hauptsächlich IFN γ , CD40L, IL-2 und TNF β und fördern somit eine Zell-vermittelte Immunantwort, wobei IFN γ die Differenzierung von Th2 Zellen blockiert (121).

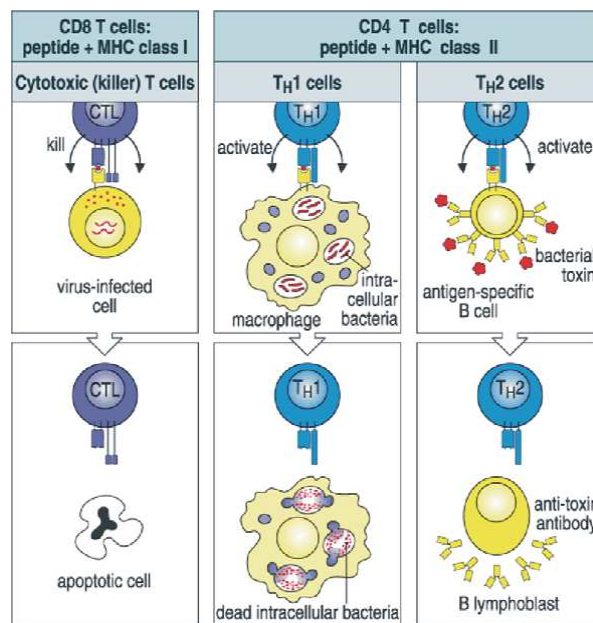


Abb. 3: Wirkungsweise der verschiedenen T-Zellen (CTL, Th1- und Th2-Zellen) (94)

Einleitung

Eine weitere Untergruppe der T-Helferzellen sind die Th17-Zellen. Sie produzieren IL-17 und haben sich unterschiedlich zu den Th1 und Th2 Zellen entwickelt. Sie spielen eine entscheidende Rolle in Autoimmunerkrankungen (122, 123) und des Weiteren wird ihnen eine besondere Rolle bei Gewebeverletzungen angedacht (124). Bis jetzt bleibt es unklar, welche Zytokine genau zur Th17-Ausbildung beitragen, aber es wird vermutet, dass TGF β , IL-6, IL-21 und IL-23 daran beteiligt sind (125). Mit diesem Zelltyp assoziierte Effektor-Zytokine sind IL-17, IL-21 und IL-22 (126). Man vermutet, dass die Aktivierung der Vorläufer Th-Zellen in Anwesenheit von TGF β und IL-6 zur Differenzierung zu Th17-Zellen führt. Abgesehen von dem Zytokinumfeld ist es unklar, ob weitere Elemente der initialen Aktivierung der Th17-Zellen von denen anderer Th-Zellen differieren. Man vermutet, dass IL-23 an der Expansion von bestehenden Th17-Populationen beteiligt ist, aber dass Zytokine alleine nicht die Differenzierung von naiven T-Vorläuferzellen in diesen Zelltypen induzieren (127). Für IL-21 ist gezeigt worden, dass es eine alternative Route zur Aktivierung von Th17 Populationen (128) darstellt. IFN γ und IL-4, die Hauptstimulatoren der Th1- und Th2-Differenzierung haben negative Auswirkungen auf die Th17-Differenzierung (122). Th17-Zellen werden allgemein mit Autoimmunkrankheiten in Verbindung gebracht und für auto-spezifische Th17 Zellen wurde gezeigt, dass sie hoch pathogen sind (129). Th17-Zellen produzieren hauptsächlich IL-17A und IL-17F, welche an der Rekrutierung, Aktivierung und Migration von Neutrophilen beteiligt sind.

Eine weitere Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (Tregs) (130, 131). Sie sind in der Lage über die Ausschüttung von inhibitorischen Substanzen wie Interleukin-10 (IL-10) und TGF β , sowie durch Zell-Zell-Kontakt die spezifische Funktion und das Wachstum von Effektorzellen negativ zu beeinflussen (132). Dadurch wird in der Regel eine erregerspezifische Immunantwort auf ein angemessenes Niveau begrenzt. Eine gezielte Regulation dieser T-Zellen kann eine enorme Bedeutung für die Entwicklung von Krebsimpfstoffen und für die Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen bekommen. Ihre Aufgabe ist die Modulation der Immunreaktion und des Weiteren sind sie vermutlich für die Unterdrückung einer überschießenden Immunantwort auf ansonsten 'harmlose' Antigene und Toleranzentwicklung gegen körpereigene Strukturen zuständig. Im Gegensatz zu den T-Suppressorzellen ist die experimentelle Beweislage für diesen Zelltyp jedoch ausgezeichnet. Die Mechanismen der Toleranzvermittlung sind noch nicht vollständig aufgeklärt, die Tregs scheinen aber von enormer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz zu sein.

Diese Zellen wurden bisher anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD25 (A-Kette des IL-2-Rezeptors) identifiziert. CD4 ist allerdings auch auf T-Helferzellen zu finden und CD25 findet sich auch auf der Oberfläche anderer T-Zellen, nach deren Aktivierung im Rahmen einer Immunantwort. Deshalb werden Tregs heute über die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (forkhead box protein 3) identifiziert. Ferner lassen sich regulatorische T-Lymphozyten auch durch die niedrigere Expression des Interleukin-7-Rezeptors (IL7-R, CD127) gegenüber Helfer-Lymphozyten unterscheiden, die den IL7-Rezeptor auf der Zelloberfläche tragen. Dieser Nach-

weis hat gegenüber der FoxP3 Messung den Vorteil, dass der Marker auf der Zellmembran und nicht intrazellulär wie FoxP3 lokalisiert ist und sich deshalb leichter anfärben lässt.

Man fasst heute die CD4⁺-CD25⁺-Zellen als eine Untergruppe der Tregs auf: Die CD4⁺CD25⁺ Zellen scheinen nach antigenspezifischer Aktivierung CD4⁺ und CD8⁺ Zellen über Zellkontakt zu hemmen. Bei den übrigen Tregs scheint der Hemmmechanismus ohne Zellkontakt, sondern durch Sekretion von Zytokinen (IL-10, TGFβ) zu funktionieren.

1.2.2 T-Zellrezeptor (TCR)

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist ein transmembranäres Heterodimer-Molekül auf T-Lymphozyten, das durch HLA Klasse I oder HLA Klasse II Moleküle präsentierte Peptide erkennt. Die Untereinheiten, die sich entweder aus α/β oder γ/δ zusammensetzen, sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (133). Das α/β oder γ/δ Heterodimer ist über die N-terminalen Enden der Ketten in der Zellmembran einer T-Zelle verankert (Abbildung 4).

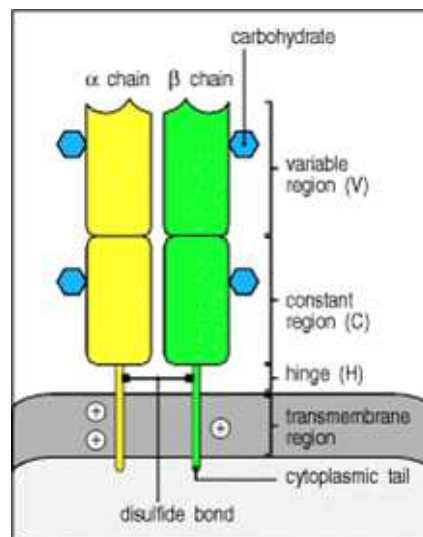


Abb. 4: Struktur des T-Zellrezeptors (TCR); aus (84, 94). Das TCR Heterodimer besteht aus zwei transmembranären Glykoproteinketten, α und β. Der extrazelluläre Bereich beider Ketten besteht aus zwei Domänen, welche den variablen und konstanten Bereichen des Immunglobulins ähneln. Beide Ketten besitzen Kohlenhydratseitenketten an ihren Domänen. Ein kurzes Segment, welches analog zur Immunglobulin-Gelenkregion ist, verbindet die Immunglobulin-ähnlichen Domänen mit der Membran, und enthält die Cysteinreste, über die eine Disulfidbrücke ausgebildet wird.

Die erworbene Vielfalt der Immunreaktivität basiert wesentlich auf genetischer Rekombination aus einem Pool von diversen diskontinuierlichen Segmenten mit Einfügung zufälliger Nukleotide an den Verbindungsstellen. Die α- und γ-Ketten werden von V-, J- und C-Gensegmenten und die

der β - und δ -Ketten von V, D, J und C-Gensegmenten kodiert (Abbildung 5). Die enorme Diversität des TCR von bis zu 10^{15} theoretisch möglichen Spezifitäten (134) entsteht unter anderem während der intrathymische Entwicklung durch die somatische Rekombination von V-, D-, J- und C-Segmenten (135).

Der TCR ist darüber hinaus mit dem CD3-Komplex (γ , δ , ϵ) und einem zytoplasmatisch gerichtetem ζ -Homodimer bzw. einem ζ/η -Heterodimer assoziiert (136). Im Falle des humanen TCR besteht der β -Lokus (TRB) aus 65 V (*variable*), 2 D (*diversity*) und 13 J (*joining*) unterschiedlichen Segmenten. Daraus resultieren beim humanen Immunsystem etwa 10^6 mögliche verschiedene β -Ketten bei den naiven T-Zellen, im *Memory*-T-Zell-Repertoire sind immer noch bis zu 2×10^5 verschiedene TRBs nachweisbar (137).

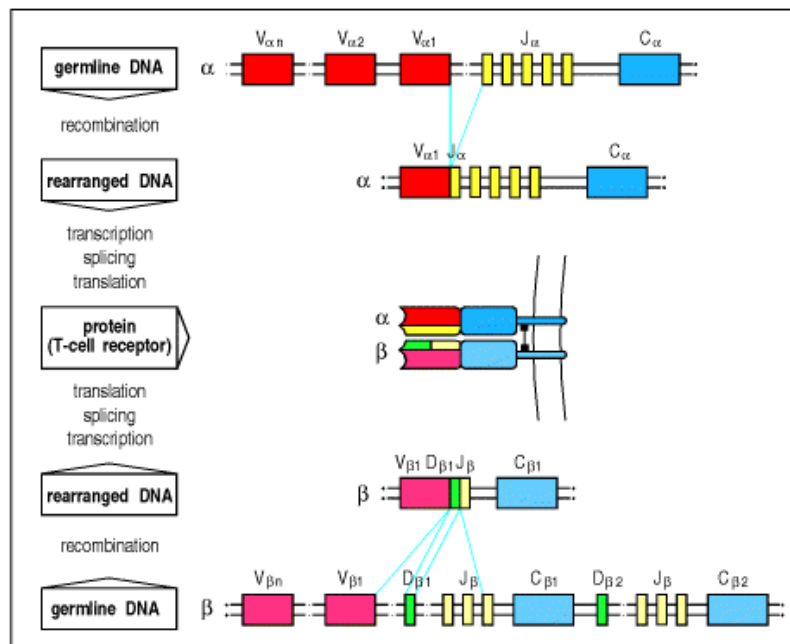


Abb. 5: T-Zell Rezeptor α und β Gen-Rearrangement (Umlagerung) aus (84, 94)

Die TCR α - und β -Ketten Gene bestehen aus einzelnen Segmenten, die durch somatische Rekombination bei der Entwicklung der T-Zellen aneinandergesetzt werden. Für die α -Kette (oberer Teil der Abbildung), ordnet sich ein V_α Gen-Segment zu einem J_α Gen-Segment um ein funktionelles Exon der V-Region zu schaffen. Transkription und Spleißen des VJ_α Exons zu C_α generiert die mRNA, die für das TCR- α -Ketten Protein kodiert. Die variable Region der β -Kette (unterer Teil der Abbildung) ist wie die schwere Kette der Immunglobuline durch drei Gensegmente V_β , D_β , und J_β kodiert. Ein Rearrangement dieser Gensegmente generiert ein funktionelles VDJ_β Exon, welches sich C_β angliedert. Die beiden Ketten bilden kurz nach ihrer Biosynthese das α/β TCR-Heterodimer aus.

Unter physiologischen Bedingungen erkennt der α/β -TCR das Fremdantigen an der Oberfläche nur in Zusammenhang mit dem körpereigenen Histokompatibilitätsantigen (MHC) (138, 139). Diese Besonderheit der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten ist als "MHC-Restriktion" bzw. als "Zinkernagel-Doherty-Phänomen" (140) bekannt. Nach Erkennung des spezifischen Anti-

gens durch den TCR, wird über den CD3-Komplex und die Ketten der ζ -Heterodimere ein intrazelluläres Signal initiiert, welches zur Aktivierung der T-Zelle führt und in Folge dessen den Prozess der klonalen Expansion einleitet.

Unter gesunden Bedingungen findet sich daher im peripheren Blut, im retikuloendothelialen System und auch in den sonstigen Organen stets eine polyklonale Zusammensetzung der T-Zellen. Klonale T-Zell-Expansionen finden hingegen in T-Zell-Lymphomen statt, und deren Detektion dient als diagnostisches Kriterium zur Unterscheidung von nicht-malignen T-Zell-Proliferationen (141). Eine chronische Aktivierung des Immunsystems, die sich gegen ein spezifisches Antigen richtet, kann auch zu einer deutlichen Einschränkung der spezifisch reaktiven T-Zell-Klone in den Zielorganen führen (142). Darüber hinaus können auch Superantigene (z.B. von Bakterien und Viren) über die Bindung an den TCR bestimmte T-Zellen aktivieren und ebenfalls zu einer Restriktion des TRBV-Repertoires führen (143). Durch Peptidscans wurden mehrere Antigene identifiziert, auf die bei diversen Autoimmunerkrankungen dominante TCR Varianten spezifisch reagieren, allerdings zeigen diese Proteine nicht durchgehend eine hohe Sequenzhomologie auf (144).

1.2.3 T-Zell-Funktionalität und Marker-Genexpression

Der Verlauf einer Virusinfektion ist wesentlich von der Funktion der Helfer-T-Zellen (Th) bestimmt. Typische Th1-Effektorzytokine (z.B. $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha/\beta$) hemmen verschiedene virale Promotoren und führen so zur Hemmung der Virusproteinsynthese und -vermehrung; eine Elimination der infizierten Zellen erfolgt durch CTL. Diese funktionellen Subpopulationen der T-Zellen sind durch charakteristische Genexpressionsmuster charakterisiert. Der Nachweis der Expression dieser Faktoren in Gewebe infiltrierenden T-Zellen erleichtert die Zuordnung zu funktionellen T-Zelllinien. Eine schnelle und ausgeprägte Th1-Antwort, kombiniert mit einer effektiven Antwort mit zytotoxischen T-Lymphozyten, führt zu einer ausgeprägten akuten Entzündungsreaktion im Gewebe, die zumeist zur effektiven Viruselimination beiträgt. Eine sich langsam entwickelnde und partielle T-Zellantwort hingegen hat zwar initial eine geringere entzündliche Aktivität, führt jedoch über eine ineffektive Viruselimination häufig zur Viruspersistenz und damit zur lang anhaltenden Persistenz der subakuten Entzündungsreaktion mit den entsprechenden potentiell, negativen Folgen. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die Entwicklung endogener Regulationsmechanismen wie Anergie (Tanerg) und regulatorische T-Zellen (Treg) der chronischen Entzündung entgegenwirken, und damit aber auch die Viruspersistenz verstärken, d.h. regulatorische Zellen können nicht nur positive Effekte zur Vermeidung von Autoimmunopathien vermitteln, sondern auch zur Herunterregulation protektiver, antimikrobieller Funktionen führen (145). Neben den CTLs-typischen Genen (Perforin, Granzyme, Granulysin) und die für Th1-Zellen ($\text{IFN}\gamma$) bzw. Th2-Zellen typischen Effektorzytokine (IL-4, IL-5, IL-13) konnten durch neuere Untersuchungen eine Reihe von Markern (vor allem Transkriptionsfaktoren) identifiziert werden, die eine relative Linienspezifität aufweisen. Als solche sind T-bet und

Eomesodermin für Th1-Zellen (146), GATA3 für Th2-Zellen (147), GRAIL für anerge T-Zellen (148) und Foxp3 für Treg (149) identifiziert worden.

1.2.4 Datenlage zur TRBV Expression bei experimenteller und humaner Myokarditis und DCM / DCMi

Sowohl bei der Myosin-induzierten Autoimmun-Myokarditis (150) als auch bei der Coxsackievirus-induzierten experimentellen Myokarditis (151) wurden klonale TRBV Expansionen durch *CDR3 (complementary determining region 3) spectratyping* bestätigt. Dass diesem Phänomen nicht nur eine pathogenetische, sondern auch potentiell eine therapeutische Relevanz beizumessen ist, zeigen Tierexperimente im Modell der Autoimmun-Myokarditis, in denen durch die Depletion der entsprechenden TRBs mittels monoklonaler Antikörper oder DNA-Vakzinen zu einer signifikanten Protektion vor den organspezifischen Folgen der Autoimmun-Myokarditis führte (152).

Über *CDR3 spectratyping* gelang bei humaner Myokarditis an 3 explantierten Herzen von pädiatrischen Patienten der Nachweis einer restringierten Zusammensetzung von bestimmten V β Familien (TCR-V β 3, 7 und 13.1) (153). Angesichts der immunhistologisch detektierten Expression von enteroviralen Proteinen (allerdings bei fehlendem PCR-Nachweis von enteroviralem Genom) wurde geschlussfolgert, dass die Virusproteinexpression der induzierende Faktor für die beobachtete TCR-V β Restriktion im Sinne einer Superantigen-getriggerten Immunantwort gewesen sei. Zumindest für Coxsackievirus-B4 Antigene, die eine TCR-V β Restriktion hervorgerufen, konnte jedoch bislang keine Superantigen-Aktivität nachgewiesen werden (154).

1.3 Zielstellungen der Promotionsarbeit

Die Ergebnisse dieser Promotion sollen übergreifend zu einem besseren Verständnis der T-Zell-Antwort bei der akuten Myokarditis (AMC) und der DCMi beitragen. Es wird von der Hypothese ausgegangen, dass die unterschiedlichen kardiotropen Viren (B19V, HHV-6 und CVB) virus-spezifische TRBV-Dominanzen induzieren.

- 1) Die für die Detektion von klonalen TRBV-Umlagerungen in Lymphomen etablierten BIOMED-2 Primersysteme (155) haben sich in Vorversuchen als nicht anwendbar auf die TRBV-Untersuchungen bei Herzmuskelgewebe von DCM-Patienten herausgestellt, weil aus der relativ geringen T-Zell-Infiltration Pseudomonoklonalitäten mittels dieses methodischen Ansatzes resultieren. Eine Zielstellung dieser Doktorarbeit ist es daher, ein alternatives TRBV-/TRBC-Primer-Sondensystem zur TRBV-Expressionsanalyse mittels real-time RT-PCR zu entwickeln, das exemplarisch an Lymphom-Zelllinien mit definierten TRBV Umlagerungen validiert werden soll.
- 2) Im Weiteren soll ein valides, reproduzierbares und exaktes Präamplifikationssystem zur Genexpressionsquantifizierung an den relativ kleinen Gewebsmengen von Endomyokardbiopsien (EMBs), und der daraus resultierenden geringen extrahierbaren RNA Mengen niedrig exprimierten T-Zell-assoziierten Genen etabliert werden. Zur Optimierung der RNA-Extraktion werden mehrere Extraktionsmethoden miteinander verglichen.
- 3) Über die Assoziation zur etablierten, immunhistologischen Diagnostik der DCMi (156-158) soll eine Grenzwertsetzung der CD3- und der TRBC-Expression versucht werden. Auf der Basis dieser Grenzwertsetzung soll die differentielle Expression von funktionellen TRBV Familien und von funktionellen T-Zellmarkern (FTZM) vorgenommen werden.
- 4) Zur Bestimmung des Verlaufs der Coxsackie-B-Virus-assoziierten TRBV-Dominanzen bei der Maus-Myokarditis sollen Untersuchungen an SWR-Mäusen nach der CVB-Infektion durchgeführt werden. Diese Untersuchungen sollen den Verlauf der TRBV Expression an einem etablierten Mausmodell bei identischem genetischen Hintergrund und definierten experimentellen Bedingungen aufzeigen.
- 5) An ausgesuchten, seltenen Fällen einer B19V assoziierten akuten Myokarditis mit initialer B19V Virämie sollen über Virusproteom-umfassende Peptidbibliotheken in Anlehnung an publizierte Methoden (159) B19V-antigenspezifische T-Zellen isoliert und deren TRBV Dominanz sowie deren differentielle FTZM-Expression ermittelt werden.
- 6) In weiteren methodischen Arbeiten sollen Grundlagen für eine hohe Effizienz und Reproduzierbarkeit der *in-vitro* T-Zell-Expansionen an PBMCs erarbeitet werden. Hierbei soll eine möglichst geringe Abweichung des TRBV-Expressionsprofil der *in vitro* expandierten T-Zellen im Vergleich zu den initial eingesetzten T-Zellen erreicht werden. Zur TRBV-Expressionsanalyse soll das zu etablierende TRBV-/TRBC-Primer-Sondensystem zum

Einsatz kommen. Diese methodischen Grundlagen sollen langfristig dazu beitragen, die in EMBs gering vorhandenen T-Zell-Infiltrate *in vitro* zu expandieren, die dann u.a. für Antigen-spezifitätsanalysen von infiltrierenden T-Zellen von DCMi-Patienten eingesetzt werden könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten- und Kontrollgruppen

Es wurden Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose einer akuten Myokarditis (AMC) oder dilatativen Kardiomyopathie (DCM) untersucht. Die Erfassung der klinischen Parameter, die Anamneseerhebung und die Einstufung der klinischen Verdachtsdiagnose erfolgte nach allgemein akzeptierten Kriterien (13, 16, 18, 156, 160-165). Eine sekundäre Pathogenese, wie arterieller Hypertonus, koronare Herzkrankheit, Vitien, angeborene Herzmuskelerkrankungen, metabolische oder Speichererkrankungen und ein exzessiver Alkoholkonsum, wurden bei diesen Patienten durch die Anamneseerhebung, Langzeitblutdruckmessung, Ergometrie, Echokardiographie, laborchemische Untersuchungen und invasiv, mittels Koronarangiographie ausgeschlossen. Die LVEF wurde in einer biplanen LV-Angiographie als Standard-Prozedur ermittelt. Des Weiteren stand die echokardiographisch nach der modifizierten Simpson's Methode ermittelte LVEF zur Verfügung, die im Rahmen von ambulanten Untersuchungen der Patienten im Verlauf beurteilt werden konnte, zusammen mit den sonstigen üblichen echokardiographischen Parametern, insbesondere des LVEDD. Diese Untersuchungen entsprachen den Richtlinien der Deklaration von Helsinki (166). Alle Patienten willigten zur invasiven Untersuchung und Entnahme von EMBs im Rahmen der klinischen Untersuchungen ein, die im Rahmen des Sonderforschungsbereichs Transregio 19 (SFB TR19) entworfen und von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin bewilligt worden waren.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

- Brutschrank Function Line BB16C4, Heraeus instruments, Hanau
- CCD-Kamera XC-003P, Sony, Japan
- Cytospin 2, Shandon Southern Products Ltd. Astmoor, Runcorn, Cheshire, UK
- Elektrophoresekammer, Biometra, Göttingen
- Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf AG, Hamburg
- Feinwaage Sartorius TE2145, Sartorius, Göttingen
- Fluoreszenzmikroskop DMRBE, Leica, Bensheim
- Homogenisator Pellet Pestle Motor, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Kryostat Microm HM 560, Microm International GmbH, Walldorf
- Kühlzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415R, Eppendorf AG, Hamburg
- Laborwaage, elektronisch DMS 580, Kern Elektronik, Albstadt
- Magnetrühr-/Heizplatte Ikamag REO, IKA-Labortechnik, Staufen
- Mikrotom Jung CM 3000, Leica, Bensheim
- MS-1 Minishaker, IKA-Labortechnik, Staufen
- Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA
- Netzgerät, Power Pack P25, Biometra, Göttingen
- Peltier Thermal Cycler PTC 100, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA
- pH-Meter, Knick Digital 646, Beyer GmbH, Düsseldorf
- Sterilbank HeraSafe, Heraeus instruments, Hanau
- Tischzentrifuge Megafuge 1,0R, Heraeus instruments, Hanau
- UV-Transilluminator/Bilddokumentation BioDocAnalyze System, Biometra, Göttingen
- 7900 HT Fast Real-time PCR System, Applied Biosystems, Darmstadt

2.2.2 Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders ausgewiesen, wurden die verwendeten Chemikalien vom höchsten Reinheitsgrad von folgenden Firmen bezogen: VWR Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen), J.T.Baker (Deventer, Holland).

Lösungen wurden in deionisiertem, sterilem Wasser angesetzt. Sterilisiert wurde durch Autoklavieren bzw. Sterilfiltration.

2.2.3 Oligodesoxynukleotide

Für das Design der Primer-/Sondensysteme der konstanten (TRBC) und der variablen Ketten (TRBVs) des T-Zell-Rezeptors beta (TRB) wurden die Gensequenzen und die Nomenklatur (Tabelle 1) des International Information System (IMGT: <http://imgt.cines.fr/>) verwendet. Das Design wurde unter Anwendung der Primer Express Software (Version 2.0; Applied biosystems, Darmstadt) nach den von Applied biosystems vorgegebenen Richtlinien vorgenommen. Die TRBC Primer umfassten TRBC1 und TRBC2 auf den homologen Sequenzabschnitten und stellen neben dem *housekeeping* Gen eine interne Kontrolle für den T-Zellrezeptor dar. Das Design des TRBV Genexpressionsassay Systems wurde so gestaltet, dass ein TRBV-familienpezifischer Vorwärtsprimer gegen eine gemeinsame Sonde und einen gemeinsamen Rückwärtsprimer auf dem TRBC gewählt wurde. Sequenzhomologien der letztlich eingesetzten TRBV Primer wurden mittels multiplem *alignment* unter Einsatz der ClustalX Software (Version 1.83; University Straßburg, Frankreich) ausgeschlossen (167). Im Fall der TRBV5, 6 und 7 wurden *wobbled* Vorwärtsprimer gewählt, um die wenigen Basendifferenzen der entsprechenden Allele bei vertretbarer resultierender Amplikonlänge (bis zu ca. 250 Basen) zu umfassen. Die FAM-markierten Fluoreszenzsonden wurden als *minor groove binder* (MGB; Applied biosystems patentiertes Design der Fluoreszenzsonde) hergestellt, was eine höhere Sensitivität der real-time RT-PCR ermöglicht.

Die Genexpressionsassays für HPRT-CCM, IL-10, IFN γ , *transforming growth factor beta* (TGF β), FoxP3, T-bet, GATA3, Granzyme A, Granzyme B, Granulysin und Perforin wurden unter Verwendung der Oligo 4.1 Software (Molecular Biology Insights, Cascade, USA) auf der Basis der vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) publizierten Sequenzen designiert. Die Sequenzen der Primer sind in der Tabelle 2 und der Sonden in Tabelle 3 gelistet. Für *tissue factor* (TF) wurde ein publiziertes Genexpressionsassay verwendet (168). Die Primer und Sonden wurden bei der Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) in Auftrag gegeben, mit Ausnahme der MGB-Sonden für die TRBC und TRBV Genexpressionsassays, die von ABI auf Auftrag hergestellt wurden. Die Codes der ebenfalls eingesetzten inventarisierten Applied Biosystems Taqman[®] Genexpressionsassays können der Tabelle 5 entnommen werden. Es wurden ausschließlich FAM (Carboxyfluorescein) gekoppelte Sonden eingesetzt.

Tab. 1: Nomenklatur des humanen TRBV Systems

IMGT	Wei et al.	Arden et al.	Rowen et al.	IMGT	Wei et al.	Arden et al.	Rowen et al.
TRBV30	20S1	20S1	30	TRBV6-7	13S8	13S8	38145
TRBV29-1	4S1	4S1	29-1	TRBV5-5	5S3	5S3	38112
TRBV28	3S1	3S1	28	TRBV7-5	6S12	6S9	38173
TRBV27	14S1	14S1	27	TRBV6-6	13S6	13S6	38144
TRVB		34S1		TRBV5-4	5S6	5S6	38111
TRBV26		28S1	26	TRBV7-4	6S11	6S8	38172
TRBVA		33S1		TRBV6-5	13S1	13S1	38143
TRBV25-1	11S1	11S1	25-1	TRBV12-2	8S5	8S5	38323
TRBV24-1	15S1	15S1	24-1	TRBV11-2	21S3	21S3	38293
TRBV23-1	19S1	19S1	23-1	TRBV10-2	12S3	12S3	38262
TRBV22		29S1	22-1	TRBV12-1	8S4	8S4	38322
TRBV21-1	10S1	10S1	21-1	TRBV11-1	21S1	21S1	38292
TRBV20-1	2S1	2S1	20-1	TRBV10-1	12S4	12S2	38261
TRBV19	17S1	17S1	19	TRBV9	1S1	1S1	9
TRBV18	18S1	18S1	18	TRBV5-3	5S5	5S5	38110
TRBV17	26S1	26S1	17	TRBV8-2		32S1	38201
TRBV16	25S1	25S1	16	TRBV7-3	6S1	6S1	38171
TRBV15	24S1	24S1	15	TRBV6-4	13S5	13S5	38142
TRBV14	16S1	16S1	14	TRBV5-2		31S1	38109
TRBV12-5	8S3	8S3	38326	TRBV8-1		30S1	38200
TRBV12-4	8S2	8S2	38325	TRBV7-2	6S7	6S5	38170
TRBV12-3	8S1	8S1	38324	TRBV6-3	13S2b	13S2b	38141
TRBV11-3	21S4	21S2	38294	TRBV4-3	7S2	7S2	38080
TRBV10-3	12S2	12S1	38263	TRBV3-2	9S2	9S2	38048
TRBV13	23S1	23S1	13	TRBV6-2	13S2a	13S2a	38140
TRBV7-9	6S5	6S4	38177	TRBV4-2	7S3	7S3	38079
TRBV5-8	5S8	5S4	38115	TRBV7-1	6S10	6S7	38169
TRBV7-8	6S3	6S2	38176	TRBV6-1	13S3	13S3	38139
TRBV6-9	13S4	13S4	38147	TRBV5-1	5S1	5S1	38108
TRBV5-7	5S7	5S7	38114	TRBV4-1	7S1	7S1	38078
TRBV7-7	6S14	6S6	38175	TRBV3-1	9S1	9S1	38047
TRBV6-8	13S7	13S7	38146	TRBV2	22S1	22S1	2
TRBV5-6	5S2	5S2	38113	TRBV1		27S1	1
TRBV7-6	6S4	6S3	38174				

Tab. 2: Sequenzen der Primer der selbst entworfenen real-time RT-PCR gene assays

Gen	Sequenz der forward primer	Sequenz der reverse primer
TRBC	TCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTA	GACAGGACCCCTTGCTGGTA
Gemeinsamer TRBV antisense primer		CTGCTTCTGATGGCTCAAACA
TRBV2	ACTCTGAAGATCCGGTCCACAA	
TRBV3	ATCAATTCCCTGGAGCTTGGT	
TRBV4	CCTGAATGCCCAACAGC	
TRBV5	GCTCTGAGCTGAATGTGAACGC	
TRBV5WBL	GCTCTGAGATGAATGTGAGTGC	
TRBV6	CACTGACAAAGGAGAAGTCCC	
TRBV6WBL6-2	AACTGCCAAAGGAGAGGTCCC	
TRBV6WBL6-4	CACTGGCAAAGGAGAAGTCCC	
TRBV7	CTCTCAGGTGTGATCCAATTTCTG	
TRBV7WBL7-2;7-3	AGCTCAGGTGTGATCCAATTTCA	
TRBV7WBL7-9	CTTTCAGGTGTGATCCAATTTCT	
TRBV9	CACAACAGTTCCTGACTTGCA	
TRBV10	CATGGGCTGAGGCTGATC	

Material und Methoden

TRBV11	CTGCAGAGAGGCTCAAAGGAGTAG	
TRBV12	AGAACCCAGGGACTCAGCTGT	
TRBV13	GAAGTGAACATGAGCTCCTTGG	
TRBV14	CTGAAAGGACTGGAGGGACGTAT	
TRBV15	CAGGAGGCCGAACACTTCTTT	
TRBV16	GCCTCCCAAATTCACCCTGTA	
TRBV18	CCAGCATCCTGAGGATCCA	
TRBV19	ACTGTGACATCGGCCAAA	
TRBV20	AACCATGCAAGCCTGACCTT	
TRBV23	CCCTGCAGCCTGGCAAT	
TRBV24	GCTAAATTCTCCCTGTCCCTAGAGT	
TRBV25	TTCCCCTGACCCTGGAGTCT	
TRBV27	GGCTTAAGGCAGATCTACTATTCAATG	
TRBV28	GCCAGCACCAACCAGACAT	
TRBV29	AGCCGCCCAAACCTAACATT	
TRBV30	CGGCAGTTCATCCTGAGTTCT	
HPRT-CCM	AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG
IL10	CAAGTTGTCCAGCTGCTTCAT	TTGGCGAAAGCAGCTCCTC
IFNg	CAGGTCATTCAGATGTAGCGGATAA	AGGAGACAATTTGGCTCTGCATT
TGFb	CCCTGCCCTACATTGGAG	CCGTTATGCTGGTTGTACA
FoxP3	TGGCAAACGGAGTCTGCAA	TTCATCCAAGAGGTGATCTGCT T
T-bet	CAACACAGGAGGCGCACTGG	CCCCCTTGTGTTTGTGAGCT
GATA3	CCTCATTAAGCCCAAGCGAAG	TTGGCATTTCCTCCAGAGT
GRAIL	GAAGCAGAGGCAATTAAGGCAG	CATCAGGGCCAATTTCTTGT
Granzyme A	CCCTGTGATTGGAATGAATATGGT	ACACCCTCGCACAAACAAGG
Granzyme B	GCGAATCTGACTTACGCCATTATT	CAAGAGGGCCTCCAGAGTCC
Granulysin	AAAACCTGAAGAAGATGGTGGATAAGC	ATCGTGACCTCCCCGTCTTA
Perforin	GGACCAGTACAGCTTCAGCACTG	AGTCAGGGTGCAGCGGG

Tab. 3: Sequenzen der selbst entworfenen fluoreszierenden Hybridisierungssonden

Gen	Sequenz
TRBC	ACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAA
TRBV common probe	CACCCGAGGTCGCT
HPRT-CCM	TTTACCAGCAAGCTTGCAGCCTTGA
IL10	TTACAGGACCAGAGGGACAAGACATGACTGTG
IFNg	TTTCTGTCACTCTCCTCTTCCAATTCTTCAA
TGFb	CACGCAGTACAGCAAGGTCCTGGCC
FoxP3	AGCCGGGAGAGTTTCTCAAGCACTGC
T-bet	CACCTGTTGTGGTCCAAGTTTAAATCAGCACC
GATA3	TCCTGTGCGAACTGTCAGACCACCAC
GRAIL	GGAAGGCTTCAACTACGCACACTGAAACAAG
Granzyme A	CTTCCAGAATCTCCAATTGCGGAGTCTCTTC
Granzyme B	CCCACGCACAACCTCAATGGTACTGTGCG
Granulysin	ACCCAGAGAAGTGTTCCTCAATGCTGCGAC
Perforin	TGCCGCTTCTACAGTTTCCATGTGGTACAC

Material und Methoden

Tab. 4: Präamplifikationsprimer für die Genexpressionsassays, die in dem SSRT-PreAmp Verfahren eingesetzt wurden

Gen	5' sense 3' Primer	5' antisense 3' Primer
HPRT-CCM	GATATAATTGACACTGGCAAAC	ACAAACATGATTCAAATCCCTGA
CD3z	CCGATTACAGAGGCACAGAG	TCGTACTCCTCTCTTCGTCC
IFNg	TTTTGGGTTCTCTTGCTGTTA	CTCTTTTGGATGCTCTGGTCA
FoxP3	CCCAGAGCTCCTACCCACT	TGGCACTCAGCTTCTCCTTC
T-bet	GACTGGAGGTGTCGGGGAA	CCACGTCCACAAACATCCTG
GATA3	TCACAAAATGAACGGACAGAAC	TAATATTGTGAAGCTTGTAGTAGA
Granulysin	AGGAGCTGGGCCGTGACTA	CTCTAGACTGATACCTCCTCA
Perforin	TGTGGCCGGCTCACACTCA	CGTAGTTGGAGATAAGCCTGA

Tab. 5: ABI inventarisierte Taqman® gene assays

Gen	ABI ID number	Gen	ABI ID number
CDKN1B	Hs00153277_m1	TLR9	Hs00370913_s1
HPRT-ABI	Hs99999909_m1	MYD88	Hs00182082_m1
CD3d	Hs00174158_m1	TRAF3	Hs00377462_m1
IL-1b	Hs00174097_m1	TRAF6	Hs00270336_m1
IL-2	Hs00174114_m1	IRF3	Hs00155574_m1
IL-4	Hs00174122_m1	IRF7	Hs00242190_g1
IL-5	Hs00174200_m1	MAPK8	Hs00177083_m1
IL-6	Hs00174131_m1	MAPK14	Hs00176247_m1
IL-17	Hs00174383_m1	STAT1	Hs00234829_m1
IL-27	Hs00377366_m1	SOCS-3	Hs00269575_s1
IFN-b	Hs01077958_s1	AP-1	Hs00277190_s1
TNFa	Hs00174128_m1	HSP70	Hs00382884_m1
CXCL14	Hs00171135_m1	Laminin	Hs00165042_m1
CX3CL1	Hs00171086_m1	Collagen I	Hs00164004_m1
APN	Hs00605917_m1	Collagen III	Hs00164103_m1
APN-R1	Hs00360422_m1	Collagen IV	Hs00266237_m1
APN-R2	Hs00226105_m1	MMP2	Hs00234422_m1
NFATC3	Hs00190046_m1	MMP8	Hs00233972_m1
CYR61	Hs00155479_m1	MMP9	Hs00234579_m1
Ku70	Hs01922652_g1	TIMP1	Hs00171558_m1
Ku80	Hs00221707_m1	TIMP4	Hs00162784_m1
MAN1A2	Hs00198611_m1	uPA	Hs00170182_m1
Eomesodermin	Hs00172872_m1	GDF15	Hs00171132_m1
RHAMM	Hs00234864_m1	CD62E	Hs00174057_m1
RhoGTPase1	Hs00205507_m1	CD56	Hs00169851_m1
RhoGTPase2	Hs00183269_m1	TIMP4	Hs00162784_m1
TLR3	Hs00152933_m1	uPA	Hs00170182_m1
TLR4	Hs00370853_m1	GDF15	Hs00171132_m1
TLR7	Hs00152971_m1	CD62E	Hs00174057_m1
TLR8	Hs00152972_m1	CD56	Hs00169851_m1

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Präparation von RNA aus PBMCs und kultivierten Zellen

Die Isolierung der RNA aus Zellen, hauptsächlich PBMCs, erfolgte unter Einsatz des RNeasy Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Dafür wurden die Zellen in 350 µl (bis 5×10^6 Zellen) oder 600 µl (bis 1×10^7 Zellen) RLT-Puffer, welcher zuvor mit β -Mercaptoethanol versetzt wurde, aufgenommen und entweder direkt in die RNA-Isolierung gegeben oder bei -70°C eingefroren. Anschließend werden 350 µl bzw. 600 µl 70% Ethanol zum Lysat hinzugegeben und durch Pipettieren sorgfältig gemischt. 700 µl der Probe werden dann auf eine RNeasy Mini Säule pipettiert und bei 8000 g für 15 sec zentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen. Sollten noch Reste der Probe im Reaktionsgefäß vorhanden sein, wird der Vorgang wiederholt. Jetzt werden 500 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und ebenfalls bei 8000 g für 15 sec zentrifugiert. Nun erfolgt der DNase-Verdau: Dafür werden 10 µl der DNase I Stock-Lösung zu 70 µl RDD-Puffer gegeben und vorsichtig gemischt. Die 80 µl DNase-Mix werden dann direkt auf die Membran der Säule pipettiert und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Danach werden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und bei 8000 g für 15 sec zentrifugiert. Jetzt werden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt. Anschließend wird die Säule auf ein neues *collection tube* überführt und für 1 Minute bei *full speed* zentrifugiert, um Ethanolreste vollständig zu entfernen. Jetzt wird die Säule auf ein beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und es erfolgt eine zweimalige Elution mit 30 µl H_2O .

2.3.2 Präparation von RNA aus Herzmuskelgewebe und EMBs

RNA-Isolierung mittels Trizol®

Die RNA-Isolierung mittels Trizol®-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) wurde sowohl für explantiertes Herzgewebe als auch für Endomyokardbiopsien benutzt. Das Gewebe wurde in 400 µl Trizol®-Reagenz mit einem *pellet-pestle* mechanisch zerkleinert, anschließend auf 800 µl aufgefüllt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde den Proben 300 µl Chloroform zugegeben, für ca. 30 sec gut durchgeschüttelt und 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 20 min bei 12000 g und 4°C . Der Inhalt der Proben teilt sich jetzt in 3 Phasen. Die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurden 400 µl Isopropanol gegeben, um die RNA zu fällen. Durch Zugabe von 5 µl Glykogen verbessert sich die Bindung und Fällung bei geringen Mengen an Gesamt-RNA. Nach kurzem *Vortexen*, werden die Proben 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 12000 g und 4°C . Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet

mit 500 µl 70% Ethanol zum Waschen geschüttelt und für 5 min bei 7400 g und 4°C nochmals abzentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde vollständig abgenommen, um das Pellet anschließend max. 10 min unter dem Abzug zu trocknen. Zum Schluss wurde das Pellet in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und 10 min bei 56°C im Thermoschüttler gelöst.

Charge Switch total RNA Cell Kit (Invitrogen) - Aufreinigung von RNA

Diese Isolierungs-/Aufreinigungsmethode basiert auf der Bindung der Nukleinsäuren aufgrund von pH-Wert Änderungen. Bei einem pH-Wert unter 6,0 sind die magnetischen *beads* positiv geladen und binden die negativ geladenen Nukleinsäuren. Andere Bestandteile, wie Proteine und weitere Kontaminationen, binden nicht und werden mit den Waschschrritten entfernt. Für die Elution wird der pH-Wert auf über 8,5 erhöht, somit werden die *Beads* neutralisiert und die RNA kann in Lösung gehen.

Als erstes wurden zu der vorhandenen RNA 20 µl der gut gemischten magnetischen *beads* und 40 µl des Bindungspuffers hinzugegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich die Nukleinsäuren an den *beads* binden können. Danach wurde der Ansatz an die Magneten gesetzt, um den Überstand abzunehmen.

Anschließend wurden die *beads* mit dem Waschpuffer W14 einmal gewaschen, um danach den DNase-Verdau anzusetzen, welcher dann 10 min bei Raumtemperatur stehen muss. Nach diesem Schritt wird erneut Bindungspuffer dazugegeben, um die optimalen Bedingungen für die RNA-Bindung an den *beads* wiederherzustellen. Nach ausreichender Resuspendierung der *beads* wurde die Probe 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz wieder an den Magneten gestellt, um den Überstand abzunehmen. Nach 2-maligem Waschen mit Waschpuffer 13 und 14 sollten alle Kontaminationen entfernt sein.

Anschließend wurden die *beads* im Elutionspuffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die RNA, durch pH-Wert Änderung, komplett in Lösung übergehen zu lassen. Am Magnet-Rack wurde der gesamte Überstand abgenommen und in ein steriles RNase freies Eppendorf-Tube überführt. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung.

2.3.3 Präparation von DNA aus Gewebe

Für die Isolierung der DNA wurde das Myokardgewebe auf Raumtemperatur gebracht. Es wurden ca. 25 mg Gewebe in kleine Stücke geschnitten und anschließend mit 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K versetzt und gut gemischt. Danach erfolgte eine Inkubation bei 56°C über Nacht, bis sich das Gewebe vollständig aufgelöst hat. Im weiteren Verlauf wurden 200 µl AL Puffer zur Probe gegeben und gründlich mit einem *vortexer* gemischt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 70°C wurden 200 µl Ethanol zur Probe gegeben und es wurde gründlich mit einem *Vortexer* gemischt. Danach wurde der gesamte Inhalt auf eine Säule pipettiert und für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde dann vorsichtig auf ein sauberes 2 ml *col-*

lection tube gesetzt und das alte *collection tube* verworfen. Im nächsten Schritt wurden 500 µl AW1 Puffer auf die Säule gegeben und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Danach wird die Säule vorsichtig auf ein sauberes 2 ml *collection tube* gesetzt und das alte *collection tube* verworfen. Anschließend gibt man 500 µl AW2 Puffer auf die Säule und zentrifugiert bei 14000 rpm für 3 min. Danach setzt man die Säule auf ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß und gibt 200 µl AE Puffer oder destilliertes H₂O auf die Säule. Es erfolgt eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur und ein abschließender Zentrifugationsschritt von 1 min bei 8000 rpm. Im Anschluss wird die DNA-Konzentration bestimmt.

2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von DNA- und RNA-Proben wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm bestimmt. Der Verunreinigungsgrad der DNA/RNA-Lösung durch Proteine und Phenole wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dabei entspricht ein Quotient $OD_{260nm}/OD_{280nm} = 2,0$ hochreiner DNA/RNA, durch Verunreinigungen mit Proteinen und Salzen wird dieser Quotient zu kleineren Werten verschoben. Die Messungen erfolgten am NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) und benötigten nur 1 µl der DNA/RNA-Lösung.

2.3.5 Reverse Transkription von RNA

Das High Capacity cDNA Archive reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nutzt *random* Primer für die cDNA-Synthese. Diese gewährleisten, dass die erste Strangsynthese effizient an allen vorhandenen RNA-Molekülen (mRNA, rRNA) stattfindet.

Transkriptionsreaktion:

Die reverse Transkription setzt sich aus folgenden Schritten zusammen:

Denaturierung der RNA für 10 Minuten bei 70°C.

Anlagerung der *random* Primer für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

cDNA-Synthese für 120 Minuten bei 37°C.

Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase

Material und Methoden

Herstellung 2x Master Mix:

	Volumen in μl	Konzentration in 2x Mix
10x RT-Puffer	10	2 x
25x dNTP-Mix	4	2 x
10x <i>random</i> Primer	10	10 mM
Multiscribe RT (50 U/ μl)	5	40 U/ μl
RNase freies Wasser	21	
Gesamtvolumen	50	

RT Ansatz:

denaturierte RNA	gewollte RNA-Menge mit Wasser auf 50 μl auffüllen
Master Mix	50 μl
Gesamtvolumen	100 μl

2.3.6 Präamplifikation

Real-time RT-PCR ist ein sensibles, präzises und reproduzierbares Werkzeug zur Bestimmung von Genexpressionen in Geweben. Allerdings sind die RNA-Mengen extrahierbar aus EMBs gering und limitieren dadurch die Anzahl zu untersuchender Zielgene durch real-time RT-PCR. Präamplifikationstechniken (PreAmp) erhöhen möglicherweise die Sensitivität der real-time RT-PCR speziell für gering vorkommende Gene und kann substantiell höhere cDNA Mengen hervorbringen, die es erlauben die Anzahl zu analysierender Gene zu erweitern. Sowohl die Aufrechterhaltung von Expressionsprofilen als auch eine breite Anwendbarkeit auf viele Zielgene ist ein weiterer faszinierender Aspekt von PreAmp-Verfahren.

T-PreAmp-Verfahren:

Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer der selbst designten Genexpressionsassays und die ABI inventarisierten Taqman® Genexpressionsassays wurden in 0,2xfacher Verdünnung (Verdünnung erfolgte in Tris-EDTA / Tris-hydroxymethyl-aminomethan-Ethylendiamintetraessigsäure Puffer) in einen Primer-/Genexpressionsassay-Pool gegeben. In Vorversuchen konnte eine Ökonomisierung des Taqman® PreAmp Master Mix durch eine Reduktion des Zielvolumens auf 500 µl statt des empfohlenen Zielvolumens von 1000 µl erzielt werden, so dass fortan aus Gründen der Kosteneffizienz mit diesem modifizierten Protokoll gearbeitet wurde.

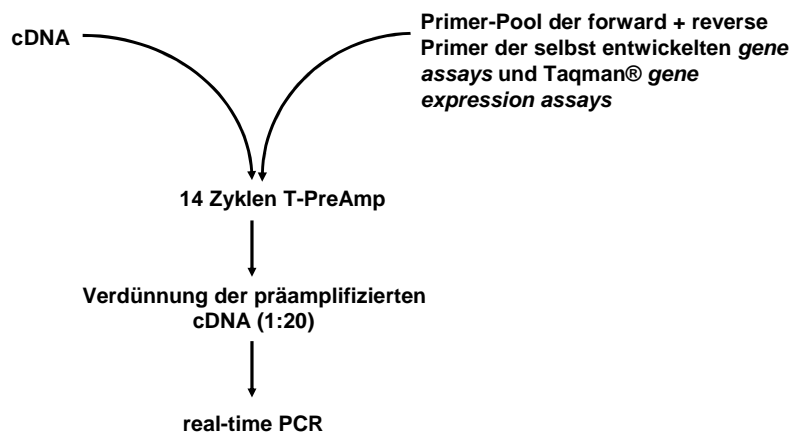


Abb. 6: Schematische Darstellung des T-PreAmp-Verfahrens (übersetzt aus (169))

Nach der reversen Transkription wird die cDNA für 14 Zyklen mit einem Pool aller zu untersuchenden selbst entwickelten Gene (Primer) und den inventarisierten ABI Taqman® assays (Mix aus Primer und Sonde) präamplifiziert. Die cDNA wird anschließend 1:20 verdünnt und in die real-time RT-PCR eingesetzt.

Material und Methoden

Das T-PreAmp-Reaktionsgemisch (25 µl) bestand aus 6,25 µl cDNA aus PBMCs oder EMBs, 12,5 µl TaqMan® PreAmp Master Mix und 6,25 µl Primer-/Genexpressionsassay-Pool. Die T-PreAmp-Reaktion wurde in über 14 Zyklen in einem PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts, USA) mit dem folgenden Programm (Denaturation bei 95°C über 10 Minuten, und 14 Amplifikationszyklen mit (15 Sekunden bei 95°C, 4 Minuten bei 60°C) durchgeführt. Bei dieser Methode können rechnerisch bis zu 100 Gene parallel präamplifiziert werden, wobei neben inventarisierten Taqman® *gene expression assays* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) auch selbst entworfene *gene assays* zum Einsatz kommen können. In Abbildung 6 ist schematisch der Ablauf der Methode dargestellt. Nachdem die zu untersuchenden *gene assays* in einem Primer-Pool vereinigt wurden, erfolgt die Präamplifikation über 14 Zyklen. Im Anschluss wird die präamplifizierte cDNA 1:20 verdünnt und kann dann direkt in die real-time RT-PCR eingebracht werden.

SSRT-PreAmp-Verfahren:

Das SSRT-PreAmp Verfahren wurde auf 8 selbst designte Genexpressionsassays (HPRT-CCM als housekeeping Gen und 7 T-Zell assoziierte Gene: CD3z, IFN- γ , FoxP3, T-bet, GATA3, Granulysin und Perforin) angewandt. In Vorversuchen an RNA von PBMCs zeigte sich, dass eine darüber hinausgehende Anzahl von Genexpressionsassays zu einer weiteren Destabilisierung der Präamplifikationsleistung führte.

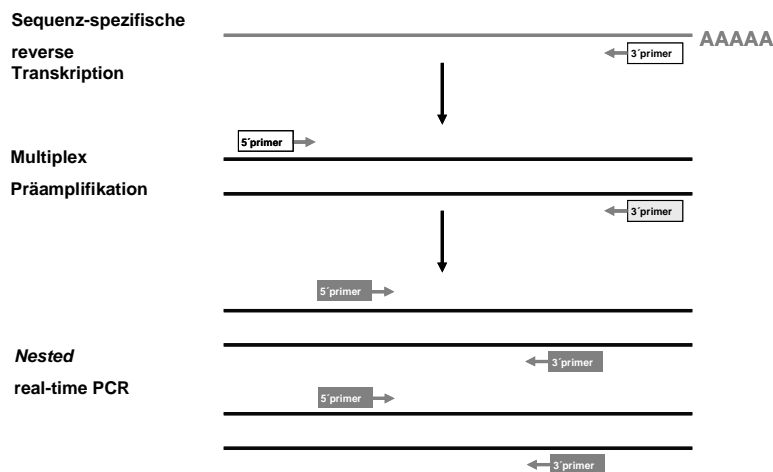


Abb. 7: Schematische Darstellung des SSRT-PreAmp-Verfahrens (169)

Die isolierte RNA wird unter Verwendung von sequenzspezifischen 3'Primern (weißer Kasten) für jedes zu untersuchende Gen in cDNA umgeschrieben. Die entstandene cDNA wurde dann in einer multiplex PCR unter Nutzung des spezifischen 3'Primers (weißer Kasten) und eines genspezifischen 5'Primer (hellgrauer Kasten) über 10 Zyklen präamplifiziert. Anschließend werden die Produkte der ersten PCR in einzelnen PCR-Reaktionen aufgeteilt, wo unter Einsatz von nested Primern (dunkelgrauer Kasten) die Gene separat in der nested real-time RT-PCR amplifiziert werden.

Bei der reversen Transkription wurden statt der üblichen oligo dT Primer gensequenzspezifische 3' Primer eingesetzt, die in Tabelle 5 gelistet sind. Diese sequenzspezifische reverse Transkription erfolgte gleichzeitig für die 8 Zielgene in einer gemeinsamen Reaktion. In einer nachgeschalteten Multiplex PCR wurden über 10 Zyklen unter Hinzugabe der genspezifischen 5' Primer und der wie oben identischen gensequenzspezifische 3' Primer die 8 Zielgene präamplifiziert. Das Zielvolumen der Reaktion von 20 µl wurde aus 50 mmol/l KCl, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.3), 2 mmol/l MgCl₂, 0,2 mmol/l dNTPs, 3 Units der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (ABI) und 0,015 µmol/l Primer zusammengesetzt. Die Amplifikation über 10 Zyklen wurde mit dem folgenden Programm vorgenommen: 45 Sekunden bei 95°C, 60 Sekunden bei 62°C, 90 Sekunden bei 72°C. In der nachgeschalteten nested real-time RT-PCR wurden die Zielgene unter Einsatz der in Tabelle 2 angeführten selbst-designten Genexpressionsassays quantifiziert. Diese Methode wurde prinzipiell von Peixoto et al. beschrieben (170). Die Modifikation in unseren Untersuchungen war die nested real-time RT-PCR mit dem Ziel einer Erhöhung der Spezifität. Die Prinzipien des SSRT-PreAmp Verfahrens sind in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

2.3.7 Real-time RT-PCR

Die real-time -RT-PCR ist eine Quantifizierungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht. Das Prinzip der PCR basiert auf der enzymatischen Amplifikation durch eine hitzestabile DNA-Polymerase eines spezifischen DNA-Bereiches, der von zwei Oligonukleotid-Primern flankiert wird, die jeweils an den Enden des zu amplifizierenden DNA-Bereiches liegen. Methodisch kommt es zu einer automatisierten Wiederholung des Zyklus von thermischer DNA-Denaturierung, Primerhybridisierung (annealing) und primer-extension zur DNA-Synthese.

Die Real-time RT-PCR bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

Die Reaktionen der real-time RT-PCR bei selbst-designten Genexpressionsassays wurde aus 2 µl cDNA oder PreAmp cDNA, 6,25 µl Master Mix (TaqMan™ Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, ABI), 0,21 µl Fluoreszenzsonde (finale Sonden-Konzentration 0,05 µM) und 1,25 µl Primer (finale Primer-Konzentration 0,9 µM) zusammengesetzt. Bei den real-time RT-PCRs unter Einsatz von oder ABI inventarisierten Taqman® Genexpressionsassays wurden die real-time RT-PCR Reaktionen aus 2 µl cDNA, 6,25 µl TaqMan™ Universal PCR Master Mix und 0,625 µl TaqMan® Genexpressionsassay zusammengesetzt. Das Zielvolumen wurde auf

12,5 µl mit sterilem H₂O erreicht. Alle Quantifizierungen erfolgten im Doppeltansatz in einem ABI 7900 HT Fast real-time PCR System (ABI) mit dem folgenden Programm: Denaturation mit einem *hot start* bei 95°C über 10 min, gefolgt von 40 Zyklen eines zweistufigen Programms (Denaturation bei 95°C über 15 Sekunden und *annealing/extension* bei 60°C über 60 Sekunden).

2.3.8 Quantifizierung der relativen Genexpression, Berechnung der Präamplifikationsuniformität, der Inter- und der Intra-Assay Varianz

Die aus der real-time RT-PCR resultierenden *cycle of threshold* (Ct) Werte wurden aus dem optimalen Bereich der linearen Amplifikation vom ABI 7900 HT Fast real-time PCR System automatisiert ermittelt. Die Quantifizierung der Genexpression der Zielgene (E) wurde auf HPRT-CCM oder CDKN1B unter Verwendung der gängigen Formel $2^{-\Delta Ct}$ bezogen (171).

Die Berechnung der Präamplifikationsuniformität (PreAmp Uniformität) erfolgte in Bezug auf CDKN1B als Referenzgen und auch bezogen auf HPRT-CCM unter Anwendung der folgenden Formeln:

$$\Delta Ct \text{ PreAmp} = \text{mittlerer Ct Zielgen X [PreAmp]} - \text{mittlerer Ct CDKN1B oder HPRT-CCM [PreAmp]}$$

$$\Delta Ct \text{ cDNA} = \text{mittlerer Ct Zielgen X [cDNA]} - \text{mittlerer Ct CDKN1B oder HPRT-CCM [cDNA]}$$

Daraus wurde der $\Delta\Delta Ct$ -Wert als Maß der PreAmp-Uniformität ermittelt:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct [\text{PreAmp}] - \Delta Ct [\text{cDNA}].$$

Ein $\Delta\Delta Ct$ -Wert bei 0 zeigt eine ideale PreAmp-Uniformität des jeweiligen Zielgens in Relation zum Präamplifikations-Referenzgen CKN1B an, von dem eine ideale PreAmp-Uniformität durch ausgiebige Voruntersuchungen von ABI bekannt ist. ABI empfiehlt, dass Zielgene eine PreAmp-Uniformität zwischen -1,5 to +1,5 als akzeptabel einhalten sollten.

Die Varianzkoeffizienten der Inter- und Intra-Assay Varianz wurden aus den mehrfachen real-time RT-PCR Bestimmungen über die folgende Formel kalkuliert:

Standardabweichungen der Mehrfachmessungen / Mittelwert der Mehrfachmessungen x100

Zur Untersuchung des möglichen Einflusses der PCR Effizienz einiger Index-Genexpressionsassays auf die T-PreAmp-Uniformität wurde gepoolte cDNA von PBMCs mit dem folgenden Stufen verdünnt: 1:4, 1:16, 1:32, 1:64, 1:256, 1:512 und 1:1,024, Die PCR-Effizienz wurde aus den resultierenden Ct-Werten und der folgenden Formel berechnet (172): $-1 + 10^{(-1/\text{slope})}$

Als Index-Genexpressionsassays wurden exemplarisch sowohl ABI inventarisierte Taqman®, als auch selbst designte Genexpressionsassays, deren PreAmp-Uniformität zwischen -1,5 bis

+1,5 lagen (HPRT-CCM, CD3d, CD3z, TRBC, TRBV19, TRBV29, NFATC3 und av5 β 1), sowie die 2 ABI inventarisierten Taqman® Genexpressionsassays, deren PreAmp-Uniformitäten außerhalb dieses empfohlenen Bereichs lagen (HPRT-ABI and CD56), eingesetzt.

2.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und effektive Methode, DNA-Fragmente von 0,5 bis 25 kb Länge voneinander zu trennen und zu identifizieren. Dabei bewegen sich die negativ geladenen DNA-Moleküle in der Matrix des Gels mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist, zur Anode. Sichtbar gemacht werden die DNA-Fragmente im Gel durch Zugabe des Farbstoffes Ethidiumbromid in die bereits geschmolzene Agarose. Nach Interkalation in die DNA-Moleküle fluoresziert Ethidiumbromid unter UV-Licht. Nach der Auftrennung lassen sich die Größe sowie ungefähre DNA-Mengen durch Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen Eichstandard bestimmen. Als Eichstandard wurde eine 1 kb DNA-Leiter (mi-100 bp+ DNA Marker Go, Metabion, Martinsried) verwendet. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente variiert man die Agarosekonzentration zwischen 0,5% und 2%. Große DNA-Fragmente lassen sich in niedrig konzentrierten Gelen (Endkonzentration ca. 0,5%) gut auftrennen, für kleinere Fragmente eignen sich höher konzentrierte Agarose-Gele. Als Laufpuffer ist TBE-Puffer (s. Anhang) verwendet worden, in dem auch die Agarose angesetzt und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst wurde. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurde das Ethidiumbromid (10 mg/ml Ethidiumbromidlösung) zugegeben. Das erkaltete Gel wurde mit 0,5 x TBE-Puffer überschichtet und mit den DNA-Proben, die mit 5 x DNA-Probenpuffer (s. Anhang) versetzt waren, beladen. Das Gel läuft mit einer Feldstärke von 5-10 Volt/cm, bis eine ausreichende Bandentrennung erreicht war. Zur Abschätzung der Lauflänge dienten die beiden Farbstoffe im 5 x DNA-Probenpuffer (Bromphenolblau und Xylencyanol). Nach erfolgter Auftrennung konnte das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert werden.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

Bei den *in vitro* T-Zell-Expansionsversuchen kamen die folgenden Präparationen von vier verschiedenen Zellkulturmedien zum Einsatz:

FBS-RPMI: RPMI1640 mit 20 mM HEPES (2-Hydroxyethyl-1-Piperazinyl-Ethansulfonsäure) als Puffer (gebrauchsfertig von Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien), 1 mM Natriumpyruvat (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FBS Gold®; PAA, Pasching, Deutschland).

HS-RPMI: RPMI1640 mit 20 mM HEPES (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien), 1 mM Natriumpyruvat (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland), supplementiert mit 10% humanem Serum, das von gesunden Spendern gepoolt wurde.

PanserinTM413: Lymphozytenspezifisches, serumfreies, synthetisches Medium (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland)

X-Vivo 15TM: Lymphozytenspezifisches, serumfreies, synthetisches Medium (Cambrex Bio Science, Deutschland)

Als Antibiotika wurden allen Medien gleichermaßen Penicillin (100 U/mL) und Streptomycin (100 µg/mL) (beide von PAA, Pasching, Deutschland) zugesetzt. Zum Ausschluss einer Lipopolysaccharid- (LPS-) Kontamination wurden alle Seren vor dem Einsatz in der Zellkultur mit 100 µL Vollblut von gesunden Spendern in 1 ml RPMI1640 Medium für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde im zellfreien Überstand der Tumornekrosefaktor α (TNF α) unter Verwendung eines etablierten hochsensitiven Quantikine® ELISA-Kits (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) bestimmt. Alle untersuchten Seren zeigten keine detektierbaren TNF α Werte (Sensitivitätsgrenze: 5.5 pg/mL).

Von 8 gesunden Spendern (Alter: 32,2+9,3 Jahre) wurden jeweils 50 ml venöses Blut aus einer peripheren Vene in einer Perfusorspritze mit 2 ml Heparin entnommen, und die PBMCs wurden daraus mittels eines Ficoll® Gradienten (LSM1077 Lymphocyte Separation Medium; PAA, Pasching, Deutschland) gewonnen. Dafür wird das Blut mit PBS verdünnt und anschließend vorsichtig auf den Ficoll®-Gradienten geschichtet. Der folgende Zentrifugationsschritt von 35 min bei 1400 rpm und 20°C erfolgt ohne Bremse. Der entstandene Lymphozytenring wird dann mit einer Pipette abgenommen und drei Mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation für 10 min, 1200 rpm, 4°C). Anschließend werden die Zellen entweder für die RNA-Isolierung einge-

Material und Methoden

froren oder es wurde eine Positiv- und Negativ-Selektion mittels des anti-CD3-EasySep™ (CellSystems, St. Katharinen, Deutschland) Systems unter Anwendung von magnetischen beads konjugierten anti-CD3-Antikörpern vorgenommen. Die Zellsuspension wird in 15 mL Röhren pelletiert (Zentrifugation für 10 min, 1200 rpm, 4°C) und der Überstand wird abgesaugt. Die Zellen werden in PBS aufgenommen, sodass eine Zellkonzentration von 1×10^8 Zellen/mL entsteht. Anschließend werden die Zellen in ein steriles 5 mL Rundboden Röhren überführt und 100 μ L EasySep® CD3 Positive Selection Cocktail pro mL Zellsuspension zugegeben und gut gemischt. Es folgt eine Inkubation von 15 Minuten bei RT und anschließend die Zugabe von 50 μ L Mix EasySep® Magnetic Nanoparticles pro mL Zellsuspension, nachdem sie durch Pipettieren gut gemischt worden sind. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT wird mit PBS auf 2,5 mL Endvolumen aufgefüllt und das Röhren für 5 min in den Magneten gestellt. Nach der 5 min wird das Röhren im Magneten belassen und der Inhalt (CD3 negative Fraktion) durch einfaches Kippen in ein 15 mL Röhren überführt. Jetzt wird das Röhren aus dem Magneten entnommen, 2,5 mL PBS hineingegeben und durch Pipettieren gemischt. Das Röhren wird wieder für 5 min in den Magneten gestellt, nach 5 min das Röhren im Magneten belassen und der Röhreninhalt durch einfaches Kippen in ein 15 mL Röhren überführt. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt. Die durch den Magneten im Röhren behaltenen Zellen (CD3 positive Fraktion) werden durch dreimaliges Waschen des Röhrens mit ca. 2,5 mL PBS in ein 15 mL Röhren überführt. Anschließend erfolgt die Zellzählung beider Fraktionen. Die positiv selektierte Fraktion bestand aus CD3⁺ T-Zellen, und in der negativ selektierten befanden sich alle CD3-negativen Zellen (vor allem Monozyten, B-Lymphozyten). Die CD3⁺ T-Zellen wurden in vitro expandiert. Die CD3⁻ Zellfraktion wurde mit Mitomycin C (Serva, Heidelberg, Deutschland) bei 37°C für 1 Stunde inaktiviert. Diese Mitomycin C inaktivierten Zellen der Spender wurden als autologe feeder cells (FC) eingesetzt. Nicht benötigte FC wurden bei -80°C in 90% FBS Gold® mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut und in die laufenden Zellkulturen eingesetzt. Initiale Experimente wurden mit letal bestrahlten CD3-negativen Zellen durchgeführt. Die Bestrahlung der FC wurde am Institut für Strahlentherapie des Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin durchgeführt. Dieses Verfahren wurde im weiteren Verlauf infolge der identischen Effizienz und der besseren Praktikabilität zugunsten der Mitomycin C inaktivierten FC verlassen.

Initial wurden 1×10^4 CD3⁺ Zellen mit 5×10^5 autologen FC in 48-Lochplatten (Corning, New York, USA) mit 20 ng/mL anti-CD3 Antikörper (Klon OKT-3; Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) und 25 U/mL Interleukin-2 (IL2; Chiron, München, Deutschland) bei 37°C in einer gesättigten 5% CO₂-Atmosphäre in Kultur gegeben. In regelmäßigen Abständen von 3 Tage erfolgte in alle Zellkulturen eine wiederholte Hinzugabe von 25 U IL-2. Weiterhin wird alle 3 Tage die Cluster Bildung sowie der Verlust der Cluster Bildung (*loss of cluster formation*; LCF) mittels Phasenkontrastmikroskopie (Leica DMRD, Bensheim, Deutschland) und der DBA-Anlage dokumentiert. Alle 7 Tage erfolgte die Ermittlung der lebendigen Zellfraktion an jeweils 2 μ l der laufenden Zellkultur mittels der Trypan-Blau-Ausschlussmethode (173) (Sigma-Aldrich, München, Deutsch-

land), und auf dieser Basis wurde die Hochrechnung der expandierten Zellen vorgenommen. Alle 7 Tage erfolgte auch die Restimulation mit dem OKT-3 anti-CD3-Antikörper und erneut IL2. An Tag 7 wurden die dichter proliferierten Zellen 1:5 verdünnt, und wenn notwendig im weiteren Verlauf bei entsprechender Zellzahl auf 24-Loch-Platten (1×10^5 CD3⁺ Zellen pro Loch) oder 12-Loch-Platten (5×10^5 CD3⁺ Zellen pro Loch) umgesetzt. Die *in vitro* T-Zell-Expansionsversuche wurden insgesamt bis Tag 28 fortgeführt.

Cytospin® (Shandon Scientific, Runcorn, United Kingdom) Präparationen aus den laufenden *in vitro* Expansionen wurden nach 14 und 28 Tagen durchgeführt, wenn die Zellen auf $>2 \times 10^5$ Zellen proliferiert waren. Cytospin® Präparationen wurden bei 750 Umdrehungen/Minute für 3 Minuten durchgeführt, und die Zellen wurden mit kaltem Aceton (4°C; Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und unter Raumluft getrocknet. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität mit 0,3% H₂O₂ wurden die Zellen mit der in Kapitel 3.4.3 beschriebenen immunhistologischen Methode mit einem anti-CD3- (Klon: UCHT1) sowie einem anti-CD11b Maus-anti-human- Primäantikörper (Klon: 2LPM19c; beide Antikörper von Immunotools, Friesoythe, Deutschland) und dem *rabbit-anti-mouse* EnVision® Detektionssystem sowie AEC als chromogenes HRPO-Substrat gefärbt. Die immunhistochemische Charakterisierung der expandierten Zellen erfolgte lichtmikroskopisch (Leica DMRD, Bensheim, Deutschland), und repräsentative Bilder wurden mit der DBA-Anlage dokumentiert.

2.4.2 Interferon- γ Sekretions-Assay

Die Anreicherung von SALK- und GLCP-reaktiven Zellen erfolgte aus PBMCs. Die PBMCs wurden aus peripherem EDTA-Blut (Vacutainer® EDTA tubes, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) mittels LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium (PAA, Pasching, Deutschland) Dichtegradientenzentrifugation isoliert und anschließend für 6 Stunden mit den Peptiden SALK und GLCP inkubiert und mittels des IFN γ secretion assays (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) nach Herstellerangaben die reaktiven Zellen isoliert. Die positiv- und negativ-selektierten Zellen, sowie unselektierte PBMCs wurden in RLT® Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) lysiert und anschließend die RNA mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem High Capacity Archive cDNA Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Anschließend erfolgten an dieser cDNA real time RT-PCR-Untersuchungen.

2.4.3 Immunhistologische Färbung

Als Immunhistologie wird in der Biologie und Medizin eine Methode bezeichnet, bei der Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Damit kann beispielsweise bestimmt werden, in welchem Gewebe bestimmte Proteine vorhanden sind und auch, in welchem Kom-

partiment der Zelle sie lokalisiert sind. Beispielsweise färben Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern lokalisiert sind, nur den Zellkern an, membranständige Proteine Teile der Zellmembran usw. Für Antikörperfärbungen wird fixiertes Gewebe verwendet, das entweder aus vollständigen Tieren (Embryonen von Zebrafisch, *Drosophila melanogaster* etc.) oder aus Gewebeschnitten bestehen kann (zum Beispiel Mikrotomschnitte von Organen der Maus oder des Menschen). Zellen aus Körperflüssigkeiten oder Punktaten u.ä., die mittels Zentrifugation auf einen Objektträger aufgebracht wurden, oder auf einem Objektträger gewachsen sind (Zellkulturtechnik), können ebenfalls immunhistochemisch untersucht werden.

Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein im Präparat sichtbar macht. Mittels verschiedener Detektionssysteme können schon geringe Mengen an Epitop verstärkt dargestellt werden. Das Ziel ist es, ein Signal am Ort des Epitops (und nur dort) in ausreichender Stärke zu erkennen.

Der Antikörper, der gegen das zu findende Epitop gerichtet ist, wird als Primärantikörper bezeichnet. Dieser Antikörper sollte sich durch hohe Spezifität und Affinität auszeichnen und keine Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen zeigen. In einem Mehrschrittverfahren werden die einzelnen Komponenten des Detektionssystems dem Präparat zugeführt. Deshalb ist die IHC relativ langwierig und fehleranfällig. Das Ergebnis ist auch beeinflussbar durch Fixierungsart, Fixierungsdauer, Einbettungsmethoden, Vorbehandlungsmethoden (antigen-retrieval) der Präparate, etc. Eine Standardisierung der Testdurchführung sollte daher angestrebt werden. Die Antigen-Antikörper-Reaktion ist abhängig von Temperatur, Konzentration, Inkubationszeit, Agitation und dem optimalen Reaktionsmilieu (pH-Wert, Salzkonzentrationen).

Indirekte Methode

Bei dieser Methode wird im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf das zu untersuchende Gewebe/Zellen aufgebracht. In einem zweiten Schritt wird ein Antikörper aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Es ist der sog. Sekundärantikörper, der hier mit einem Enzym gekoppelt ist und die Farbentstehung mit einer Enzym-Substrat-Reaktion auslöst. Es entsteht ein sichtbarer Farbstoff.

Antigen + Primärantikörper + Sekundärantikörper mit Enzym + Substrat/Chromogen = Farbe

Die angefertigten Zytospins wurden 10 min in 4°C kaltem Aceton fixiert und anschließend wurden sie mit 0,3 % H₂O₂ in PBS für 20 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit humanen anti-CD3- (Klon UCHT1) und anti-CD11b- (Klon 2LPM19c) Antikörper für eine Stunde in einer feuchten Kammer inkubiert. Beide Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Anschließend wurden die Objektträger dreimal (je 5 min) in PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation von 45 min mit dem Peroxidase gekoppelten polyklonalen *rabbit-anti-mouse* Envision-Antikörper (Verdünnung 1:200, Dianova, Hamburg,

Deutschland). Als nächstes wurden die Objektträger zweimal (je 5 min) mit PBS gewaschen und die Antikörperbindung durch die Peroxidase-vermittelte Umwandlung des chromogenen Substrats AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) (Merck, Darmstadt, Deutschland) sichtbar gemacht. Dafür wurden 200 mL Färbelösung (35 mL 0,2 M Natriumacetat + 15 mL 0,2 M Essigsäure + 150 mL dest. Wasser) pro Küvette hergestellt und 50 mg AEC unter dem Abzug abgewogen und in 10 mL Dimethylformamid gelöst. Dies wurde im Anschluss zu der Färbelösung gegeben. Schließlich wurden noch 100 μ L 30% H₂O₂ in die Küvette gegeben. Die Objektträger wurden für 12 min in der Substratlösung dunkel inkubiert und dann zweimal mit PBS gewaschen. Für die Gegenfärbung wurden die Schnitte in eine Küvette mit Hämatoxyllin gegeben und 30 min inkubiert. Danach wurden sie mit kaltem Leitungswasser gewaschen und 10 min in warmem Wasser gebläut. Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde auf 40°C erwärmt und anschließend auf die Objektträger gegeben und mit 24 x 40 mm Deckgläschen eingedeckt. Danach erfolgt die Auswertung durch Lichtmikroskopie (MDRD; Leica) (174). Die immunhistologisch gefärbten Zytospin®-Präparate wurden mittels einer digitalen Bildbearbeitungssoftware (158, 175) (LUCIA GTM, Nikon, Düsseldorf) archiviert. Hierbei wurde auch die räumliche Zuordnung der in vitro expandierten Zellen, insbesondere das teilweise auch in den Zytospin®-Präparationen zu beobachtende Clusterverhalten dokumentiert.

2.5 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde die Software JMP (Version 4,02, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) eingesetzt. Bei normalverteilten Werten wurde der Student's t-Test als statistisches Testverfahren angewendet. Um die Zeitabhängigkeit des Verlaufs der CAMs-Immunreaktivität unter Autolyse zu prüfen wurde eine MANOVA-Analyse für wiederholte Messungen und „Zeit“ als Effektparameter durchgeführt. Bei Ausschluss einer Gauß'schen Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk W Test ($p < 0,05$) wurden nicht-parametrische Test angewandt. Werte der Patientengruppe, die die 90%ige Perzentile der Kontrollgruppe überschritten, wurden als signifikant bzw. pathologisch erhöht klassifiziert. Ordinal- bzw. Nominaldaten zweier Gruppen wurden mittels χ^2 Test verglichen. Kontinuierliche Daten wurden mit Ordinaldaten mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-test mit Tukey-Kramer post-hoc Analyse zur Ermittlung der *honestly significant difference* bei Vergleichen von >2 Gruppen verglichen. Diese Analyse wird graphisch durch Quintilen Boxplots (Anzeige der 10%, 25%, 50%, 75% und 90% Perzentilen) mit den verglichenen Gruppen zuzuordnenden Kreisen illustriert, die bei statistisch signifikanten Unterschieden sich nicht berühren oder sich mit einem Winkel >90° überschneiden. In diesen Boxplots wird der Gesamtmittelwert der untersuchten Daten (grand mean) durch eine den gesamten Boxplot durchquerenden horizontalen Linie angezeigt. Die Mediane mit dem 25.-75. Perzentilen-Bereich sind oberhalb der entsprechenden Gruppen angegeben. Bei Vergleich zwischen mehreren kontinuierlichen Datenmengen wurden multiple bivariate Analysen mit Berechnung des Spearman's Korrelationskoeffizienten durchgeführt. In den entsprechenden Tabellen ist dieser jeweils in der dritten Spalte

Material und Methoden

angeführt, illustriert durch horizontale Säulen, und die entsprechenden p Werte sind jeweils (von links) in der vierten Spalte angezeigt. Ein Probabilitätswert $p < 0,05$ wurde in allen verwendeten Testverfahren als statistisch signifikant eingestuft.

3 Ergebnisse

3.1 Aufbau eines TRBV Nachweis-Systems

3.1.1 RNA-Extraktions-Optimierung

Die Ribonukleinsäure RNA (*ribonucleic acid*) ist ein einzelsträngiges, multifunktionelles Molekül, welches einer hohen Abbaurrate unterliegt. Um Untersuchungen auf RNA-Ebene durchzuführen, muss die Isolierung der RNA schnellstmöglich erfolgen, um den Abbau der RNA durch Enzyme (RNasen) möglichst gering zu halten. Die Isolierung von RNA aus Herzmuskelgewebe von DCM-Patienten gestaltete sich auf Grund der Gewebebeschaffenheit, und auch infolge der relativ kleinen Gewebegröße von EMBs (ca. 3-5 mg Gewebe) als sehr schwierig, um daraus die relativ geringe Expression von T-Zell-spezifischen Genen mittels konventioneller real-time RT-PCR zu quantifizieren. Für nachfolgende Analysen wie z.B. real-time RT-PCR ist eine möglichst hohe RNA-Ausbeute und eine gute RNA-Qualität von entscheidender Bedeutung. Um dies zu gewährleisten, wurden mehrere RNA-Isolierungsmethoden ausgetestet. Zum einen wurden die Phenol-Chloroform-Fällung und Isolierungen über Trägermaterialien und eine Kombination von beidem angewandt.

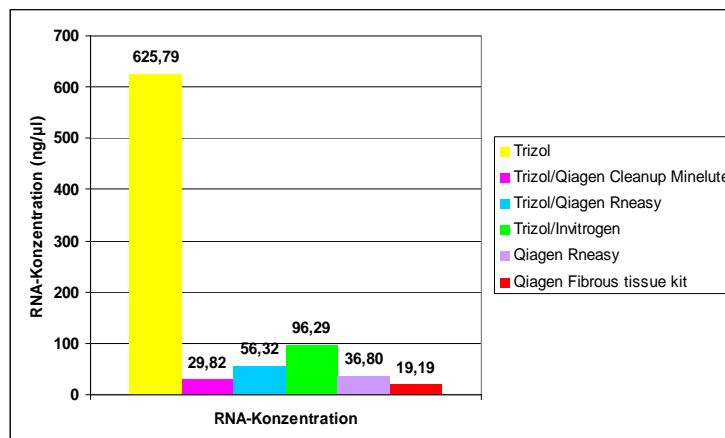


Abb. 8: RNA-Konzentrationen von explantiertem Herzmuskelgewebe nach verschiedenen RNA-Isolierungsmethoden. Nach der Isolation wurde die Konzentration (angegeben in ng/µl) der RNA am Nanodrop ND-1000 bestimmt.

Zur Austestung der besten Isolierungsmethode wurde Gewebe von explantierten Herzen eingesetzt. Bei der Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Fällung (Trizol®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) erhält man augenscheinlich die höchste RNA-Ausbeute (Abbildung 8) im Vergleich zu den anderen Isolierungsmethoden. In Bezug auf die RNA-Reinheit schneidet diese Art der RNA-

Ergebnisse

Isolierung mit einer $\text{Ratio}_{260/280}$ von 1,85 aber verhältnismäßig schlecht ab (Abbildung 9). Diese Beobachtung ist vermutlich auf Verunreinigungen durch Phenole und Proteine aus der TRIZOL® Lösung zurückzuführen. Um dieses Phänomen zu umgehen, wurde auf Systeme zugegriffen, die auf Basis von Silika-Membranen fundieren. Es wurden zwei verschiedene Kits angewendet. Das RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) ist für besonders fibröses Gewebe wie Skelettmuskel, Herz oder Haut ausgelegt. Die Untersuchungen haben im Mittelwert die geringste Ausbeute erbracht, da das Gewebe nie vollständig lysiert werden konnte. Die Reinheit liegt mit einer $\text{Ratio}_{260/280}$ von 2,06 im idealen Bereich und weist somit auf eine hohe RNA-Qualität hin.

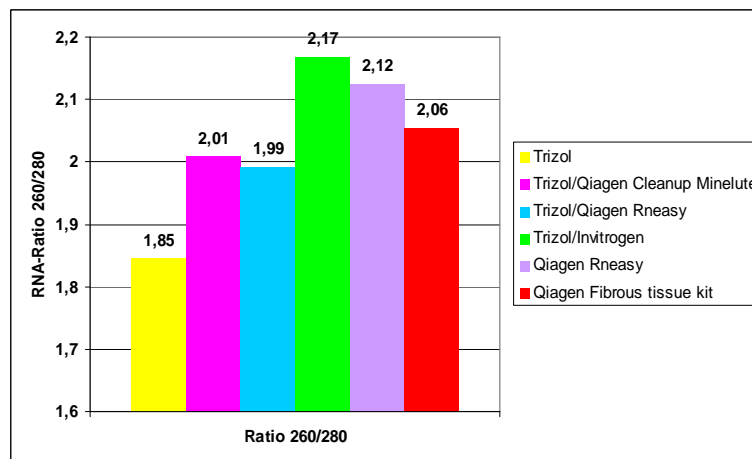


Abb. 9: RNA-Ratio $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ der verschiedenen RNA-Isolierungsmethoden aus explantiertem Herzmuskelgewebe.

Die Anwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen) zur Isolierung erbrachte zwar eine bessere Ausbeute, als das RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) (Abbildung 8), aber auch bei dieser Isolierung war die Lyse des Gewebes nicht vollständig und es kam daher nicht zu einer idealen RNA-Ausbeute. Mit einer $\text{Ratio}_{260/280}$ von 2,12 (Abbildung 9) erhielt man abermals RNA von einer guten Qualität.

Da mittels der Trizol® Methode eine gute Lyse des Herzmuskelgewebes erreicht werden konnte, wurde wieder auf diese Art der RNA-Isolierung zurückgegriffen. Um Verunreinigungen durch Proteine und Phenol zu beseitigen, wurde nach der Trizol®-Isolierung eine anschließende Aufreinigung durchgeführt. Zur Aufreinigung kamen Silika-Säulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) aber auch magnetische Kügelchen (*magnetic beads*, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zum Einsatz. Die Kombination von Trizol und dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) zeigte sich mit einer $\text{Ratio}_{260/280}$ von 1,99 und einer guten RNA-Ausbeute als ein möglicher Kandidat für die routinemäßige Anwendung. Neben dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) wurde ein spezielles Aufreinigungskit (RNeasy MinElute Cleanup Kit, Qiagen) benutzt. Es zeigt eine gute $\text{Ratio}_{260/280}$ von 2,01 (Abbildung. 9), aber die Verluste bei der RNA Ausbeute sind relativ hoch (Abbildung. 8).

Neben den Silika-Säulen von Qiagen wurde ein weiteres System zur Aufreinigung eingesetzt,

Ergebnisse

dabei handelt es sich um das ChargeSwitch® Total RNA Cell Kit (Invitrogen), welches über Ladungsänderung die RNA an kleine *magnetic beads* bindet. Die Ladungsänderung erfolgt über den pH-Wert, welcher über verschiedene Puffer verändert wird. In niedrigen pH-Bedingungen ist die Oberfläche der *magnetic beads* positiv geladen und bindet somit die negativ geladenen Nukleinsäuren. Proteine und andere Verunreinigungen binden nicht an den *magnetic beads* und können somit gut durch Waschen entfernt werden. Zur Elution der Nukleinsäuren wird die Oberflächenladung durch eine Erhöhung des pH auf 8,5 neutralisiert und die Nukleinsäuren lösen sich von den *magnetic beads*. Von allen bisher angewendeten Methoden konnte so die höchste Ausbeute (Abbildung 8) erzielt werden. Und auch die Ratio_{260/280} von 2,17 (Abbildung 9) spricht für eine entsprechend gute RNA-Qualität.

Aber nicht nur die Ausbeute und Ratio_{260/280} spielten bei der Wahl der Isolierungsmethode eine Rolle, sondern auch die Performance der Real-time PCR war von entscheidender Bedeutung. Denn auch hier gab es Unterschiede zwischen den verschiedenen Isolierungsmethoden.

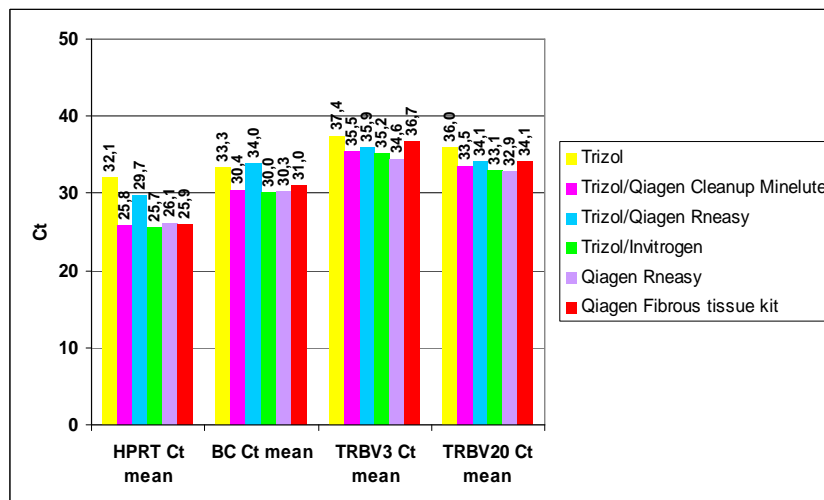


Abb. 10: Vergleich der Ct-Werte aus explantierten Herzmuskelproben nach verschiedenen RNA-Isolierungsmethoden. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend in der real-time RT-PCR einige ausgesuchte Gene untersucht.

In Abbildung 10 ist der durchschnittliche Ct-Wert der verschiedenen Isolierungen an vier Beispielgenen dargestellt. Insgesamt konnte bei allen angewandten Methoden ein Ct-Gewinn im Vergleich zur Trizol®-Isolierung verzeichnet werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass man nach einer Trizol®-Isolierung die RNA aufreinigen sollte. Insgesamt verzeichnet die Kombination von Trizol® und ChargeSwitch® Total RNA Cell Kit (Invitrogen) den größten Ct-Gewinn, was diese Kombination als einen möglichen Kandidaten für die routinemäßige Anwendung prädestiniert. Unter Berücksichtigung aller Kriterien wird für die routinemäßige Analyse der EMBs die Isolierung mittels Trizol® und nachfolgender Aufreinigung mittels ChargeSwitch® Total RNA Cell Kit (Invitrogen) angewendet, da diese Methode die größte Ausbeute, eine gute Ratio_{260/280} sowie einen stabilen PCR-Lauf und somit reproduzierbare Ergebnisse aufwies.

3.1.2 Entwicklung eines Real-time RT-PCR Systems zum Nachweis des TCR

Für die Expressionsanalyse der funktionellen TRBV des humanen und murinen T-Zellrezeptor V β mittels real-time RT-PCR sind keine etablierten Primer-/Sondensysteme erhältlich. Daher wurden für dieses Projekt TRBV-/TRBC-Primer-/Sonden-Systeme etabliert. Für das Design der Primer-/Sondensysteme der konstanten (TRBC) und der variablen Ketten (TRBVs) des T-Zell-Rezeptors beta (TCR) wurden die Gensequenzen und die Nomenklatur des *International Information System* (IMGT: <http://imgt.cines.fr/>) verwendet. Das Design wurde unter Anwendung der Primer Express Software (Version 2.0; Applied Biosystems) nach Applied Biosystems Richtlinien vorgenommen. Die TRBC Primer umfassten TRBC1 und TRBC2 auf den homologen Sequenzabschnitten. Dieser TRBC-Assay wurde neben den *housekeeping* Genen als interne Kontrolle für den TCR verwendet. Das Design des TRBV Genexpressionsassay Systems wurde so gestaltet, dass ein TRBV-familienpezifischer Vorwärtsprimer gegen eine gemeinsame Sonde und einen gemeinsamen Rückwärtsprimer auf dem TRBC gewählt wurde. Sequenzhomologien der letztlich eingesetzten TRBV Primer wurden mittels multiple *alignment* unter Einsatz der ClustalX Software (Version 1.83; University Straßburg, Frankreich) ausgeschlossen (167). Im Fall der TRBV5, 6 und 7 wurden *wobbled* Vorwärtsprimer gewählt, um die wenigen Basendifferenzen der entsprechenden Allele bei vertretbarer resultierender Amplikonlänge (bis zu ca. 250 Basen) zu umfassen. Die FAM-markierten Fluoreszenzsonden wurden als *minor groove binder* (MGB) hergestellt, was eine höhere Sensitivität der real-time RT-PCR ermöglicht. Die Genexpressionsassays für HPRT-CCM, IL-10, IFN γ , *transforming growth factor beta* (TGF β), FoxP3, T-bet, GATA3, Granzyme A, Granzyme B, Granulysin und Perforin wurden unter Verwendung der Oligo 4.1 Software (Molecular Biology Insights, Cascade, USA) auf der Basis der vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) publizierten Sequenzen designt.

Ergebnisse

Die selbstentworfenen *gene assays* sind Intron-überspannend entwickelt worden. Hinsichtlich aller eingesetzten Genexpressionsassays wurden Kreuzreaktivitäten mit genomischer DNA in Vorversuchen ausgeschlossen (Abbildung 11).

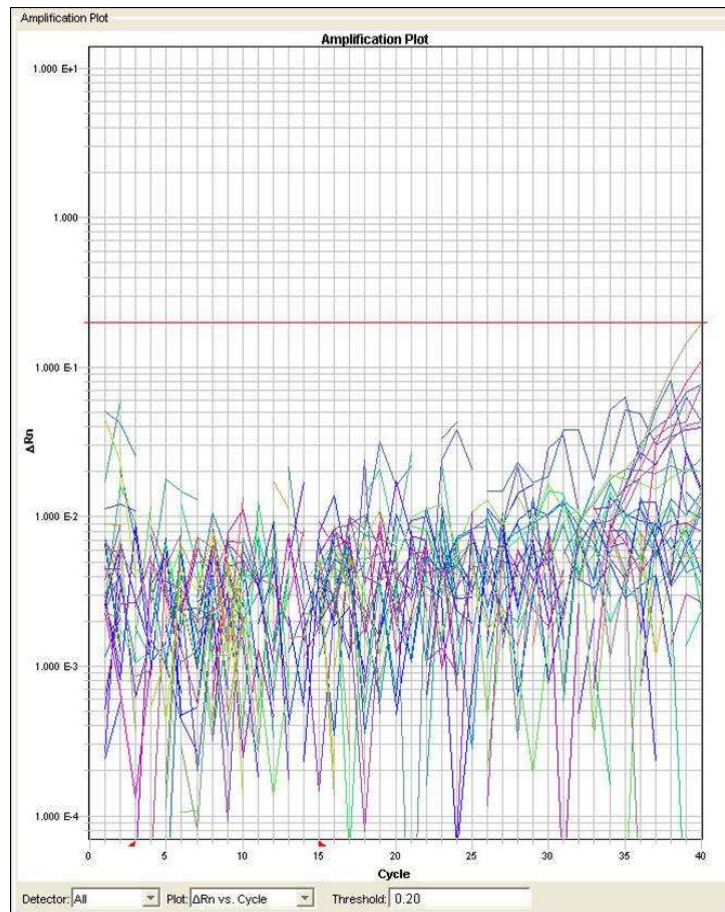


Abb. 11: Ausschluss einer DNA-Kreuzreaktivität der TRBV-/TRBC Primer-/Sondensysteme. Durch das Intron-überspannende Design der TRBV-/TRBC-Primer wurde eine Kreuzreaktion der Primer mit genomischer DNA ausgeschlossen. Darstellung des Amplifikations-Blot der real-time RT-PCR.

Ergebnisse

Die Spezifität der selbstentworfenen TRBV *gene assays* wurde an verschiedenen Lymphom-Zelllinien (die cDNA wurde freundlicherweise von PD Dr. Michael Hummel, Pathologie zur Verfügung gestellt) ausgetestet. Bei diesen Lymphom-Zelllinien sind monoklonale TRBV-Umlagerungen (rearrangements) bekannt. Die Umlagerungen der Lymphom-Zelllinien wurden zuvor in dem Institut für Pathologie mittels BIOMED-2 Analysen bestimmt.

Die cDNA der Zelllinien mit bekannten Umlagerungen wurde in die real time RT-PCR eingebracht und die Spezifität der entsprechenden Primer untersucht. Es wurden die Zelllinien Jurkat (Abbildung 12A) mit der spezifischen Umlagerung TRBV12 und PEER (Abbildung 12B) mit der spezifischen Umlagerung TRBV4 untersucht. Zum einen wurde die cDNA direkt und weiterhin wurde die cDNA der Zelllinien auch mit cDNA von PBMCs in Vermischungsverhältnissen von 50% bis 0,78% untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Primer spezifisch für die entsprechenden TRBVs sind.

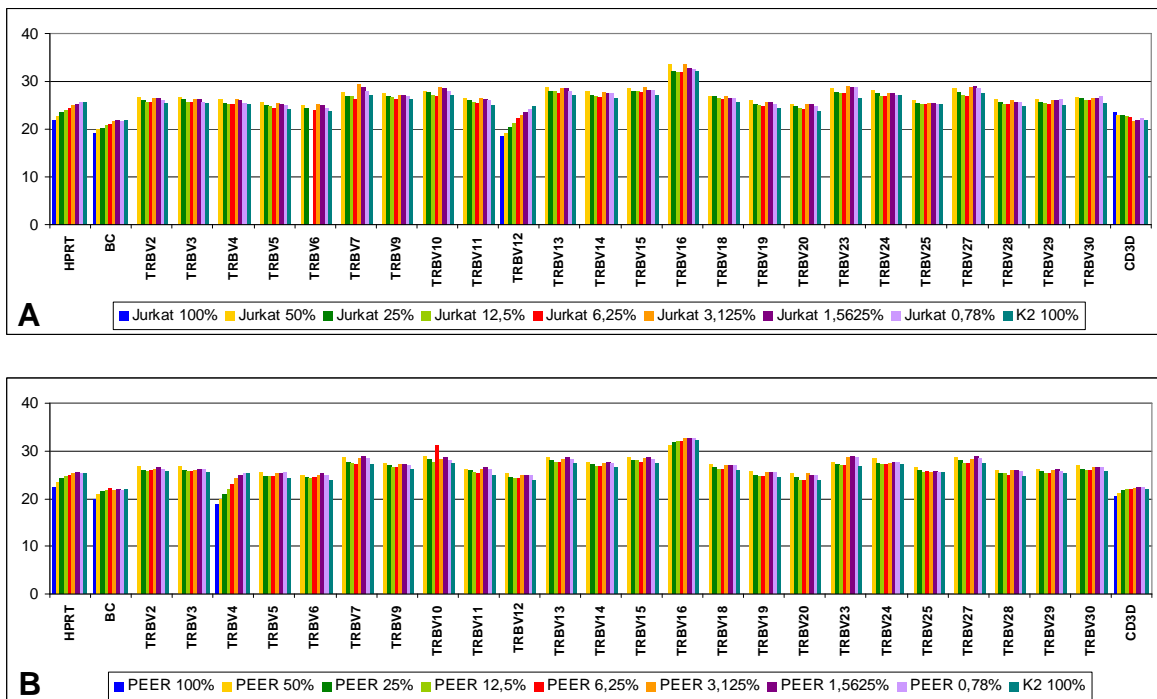


Abb. 12: Untersuchungen zur Spezifität der TRBV-Primersysteme an Lymphomzelllinien
A: Vermischungsversuch an der Zelllinie Jurkat mit der spezifischen Umlagerung TRBV12. **B:** Vermischungsversuch an der Zelllinie PEER mit der spezifischen Umlagerung TRBV4. In beiden Darstellungen ist jeweils der Ct-Wert abgebildet

In Abbildung 13 ist eine genauere Darstellung der RT-PCR-Ergebnisse der beiden untersuchten Zelllinien zu sehen. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass der Ct-Wert mit zunehmender Vermischung mit PBMC cDNA deutlich abnimmt. Im Mittel um ungefähr einen Ct je Verdünnungsstufe. In den niedrigen Vermischungsstufen nimmt dies jedoch ab, da die Zelllinien nur noch in sehr geringen Anteilen vorkommen und in dem Fall hauptsächlich der TRBV der PBMCs nachgewiesen wird.

Ergebnisse

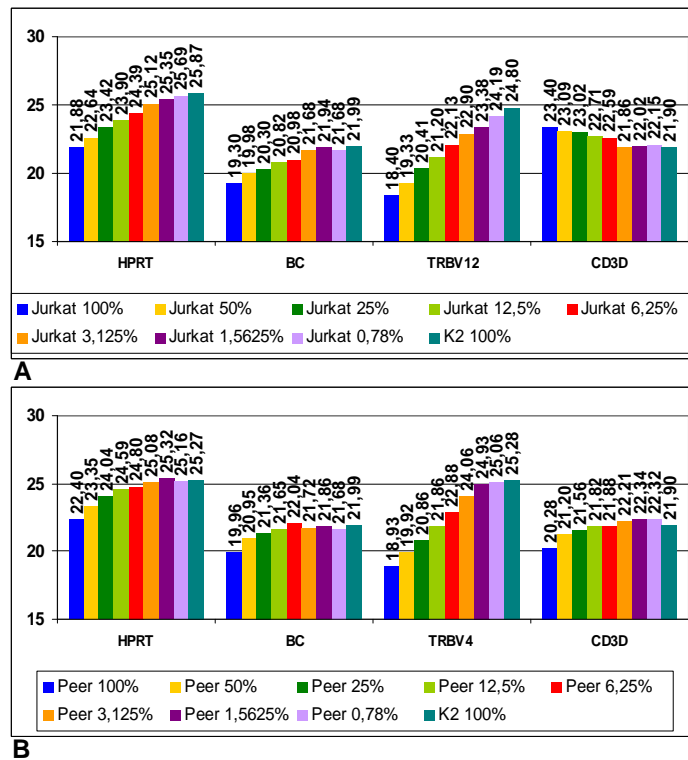


Abb. 13: Untersuchungen zur Spezifität der TRBV-Primersysteme an Lymphomzelllinien
A: Vermischungsversuch an der Zelllinie Jurkat mit der spezifischen Umlagerung TRBV12. **B:** Vermischungsversuch an der Zelllinie PEER mit der spezifischen Umlagerung TRBV4. In beiden Darstellungen ist jeweils der Ct-Wert abgebildet

Besonders deutlich wird dieses Phänomen, wenn man sich die Expressionswerte der spezifischen Umlagerung in Bezug auf das *housekeeping* Gen HPRT und die interne Kontrolle TRBC betrachtet (Abbildung 14). Dabei ist zu erkennen, dass die Expression des entsprechenden TRBV bei den Zelllinien mit jeder Verdünnungsstufe sich der TRBV-Expression der PBMCs angleicht. Die spezifische Umlagerung in den Zelllinien ist aber trotzdem deutlich über dem PBMC Hintergrund nachzuweisen.

Ergebnisse

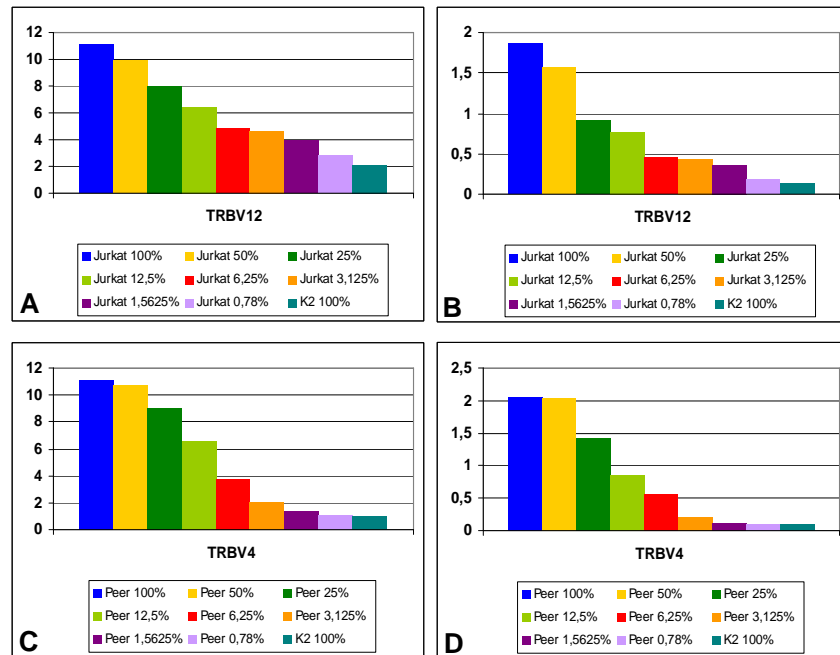


Abb. 14: Darstellung der Expression in Bezug auf das *house keeping* Gen der Vermischungsversuche an Zelllinien

- A:** Vermischung Zelllinie Jurkat, Expression in Bezug auf HPRT
- B:** Vermischung Zelllinie Jurkat, Expression in Bezug auf TRBC
- C:** Vermischung Zelllinie PEER, Expression in Bezug auf HPRT
- D:** Vermischung Zelllinie PEER, Expression in Bezug auf TRBC

Neben der Spezifität der Primer wurde auch deren Effizienz in der PCR bestimmt. Die PCR-Effizienz spielt eine wichtige Rolle für real-time RT-PCR Analysen. In einer perfekten PCR-Amplifikation würden idealerweise in jedem Zyklus die genspezifischen Amplikons verdoppelt, was in einer PCR Effizienz von $E=1=100\%$ resultieren würde. In der Regel liegt aber die PCR-Effizienz von *gene assays* zwischen 0,65 und 0,9. Die PCR-Effizienz kann auf verschiedene Weisen bestimmt werden. Zum einen wurde cDNA von gepoolten PBMCs 1:4, 1:16, 1:32, 1:64, 1:256, 1:512 and 1:1024 verdünnt und die Effizienz dann mittels folgender Formel: $-1+10(-1/\text{Steigung})$ anhand einer Standardkurve bestimmt (Abbildung 15). Neben dieser Art der Effizienzbestimmung wurde auch die Effizienz direkt aus der real-time RT-PCR Reaktion bestimmt. Dafür wurde das Programm LinRegPCR (Version 7.2, (176)) und dessen zu Grunde liegende Berechnung verwendet.

Ergebnisse

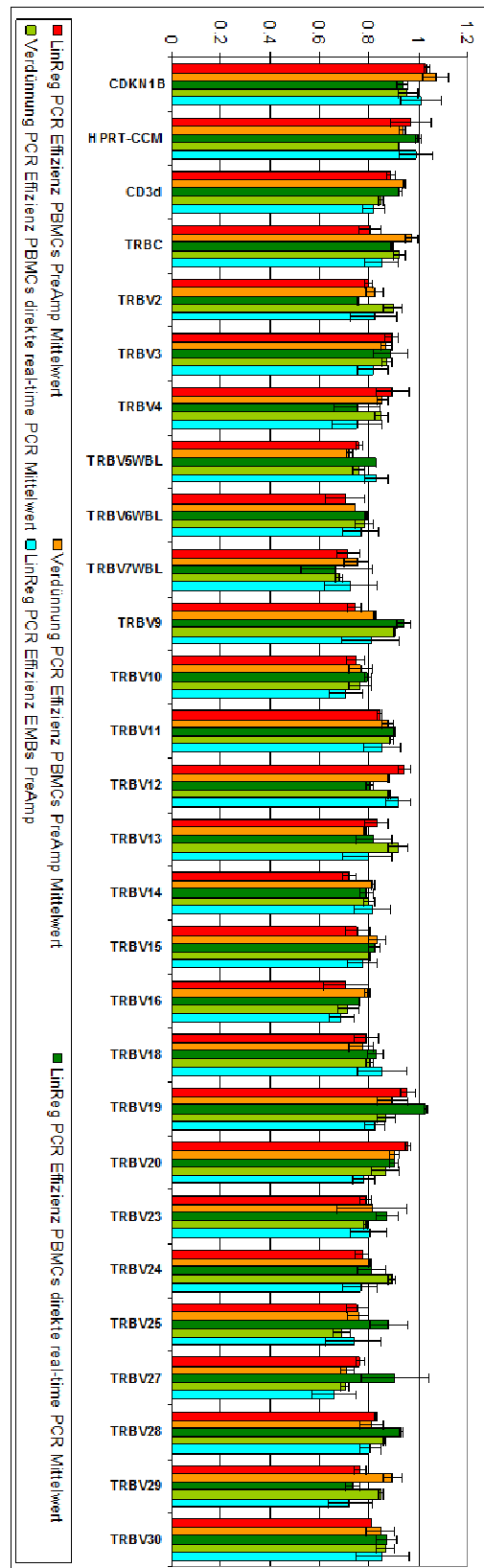


Abb. 15: Bestimmung der PCR Effizienz der TRBV/TRBC *gene assays*. Vergleich der computer gestützten PCR-Effizienz Bestimmung und der Standardkurvenbestimmung an präamplifizierter und direkter cDNA von PBMCs.

In Abbildung 15 sind diese beiden Methoden miteinander vergleichend dargestellt. Dabei ist ersichtlich, dass die Effizienz der TRBV-/TRBC-*gene assays* an cDNA von PBMCs zwischen 0,67 und 1,07 und an cDNA von EMBs zwischen 0,66 und 1,01 liegt. Außerdem gibt es zwischen den beiden Methoden zur Bestimmung der Effizienz bis auf einige Ausnahmen keine nennenswerten Unterschiede. Daraus ergibt sich, dass die PCR Effizienz der selbst entwickelten humanen TRBV-/TRBC-*gene assays* im Bereich herkömmlicher, auch kommerziell erhältlicher *gene assays* liegt.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass das selbstentwickelte TRBV-Primer/Sonden-System spezifisch für die TRBVs ist und auch keine Kreuzreaktivitäten mit genomischer DNA auftreten. Weiterhin liegt auch die PCR-Effizienz überwiegend in den allgemein anerkannten Grenzen.

3.1.3 Entwicklung von Präamplifikationsmethoden zum Nachweis des TCR

Die real-time RT-PCR ist ein sensitives, präzises und reproduzierbares Werkzeug zur Bestimmung von Genexpressionen in Geweben. Allerdings sind die RNA-Mengen extrahierbar aus Endomyokardbiopsien gering und limitieren dadurch die Anzahl der zu untersuchenden Zielgene durch real-time RT-PCR. Präamplifikationstechniken (PreAmp) erhöhen möglicherweise die Sensitivität der real-time RT-PCR speziell für gering vorkommende Gene und können somit substantiell höhere cDNA Mengen hervorbringen, die es erlauben die Anzahl zu analysierender Gene zu erweitern.

Sowohl die Aufrechterhaltung von Expressionsprofilen als auch eine breite Anwendbarkeit auf viele Zielgene ist ein weiterer vorteilhafter Aspekt von PreAmp Verfahren. Hier wurde der Taqman® PreAmp Master Mix Technik (T-PreAmp) angewandt und mit einer sequenzspezifischen reversen Transkription (SSRT), welche von einem multiplex PreAmp Schritt gefolgt wird, in Anlehnung an die Strategie von Peixoto et. al. (170) verglichen.

Zur Etablierung der Methode wurde venöses Blut (jeweils 3 ml) von 5 freiwilligen männlichen Spendern in Vacutainer® EDTA Gefäßen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) abgenommen. Innerhalb von 10 Minuten wurden die peripheren Blutmonozyten (PBMCs) unter Verwendung des Ficoll® Gradienten mittels LSM 1077 (PAA, Pasching, Deutschland) getrennt. Die RNA wurde aus PBMCs nach Lyse in RLT® Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Einsatz des Rneasy® Silikaharz-Säulen-Systems (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die RNA von PBMCs wurde für real-time RT-PCR Zwecke vor der reversen Transkription zu cDNA auf eine Konzentration von 25 ng/µl adjustiert. Nach der reversen Transkription (RT) unter Anwendung des high capacity cDNA archive® Kits (Applied Biosystems/ABI, Darmstadt, Deutschland) wurde die komplementäre DNA (cDNA) der PBMCs auf 1:50 verdünnt, um auf vergleichbare Expressionsniveaus wie die nicht-verdünnte cDNA aus EMBs zu gelangen. Für die Etablierungsarbeiten der Präamplifikationsverfahren der real-time RT-PCR wurde die cDNA dieser 5 Probanden gepoolt, um die interindividuellen Genexpressionsunterschiede bei dem methodischen Etablierungsschritt gering zu halten.

Ergebnisse

Weiterhin wurden EMBs von n=36 DCM Patienten (8/22% Frauen; Alter: 38.2+12,7 Jahre; LVEF: 37,7+17,4%) für die methodische Etablierung und Bestimmung der Präamplifikationsleistung des Verfahrens auf der Basis des Taqman® Preamplification Master Mix Kits (T-PreAmp) verwendet. Infolge der für diese umfassenden methodischen Untersuchungen limitierten cDNA Mengen wurden jeweils 9-10 gruppenweise Untersuchungen an jeweils 4 EMBs mit 9-10 Zielgenen durchgeführt. Im Rahmen der Etablierungsuntersuchungen mit der sequenzspezifischen reversen Transkription mit jeweils nested Primern (SSRT-PreAmp) wurden EMBs von 4 weiteren Patienten (alle männlich, Alter: 41,2+5,6 Jahre, LVEF: 35,1+9,1%) eingesetzt.

3.1.3.1 Expression von HPRT und CDKN1B in Donorherzen und explantierten DCM Herzen

Der Einsatz von HPRT als *housekeeping* Gen ist für viele Gewebsarten gut dokumentiert und anerkannt. Die enge Assoziation zwischen den Ct-Werten von HPRT-CCM und CDKN1B sowie die gleichsam differentielle Expression von Genen in Bezug auf HPRT-CCM und CDKN1B in EMBs von Patienten mit DCM versus DCMi sind mit einer möglichen Relevanz von CDKN1B als *housekeeping* Gen vereinbar. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Ct-Werte von HPRT (HPRT-ABI und HPRT-CCM) und CDKN1B durch direkte real-time RT-PCR an Herzmuskelgewebe von jeweils 5 explantierten Herzen von gesunden Spendern und 5 terminal insuffizienten, explantierten DCM-Herzen ermittelt.

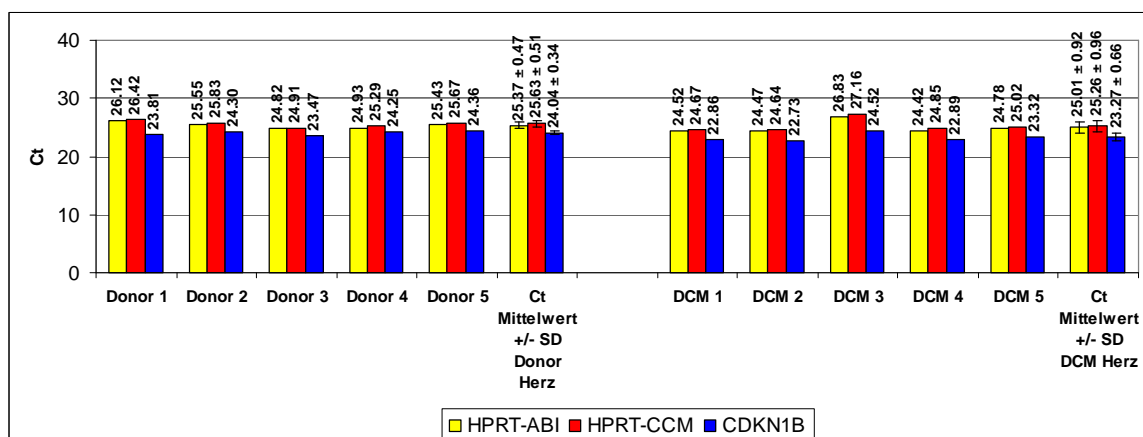


Abb. 16: Vergleich von HPRT-ABI, HPRT-CCM und CDKN1B an adjustierter RNA aus Donor- und explantierten DCM-Herzen. Ct-Werte von HPRT-ABI, HPRT-CCM und CDKN1B in 5 Donorherzen (Balken links) und in 5 terminal insuffizienten, explantierten DCM-Herzen (rechte Balken). Die RNA wurde bei allen Geweben vor der cDNA Umschreibung auf 50 ng/µl gleichsam eingestellt. MW: Mittelwert. SD: Standardabweichung.

Für die Untersuchungen wurde eine RNA-Ausgangskonzentration von 50 ng/µl vor der cDNA-Umschreibung adjustiert. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Ct-Werte von

Ergebnisse

HPRT-ABI, HPRT-CCM und CDKN1B in Donor- und in DCM-Herzen (Abbildung 16). Es kann davon ausgegangen werden, dass CDKN1B nicht in DCM Herzen reguliert wird und somit die Funktion als weiteres *housekeeping* Gen neben HPRT übernehmen kann.

3.1.3.2 Präamplifizierte real-time RT-PCR - T-PreAmp

Obwohl die Ct-Werte von dem Genexpressionsassay HPRT-CCM und dem Applied Biosystems inventarisierten Taqman® Genexpressionsassay HPRT-ABI in initialen Versuchen an cDNA von PBMCs und EMBs in konventioneller, direkter real-time RT-PCR lediglich eine Differenz von 0,3 Ct aufzeigten, ergaben sich entscheidende Unterschiede in der T-PreAmp-Uniformität dieser beiden Genexpressionsassays. Im Fall von HPRT-CCM betrug der Ct-Gewinn 7,2 Ct-Werte (Abbildung 17, blaue Balken), wohingegen HPRT-ABI nach der T-PreAmp nur einen Ct-Gewinn von 4,9 Ct-Werten erreichte.

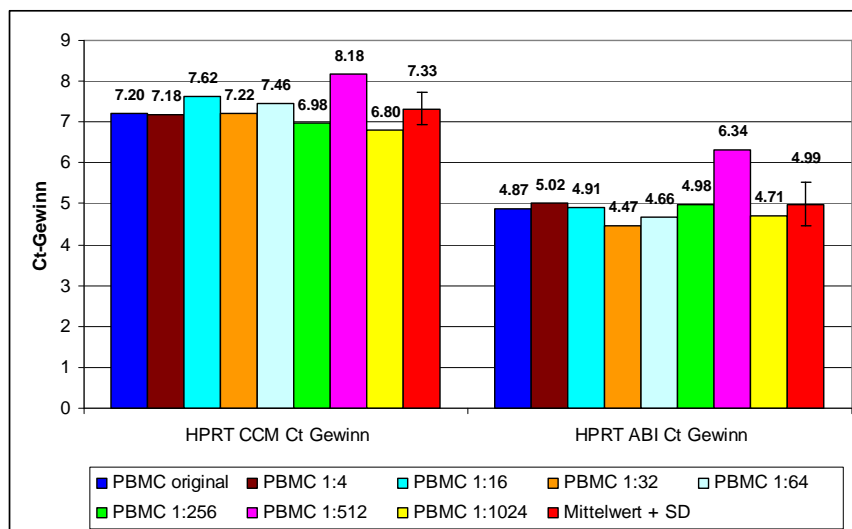


Abb. 17: Vergleich des Ct-Gewinns an HPRT-CCM und HPRT-ABI nach Präamplifikation (T-PreAmp) an PBMCs. Die blauen Balken stellen den Ct-Gewinn an unverdünnter PBMC cDNA dar.

Dies führte zu einer Verschiebung der T-PreAmp-Uniformität bezogen auf CDKN1B von 0,82 für HPRT-CCM zu 3,14 für HPRT-ABI (Abbildung 18B, blaue Balken). Die empfohlenen PreAmp-Uniformitätswerte sollten zwischen -1,5 und +1,5 liegen. Angesichts der schlechteren Leistung von HPRT-ABI in der T-PreAmp wurde für die weiteren Untersuchungen nur noch HPRT-CCM neben CDKN1B als *housekeeping* Gen verwendet.

Ergebnisse

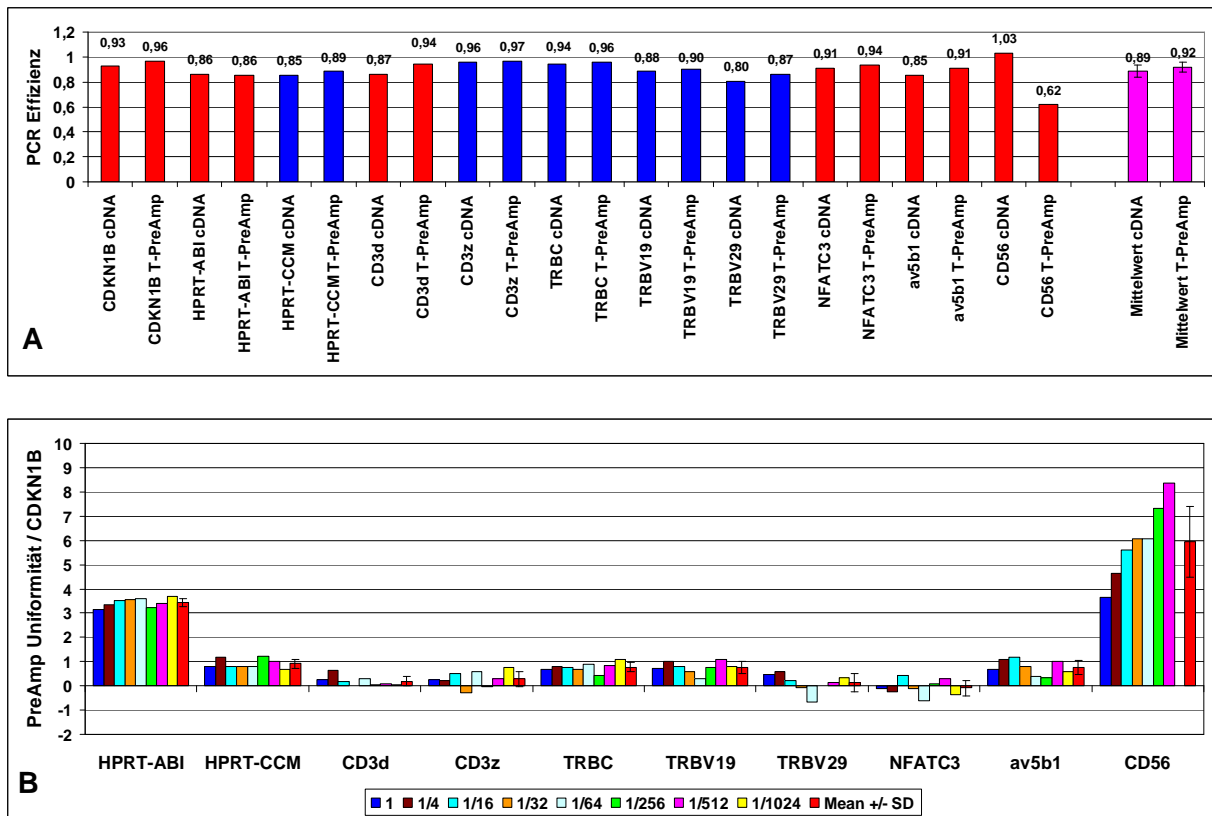


Abb. 18: PCR Effizienz und PreAmp Uniformität an PBMCs mittels T-PreAmp. **A:** Vergleich der PCR Effizienz von ausgewählten Genen kalkuliert an PBMC cDNA (25 ng/µl) und 7 weiteren Verdünnungsstufen (bis 1:1024) durch direkte (cDNA) und T-PreAmp real-time RT-PCR (T-PreAmp). Taqman® ABI inventarisierte *gene assays* sind durch rote Balken, selbst entwickelte Gene durch blaue Balken dargestellt. **B:** PreAmp Uniformität der untersuchten Kandidatengene an 7 Verdünnungsstufen von original PBMC cDNA (25 ng/µl) (1) bis 1:1024, Die roten Balken indizieren den Mittelwert \pm SD der 8 Reaktionen pro Gen.

In der direkten real-time RT-PCR von der gepoolten PBMCs cDNA 8 gesunder Spender (25 ng/µl; 1:50 verdünnt) ergab sich ein mittlerer Ct-Wert der untersuchten Genexpressionsassays von $31,28 \pm 3,47$ (Bereich: 24,75 bis 38,93), und in der T-PreAmp cDNA ein mittlerer Ct-Wert von $23,91 \pm 3,46$ (Bereich: 16,92 bis 31,85) (Abbildung 19). Die T-PreAmp erzielte einen mittleren Ct-Gewinn von $7,37 \pm 0,51$ Zyklen (Bereich: 6,35 bis 8,90) an den untersuchten *gene assays* (siehe Anhang S. IV, Abbildung 1). Das entspricht einem p-Wert von $p < 0,0001$ im Vergleich zu den Ct-Werten, die mittels konventioneller real-time RT-PCR erreicht wurden. CD56 wurde von diesen Analysen ausgeschlossen, da die T-PreAmp Uniformität mit 3,63 in Bezug auf CDKN1B (Abbildung 18B) und 2,82 in Bezug auf HPRT-CCM nicht die vorgegebenen Grenzwerte einhielt.

Ergebnisse

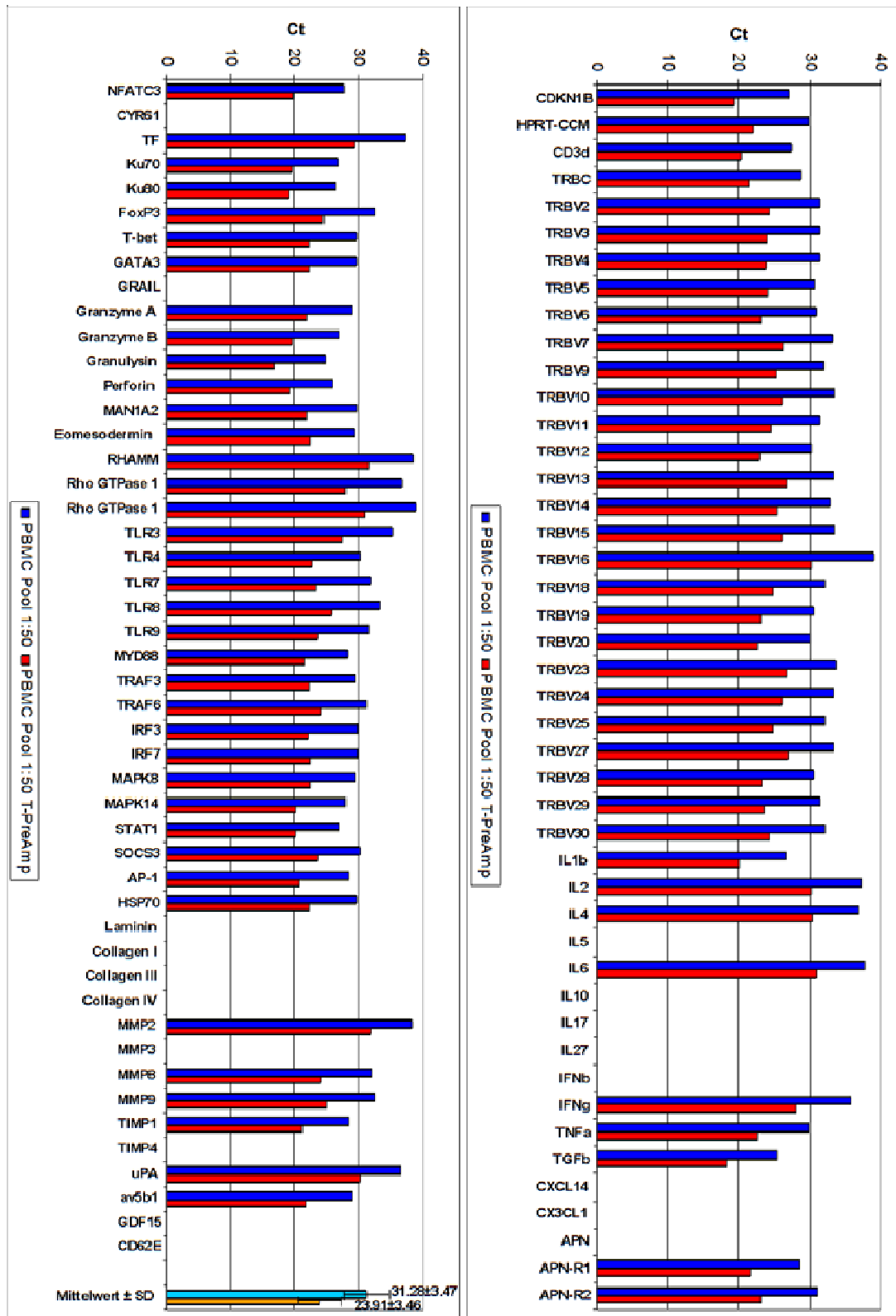


Abb. 19: Mittlerer Ct-Wert der direkten real-time RT-PCR von der gepoolten PBMCs cDNA (blaue Balken) und der T-PreAmp cDNA (rote Balken). Der türkise Balken zeigt den Mittelwert \pm SD der Ct-Werte der direkten real-time RT-PCR und der orangefarbene Balken zeigt den Mittelwert \pm SD der Ct-Werte der T-PreAmp von allen gene assays an.

Ergebnisse

Weder in der direkten noch in der T-PreAmp cDNA der PMCs gab es eine nachweisbare Expression der Gene IL-5, IL-10, IL17, IL27, IFN β , CYR61, CXCL14, CX3CL1, APN, GRAIL, Kollagen I, III und IV, Laminin, MMP3, TIMP4, GDF15 und CD62E (Abbildung 19). Die mittlere T-PreAmp Uniformität der untersuchten Genexpressionsassays in PBMCs (exklusive CD56) in Bezug auf CDKN1B betrug $0,24 \pm 0,50$ (Bereich -1,26 bis 1,29), und in Bezug auf HPRT-CCM betrug die Uniformität $0,39 \pm 0,54$ (Bereich -1,06 bis 1,49) (Abbildung 20). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den selbst entwickelten (mittlerer Ct-Gewinn: $7,46 \pm 0,49$ Zyklen, T-PreAmp Uniformität bezogen auf CDKN1B $0,23 \pm 0,47$, respektive auf HPRT-CCM $0,34 \pm 0,56$) und den Applied Biosystems inventarisierten Taqman $\text{\textcircled{R}}$ Genexpressionsassays (mittlerer Ct-Gewinn: $7,38 \pm 0,53$ Zyklen, T-PreAmp Uniformität bezogen auf CDKN1B $0,25 \pm 0,53$ und bezogen auf HPRT-CCM $0,45 \pm 0,52$; unter Ausschluss von CD56; $p > 0,05$). Auf der Basis des von Canales et al. publizierten Grenzwert-Ct-Werts für geringe Expressionsbereiche (177), zeigten 13/78 (17%) der Zielgene Ct-Werte > 35 in der direkten real-time RT-PCR. Diese Unterscheidung hat keinen Einfluss auf die T-PreAmp Uniformität, ob die Genexpressionsassays in der direkten real-time RT-PCR Ct-Werte < 35 (CDKN1B: $0,27 \pm 0,43$; HPRT-CCM: $0,45 \pm 0,46$) oder ≥ 35 (CDKN1B: $0,05 \pm 0,78$; HPRT-CCM: $0,17 \pm 0,86$) aufzeigten.

Angesichts der disproportionalen T-PreAmp Uniformitäten von HPRT-CCM und HPRT-ABI, trotz der vergleichbaren Ct-Werte in der direkten / konventionellen real-time RT-PCR, ist anzunehmen, dass die PCR-Effizienz für die T-PreAmp Uniformität eine entscheidende Rolle spielt. Der Vergleich von zwei Genexpressionsassays (HPRT-ABI und CD56), die eine schlechte T-PreAmp Uniformität aufzeigen, mit ausgesuchten Kandidaten Genexpressionsassays (selbst entwickelte und Applied Biosystems inventarisierte Taqman $\text{\textcircled{R}}$ Genexpressionsassays: HPRT-CCM, CD3d, CD3z, TRBC, TRBV19, TRBV29, NFATC3 und av β 1), deren T-PreAmp Uniformität zwischen -1,5 und 1,5 liegen, über serielle Verdünnungen von PBMC cDNA zeigt eine nicht signifikante Tendenz für eine erhöhte PCR-Effizienz bei der T-PreAmp gegenüber der konventionellen real-time RT-PCR ($0,92 \pm 0,04$ versus $0,89 \pm 0,05$ unter Ausschluss von CD56) (Abbildung 18A). Das galt auch für HPRT-ABI. Die PreAmp Uniformitäten dieser Genexpressionsassays mit Ausnahme von CD56 blieben über die seriellen Verdünnungen vergleichbar erhalten (Abbildung 18B). CD56 hingegen zeigte bei der T-PreAmp eine wesentlich erniedrigte PCR-Effizienz im Vergleich zur konventionellen real-time RT-PCR. Die PCR-Effizienz betrug bei der T-PreAmp 0,62, wohingegen die PCR-Effizienz ohne T-PreAmp 1,03 betrug (Abbildung 18A) ist. Ferner war eine graduell ansteigende Uniformität über die seriellen Verdünnungsstufen bis hin zu 8,37 bei der Verdünnungsstufe 1:512 zu beobachten (Abbildung 18B). Bei der Verdünnungsstufe 1:1024 zeigte sich keine Expression.

Ergebnisse

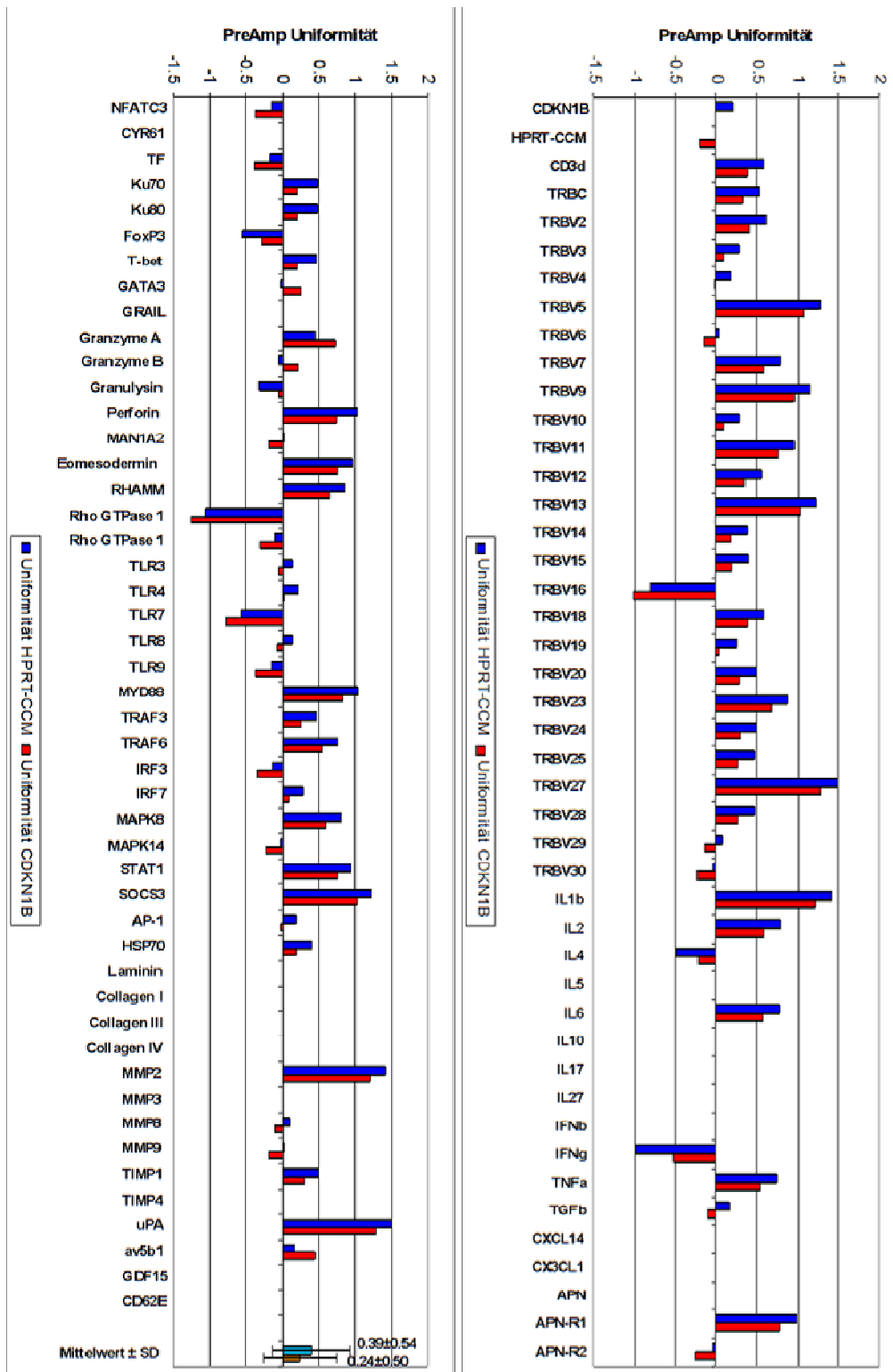


Abb. 20: T-PreAmpl Präamplifikationsuniformität an PBMCs. Die Uniformität in Bezug auf HPRT-CCM wird durch die roten Balken, die Uniformität in Bezug auf CDKN1B durch die blauen Balken dargestellt. Der türkise und orange Balken zeigen den PreAmpl Uniformität Mittelwert ± SD von allen *gene* assays. Die mittlere T-PreAmpl Uniformität der untersuchten Genexpressionsassays in PBMCs (exklusive CD56) in Bezug auf CDKN1B betrug $0,24 \pm 0,50$ (Bereich -1,26 bis 1,29) (rote Balken), und in Bezug auf HPRT-CCM betrug die Uniformität $0,39 \pm 0,54$ (Bereich -1,06 bis 1,49) (blaue Balken).

Ergebnisse

Nachdem gezeigt wurde, dass das System stabil an cDNA von PBMCs funktioniert, wurden die Analysen an cDNA von EMBs fortgeführt. Dabei resultierte die T-PreAmp an cDNA aus EMBs in einem mittleren Ct-Gewinn von $6,86 \pm 0,13$ Ct (Bereich: 6,65 bis 7,07) für CDKN1B und $7,16 \pm 0,14$ Ct (Bereich: 6,91 bis 7,39) für HPRT-CCM. Die mittlere T-PreAmp Uniformität von HPRT-CCM in Bezug auf CDKN1B liegt mit $-0,30 \pm 0,05$ (Bereich: -0,37 bis -0,21) innerhalb der vorgegebenen Uniformitätsgrenzen und nahe dem Idealwert 0. Hinsichtlich der sonstigen untersuchten Genexpressionsassays (exklusive CD56) wurde bei der T-PreAmp ein mittlerer Ct-Gewinn von $7,24 \pm 0,33$ Ct-Werte (Bereich: 6,31 bis 7,84) erzielt (Siehe Anhang S. V, Abbildung 2). Das CD56 Genexpressionsassay zeigte unter denselben Reaktionsbedingungen nur einen mittleren Ct-Gewinn von $3,37 \pm 0,09$. Unter Ausschluss von CD56 betrug die T-PreAmp Uniformität der untersuchten Genexpressionsassays in Bezug auf CDKN1B (Siehe Anhang S: VI, Abbildung 3) $-0,38 \pm 0,33$ (Bereich: -1,01 bis 0,59), und in Bezug auf HPRT-CCM auf $-0,08 \pm 0,33$ (Bereich: -0,70 bis 0,88) (Siehe Anhang S. VII, Abbildung 4).

Wie schon bei der cDNA aus PBMCs gab es auch bei der cDNA von EMBs keine signifikanten Unterschiede zwischen den selbst entwickelten (mittlerer Ct-Gewinn: $7,3 \pm 0,27$; T-PreAmp Uniformität bezogen auf CDKN1B: $-0,42 \pm 0,29$; bezogen auf HPRT-CCM: $-0,17 \pm 0,30$) und den Applied Biosystems inventarisierten Taqman® Genexpressionsassays (mittlerer Ct-Gewinn: $7,20 \pm 0,36$; T-PreAmp Uniformität bezogen auf CDKN1B: $-0,36 \pm 0,36$; bezogen auf HPRT-CCM: $-0,06 \pm 0,36$). Unter Berücksichtigung des Grenzwert-Ct-Werts für niedrige Expressionsniveaus (177) zeigten 48/337 (14%) Genexpressionsbestimmungen der Zielgene in der direkten real-time RT-PCR Ct-Werte von ≥ 35 . Aus dieser Unterscheidung resultierte erneut kein signifikanter Unterschied: bezogen auf CDKN1B: Ct $<$ 35: $-0,33 \pm 0,6$; Ct \geq 35: $-0,4 \pm 0,34$; bezogen auf HPRT-CCM: Ct $<$ 35: $-0,03 \pm 0,6$; Ct \geq 35: $-0,1 \pm 0,35$).

Für die Intra-Assay-Varianz Bestimmung wurde die cDNA einer EMB 5 Mal präamplifiziert und die Expression der Zielgene bestimmt. Die Intra-Assay-Varianz der untersuchten Gene liegt unter 0,5 Ct Werte (Abbildung 21). Der mittlere Intra-Assay Varianzkoeffizienten betrug $0,85 \pm 0,44\%$ (Bereich: 0,19 bis 2,58) unter Einbeziehung von CD56, welches hinsichtlich des Intra-Assay CV nicht anders funktionierte als die restlichen Genexpressionsassays (Siehe Anhang S. VIII, Abbildung 5). Applied Biosystems inventarisierte Genexpressionsassays wiesen insgesamt einen niedrigeren Intra-Assay CV ($0,77 \pm 0,45\%$) als die selbst entwickelten Genexpressionsassays ($0,98 \pm 0,41\%$; $p=0,0274$) auf.

Ergebnisse

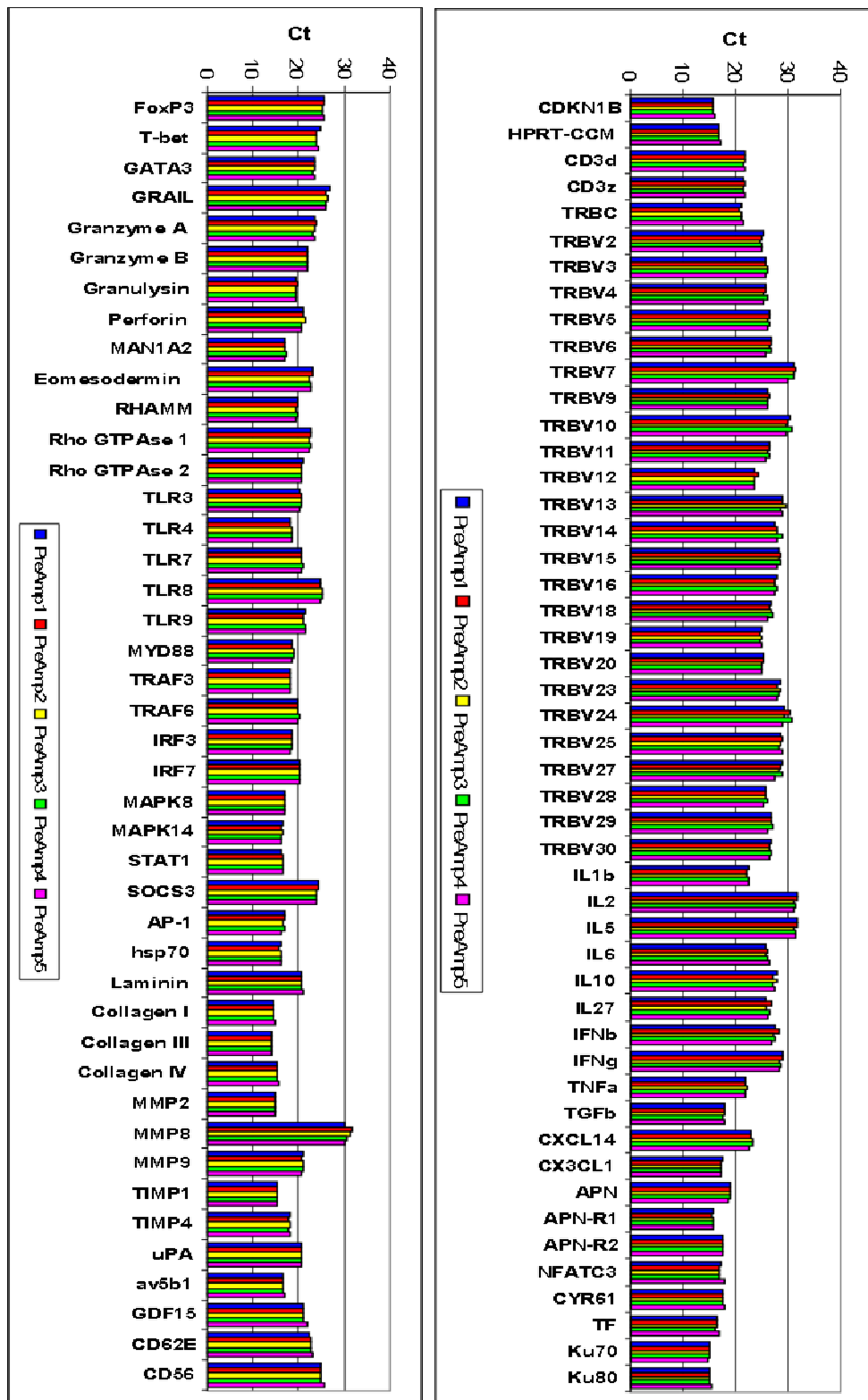


Abb. 21: Intra-Assay Varianz des T-PreAmp Verfahrens an cDNA von EMBs. Ct-Gewinn aus 5 unterschiedlichen T-PreAmp Reaktionen aus der cDNA der identischen EMBs (markiert durch 5 verschiedene Farben).

Ergebnisse

Zur Bestimmung der Inter-Assay-Varianz wurden parallel 4 EMBs präamplifiziert und der Ct-Gewinn miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass eine überwiegend gleichmäßige Präamplifikation der Zielgene stattfindet, wobei die Inter-Assay-Varianz der 4 EMBs unter 0,5 Ct-Werte liegt (Siehe Anhang S. IX, Abbildung 6). Die daraus resultierenden Varianzkoeffizienten (CV: *coefficient of variation*) liegen bei $1,89 \pm 0,48\%$ (Bereich: 0,75 bis 3,39%) (Siehe Anhang S. X, Abbildung 7) In dieser Analyse ist CD56 mit einbezogen, weil dieses Genexpressionsassay in dieser Hinsicht nicht von den anderen Genexpressionsassays abweicht. Im Vergleich zu den selbstentwickelten Genexpressionsassays ($1,74 \pm 0,46\%$) zeigen die Applied Biosystems inventarisierten Taqman® Genexpressionsassays einen höheren Inter-Assay-CV ($1,99 \pm 0,46\%$, $p=0,0135$). Für die Gene TRBV7, 10, 14, 15, 16, 24, 25, 27, 28, IL2, IL5, IL10, IFN β und APN wurde nicht in allen EMBs, weder in der direkten noch der T-PreAmp real-time RT-PCR eine Expression nachgewiesen (Siehe Anhang S. V, Abbildung 2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Methode zur Voramplifikation von cDNA aus PBMCs und EMBs bis auf einige Ausnahmen sehr gut funktioniert und eine einheitliche Uniformität erreicht wird. Außerdem liegen die Varianzkoeffizienten innerhalb vorgegebener Parameter und auch die PCR-Effizienz liegt in akzeptablen Bereichen.

3.1.3.3 Präamplifizierte real-time RT-PCR - SSRT-PreAmp (Sequenzspezifische reverse Transkription gefolgt von einer Multiplex PreAmp)

Vergleichend zur T-PreAmp wurde eine selbstentwickelte Methode zur Präamplifikation nach Peixoto et. al. (170) an cDNA von PBMCs und EMBs ausgetestet. Unter Anwendung der SSRT-PreAmp-Methode mit HPRT-CCM als *housekeeping* Gen wurden parallel 7 selbst entwickelte T-Zell-verwandte Genexpressionsassays untersucht. Diese zeigten einen mittleren Ct-Gewinn von $9,26 \pm 1,94$ (Bereich: 7,09 bis 11,9) Zyklen an cDNA von PBMCs (Abbildung 22).

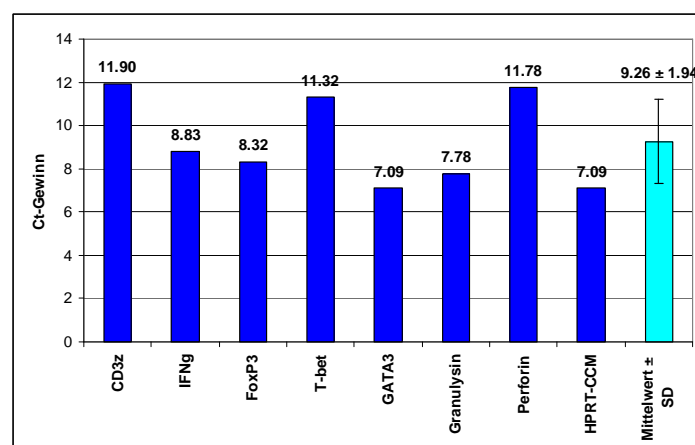


Abb. 22: Ct-Gewinn durch SSRT-PreAmp an cDNA von PBMCs. Der türkise Balken stellt den Mittelwert \pm SD des Ct-Gewinn der untersuchten *gene* assays dar.

Ergebnisse

Die gemessenen Ct-Werte in der direkten real-time RT-PCR betragen $29,99 \pm 3,84$ (Bereich: 24,18 bis 37,36) und in der SSRT-PreAmp $20,73 \pm 3,81$ (Bereich: 16,40 bis 28,53), was einem $p < 0,0001$ entspricht (Abbildung 23).

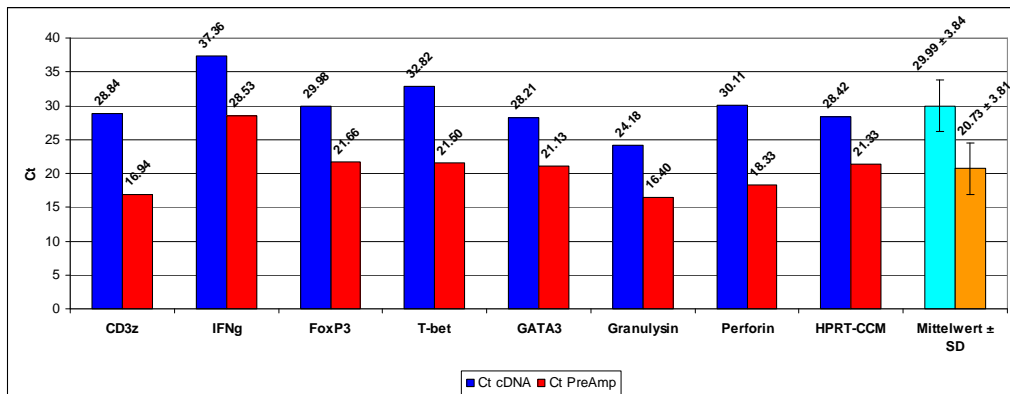


Abb. 23: Vergleich der Ct-Werte mit und ohne SSRT-PreAmp. Der türkise Balken zeigt den Mittelwert \pm SD der Ct-Werte der direkten real-time RT-PCR und der orange Balken zeigt den Mittelwert \pm SD der Ct-Werte der T-PreAmp von allen *gene assays* an.

Die mittlere SSRT-PreAmp Uniformität der untersuchten Genexpressionsassays in Bezug auf HPRT-CCM betrug $-2,49 \pm 2,04$ (Bereich: $-4,81$ bis 0) (Abbildung 24). Dies war signifikant ($p < 0,0001$) niedriger im Vergleich zur T-PreAmp Uniformität. Nur die Genexpressionsassays FoxP3, GATA3 und Granulysin lagen in den vorgegebenen Uniformitätsgrenzen von $-1,5$ bis $1,5$.

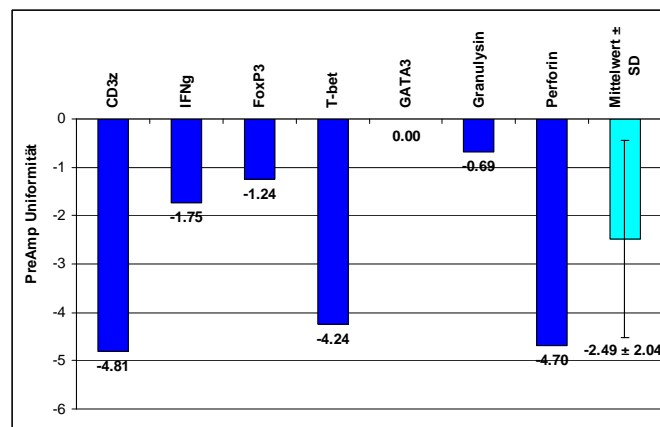


Abb. 24: SSRT-PreAmp Uniformität an PBMCs. Die blauen Balken zeigen die PreAmp Uniformitäten der Zielgene an. Der türkisarbene Balken zeigt den Mittelwert \pm SD aller Bestimmungen an.

Unter Einsatz der SSRT-PreAmp wurde an RNA aus EMBs ein mittlerer Ct-Gewinn von $9,76 \pm 2,45$ erzielt (Bereich: 6,34 bis 13,32 Zyklen) (Siehe Anhang S.XI, Abbildung 8A) In einer EMB konnte keine IFN γ Expression weder in der direkten noch in der SSRT PreAmp real-time RT-PCR nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Die mittlere Uniformität der SSRT-PreAmp an EMBs bezogen auf HPRT-CCM betrug $-3,26 \pm 2,22$ (Bereich: -6,27 bis -0,65) (Siehe Anhang S.XI Abbildung 9). Dies war signifikant niedriger ($p < 0,0001$) im Vergleich zu den T-PreAmp Ergebnissen. Wie schon bei den PBMCs lagen die PreAmp Uniformitätswerte von FoxP3, GATA3 und Granulysin innerhalb der vorgegebenen Uniformitätsgrenzen. Der mittlere Inter-assay CV betrug $5,38 \pm 2,06\%$ (Siehe Anhang S.XI, Abbildung 8B) und war im Vergleich zur T-PreAmp signifikant höher ($p = 0,01$). Der Intra-Assay CV aus 5 SSRT-PreAmp Präamplifikationen aus der RNA einer EMB betrug $1,47 \pm 0,74$ und war somit vergleichbar mit den T-PreAmp Werten (Siehe Anhang S.XII, Abbildung 10).

Obwohl die Varianzkoeffizienten der SSRT nicht von denen der T-PreAmp abweichen, aber die Uniformitäten nicht die vorgegebenen Grenzen von $-1,5 - 1,5$ einhält, wird im Weiteren von dieser Anwendung Abstand genommen und nur noch die T-PreAmp angewendet. Denn für diese Methode konnte gezeigt werden, dass die Uniformität eingehalten wird und das nicht nur für die kommerziell erhältlichen *gene assays*, sondern auch für das selbst entwickelte TRBV-Primer/Sonden-System. Es zeigen sich keine Unterschiede weder beim Inter- noch beim Intra-Assay-Varianzkoeffizienten zwischen dem selbst entwickelten TRBV-Primer/Sonden-System und den kommerziellen *gene assays*, was für die Stabilität der T-PreAmp Methode, aber auch für die selbst entworfenen Primersysteme spricht.

3.1.4 Differentielle Genexpressionsanalysen mittels T-PreAmp real-time RT-PCR in EMBs von Patienten mit immunhistologischem Nachweis einer DCMi

Angesichts der stabilen Präamplifikationsleistungen, sowie der ungleich größeren Anzahl von Genexpressionsassays, die mittels T-PreAmp im Vergleich zu der SSRT-PreAmp Methode unter Einsatz geringer RNA-Mengen durchgeführt werden können, wurde eine erste Durchführung einer T-PreAmp real-time RT-PCR Bestimmung an EMBs von 20 Patienten angestrebt. Bei der Hälfte dieser Patienten war eine DCMi immunhistologisch bestätigt worden. Dabei zeigten 30 der 92 (32%) untersuchten Zielgene in diesem Vergleich eine differentielle Expression ($p < 0,05$) auf. Dieselben Zielgene mit signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlicher Expression, normalisiert auf das housekeeping Gen HPRT-CCM (Tabelle 6), zeigten auch in der Quantifizierung in Bezug auf das Präamplifikations-Referenzgen CDKN1B gleichsinnig signifikante Expressionsunterschiede auf (Siehe Anhang S. XIII, Tabelle 1).

Die kompletten Tabellen mit allen berechneten Expressionen, unter Einbeziehung auch der nicht differenziell regulierten Gene, können dem Anhang (S. XIV, Tabelle 2 und S. XVII, Tabelle 3) entnommen werden. Von Interesse war auch die Beobachtung, dass die Expressionen von HPRT-CCM und CDKN1B aufeinander bezogen sich nicht zwischen den EMBs von Patienten mit immunhistologisch gesicherter DCMi versus DCM (keine immunhistologisch fassbare DCMi) unterschieden, woraus eine fehlende Genexpressionsregulation nicht nur des bekannten *housekeeping* Gens HPRT, sondern auch von CDKN1B in dieser Konstellation geschlussfolgert werden kann. Daher sind auch diese nicht-signifikant unterschiedlichen Expressionen auch in den entsprechenden Tabellen angeführt.

Bis auf CXCL14 (MIP-2 γ), Adiponectin (APN) und tissue factor (TF) ist die Genexpression aller 30 regulierten Gene in DCMi-Patienten signifikant erhöht. Eben genannte Gene zeigten bei DCMi-Patienten eine signifikant erniedrigte Expression im Vergleich zu DCM-Patienten ohne immunhistologischen DCMi-Nachweis.

Ergebnisse

Tab. 6: Differentielle Genexpressionsanalysen in EMBs von Patienten mit immunhistologisch gesicherter DCMi mittels T-PreAmp real-time RT-PCR, normalisiert auf das *housekeeping* Gen HPRT

Gen	DCM	DCMi	p Wert
CDKN1B	3.12755±1.57223	3.73352±1.68606	n.s.
CD3d	0,014163±0,008761	0,045395±0,015252	<0,0001
CD3z	0,043139±0,010119	0,060631±0,007718	0,0023
TRBC	0,015027±0,010150	0,027622±0,010532	0,0098
TRBV2	0,001487±0,001300	0,004503±0,002881	0,0053
TRBV4	0,001501±0,001432	0,005441±0,003850	0,0047
TRBV6	0,002926±0,002154	0,005478±0,002562	0,0307
TRBV10	0,000186±0,000127	0,000905±0,000967	0,0245
TRBV20	0,003935±0,003140	0,019818±0,018318	0,0105
TRBV23	0,000408±0,000269	0,006402±0,008324	0,0270
TRBV24	0,000282±0,000265	0,004754±0,006232	0,0075
TRBV29	0,001302±0,001168	0,002815±0,00138	0,0192
IL6	0,002020±0,001246	0,004133±0,002452	0,0094
TNFα	0,028511±0,014230	0,052024±0,017001	0,0049
CXCL14	0,151853±0,145437	0,054158±0,052000	0,0299
CX3CL1	0,96874±0,431717	1,39651±0,790158	0,0245
APN	0,390377±0,555952	0,035850±0,058782	0,0092
NFATC3	1,29493±0,479396	2,56855±0,776956	0,0052
CYR61	0,85785±0,47640	2,94840±2,33843	<,0001
TF	3,59608±1,01046	2,14158±0,53169	0,0109
T-bet	0,014431±0,005826	0,022267±0,008127	0,0355
Granzyme A	0,014704±0,006914	0,035028±0,011726	0,0004
Granzyme B	0,062487±0,022406	0,105532±0,026082	0,0027
Granulysin	0,206285±0,186560	0,532339±0,327002	0,0183
Eomesodermin	0,014428±0,007246	0,036024±0,007900	0,0011
avβ1	1,04571±0,283760	1,71316±0,844310	0,0033
GDF15	0,020984±0,013187	0,041715±0,028283	0,0127
CD62E	0,002714±0,001093	0,012877±0,008890	0,0119

Signifikant unterschiedliche Expressionen von Zielgenen, normalisiert auf HPRT-CCM, in EMBs von DCM-Patienten mit immunhistologisch gesicherter DCMi (>7,0 CD3⁺ T-Lymphozyten/mm²) verglichen mit DCM-Patienten ohne immunhistologischen DCMi Nachweis. CDKN1B zeigte in diesem Vergleich, ebenso wie die anderen bestimmten Gene, keinen signifikanten Expressionsunterschied (n.s.: nicht-signifikant) auf. Es sind die Mittelwerte±SD der auf das *housekeeping* Gen HPRT-CCM normalisierten Expressionen angegeben.

Ergebnisse

Signifikant erhöhte Expressionen in DCMi⁺ EMBs wurden unter Einsatz der T-PreAmp real-time RT-PCR hinsichtlich folgender Zielgene ermittelt:

- a) T-Zell-assoziierte Gene: CD3d, CD3z, TRBC, TRBV2, TRBV4, TRBV6, TRBV10, TRBV20, TRBV23, TRBV24, TRBV29, NFATC3 (*nuclear factor of activated T-cells C3*), Th1 assoziierte Gene (T-bet und Eomesodermin), Gene, die zytotoxische T-Lymphozyten charakterisieren (Granzyme A und B, Granulysin)
- b) Zytokine: Interleukin 6 (IL6), Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), das Chemokin CX3CL1 (Fractalkin)
- c) CAMs: β_1 -Integrine (av5 β_1), Selektin CD62E (E-Selektin)
- d) Sonstige: *cysteine-rich angiogenic inducer 61* (CYR61), *growth-differentiation factor 15* (GDF15)

Eine signifikant erniedrigte Expression zeigte sich in DCMi⁺ befundeten EMBs hinsichtlich der folgenden Gene: Chemokin CXCL14 (MIP-2 γ), Adiponektin (APN) und *tissue factor* (TF).

3.1.5 Murines SWR-Modell der akuten und chronischen Myokarditis

Zur quantitativen Erfassung der Dominanz von funktionellen TRBV an einem definierten Tiermodell der CVB3-induzierten Virus-Myokarditis im akuten und im chronischen Stadium wurden Untersuchungen an SWR-Mäusen durchgeführt. Die Untersuchungen sollten exemplarisch aufzeigen, welche TRBV Dominanzen in einem definierten Myokarditis-Tiermodell unter identischen, genetischen Hintergrund entstehen, und welchen dynamischen Verlauf diese TRBV-Dominanzen im akuten und chronischen Stadium der Myokarditis aufweisen.

Dafür wurden jeweils 6 Kontroll- und mit CVB3 infizierte SWR-Mäuse 4, 7, und 28 Tage nach der Infektion mittels real-time RT-PCR untersucht. Die entsprechenden Genexpressionsassays wurden in Analogie zu den humanen TRBV/TRBC designet. Die cDNA, die mir freundlicherweise von der AG Pauschinger für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurde, wurde mittels des T-PreAmp-Verfahrens für 14 Zyklen präamplifiziert und dann in der real-time RT-PCR analysiert.

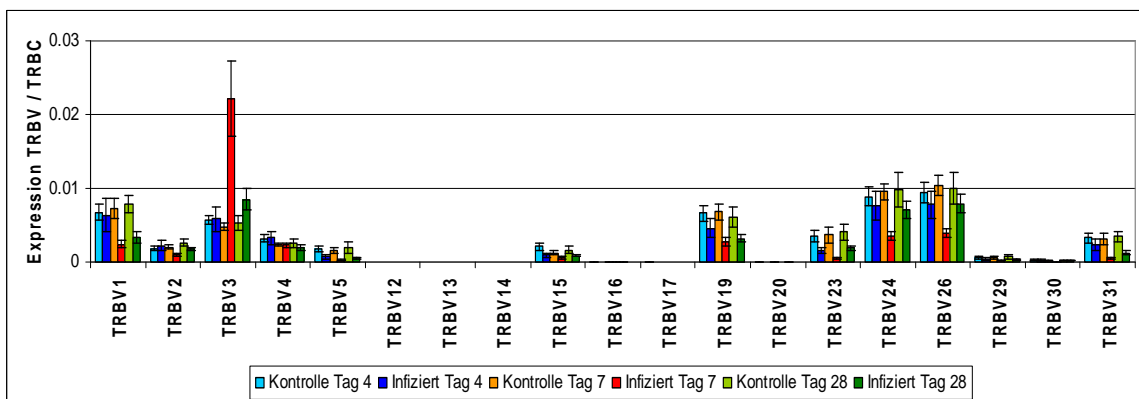


Abb. 25: TRBV 3 Dominanz im akuten und chronischen Stadium bei CVB3 infizierten SWR-Mäusen

Am Tag 4, 7 und 28 nach der Virusinfektion wurde die TRBV Expression mittels real-time RT-PCR in Bezug auf TRBC bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert \pm SD dar. Es wurden jeweils n=6 Tiere pro Gruppe untersucht.

Es wurden überwiegend T-Zellrezeptor $V\beta$ und andere T-Zell relevante Gene untersucht. Bei der Analyse der TRBV-Expression kommt es über den Verlauf der 28 Tage zu einer deutlichen Verschiebung des Expressionsmusters (Abbildung 25, 26) bei den infizierten Tieren. Für die untersuchten TRBVs 12, 13 und 14 konnte keine Expression nachgewiesen werden. Für die TRBVs 16, 17 und 20 war nur eine sehr geringe Expression in den Kontrolltieren zu verzeichnen. Die TRBV-Expression in den Kontrolltieren war zu allen Zeitpunkten gleich. An Tag 4 war bei den infizierten Tieren überwiegend eine zu den Kontrolltieren vergleichbare TRBV Expression zu beobachten.

Ergebnisse

Am Tag 7 p.i. war eine deutliche Zunahme der TRBV3 Expression (3,6-fach) im Vergleich zu den Kontrolltieren zu sehen, welche bei Tag 28 zwar abnahm, aber weiterhin deutlich höher als bei den nicht-CVB3-infizierten SWR Mäusen persistierte (Abbildung 25).

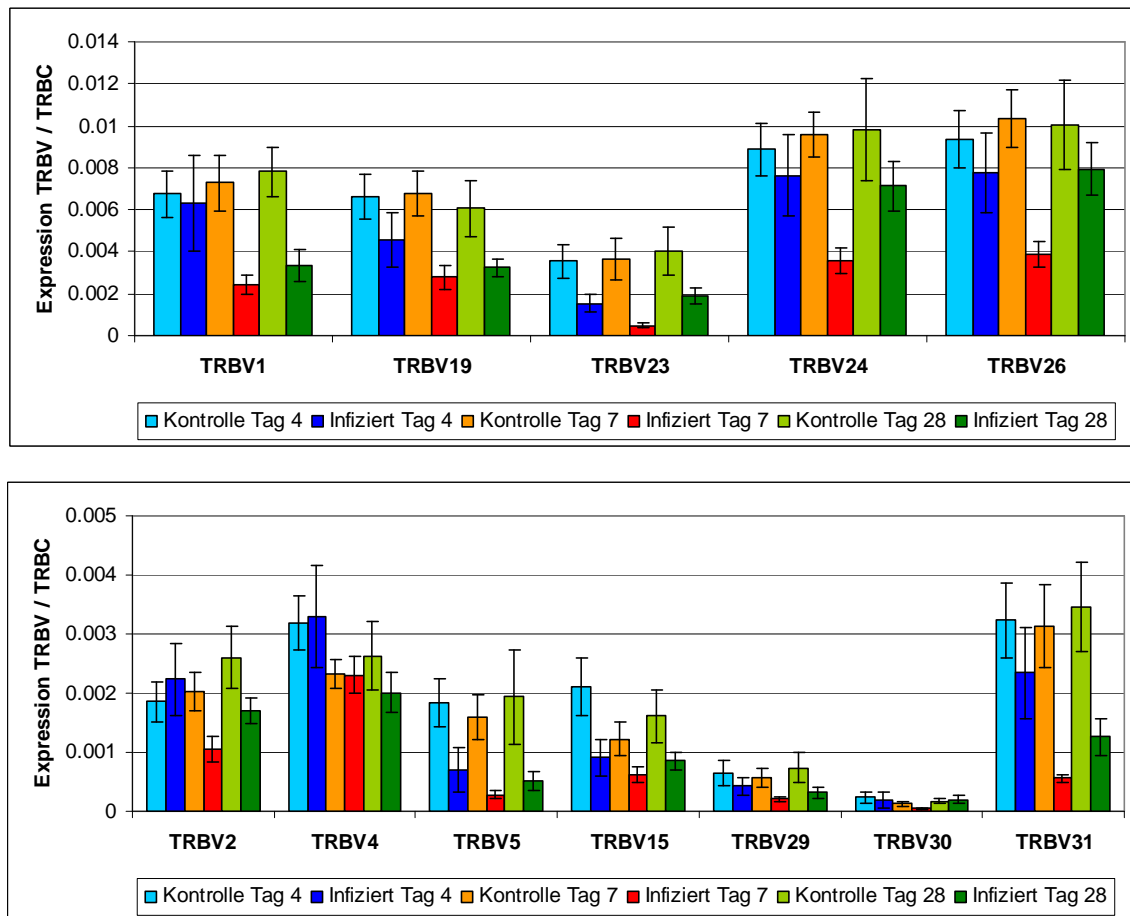


Abb. 26: Vergleich der TRBV Expression bei CVB3 infizierten SWR-Mäusen

Am Tag 4, 7 und 28 nach der Virusinfektion wurden die TRBV Expression mittels real-time RT-PCR in Bezug auf TRBC bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert \pm SD dar. Es wurden jeweils $n=6$ Tiere pro Gruppe untersucht.

Gleichzeitig zu der TRBV3-Zunahme nahm die Expression der restlichen TRBVs deutlich ab. Im Mittel war die Expression der übrigen TRBVs am Tag 7 $2,34 \pm 1,88$ -fach erniedrigt. Besonders deutlich war die Abnahme der Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren bei TRBV5 (4,6-fach), TRBV23 (6,4-fach) und TRBV31 (4,6-fach) (Abbildung 26). Am Tag 28 war ein Anstieg der Expression zu beobachten und die mittlere Expressionserniedrigung im Vergleich zu den Kontrolltieren belief sich auf $0,95 \pm 0,79$ -fach. Bei TRBV5 (2,8-fach), TRBV23 (1,1-fach) und TRBV31 (1,7-fach) hatte sich die Expression noch nicht so stark normalisiert wie bei anderen TRBVs, wie z.B. TRBV2, TRBV24 und TRBV26. TRBV4 schien als einziger TRBV nicht von der CVB3-Infektion betroffen zu sein. Die Expression blieb über den Verlauf des Versuches stabil (Abbildung 26 unten) und zeigte keine Unterschiede zwischen den infizierten und Kontrolltieren.

Ergebnisse

Neben den TRBVs wurden weiterhin T-Zell-assoziierte Gene untersucht, die die Funktionalität der T-Zell-Antwort charakterisieren. Dabei konnte beobachtet werden, dass an Tag 4 besonders die Expression von IFN β (199,8-fach) erhöht ist (Abbildung 27, Tabelle 7). Und auch die Expressionen von IL-6 und Granzyme B lag mit einer 22,27- und 36,33-fachen Erhöhung deutlich über den restlichen Genen, die eine Erhöhung von 0,23- bis 9,44-fach aufweisen (Tabelle 7).

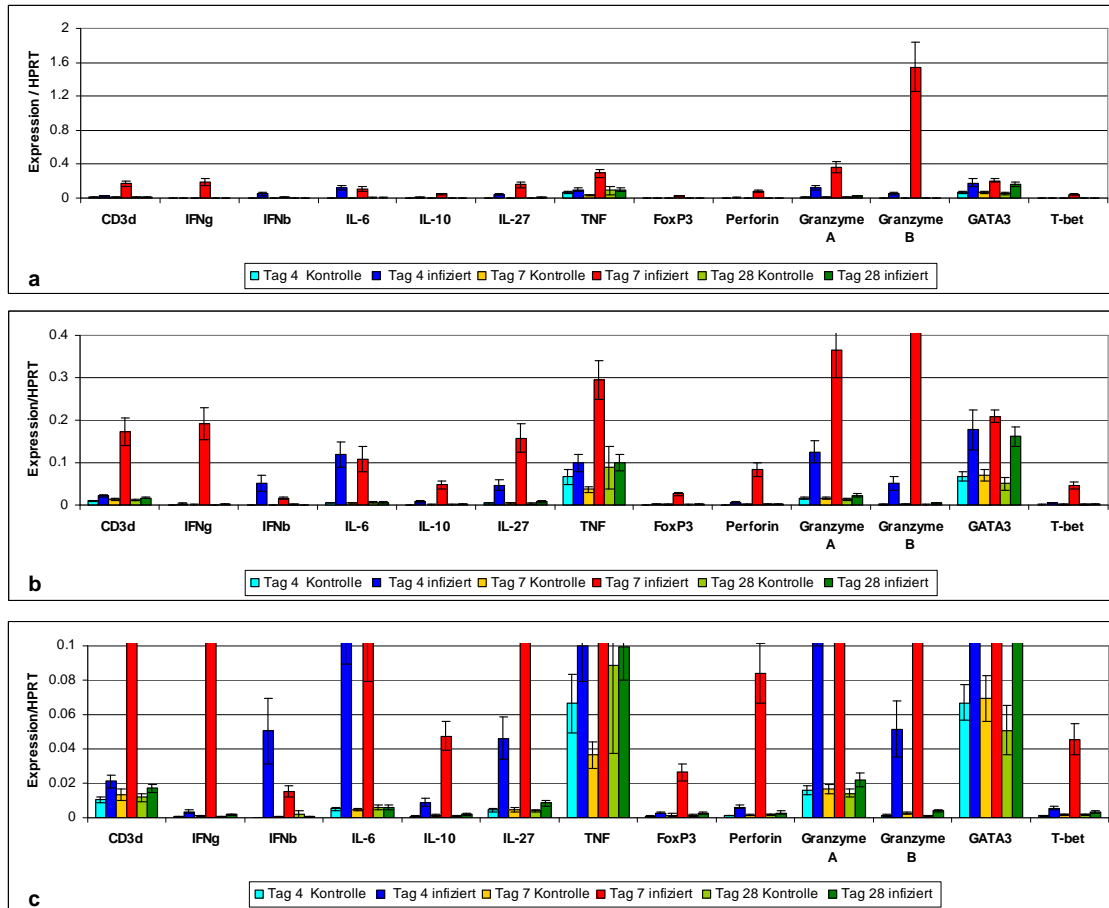


Abb. 27: Myokardiale Expression von funktionellen T-Zell-Markern nach CBV-induzierter Myokarditis in SWR-Mäusen. An Tag 4, 7 und 28 nach der Virusinfektion wurden die Expressionen der funktionellen T-Zellmarker mittels real-time RT-PCR in Bezug auf HPRT bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert \pm SD dar. Es wurden jeweils n=6 Tiere pro Gruppe untersucht.

Im Mittel gab es an Tag 4 eine Expressionserhöhung aller Gene von $19,03 \pm 49,15$ -fach. Am Tag 7 kommt es zu einer starken Erhöhung der Genexpression im Mittel um $62,76 \pm 143,45$ -fach im Vergleich zu den Kontrolltieren. Besonders Granzyme B weist eine extreme Expressionssteigerung von 582,84-fach im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (Abbildung 27). Die IFN β Expression hingegen nimmt an Tag 7 ab und war nur noch 39,01-fach im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht. An Tag 28 hatte sich die Expression aller Gene wieder auf das Kontrolltierniveau reguliert und wies nur noch eine $0,87 \pm 0,73$ -fache Erhöhung der Expression auf.

Ergebnisse

Ferner war die nicht vorhandene Regulation von Grail und TGF β auffallend. Hinsichtlich TGF β kam es über den Verlauf des Experiments nur zu einer minimalen Erhöhung der Expression von 0,91-fach an Tag 28 (Abbildung 28 Mitte).

Die Expression von Grail nimmt an Tag 4 leicht zu (0,88-fach) und am Tag 7 wieder ab (0,21-fach), um am Tag 28 wieder leicht zu steigen (1,16-fach) (Abbildung 28 rechts). Auch IL-4 ist über den Verlauf der Untersuchung kaum reguliert und weist nur an Tag 7 eine leichte Erhöhung der Expression von 1,99-fach auf (Abbildung 28, Tabelle 7).

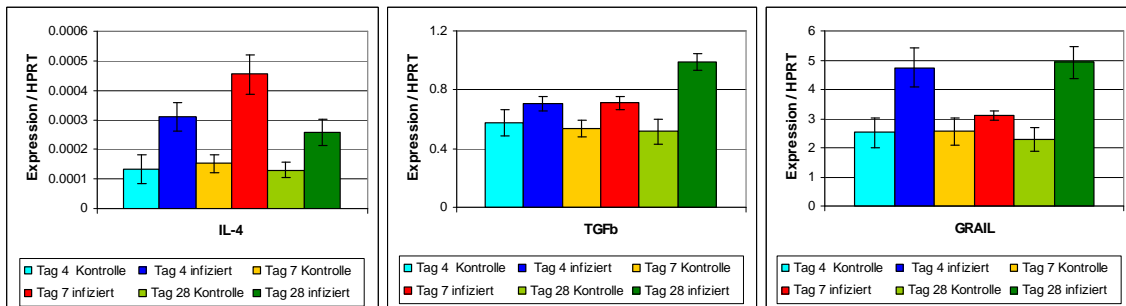


Abb. 28: Myokardiale differentielle Expression von IL-4, bei fehlender Regulation von TGF β und Grail nach CBV-induzierter Myokarditis in SWR-Mäusen. An Tag 4, 7 und 28 nach der Virusinfektion wurden die Expressionen der funktionellen T-Zellmarker mittels real-time RT-PCR in Bezug auf HPRT bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert \pm SD dar. Es wurden jeweils n=6 Tiere pro Gruppe untersucht.

Tab. 7: Expressionsänderungen der infizierten CVB3 SWR-Mäuse zu den Kontrolltieren

	Tag4	Tag7	Tag28
CD3d	1,04	12,16	0,47
IFNg	4,85	152,58	1,33
IFNb	199,80	39,02	-0,72
IL-6	22,27	23,94	0,01
IL-10	9,17	35,58	0,86
IL-27	9,44	31,73	1,13
TNF	0,50	7,06	0,12
FoxP3	2,45	15,31	1,02
Perforin	4,26	53,04	0,73
Granzyme A	6,89	20,94	0,54
Granzyme B	36,33	582,84	2,19
GATA3	1,65	2,02	2,17
T-bet	3,37	25,34	0,95
IL-4	1,35	1,99	0,97
TGFb	0,23	0,33	0,91
GRAIL	0,88	0,21	1,16
Mittelwert	19,03	62,76	0,87
Esonders SD	49,15	143,45	0,73

Die Expressionsänderungen zur Kontrollgruppe sind in x-fach dargestellt. Im Anschluß sind der Mittelwert und die Standardabweichung aller Gene angeführt.

Ergebnisse

Abschließend lassen sich folgende Ergebnisse der Untersuchungen am SWR-Mausmodell zusammenfassen: Für die Untersuchungen der TRBV zeigt sich eine erhöhte Expression von TRBV3 an Tag 7, die auch an Tag 28 p.i. noch nachweisbar ist. Für die weiteren TRBV, ausser TRBV4 ist eine Abnahme der Expression zu beobachten. TRBV4 ist über den Verlauf der 28 Tage nicht reguliert im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Bei den T-Zell-assoziierten Genen ist an Tag 4 besonders IFN β (199,8-fach) hochreguliert. An Tag 7 sind die Expression von Granzyme B (582,8-fach) und IFN γ (152,6-fach) erhöht. An Tag 28 zeigen alle untersuchten Gene wieder eine Expression vergleichbar zu den Kontrolltieren. Für TGF β , Grail und IL-4 zeigen über den gesamten Versuch keine oder nur eine sehr geringe Änderung der Expression.

3.2 TRBV-Repertoire in expandierten T-Zellen

3.2.1 *In vitro* Expansion von humanen T-Zellen

Ein breites Spektrum an Krankheiten, wie Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten und maligne Erkrankungen können mit einer Krankheits-spezifischen Verzerrung des TRBV Reper-toires in Zusammenhang stehen (153, 178-180). Untersuchungen der TRBV Nutzung, der T-Zell-Funktionen und Antigen-spezifität, oder adoptive immuntherapeutische Ansätze sind oft be-hindert durch die niedrigen Frequenzen von zirkulierenden Antigen-spezifischen T-Zellen, wel-che noch niedriger in T-Zell Infiltraten in festem Gewebe sein können (159, 181-188).

EMBs von DCMi-Patienten enthalten nur eine relativ niedrige Zahl von infiltrierenden T-Zellen (ca. 800-3000 T-Zellen, hochgerechnet aus immunhistologischen Untersuchungen, je nach T-Zell-Infiltrationsausprägung). Für die Bestimmung der Antigen-spezifität werden aber ungleich höhere Zellmengen benötigt. Für den IFN γ -FACS-Nachweis von Peptid-stimulierten Zellen wer-den mindestens 10⁶ T-Zellen benötigt (159). Im Idealfall sollten Techniken zur *in vitro* Expansion alle in der initialen T-Zellpopulation vorkommenden TRBV beibehalten. Das gleiche gilt für die Expansion von kleinen T-Zellpopulationen.

Neben den Kulturbedingungen können auch krankheitsspezifische Eigenschaften der in den Krankheitsverlauf involvierten T-Zellen das Ergebnis der T-Zellkultur beeinflussen. Das TRBV Repertoire von T-Zellen aus der Darmschleimhaut reduzierte sich nach einer längerfristigen *in vitro* Kultivierung in Abwesenheit von *feeder* Zellen, was auf die Anwesenheit eines intestinalen Superantigens der Krankheit Morbus Crohn zurückzuführen war (189).

Hauptsächlich wurden die Bemühungen, T-Zellen mit synthetischen Medien zu expandieren, für die Nutzung als therapeutisches Mittel (*adoptive transfer*) gemacht und weil autologe Seren nicht leicht zugänglich sind. Ersatzseren z. B. humanes Serum von mehreren Spendern (HS) oder fötales Rinderserum (FBS) können möglicherweise nicht vorteilhafte und nicht kontrollier-bare Effekte verursachen, z.B. durch *inter-batch* Variationen und Kontamination mit bakteriellen Polysacchariden. Deswegen sollte die alternative Nutzung von synthetischen, serumfreien Me-dien mit vernachlässigbaren Abweichung innerhalb einer Charge hypothetisch ideal zur Minimie-rung solcher Effekte sein.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Zellkulturmedien inklusive Lymphozyten-spezifischer serumfreier Medien auf die polyklonale T-Zellexpansionseffizienz und TRBV Expression in der Anwesenheit von autologen FC untersucht.

Zur Bestimmung der Effizienz der T-Zellexpansion wurden die erhaltene Zellzahl und die Clus-terbildung, während der Langzeitkultur in den vier verschiedenen Zellkulturmedien (HS-RPMI, FBS-RPMI, Panserin 413, X-Vivo15TM) bis hin zu 28 Tagen durch Phasenkontrastmikroskopie (Abbildung 29) untersucht. Während alle Kulturen, die letztendlich zu einer beträchtlichen T-Zellexpansion führten, bis Tag 14 ähnlich aussahen, mit gleichmäßig verteilten Clustern von bis

Ergebnisse

zu 40 Zellen pro Cluster, wurden ab Tag 21 Unterschiede deutlich (Abbildung 29a). Mit Ausnahme der Kulturen mit dem X-Vivo15™ Medium, in dem die Cluster die Größe von Tag 7 beibehalten, vergrößern sich die Cluster kontinuierlich in den Kulturen mit HS-RPMI oder FBS-RPMI.

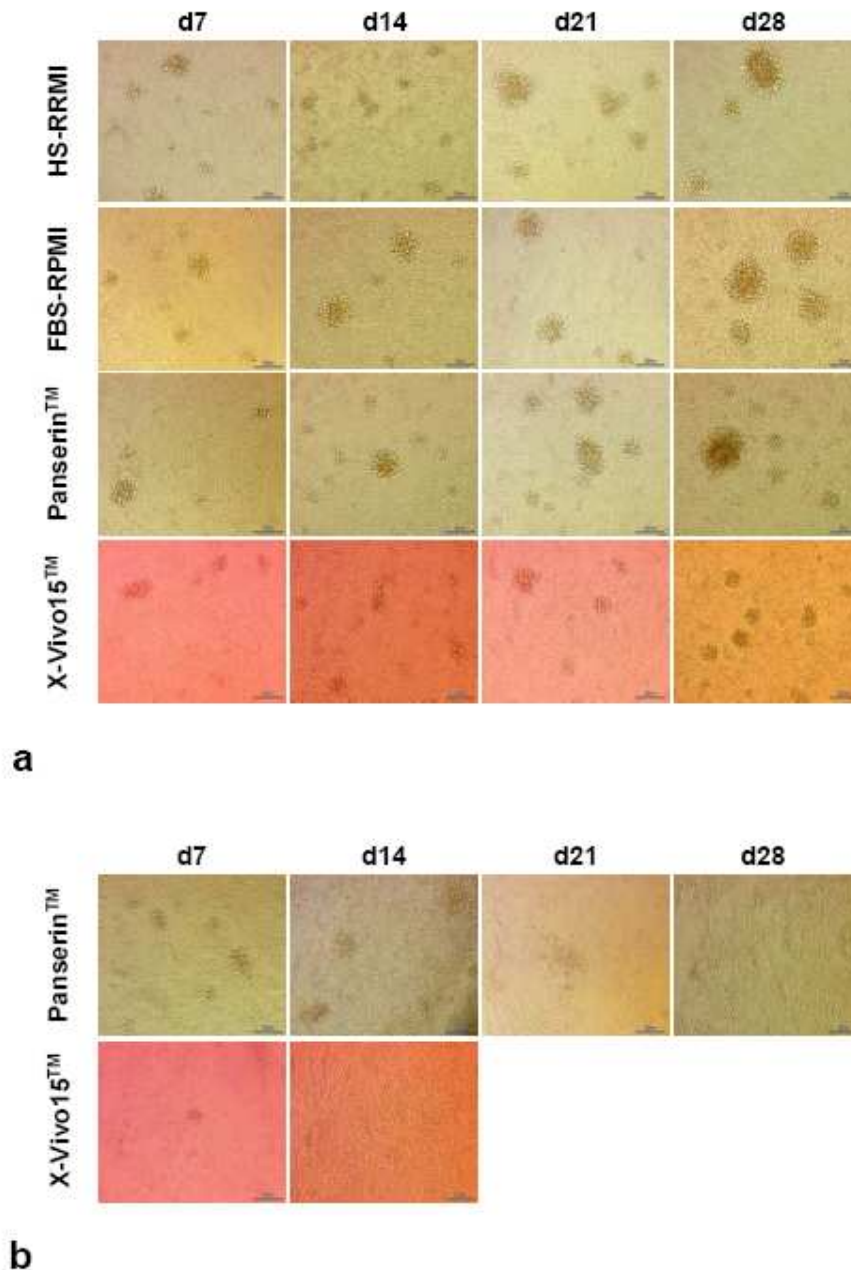


Abb. 29: Verlauf der Clusterbildung in *in vitro* T-Zellkulturen

Kulturen mit 1×10^4 CD3 angereicherten PBLs wurden mit 5×10^5 Mitomycin C-inaktivierten FCs, 20 ng/ml OKT-3 und 25U/ml IL-2 angesetzt. HS-RPMI, FBS-RPMI, Panserin 413™ oder X-vivo15™ Kulturmedien wurden verwendet wie angegeben. Alle 7 Tage wurden die Kulturen mittels Phasenkontrastmikroskopie evaluiert und daraufhin bis zu 28 Tage restimuliert. (A) Erfolgreiche und (B) nicht-erfolgreiche Clusterbildung über die Zeit. Originalvergrößerungen x200.

Ergebnisse

Hinweisend auf eine hohe Reproduzierbarkeit der T-Zellexpansion konnten Dreifach-Kulturen in RPMI basierten Medien mit HS oder FBS bis zu 28 Tagen durchgeführt werden, wobei eine Clusterbildung über die ganze Kultivierungsdauer für alle Spender beobachtet werden konnte. An Tag 28 zeigen die Panserin413TM-geführten Kulturen diverse Clustergrößen mit optisch dichteren Zentren von größeren Clustern. Bei einigen Kulturen in synthetischen Medien kam es nicht zu einer Ausbildung von Clustern (Abbildung 29b).

Die enge, räumliche Beziehung zwischen CD3⁺ T-Zellen und einigen zwischengelagerten CD11b⁺ FCs in den entsprechenden immunhistologischen Färbungen von Zellen expandierender HS-RPMI Kulturen zeigt, dass die Cluster aus CD3⁺ T-Zellaggregaten bestehen, die die FC umschließen (Abbildung 30).

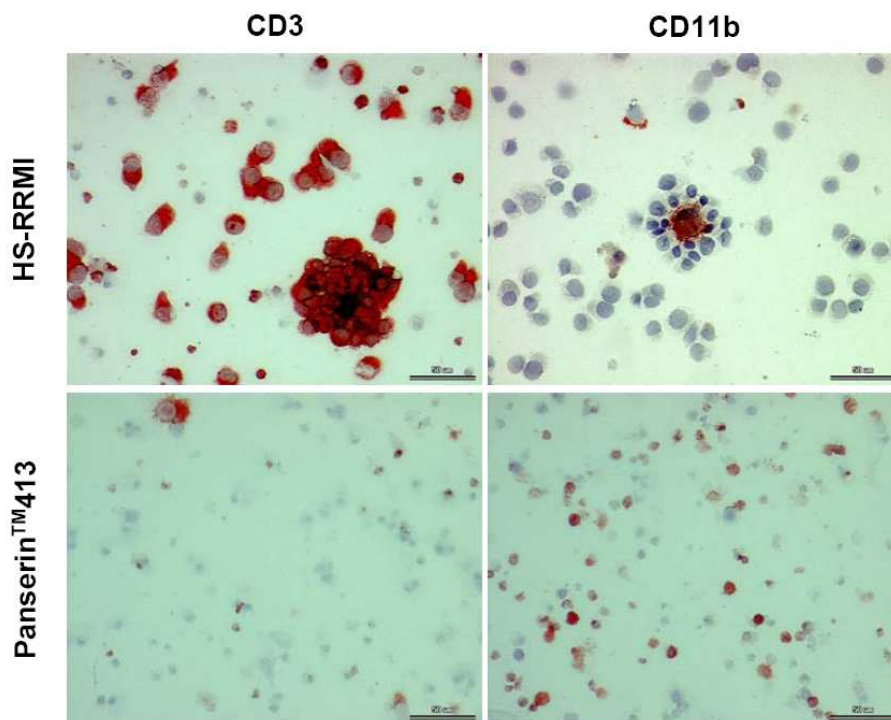


Abb. 30: Immunhistochemische Darstellung von Kulturen mit erfolgreicher und keiner Clusterbildung.

Nach 28 Tagen wurden 3×10^4 Zellen von HS-RPMI oder Panserin 413TM Kulturen auf Objektträger gebracht und anschließend auf CD3⁺ T-Zellen oder CD11b⁺ FC gefärbt. Originalvergrößerung x400,

Für Panserin 413TM wurde ein gelegentlicher Verlust der Clusterbildung beobachtet. In diesen Fällen wurden nur einzelne wenige T-Zellen beobachtet und CD11b⁺ Zellen verblieben in der Kultur (Abbildung 30). Der Verlust der Zellclusterbildung und das Fehlen von Expansion waren signifikant für X-Vivo15TM am Tag 21 ($p=0,037$) und Tag 28 ($p<0,0001$) sowie für Panserin 413TM an Tag 28 ($p=0,0052$). Grundlegend sind die Zeitverläufe der T-Zellexpansion und Lebendzellzahlen ähnlich zwischen den Kulturen mit Serum und denen mit serumfreien Medien (Abbildung 31a). Die maximalen Zellzahlen für Panserin 413TM und X-Vivo15TM am Tag 28 wurden

Ergebnisse

überwiegend schon nach 21 Tagen Kultivierung erreicht und erhöhten sich im Verlauf nicht weiter. Auf der anderen Seite deuten die Kurvenverläufe der Kulturen mit RPMI-Medium + 10% Serum weitere Expansionsfähigkeiten über den 28. Tag hinaus an.

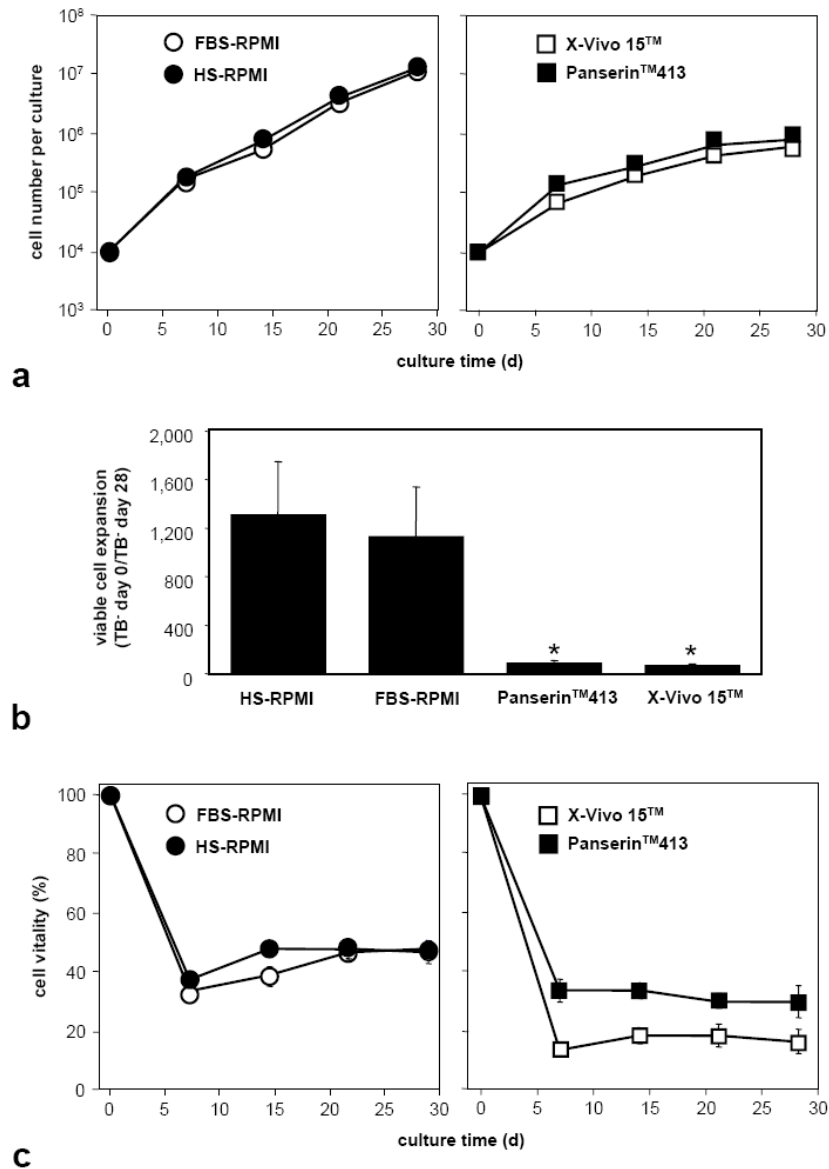


Abb. 31: Zellzahlen und Vitalität während der längerfristigen Kultivierung von CD3⁺ T-Zellen in HS-RPMI, FBS-RPMI, Panserin 413TM und X-vivo15TM.

Die Zellen wurden wie in Abbildung 37 beschrieben kultiviert und die Lebendzellzahlen wurden mittels Trypanblau Ausschluss alle 7 Tage bestimmt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SEM von Kulturen in Dreifachbestimmung (n=24). **(A)** Zellzahlen pro Kultur über die Zeit. **(B)** Kumulative Expansionsrate am Tag 28 kalkuliert in Relation zur Zellzahl an Tag 0, * signifikant im Vergleich mit HS-RPMI und FBS-RPMI Kulturen, bestimmt durch Tukey-Kramer post hoc Analyse. **(C)** Lebensfähigkeit aller Zellen während der *in vitro* Kultivierung

Ergebnisse

Ungeachtet dessen sind die Expansionsraten am letzten Tag des Experiments bei den Kulturen mit HS-RPMI ($1301,7 \pm 446,1$ fach) oder FBS-RPMI ($1124,4 \pm 414,6$ fach) ungefähr 15-mal höher als bei Panserin 413TM ($78,6 \pm 34,5$ fach) und X-Vivo15TM ($60,3 \pm 22,2$ fach) (Abbildung 31b). Hinsichtlich der Überlebensrate der kultivierten Zellen an Tag 28 sind Panserin 413TM ($30,7 \pm 5,5\%$) und X-Vivo15TM ($20,2 \pm 3,9\%$) abermals signifikant schlechter als HS-RPMI ($46,9 \pm 3,7\%$) und FBS-RPMI ($48,1 \pm 2,6\%$) (Abbildung 31c).

Von Zellkulturen, die Expansion und Clusterbildung vorwiesen, wurden Cytospins und anschließend immunhistologische Färbungen durchgeführt. Dabei sind an Tag 14 und Tag 28 bei Kulturen mit RPMI-Medium + 10% Serum große Mengen an aktivierten CD3⁺ T-Zellen (Abbildung 32) zu erkennen.

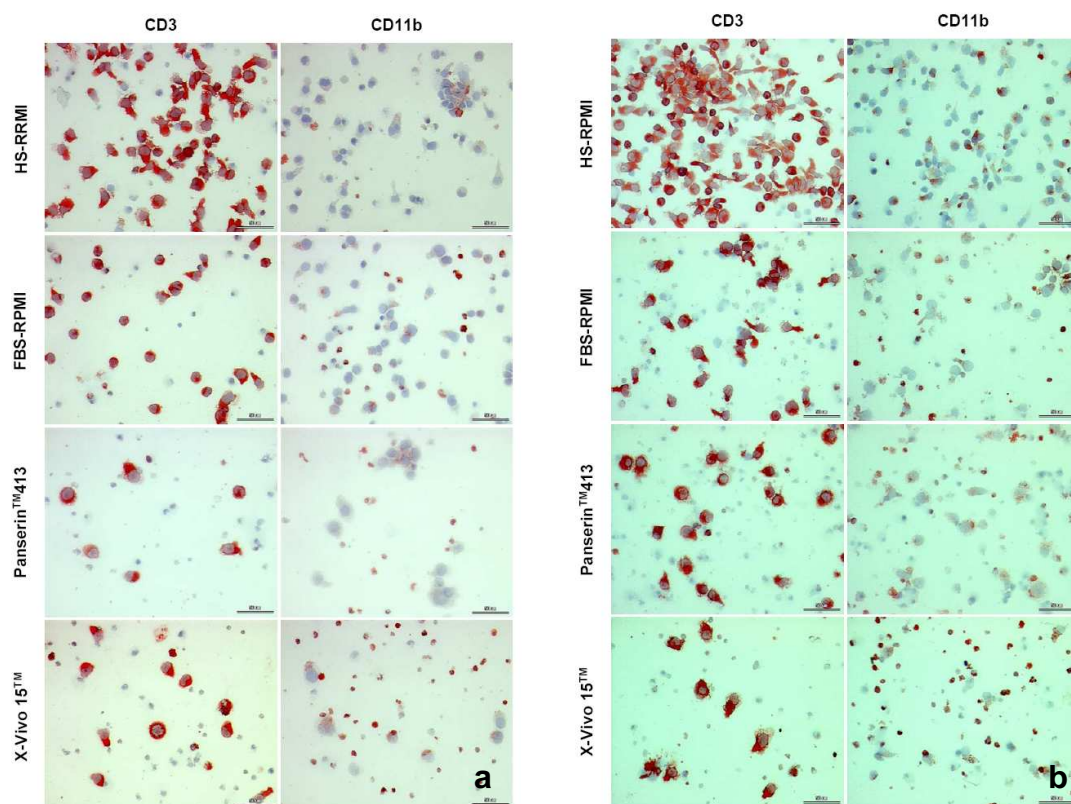


Abb. 32: Immunfärbung von T-Zellen und Monozyten/Makrophagen nach 14 Tagen (a) und 28 Tagen (b) *in vitro* Expansion mit FC

Cytospins von 3×10^4 Zellen von HS-RPMI, FBS-RPMI, Panserin 413 und X-Vivo15 wurden gegen CD3⁺ Zellen (linke Spalte) oder CD11b⁺ Monozyten/Makrophagen (rechte Spalte) gefärbt. Originalvergrößerung x400,

In Panserin 413TM und X-Vivo15TM Kulturen kommen nur wenige CD3⁺ T-Zellen und CD11b⁺ FC vor. Die T-Zellmorphologie, charakterisiert durch ziemlich große runde Zellen mit einem niedrigen Zytoplasma/Zellkern Verhältnis deutet auf eine schlechte T-Zellaktivierung begleitet von einer niedrigen T-Zellexpansion hin.

Folglich konnten die für weitere Versuche benötigten 10^6 CD3⁺ T-Zellen reproduzierbar nur durch *in vitro* Kultivierung mit FC in RPMI versetzt mit Seren (HS und FBS) erhalten werden.

3.2.2 TRBV Expression nach T-Zellexpansion

Der entscheidende Punkt für alle getesteten Systeme ist, wie die TRBV Expression nach 14 und 28 Tagen das T-Zellrepertoire vor der Expansion widerspiegelt. Dafür wurde die TRBV-spezifische mRNA quantifiziert und auf TRBC normalisiert (Abbildung 33).

Aufgrund von einer nicht ausreichenden Expansion von T-Zellen in Panserin 413TM konnten am Tag 28 keine Zellen von zwei Spendern untersucht werden. Für X-Vivo15TM konnten am Tag 14 nur Zellen von zwei Spendern und am Tag 28 nur von drei Spendern untersucht werden. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden Veränderungen von weniger als 2-facher Änderung in der TRBV Expression als vernachlässigbar/unerheblich betrachtet. Unter diesen Kriterien behielten nur *in vitro* Kulturen mit FC in HS-RPMI das initiale TRBV Repertoire bei (Abbildung 33a). Mit der Ausnahme von TRBV27, welches an Tag 28 6,1-fach erhöht war, hat auch FBS-RPMI eine TRBV-Zusammensetzung ähnlich der von Tag 0 gezeigt (Abbildung 33b). Zusätzlich zu der schlechteren Kapazität T-Zellen zu expandieren, eignen sich T-Zellen, die in Lymphozyten-spezifischen serumfreien Medien expandiert wurden, Veränderungen im TRBV Repertoire während der Kultivierung von 28 Tagen an. Insbesondere bei Panserin 413TM Kulturen sind die Expressionen von TRBV9 (3,3-fach), TRBV10 (3,3-fach), TRBV24 (17,7-fach) und TRBV30 (2,6-fach) am Tag 28 verändert (Abbildung 33c). Bei in X-Vivo15TM expandierten Zellen kommt es zu Veränderungen der Expression an Tag 14 von TRBV13 (2,2-fach) und TRBV16 (7,3-fach) und an Tag 28 von TRBV25 (4,4-fach) und TRBV27 (2,1-fach) (Abbildung 33d).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das TRBV-Repertoire in HS-RPMI und FBS-RPMI überwiegend stabil bleibt, auch nach Expansion der T-Zellen über einen Zeitraum von 28 Tagen. Diese Methode kann zukünftig für die Expansion von T-Zellen aus Endomyolardbiopsien und anderen Geweben genutzt werden. Die Austestung der Expansion von T-Zellen aus EMBs war aber nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Ergebnisse

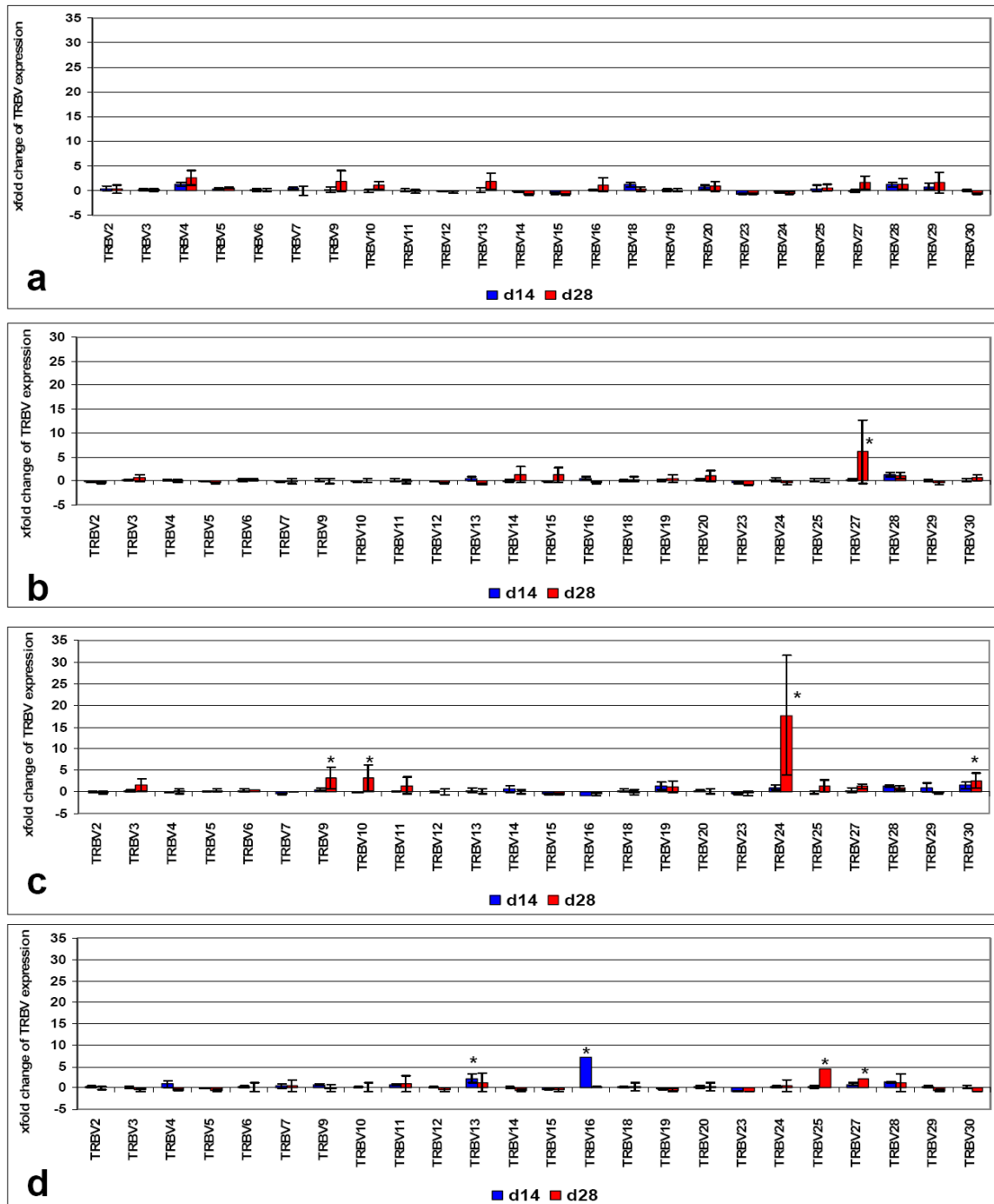


Abb. 33: Vergleich der TRBV Expression in vier verschiedenen Zellkulturmedien. CD3⁺ T-Zellen wurden in HS-RPMI, FBS-RPMI, Panserin 413™ und X-Vivo15™ kultiviert wie in Abbildung 36. Nach 14 und 28 Tagen wurde die TRBV Expression durch real-time RT-PCR in Bezug auf TRBC bestimmt. Veränderungen der TRBV Expression der *in vitro* Kulturen im Vergleich zu unkultivierten CD3⁺ Zellfraktionen wurden bestimmt. Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM dar. * gibt die > zweifache Änderung der TRBV Expression im Vergleich zur initialen TRBV Expression von peripherem Blut wieder. (a) HS-RPMI, (b) FBS-RPMI, (c) Panserin 413™, (d) X-Vivo15™.

3.3 Analyse der Expression der funktionellen T-Zellmarker (FTZM) und des T-Zellrezeptor Vbeta (TRBV) in EMBs

In diesem Teil der Arbeit soll überprüft werden, ob die zuvor beschriebene Methode der T-PreAmp auch ohne vorherige Anreicherung der T-Zellen aus Endomyokardbiopsien angewendet werden kann und ob dabei sogar krankheitsspezifische T-Zell-Profile ausfindig gemacht werden können.

3.3.1 Ergebnisse der immunhistologischen und virologischen EMB Diagnostik

Endomyokardbiopsien von Kontrollpatienten waren negativ für immunhistologisch detektierbare DCMi und ebenfalls für kardiotope virale Genome. Eine DCMi wurde zu beträchtlichen Anteilen in AMC (72%) und DCM-Patienten (56%) nachgewiesen. Jeweils 28% der EMBs von AMC-Patienten und 20% der DCM-Patienten waren negativ für virale Genome. Der am meisten nachgewiesene Virus war B19V, gefolgt von HHV6 und EV in Übereinstimmung mit früheren Publikationen. Die detaillierten Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tab. 8: Ergebnisse der immunhistologischen und virologischen EMB Routine-Diagnostik in Kontrollen, AMC und DCM-Patienten

Parameter	Kontrollen	AMC	DCM
DCMi (Immunhistologie)	n=0 / 0% *	n=42 / 72,4%	n=19 / 55,9%
Virus negativ	n=19 / 100% *	n=16 / 27,6%	n=7 / 20,1%
B19V	n=0 / 0 % *	n=31 / 53,5%	n=18 / 52,9%
HHV6	n=0 / 0 % *	n=6 / 10,3% *	n=7 / 20,6%
CBV	n=0 / 0% *	n=5 / 8,6%	n=2 / 5,9%

Die Werte sind in Fallzahlen / Prozent angegeben. Signifikant unterschiedliche Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit einem Sternchen * markiert.

3.3.2 Genexpression von CD3d, CD3z und TRBC

EMBs von AMC- und DCM-Patienten weisen eine signifikant erhöhte Genexpression von CD3d, CD3z und TRBC im Vergleich zu EMBs von Kontrollpatienten auf. Die Expressionen wurden auf HPRT als *housekeeping* Gen normalisiert. Als Schwellenwert/Grenzwert für eine signifikant erhöhte Genexpression dient die obere 90% Perzentile der Datenverteilung der Kontrollgruppe. In Tabelle 9 sind diese Ergebnisse dargestellt.

Tab. 9: Expression von CD3d, CD3z und TRBC in Kontrollen und AMC-/DCM-Patienten

T-Zell Genexpression bezogen auf das jeweilige housekeeping Gen	Kontrollen	AMC/DCM	p Wert	obere 90% Perzentile bei den Kontrollen
E CD3d/HPRT	0,017241 (0,01195 - 0,022482)	0,035365 (0,01957 - 0,055977)	0,0184	0,039994
E CD3z/HPRT	0,028806 (0,023519 - 0,042174)	0,047822 (0,034976 - 0,064901)	0,0229	0,047366
E TRBC/HPRT	0,020543 (0,015208 - 0,027374)	0,039182 (0,026491 - 0,068603)	0,027	0,044435

Die Zielgenexpression wurde auf HPRT normalisiert. Die Werte sind als Median und 25-75 Perzentil-Bereiche in Klammern angegeben. In Spalte 3 sind die entsprechenden p-Werte dargestellt. In Spalte 4 sind die 90% Perzentil-Werte der Verteilung in der Kontrollgruppe aufgelistet. Diese wurden als Grenzwert für eine signifikant erhöhte Genexpression in EMBs von AMC/DCM-Patienten verwendet.

3.3.3 Immunhistologisch nachgewiesene DCMi und erhöhte Expression von CD3d, CD3z und TRBC

Der Vergleich von immunhistologisch nachgewiesener DCMi und signifikant erhöhten Expressionen von CD3d, CD3z und TRBC normalisiert auf HPRT zeigte signifikante Korrelationen auf. Die korrespondierenden statistischen Kenngrößen variierten für die entsprechenden Vergleiche mit p-Werten von 0,0013 bis $< 0,0001$, Sensitivitäten von 49,2% bis 74,5%, Spezifitäten von 76% bis 92%, positiven Vorhersagewerten von 73,3% bis 92% und negativen Vorhersagewerten von 57,6% bis 75,4%. Eine genaue Auflistung der statistischen Werte der entsprechenden Vergleiche dieser diagnostischen Vorangehensweise ist in Tabelle 10 zu ersehen.

Die Parameter der statistischen Vergleiche zwischen der immunhistologisch nachgewiesenen DCMi und der CD3d, CD3z und TRBC Expression beinhalten den Pearson χ^2 Koeffizienten, den p-Wert, Sensitivität (Se), Spezifität (Sp), positive Vorhersagewerte (PPV) und negative Vorhersagewerte (NPV).

Tab. 10: Statistischer Vergleich der immunhistologisch nachgewiesenen DCMi und erhöhten Expression von CD3d, CD3z und TRBC

	DCMi (Immunhistologie)
E CD3d/HPRT $>0,032573$	Pearson χ^2 : 50,4 p Wert: $<0,0001$ Sensitivität: 75,4% Spezifität: 92% PPV: 92% NPV: 75,4%
E CD3z/HPRT $>0,047366$	Pearson χ^2 : 15,0 p Wert: 0,0001 Sensitivität: 60,7% Spezifität: 76% PPV: 75,5% NPV: 61,3%
E TRBC/HPRT $>0,044435$	Pearson χ^2 : 13,5 p Wert: 0,0002 Sensitivität: 54,1% Spezifität: 80% PPV: 76,7% NPV: 58,8%

Ergebnisse

In multiplen paarweisen Korrelationen (Tabelle 11) zeigten die Expressionen von CD3d, CD3z und TRBC (normalisiert auf HPRT oder CDKN1B) hohe Assoziationen mit p Werten von $\leq 0,0001$ und Spearman ρ Koeffizienten von 0,48 bis 0,93. Die höchsten Assoziationen wurden in Vergleichen von bestimmten T-Zellgenexpressionen gefunden und schienen schwächer zu werden, wenn unterschiedliche T-Zellgene gemeinsam untersucht wurden.

Tab. 11: Multiple paarweise Korrelationen zwischen der CD3d, CD3z und TRBC-Expressionen (normalisiert auf HPRT oder CDKN1B) und immunhistologisch quantifizierten CD3⁺ Infiltraten in EMBs.

Variable	by Variable	Spearman ρ	Prob> ρ	Plot
E CD3d/CDKN1B	E CD3d/HPRT	0,9276	<,0001	
E CD3z/HPRT	E CD3d/HPRT	0,6593	<,0001	
E CD3z/HPRT	E CD3d/CDKN1B	0,6498	<,0001	
E CD3z/CDKN1B	E CD3d/HPRT	0,5833	<,0001	
E CD3z/CDKN1B	E CD3d/CDKN1B	0,6863	<,0001	
E CD3z/CDKN1B	E CD3z/HPRT	0,8659	<,0001	
E TRBC/HPRT	E CD3d/HPRT	0,7165	<,0001	
E TRBC/HPRT	E CD3d/CDKN1B	0,6343	<,0001	
E TRBC/HPRT	E CD3z/HPRT	0,4794	<,0001	
E TRBC/HPRT	E CD3z/CDKN1B	0,3590	0,0001	
E TRBC/CDKN1B	E CD3d/HPRT	0,6605	<,0001	
E TRBC/CDKN1B	E CD3d/CDKN1B	0,7424	<,0001	
E TRBC/CDKN1B	E CD3z/HPRT	0,4858	<,0001	
E TRBC/CDKN1B	E CD3z/CDKN1B	0,5000	<,0001	
E TRBC/CDKN1B	E TRBC/HPRT	0,8871	<,0001	
CD3/mm ²	E CD3d/HPRT	0,5016	<,0001	
CD3/mm ²	E CD3d/CDKN1B	0,4664	<,0001	
CD3/mm ²	E CD3z/HPRT	0,3253	0,0005	
CD3/mm ²	E CD3z/CDKN1B	0,2202	0,0202	
CD3/mm ²	E TRBC/HPRT	0,4185	<,0001	
CD3/mm ²	E TRBC/CDKN1B	0,3877	<,0001	

Die dritte Spalte zeigt die Spearman ρ Korrelations-Koeffizienten, die auch durch die horizontalen Balken dargestellt sind. Die dazugehörigen p-Werte sind in der 4. Spalte aufgelistet. E: Zielgenexpression (normalisiert auf HPRT oder CDKN1B).

3.3.4 Expression von funktionellen T-Zellmarker (FTZM) in EMBs

EMBs von AMC- und DCM-Patienten mit einer Expression $E_{CD3d/HPRT} > 0,039994$ weisen eine signifikant erhöhte Expression von CD3z, TRBC und Eomesodermin im Vergleich zu den restlichen AMC- und DCM-Patienten und den Kontrollen auf. In der Gruppe der DCM-Patienten mit einer $E_{CD3d/HPRT} > 0,039994$ gab es signifikant erhöhte FTZM Expressionen für IFN γ , Tbet, IL-27, FoxP3, TGF β , Perforin, Granulysin, Granzyme A und IL-4 im Vergleich zu den Kontrollen, den restlichen DCM-Patienten und allen AMC-Patienten, zuzüglich derer mit $E_{CD3d/HPRT} > 0,039994$. Die Daten sind in Tabelle 12 ausführlich dargestellt. Die Vergleiche der Genexpressionen in Bezug auf CDKN1B als alternatives *housekeeping* Gen zeigen die gleichen Ergebnisse. Da IL-17 durch die T-PreAmp real-time RT-PCR nur in 3 EMBs von AMC- und einer EMB von DCM-Patienten nachgewiesen wurde, ist für dieses Gen keine statistische Analyse durchgeführt worden.

Ergebnisse

Tab. 12: FTZM Expression in Kontrollen, AMC- und DCM-Patienten

Gen	Kontrollen	AMC		DCM	
		ECD3d/HPRT ≤ 0,039994	ECD3d/HPRT > 0,039994	ECD3d/HPRT ≤ 0,039994	ECD3d/HPRT > 0,039994
CD3d	0,017241 (0,01195 – 0,022482)	0,015624 (0,009558 – 0,022692)	0,050362 * (0,044593 – 0,080565)	0,019745 (0,011538 – 0,030041)	0,060909 * (0,037868 – 0,147517)
CD3z	0,028806 (0,023519 – 0,042174)	0,036225 (0,030524 – 0,043113)	0,052647 * (0,046714 – 0,070963)	0,038075 (0,027682 – 0,053106)	0,065041 * (0,042586 – 0,084657)
TRBC	0,020543 (0,015208 – 0,027374)	0,029479 (0,018943 – 0,037078)	0,057636 * (0,034176 – 0,083597)	0,03197 (0,023881 – 0,049869)	0,070189 * (0,039541 – 0,193903)
IFNγ	0,000089 (0,000030 – 0,000278)	0,000116 (0,000064 – 0,000257)	0,000219 (0,000116 – 0,000385)	0,000088 (0,000051 – 0,000209)	0,000269 * (0,000183 – 0,00064)
T-bet	0,010972 (0,006056 – 0,016863)	0,012632 (0,005922 – 0,01939)	0,018707 (0,012792 – 0,02545)	0,014378 (0,007747 – 0,021309)	0,023972 * (0,016291 – 0,046813)
IL-27	0,001439 (0,000876 – 0,00397)	0,001231 (0,000832 – 0,001968)	0,002491 (0,001387 – 0,005546)	0,001238 (0,000973 – 0,001818)	0,00319 * (0,00129 – 0,016435)
GATA3	0,032129 (0,021381 – 0,049549)	0,036241 (0,028971 – 0,058614)	0,040247 (0,031686 – 0,046156)	0,032464 (0,02409 – 0,041181)	0,045912 (0,035428 – 0,078908)
FoxP3	0,003696 (0,002915 – 0,004979)	0,00414 (0,00262 – 0,004753)	0,004313 (0,002934 – 0,00556)	0,002976 (0,00213 – 0,005701)	0,008046 * (0,005542 – 0,014109)
TGFβ	1,394744 (1,248331 – 2,066945)	1,440919 (1,142788 – 1,780641)	1,486279 (1,236013 – 2,311396)	1,428994 (1,133129 – 1,674599)	2,386671 * (1,413375 – 5,1479)
IL-10	0,001112 (0,000478 – 0,001492)	0,000587 (0,000365 – 0,000866)	0,000715 (0,00054 – 0,001586)	0,000531 (0,000317 – 0,000815)	0,000905 (0,0005 – 0,005131)
GRAIL	0,001657 (0,000393 – 0,002182)	0,000728 (0,000501 – 0,001313)	0,001807 (0,000754 – 0,003104)	0,001069 (0,00065 – 0,002572)	0,001346 (0,000736 – 0,002141)
Perforin	0,132816 (0,076947 – 0,218393)	0,103681 (0,071026 – 0,145478)	0,153362 (0,111311 – 0,213232)	0,118257 (0,079937 – 0,161826)	0,231647 * (0,155939 – 0,407544)
Granulysin	0,34151 (0,226215 – 0,415848)	0,363345 (0,196849 – 0,525413)	0,535916 (0,373409 – 0,647673)	0,301481 (0,180528 – 0,591494)	0,588453 * (0,464902 – 1,028114)
Granzyme A	0,015145 (0,006801 – 0,02836)	0,017443 (0,012842 – 0,028647)	0,03568 (0,02354 – 0,041958)	0,013888 (0,0099 – 0,019984)	0,062068 * (0,022799 – 0,076536)
IL-5	0,000029 (0,000008 – 0,000049)	0,000042 (0,000014 – 0,000069)	0,000051 (0,000026 – 0,000096)	0,000022 (0,000016 – 0,000078)	0,00007 (0,00004 – 0,000143)
Eomesodermin	0,014753 (0,008596 – 0,022635)	0,012635 (0,010902 – 0,017125)	0,030637 * (0,024241 – 0,038204)	0,015685 (0,00878 – 0,017613)	0,029878 * (0,019866 – 0,038148)
IL-4	0,00005 (0,000028 – 0,000335)	0,000141 (0,000032 – 0,000189)	0,00019 (0,000076 – 0,000427)	0,000083 (0,00002 – 0,000192)	0,00026 * (0,000081 – 0,001658)

Die Werte der Genexpression normalisiert auf HPRT sind als Median und in Klammern als 25-75 Perzentil-Bereich dargestellt. Die AMC- und DCM-Patienten sind durch den CD3d/HPRT Expressionsgrenzwert der Kontrollen unterteilt. Signifikant erhöhte Werte im Vergleich mit der restlichen Patientengruppe ermittelt durch eine Tukey-Kramer posthoc Analyse sind mit einem Sternchen * und Rot markiert.

3.3.5 TRBV Expression in EMBs

Nachdem die Gruppen hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Expression der funktionellen T-Zellmarker untersucht wurden, war auch die Expression der verschiedenen TRBV-Ketten von entscheidender Wichtigkeit. In der DCM-Patientengruppe mit B19V Genomen und einer erhöhten TRBC-Expression ($>0,044435$) konnte im Vergleich zu den restlichen Patientengruppen eine signifikant erhöhte Expression von TRBV11 (6,5-fach) und TRBV24 (30,3-fach) beobachtet werden (Tabelle 13). EMBs von AMC-/DCM-Patienten mit HHV6 Genomen und einer erhöhten TRBC-Expression hingegen wiesen eine signifikant verstärkte Expression von TRBV4 (7,4-fach), 10 (106,1-fach) und 28 (15,1-fach) auf. In EMBs von AMC-/DCM-Patienten mit CVB Genomen zeigte sich eine signifikante TRBV14 Expression (3,5-fach). Aufgrund der geringen Anzahl an zugänglichen CVB-Patienten, was sich auf die substantiell abnehmende epidemiologische Rolle von CVB in EMBs in der letzten Dekade (26) zurückführen lässt, ist eine umfassende statistische Analyse differenziert durch den TRBC Grenzwert in dieser Subanalyse nicht möglich.

Ergebnisse

Tab. 13: TRBV-Expression in Kontrollen, AMC- und DCM-Patienten bezogen auf virale Genome und erhöhte TRBC-Expression

TRBV	Kontrolle	AMC/DCM Virus(-)	AMC/DCM B19V(+) TRBC(-)	AMC B19V(+) TRBC(+)	DCM B19V(+) TRBC(+)	AMC/DCM HHV6(+) TRBC(-)	AMC/DCM HHV6(+) TRBC(+)	AMC/DCM CVB(+)
2	0,001928 (0,000794 - - 0,003396)	0,002097 (0,000411 - 0,007338)	0,002029 (0,000961 - 0,003278)	0,001474 (0,000696 - 0,003686)	0,003187 (0,001076 - 0,013774)	0,001469 (0,001175 - 0,001645)	0,005071 (0,00342 - 0,009766)	0,003567 (0,003176 - 0,004011)
3	0,001702 (0,000892 - 0,002603)	0,004131 (0,00153 - 0,008266)	0,00197 (0,001 - 0,002691)	0,001743 (0,000463 - 0,00369)	0,003026 (0,001946 - 0,011315)	0,001639 (0,001109 - 0,002442)	0,005284 (0,002905 - 0,009192)	0,003277 (0,00089 - 0,004666)
4	0,001661 (0,000875 - 0,002763)	0,002038 (0,001213 - 0,007388)	0,001726 (0,001125 - 0,00321)	0,002456 (0,000804 - 0,004217)	0,003409 (0,002191 - 0,014059)	0,001056 (0,000313 - 0,004406)	0,012246 * (0,005318 - 0,062402)	0,002592 (0,001447 - 0,003799)
5	0,002115 (0,001205 - 0,004584)	0,003192 (0,00142 - 0,004154)	0,002511 (0,001383 - 0,003681)	0,00168 (0,00064 - 0,004305)	0,004478 (0,001946 - 0,022951)	0,001661 (0,000996 - 0,003046)	0,008131 (0,00121 - 0,010478)	0,002758 (0,001719 - 0,004714)
6	0,002054 (0,001363 - 0,003954)	0,00421 (0,002236 - 0,007072)	0,00278 (0,001346 - 0,005981)	0,003161 (0,001155 - 0,004689)	0,002978 (0,002297 - 0,012317)	0,003311 (0,001321 - 0,00577)	0,003004 (0,001728 - 0,017256)	0,003982 (0,000504 - 0,004283)
7	0,000147 (0,000027 - 0,00023)	0,000079 (0,000016 - 0,000202)	0,000155 (0,000025 - 0,000235)	0,000223 (0,000044 - 0,000413)	0,0000004 (0,0000001 - -0,000098)	0,000102 (0,000062 - 0,000524)	0,000092 (0,0000015 - -0,000198)	0,000169 (0,0000008 - -0,000324)
9	0,000957 (0,000586 - 0,003787)	0,001302 (0,000498 - 0,003309)	0,001311 (0,000538 - 0,001885)	0,001323 (0,000373 - 0,003814)	0,00317 (0,001689 - 0,010296)	0,00119 (0,000314 - 0,002382)	0,001461 (0,000911 - 0,018005)	0,002127 (0,001289 - 0,004514)
10	0,000188 (0,000025 - 0,000863)	0,000192 (0,000093 - 0,000828)	0,000197 (0,000114 - 0,000432)	0,00021 (0,000018 - 0,000766)	0,000392 (0,000047 - 0,001019)	0,000084 (0,000091 - 0,000473)	0,001994 * (0,000823 - 0,010177)	0,0000003 (0,0000000 7 - 0,000329)
11	0,001217 (0,000839 - 0,00183)	0,001538 (0,000809 - 0,002703)	0,001461 (0,001014 - 0,002516)	0,001872 (0,001146 - 0,00444)	0,007912 * (0,004443 - 0,015331)	0,000848 (0,000408 - 0,001838)	0,001059 (0,000514 - 0,00555)	0,001231 (0,000505 - 0,002154)
12	0,004933 (0,002466 - 0,010535)	0,008902 (0,004167 - 0,017574)	0,005398 (0,00309 - 0,008327)	0,006346 (0,001493 - 0,013046)	0,009535 (0,007464 - 0,033526)	0,002827 (0,00248 - 0,014059)	0,023166 (0,003952 - 0,036162)	0,006783 (0,002232 - 0,012996)
13	0,000247 (0,000164 - 0,001152)	0,000509 (0,000176 - 0,003656)	0,000248 (0,000112 - 0,000679)	0,00051 (0,000132 - 0,000836)	0,001725 (0,000835 - 0,002528)	0,000454 (0,000257 - 0,000487)	0,000453 (0,000221 - 0,001912)	0,000641 (0,000401 - 0,001431)
14	0,000214 (0,000027 - 0,000518)	0,000185 (0,0000018 - -0,000364)	0,000259 (0,0000016 - -0,000644)	0,00015 (0,000054 - 0,000293)	0,000015 (0,0000001 8 - 0,000236)	0,000373 (0,000235 - 0,000554)	0,000017 (0,0000001 6 - 0,000246)	0,000755 * (0,000254 - 0,002344)

Ergebnisse

(Fortsetzung Tabelle 13)

TRBV	Kontrolle	AMC/DCM Virus(-)	AMC/DCM B19V(+) TRBC(-)	AMC B19V(+) TRBC(+)	DCM B19V(+) TRBC(+)	AMC/DCM HHV6(+) TRBC(-)	AMC/DCM HHV6(+) TRBC(+)	AMC/DCM CVB(+)
15	0,000177 (0,000078 - 0,000709)	0,0005 (0,000199 - 0,000815)	0,000272 (0,000154 - 0,000661)	0,00052 (0,000037 - 0,000768)	0,000557 (0,000263 - 0,002645)	0,000215 (0,00012 - 0,000849)	0,000662 (0,000021 - 0,002467)	0,000511 (0,00038 - 0,000591)
16	0,00001573 (0,00000009 - 0,00008746)	0,00000178 (0,0000001 - 0,00008338)	0,00000021 (0,00000009 - 0,00006856)	0,00004881 (0,00000041 - 0,000397)	0,00000562 (0,00000006 - 0,000713)	0,00000341 (0,00000017 - 0,00007738)	0,00000003 (0,00000014 - 0,00008989)	0,00000002 (0,00000011 - 0,000134)
18	0,000961 (0,000615 - 0,001887)	0,001457 (0,000649 - 0,00369)	0,001211 (0,000701 - 0,0022)	0,00197 (0,000688 - 0,004106)	0,002763 (0,001155 - 0,006906)	0,001061 (0,000483 - 0,001623)	0,002851 (0,000124 - 0,015036)	0,001143 (0,000717 - 0,001955)
19	0,003543 (0,002423 - 0,007869)	0,003563 (0,002019 - 0,007799)	0,003095 (0,001518 - 0,005414)	0,003255 (0,001523 - 0,010944)	0,006923 (0,003031 - 0,029505)	0,002665 (0,001181 - 0,008026)	0,00995 (0,006445 - 0,021179)	0,004304 (0,003241 - 0,008502)
20	0,004208 (0,001933 - 0,012115)	0,006322 (0,003779 - 0,017081)	0,005624 (0,002766 - 0,011362)	0,004631 (0,002396 - 0,006937)	0,00589 (0,003357 - 0,026459)	0,004483 (0,001985 - 0,017753)	0,012029 (0,007148 - 0,032404)	0,006006 (0,004106 - 0,009773)
23	0,000691 (0,000281 - 0,001176)	0,000652 (0,000325 - 0,001664)	0,000631 (0,0002 - 0,001189)	0,001166 (0,00011 - 0,002737)	0,001432 (0,000656 - 0,004855)	0,000408 (0,000183 - 0,001445)	0,002122 (0,000799 - 0,0079)	0,000856 (0,000262 - 0,001805)
24	0,000391 (0,000146 - 0,001377)	0,000331 (0,000134 - 0,001104)	0,000521 (0,000183 - 0,001612)	0,000746 (0,000227 - 0,001463)	0,011833 * (0,003646 - 0,03062)	0,000745 (0,00021 - 0,001513)	0,000548 (0,000408 - 0,000922)	0,000371 (0,000061 - 0,000503)
25	0,000294 (0,000063 - 0,000393)	0,000396 (0,000109 - 0,001)	0,000409 (0,000242 - 0,000853)	0,000512 (0,000161 - 0,000995)	0,000657 (0,00019 - 0,004788)	0,000551 (0,000197 - 0,002109)	0,001034 (0,000214 - 0,002468)	0,000859 (0,000179 - 0,001109)
27	0,000215 (0,000145 - 0,000471)	0,000275 (0,000112 - 0,000692)	0,000272 (0,000124 - 0,000517)	0,000323 (0,0000593 - 0,000732)	0,000224 (0,000141 - 0,001455)	0,000345 (0,0000276 - 0,001008)	0,000241 (0,00000008 - 0,006234)	0,000564 (0,000153 - 0,000729)
28	0,001951 (0,000531 - 0,004149)	0,004128 (0,000762 - 0,011122)	0,002582 (0,001193 - 0,005631)	0,004787 (0,002037 - 0,009298)	0,008639 (0,002261 - 0,012516)	0,006637 (0,00000017 - 0,009054)	0,029549 * (0,007539 - 0,079442)	0,001584 (0,000052 - 0,005727)
29	0,001282 (0,000647 - 0,003322)	0,001638 (0,001109 - 0,004959)	0,001265 (0,000511 - 0,002276)	0,001385 (0,000394 - 0,002814)	0,002661 (0,000877 - 0,017445)	0,001355 (0,000478 - 0,003729)	0,005087 (0,001624 - 0,015303)	0,00192 (0,00132 - 0,002643)
30	0,000506 (0,0000477 - 0,001424)	0,001147 (0,000312 - 0,002614)	0,001287 (0,000562 - 0,002035)	0,000793 (0,000346 - 0,003912)	0,001759 (0,000905 - 0,008802)	0,000555 (0,000407 - 0,000751)	0,00442 (0,000615 - 0,004721)	0,001396 (0,000356 - 0,002237)

Die Werte der TRBV-Expression normalisiert auf HPRT sind als Median und in Klammern als 25-75 Perzentil-Bereich dargestellt. Die AMC- und DCM-Patienten sind durch die nPCR nachgewiesenen viralen Genome und den TRBC/HPRT Expressionsgrenzwert der Kontrollen unterteilt. Signifikant erhöhte Werte im Vergleich mit den restlichen Patientengruppen ermittelt durch eine Tukey-Kramer posthoc Analyse sind mit einem Sternchen * und Rot markiert.

3.4 TRBV-Dominanz und funktionelle Charakterisierung von B19V-NS1-antigen-spezifischen T-Zellen bei einem Patienten mit akuter B19V assoziierter inflammatorischer Kardiomyopathie und initialer B19V Virämie

Nachdem an Endomyokardbiopsien von AMC bzw. DCM-Patienten erste differentielle TRBV-Expressionen gezeigt werden konnten, wurden anhand eines hochtitrigen B19V positiven Patienten antigen-spezifische T-Zellen mittels des selbst entwickelten TRBV-Primer/Sondensystems untersucht.

Nach seiner ersten Beschreibung, wurde Parvovirus B19 (B19V) mit vielen humanen Krankheiten wie Erythema infectiosum, Hydrops fetalis, Anämie, aplastischer Krise, Arthritis und Vasculitis in Verbindung gebracht. Parvovirus B19 besitzt ein einzelsträngiges DNA-Genom, welches im Zellkern der infizierten Wirtszelle repliziert wird. Das ikosaeder-förmige Kapsid von B19V besteht aus zwei Strukturproteinen VP1 (83 kDa) und VP2 (58 kDa), welche durch das gleiche *open reading frame* (ORF) kodiert sind. VP1 unterscheidet sich von VP2 nur durch ein zusätzliches n-terminales Fragment. Das nicht-Struktur Protein 1 (NS1) wird für die Virusreplikation und Übertragung in die Wirtszelle benötigt. B19V ist der am häufigsten nachgewiesene Virus in EMBs von Patienten mit akuter Myokarditis (AMC), dilatativer Kardiomyopathie (DCM) oder inflammatorischer Kardiomyopathie (DCMi).

Trotz der entscheidenden Bedeutung von T-Zellen in der antiviralen Abwehr ist nur sehr wenig über B19V spezifische T-Zellen bekannt. In anderen Krankheiten wurden antigen-spezifische T-Zellen über Peptidpools und intrazelluläre INF γ -Sekretion identifiziert.

In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal Hinweise für antigen-spezifische T-Zellen in einem Patienten mit bewiesener DCMi und außergewöhnlich hoher B19V Viruslast bei der initialen Vorstellung erbracht werden. Dafür wurden die TRBV Expression und die Expressionsprofile von Th1, Th2 T-Zellen, und Markergene, die CTL, Treg und anerge T-Zellen charakterisieren, bestimmt.

Patientenbeschreibung

Ein zuvor gesunder 44 jähriger Mann wurde mit fortschreitendem Herzversagen nach vorhergehender Infektion der Atemwege mit Fieber bis 39°C eingewiesen. Es gab keine erhöhten biochemischen Marker für eine myokardiale Ischämie. Koronare Gefäßerkrankungen wurden durch koronare Angiographie ausgeschlossen. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) bestimmt durch Echokardiographie nach modifizierter Simpson-Methode betrug 45%.

Ergebnisse

Diese klinische Präsentation ist übereinstimmend mit der klinischen Verdachtsdiagnose einer akuten Myokarditis. Der Patient wurde mit Herzinsuffizienz-Medikamenten (Carvedilol, Ramipril und Diuretika) behandelt. Im weiteren Verlauf kam es zu einem graduellen Anstieg bis zuletzt nahezu Normalisierung der LVEF und einer Abnahme der LVEDD (Tabelle 14).

Tab. 14: Verlauf der klinischen Parameter, EMBs und serologischen Ergebnissen

	Initiale Präsentation	6 Monate	12 Monate
LVEF (%)	45	54	70
LVEDD (mm)	64	56	54
EMBs - B19V nPCR /	positiv	positiv	positiv
EMBs - B19V qPCR	115091	23846	1026
PBMCs - B19V nPCR /	positiv	negativ	negativ
PBMCs - B19V qPCR	184000		
Serum - B19V nPCR /	positiv	negativ	negativ
Serum - B19V qPCR	57468		
B19V IgG titer (ELISA)	146	143,6	141,7
B19V IgG fractions (recomLine® blot)	VP-2p; VP-N; VP-1S; VP-2r; VP-C	VP-2p; VP-N; VP-1S; VP-2r; VP-C; NS1	VP-2p; VP-N; VP-1S; VP-2r; VP-C; NS1
B19V IgM titer (ELISA)	115,7	negativ	negativ
B19V IgM fractions (recomLine® blot)	VP-2p; VP-N; VP-1S; VP-2r; VP-C	negativ	negativ
CD3/mm ²	16	7,5	3,6
LFA-1/mm ²	36,4	12,2	7,4
CD45R0/mm ²	19	10,1	5,5
Mac-1/mm ²	36,8	14,8	13,3
HLA class I AF (%)	10,4	7,4	5,1
ICAM-1 AF (%)	4,1	2,7	1,1

Entwicklung der echokardiographischen Parameter (LVEF, LVEDD: LV enddiastolischer Durchmesser), der B19V Quantifizierungsergebnisse in EMBs und PBMCs (virale Kopien/ μ g Nukleinsäuren in EMBs und virale Kopien/ml Serum) und der DIA quantifizierten, immunhistologisch markierten Infiltrate und CAMs Expression der EMBs. AF: fraction of area in Prozent (DIA ermittelte Wert der CAMs Expression). Normale Werte für DIA quantifizierte Infiltrate und CAMs Expression in EMBs CD3: <7/mm², LFA-1: <9/mm², CD45R0: <7/mm², Mac-1: <35/mm², HLA class I: <5,5%, ICAM-1: <1,2%.

3.4.1 Immunhistologischer Verlauf der DCMi

Die histologischen Analysen der EMBs zeigten zu keinem Zeitpunkt Hinweise einer akuten Myokarditis hinsichtlich der Dallas-Kriterien (Abbildung 34a, b, c). Mit der Quantifizierung der immunhistologisch gefärbten EMBs durch digitale Bildanalyse konnten jedoch eine erhöhte Infiltratmenge und erhöhte Expressionen von Zelladhäsionsproteinen (CAMs) übereinstimmend mit einer DCMi nachgewiesen werden (Tabelle 14, Abbildung 34d, g). Nested PCR (nPCR) Analysen auf kardiotope Vireng Genome zeigten positive B19V Ergebnisse in EMBs, PBMCs und Serum.

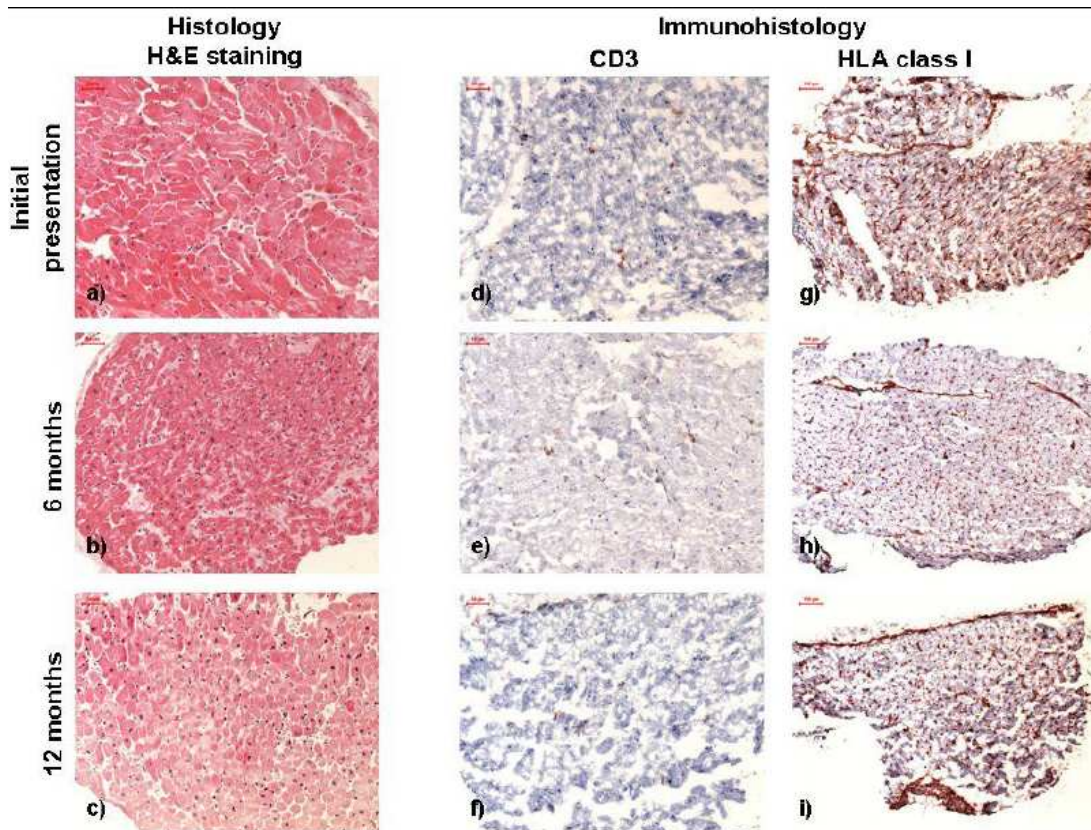


Abb. 34: Histologische (a, b, c) und immunhistologische (d-i) Färbung (CD3: d-f, HLA Klassel Expression: g-i) der Biopsien zum Zeitpunkt der initialen Präsentation und der Folgeuntersuchungen nach 6 und 12 Monaten. Die histologischen Analysen zeigen zu keinem Zeitpunkt eine aktive oder grenzwertige Myokarditis. Die initial erhöhte CD3⁺ T-Zellanzahl und HLA Expression nimmt bei den Folgebiopsien ab.

Ergebnisse

Die quantitative PCR (qPCR) zeigte bei der initialen Untersuchung eine ungewöhnlich hohe B19V Viruslast von 115.091 Kopien/ μ g Nukleinsäuren in EMBs und 184.000 Kopien in PBMCs. Die Viruslast im Serum wurde mit 57.468 Kopien/ml bestimmt. Die B19V qPCR von EMBs nach 6 und 12 Monaten nach der initialen Präsentation zeigte im Verlauf deutlich abnehmende B19V Viruslasten in EMBs (23.846 und 1026 Viruskopien/ μ g Nukleinsäure). In PBMCs und Serum konnte B19V bei den Folgeuntersuchungen nicht mehr durch nPCR nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden begleitet von einer Abnahme der Infiltration und der CAMs-Expression in den Folgebiopsien, bis hin zur Normalisierung der Werte am 3. Zeitpunkt (Tabelle 14, Abbildung 34e, f, h, i). B19V IgM waren zum initialen Zeitpunkt durch ELISA und recomLine® blot Analysen, aber nicht mehr zu den Folgeuntersuchungen, nachweisbar. Der B19V IgG Titer blieb zu den drei Zeitpunkten überwiegend stabil (Tabelle 14). Jedoch zeigten recomLine® blot Analysen das Vorhandensein von NS1 spezifischen Antikörpern 6 und 12 Monate nach der Erstpräsentation, was auf eine persistierende Infektion hinweist.

Ex vivo Analysen der zellulären Immunantwort wurden 10 und 12 Monate nach der Erstpräsentation durchgeführt. Dafür wurden Peptidbibliotheken, die das gesamte B19V Genom abdecken eingesetzt. Starke CD8+ T-Zellantworten auf wenigstens zwei B19V abgeleitete Peptide wurden zu beiden Zeitpunkten mit starken Antworten (19,7%) am 10 Monatszeitpunkt (Abbildung 35) detektiert. Zum späteren Zeitpunkt reagierten noch 10% der CD8+ T-Zellen mit IFN γ Sekretion auf die Stimulation mit den 10 Aminosäure Peptiden SALKLAIYKA257-266 (SALK) und QSALKLAIYK256-265 (QSAL). Eine dritte 13 AS lange Peptidsequenz IQSALKLAIYKAT255-267 (IQSA), welche die beiden anderen Peptide beinhaltet, aktivierte 14,6% der CD8+ T-Zellen. Ähnliche Frequenzen wurden auch mit der TNF α Sekretion als *read out* (statt IFN γ ; Abbildung 35) erhalten. Der Sequenzshift von IQSA zu QSAL und SALK beträgt nur je eine AS und lässt vermuten, dass alle das gesamte oder Teile des gleichen Epitops enthalten. Für jedes dieser Peptide konnte eine kleine aber deutliche CD4+ T-Zellantwort (0,02 bis 0,04% aller CD4+ T-Zellen) gemessen werden (Abbildung 35). Zwei zusätzliche 10 AS Peptide erzeugten ebenfalls CD8+ T-Zellantworten. Das Peptid GLCPHCINVG613-622 (GLCP) wurde von 0,71% der CD8+ T-Zellen und das Peptid LLHTDFEQVM276-285 (LLHT) wurde von 0,06% der CD8+ T-Zellen erkannt. Beide induzieren eine IFN γ -Antwort, GLCP erzeugte zudem auch eine vergleichbare TNF α Antwort. Beide Sequenzen beinhalten ein publiziertes HLA-A2 Epitop (GLCPHCINV und LLHTDFEQV) in Übereinstimmung mit dem HLA-Typen des Spenders. Nach zwei Monaten nahmen die Antworten auf 5,34% (SALK), 4,4% (QSAL) und 0,07% (IQSA), 0,08% (GLCP) und 0,03% (LLHT) ab.

Ergebnisse

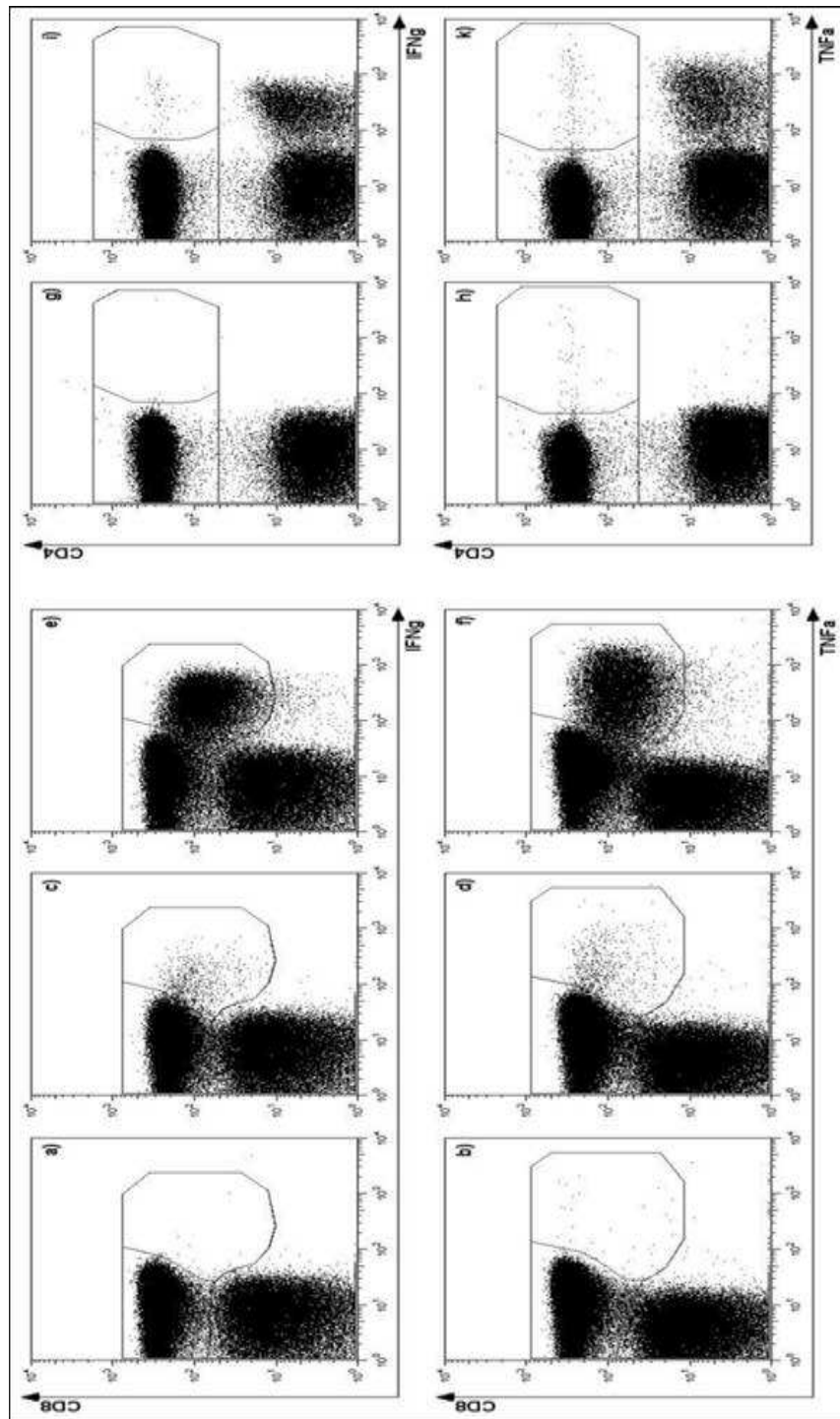


Abb. 35: FACS Analyse der zwei B19V NS1-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten und einer CD4⁺ T-Zellantwort 10 Monate nach der initialen Präsentation. Die oberen Abbildungen zeigen die IFN γ Sekretion und die unteren Abbildungen die TNF α Sekretion 16 Stunden nach der Stimulation. (a, b, g, h) zeigen die Negativkontrollen, CD8⁺ T-Zellantworten nach Stimulationen mit den 10 AS-Peptiden GLCPHCINVG (GLCP; c, d) und SALKLAIYKA (SALK; e, f), und die CD4⁺ T-Zellantwort nach Stimulation mit dem 13 AS-Peptid IQSALKLAIYKAT (i, k).

3.4.2 TRBV11 Dominanz der NS1-B19V-antigenspezifischen T-Zellen

Die real-time RT-PCR Analysen für funktionelle TRBV-Expression an SALK- und GLCP-reaktiven T-Zellen zeigte eine überproportionale Expression von TRBV11 im Vergleich zu den nicht-reaktiven Zellen (SALK: 7,5 fach; GLCP: 4,7 fach) und den unselektierten PMBC (Abbildung 36). Alle weiteren TRBV sind in den SALK- und GLCP-reaktiven, sowie den nicht-reaktiven Zellen und den unselektierten PMBCs vergleichbar exprimiert.

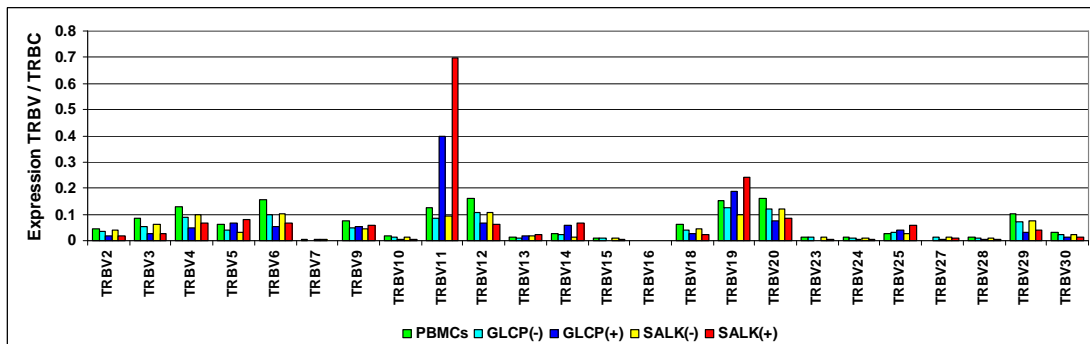


Abb. 36: TRBV Expression der B19V NS1-spezifischen T-Zellen. Die Balken kennzeichnen die TRBV Expression in Bezug auf TRBC in nicht-selektierten PMBCs im Vergleich mit positiv und negativ selektierten GLCP und SALK reaktiven T-Zellen, die durch die Verwendung des IFN γ Sekretionsassays angereichert wurden.

Weiterhin weisen SALK- und GLCP-reaktive Zellen eine dominante Expression der Typ1 T-Zellmarker IFN γ (SALK 11,9 fach, GLCP 5 fach), IL2 (SALK 16,55 fach, GLCP 24,71 fach), IL27 (SALK 8,72 fach, GLCP 4,43 fach), T-bet (SALK 2,3 fach, GLCP 3,3 fach), und der CTL-Marker Perforin (SALK 2,3 fach, GLCP 4 fach) und Granzyme B (SALK 2,62 fach, GLCP 3,62 fach) auf.

Im Gegensatz dazu wurden die Marker für den Typ 2 (GATA3: SALK 0,4 fach und GLCP 0,3 fach; IL4: SALK 0,3 fach und GLCP 0,2 fach) und für regulatorische T-Zellen (FoxP3: SALK: 0, fach und GLCP: 0,6 fach) nur gering exprimiert. Zusätzlich wurden wesentlich höhere Expressionen von generellen Inflammationsmarkern in den positiv selektierten IFN γ exprimierenden Zellen (IL-6: SALK: 2,0 fach; GLCP: 3,1 fach; TNF α : SALK: 7,5 fach; GLCP: 10,7 fach und NF κ B: SALK: 5,9 fach; GLCP: 3 fach) gemessen (Abbildung 37).

Ergebnisse

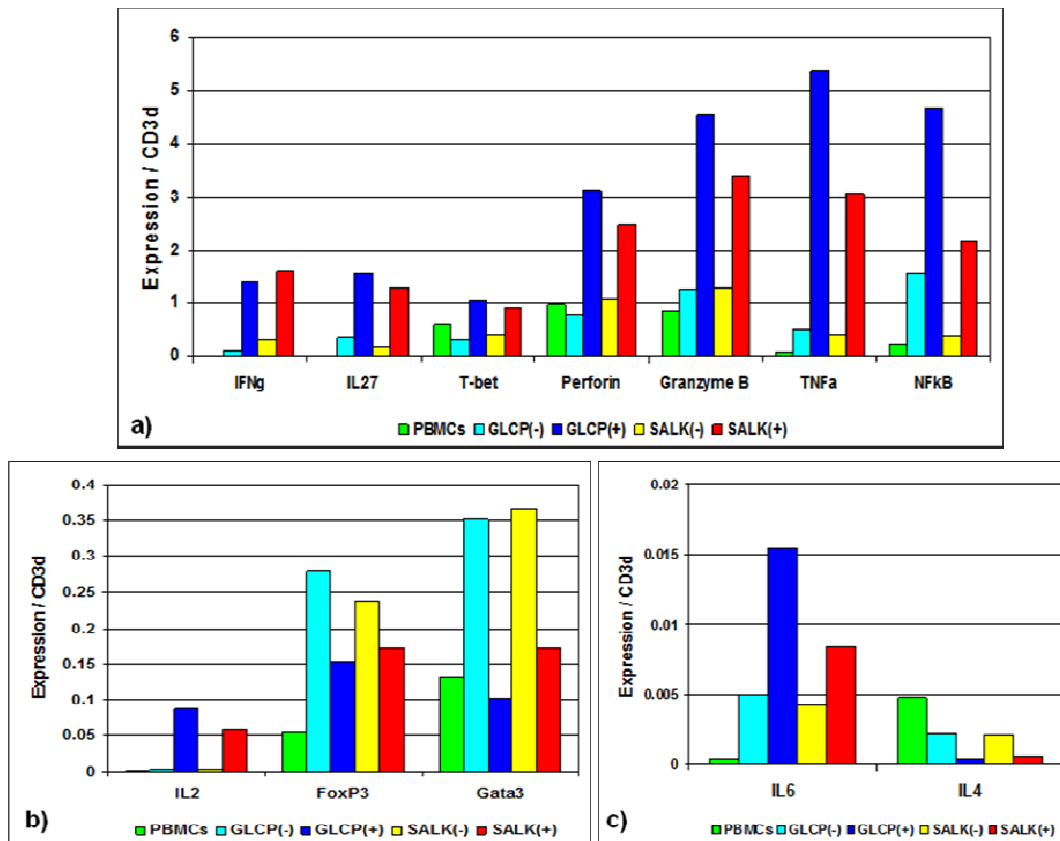


Abb. 37: Expression der Effektor-T-Zellmarker von B19V NS1-spezifischen T-Zellen. Die Balken stellen die Markerexpression (normalisiert auf CD3d) von unselektierten PBMCs im Vergleich mit positiv und negativ selektierten GLCP und SALK reaktiven T-Zellen, die durch die Verwendung des IFN γ Sekretionsassays angereichert wurden. Die drei Abbildungen zeigen unterschiedliche Zielgenexpressionslevel.

4 Diskussion

4.1 RNA-Extraktionsoptimierungen an Herzmuskelgewebe

Aus ca. 5 mg EMBs Gewebe können naturgemäß nur limitierte RNA Mengen für Untersuchungen der Genexpression extrahiert werden. Optimierte RNA-Extraktionsmethoden sind demzufolge für eine möglichst hohe RNA-Ausbeute von möglichst reiner RNA wichtig. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden die konventionelle Trizol® Methode (basierend auf der Phenol-Chloroform-Fällung), die u.a. für den Nachweis von enteroviraler RNA verwendet wird (14, 190), mit nachgeschalteter Aufreinigung des Extraktes mit neu auf den Markt gekommenen ChargeSwitch® *beads*, und unterschiedliche kommerzielle Kits auf der Basis von Lyse-Puffern und Silika Säulen (RNeasy Mini Kit / Qiagen; RNeasy Fibrous Tissue Kit / Qiagen) eruiert. Das RNeasy Mini Kit ist vornehmlich für kultivierte Zellen und Blutzellen entwickelt worden, die durch den Lyse-Puffer rasch und vollständig lysiert werden können. Da fibröses Gewebe durch dieses Verfahren nur unvollständig lysiert wird, wurde in einer Fortentwicklung im RNeasy Fibrous Tissue Kit das Lyseverfahren intensiviert. Beide Verfahren zeichneten sich in den Untersuchungen durch eine hohe Qualität der erhaltenen RNA aus ($\text{Ratio}_{260/280}$ 2,06 respektive 2,12), allerdings war die RNA-Ausbeute aus explantierten Herzmuskelgewebe gering. Dass das konventionelle Trizol® eine effektive RNA-Extraktionsmethode darstellt, zeigt sich in der substantiell höheren RNA-Konzentration, allerdings enthält diese RNA oft Verunreinigung von Phenol- und Proteinresten, die die real-time RT-PCR behindern

Die Aufreinigung des Trizol® Extrakts mit den Silika-Säulen basierten RNeasy Mini Kit oder dem für kleinere RNA-Mengen entwickelten RNeasy Cleanup Minelute Kit erbrachte zwar eine entscheidende Besserung der $\text{Ratio}_{260/280}$ auf ca. 2, allerdings wurde hierdurch auch die RNA Menge deutlich reduziert.

Eine optimale Lösung dieser Problematik bietet sich nach unseren Untersuchungen aus der Kombination der konventionellen Trizol® Methode mit nachgeschalteter Aufreinigung des Trizol® Extrakts mit ChargeSwitch® *beads*. Diese Kombination ermöglichte eine gegenüber den kommerziellen, auf Silika-Säulen basierende Verfahren eine um ca. 2-3fach erhöhte extrahierte RNA-Menge (96,3 ng/ml), bei einer $\text{Ratio}_{260/280}$ von 2,17, was dafür spricht, dass die Phenol- und Protein-Verunreinigungen, die aus der Trizol® Extraktion hervorgehen, weitestgehend eliminiert werden. Für die weiteren Untersuchungen hinsichtlich der RNA-Extraktion aus EMBs wurde dieses Kombinationsverfahren eingesetzt.

Explantierte Herzmuskelgewebe sind u.a. infolge der sicherlich vorhandenen RNA Degradation unmittelbar nach Explantation des Organs nicht uneingeschränkt repräsentativ. Jedenfalls zeigen die erhaltenen Ct-Werte aus den unterschiedlichen Extraktionsmethoden, dass sich die optischen Messungen der erhaltenen RNA-Mengen und Qualitäten auch in entsprechenden real-time RT-PCR Ct-Werten umsetzen lassen. Die Aufreinigung der RNA aus Herzmuskelge-

Diskussion

webe trägt zu einer deutlichen Senkung des Ct-Werts bei, infolge der besseren Linearität der real-time RT-PCR. Dieses wird vor allem auch insbesondere durch die deutlich niedrigeren Ct-Werte der nach konventioneller Trizol® Extraktionsmethode aufgereinigten RNA verdeutlicht, die im Vergleich um ca. 2-3 Ct-Werte abnehmen. Diese Beobachtung allein ist dafür indikativ, dass die optische Quantifizierung der nach der konventionellen Trizol® Methode extrahierten RNA offenbar durch die Phenol- und vor allem die Proteinreste falsch zu hoch ermittelt wird.

4.2 Entwicklung eines Real-time RT-PCR Systems zum Nachweis des TCR

Es ist weithin bekannt, dass die konventionelle histologische Diagnostik nicht ausreicht, um die komplexen Prozesse, welche kritisch in der Pathogenese der DCMi involviert sind, ausreichend aufzuklären. Weiterhin fehlt es dieser Methode an prognostischer Wirkung und sie ist nicht hinreichend, um DCM- von DCMi-Patienten zu unterscheiden, welche wahrscheinlich von einer immunmodulatorischen Therapie profitieren würden. Hingegen sind die sensitiveren und spezifischeren immunhistologischen Verfahren geeignet, die DCMi besser zu diagnostizieren. Darüber hinaus konnten erst die immunhistologische Diagnostik der DCMi eine prognostische Aussagekraft vorweisen, und als diagnostische Grundlage Patienten selektieren, die von immunmodulatorischen Therapien profitieren (25, 165, 174, 191-195). Genexpressionsuntersuchungen sind ein vielversprechender Ansatz für ein tiefgreifendes Verstehen der Pathogenese von DCM/DCMi und der prognostischen Auswirkungen der Genexpressionsprofile im natürlichen Verlauf der Krankheit, sowie unter immunmodulatorischen Therapien (165, 192-194, 196).

Zum besseren Verständnis der DCM/DCMi sollten insbesondere T-Zell-assoziierte Gene und vor allem auch der T-Zellrezeptor beta untersucht werden. Da es für die Genexpressionsanalysen des TCR keine kommerziell erhältlichen *gene assays* gibt, wurde ein Primer/Sonden-System für die real-time RT-PCR entwickelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle funktionellen TRBVs durch Primer und Sonden abgedeckt sind. Es wurden die Gensequenzen und die Nomenklatur des International Information System (IMGT: <http://imgt.cines.fr/>) verwendet. Die Primer wurden mittels *alignment* auf potentielle Sequenzhomologien hin untersucht, um eventuelle Fehlbindungen zu vermeiden. Außerdem wurden die *gene assays* Intron überspannend entwickelt, damit es zu keiner Kreuzreaktivität mit genomischer DNA kommt, was in Versuchen bestätigt werden konnte.

Zur Überprüfung der Spezifität der Primer wurden verschiedene Lymphom-Zelllinien mit bekannten T-Zellumlagerungen, die zuvor mittels des BIOMED-2 Primersystems bestimmt wurden, untersucht (155). Dabei wurden diese bekannten Umlagerungen spezifisch von den entsprechenden Primern amplifiziert. Auch die PCR-Effizienz der TRBV-Primersysteme liegt in den allgemein anerkannten Grenzen (172).

Nach allen positiven Vortests an PBMCs wurde das System auch an cDNA aus Myokardgewebe getestet. Dabei wurde festgestellt, dass die isolierten RNA-Mengen aus Endomyokardbiopsien nicht ausreichen, um die TRBV-Expression vernünftig zu nachzuweisen, deshalb wurden Präamplifikationsstrategien angestrebt.

4.2.1 Entwicklung einer Präamplifikation zum Nachweis des TCR

Präamplifikations-Verfahren können möglicherweise die Sensitivität der real-time RT-PCR verbessern, vor allem für niedrig exprimierte Gene. Diese führen dann zu wesentlich höheren Mengen an cDNA, die dann die Zahl der zu untersuchenden Zielgene aus einer begrenzten cDNA vergrößert. Die Aufrechterhaltung der Genexpressionsprofile sowie eine breite Anwendbarkeit auf viele Zielgene ist ein weiterer faszinierender Aspekt der PreAmp Verfahren.

Das auf die Taqman® PreAmp Master Mix Technik (T-PreAmp) basierende Verfahren ermöglicht einen relativ einfachen Arbeitsablauf, der im Wesentlichen aus der Herstellung des *primer/gene assay* Pools und der Präamplifikation von cDNA über 10 oder 14 Zyklen in einem speziellen Mastermix besteht. Es werden identische Primer für die T-PreAmp als auch der darauffolgenden real-time RT-PCR verwendet. Dieses T-PreAmp Verfahren ist deutlich einfacher im Vergleich zu dem selbst-designten SSRT-PreAmp Verfahren. Diese Methode erfordert spezifische Primer jeweils für die SSRT und in dem folgenden Präamplifikationsschritt (170), die in diesen Versuchen im nested Design gewählt wurden, um eine höhere Spezifität der PreAmp zu gewährleisten. Theoretisch können bis zu 100 gene assays gleichzeitig in jeder T-PreAmp Reaktion präamplifiziert werden. Diese Limitation ergibt sich rechnerisch aus dem Zielvolumen der PreAmp cDNA in Doppelt-Bestimmungen. Dies lässt sich auch durch unsere Daten von 92 parallel präamplifizierten gene assays an cDNA von EMBs und PBMCs bestätigen. Ein weiterer Vorteil der T-PreAmp Technik ist, dass aus 60 µl cDNA aus den in dieser Arbeit angewandten RNA-Extraktions- und cDNA-Umschreibungs-Methoden für EMBs, 8 verschiedene T-PreAmp Reaktionen aus einer einzigen EMB möglich sind. Rechnerisch wäre damit die Genexpressionsanalyse von 784 verschiedenen Zielgenen (minus eines housekeeping Gens wie HPRT oder CDKN1B als etabliertes Referenz-Gen für die PreAmp Uniformität) möglich. Dies ist eine wesentlich höhere Anzahl von quantifizierbaren Zielgenen im Vergleich mit der direkten konventionellen, direkten real-time RT-PCR, bei der maximal 30 verschiedene Zielgene in zweifacher Ausfertigung in der real-time RT-PCR-Analyse mit 1 µl cDNA pro Reaktion gemessen werden können. Im Gegensatz zu der Situation in der Genexpressionsanalysen in verschiedene Gruppen von Zielgenen auf cDNA mehrerer EMBs von Patienten, angesichts der begrenzten RNA/cDNA Menge aus einzelnen EMBs, für direkte real-time RT-PCR-Analysen aufgeteilt hätte werden müssen.

Das T-PreAmp-Verfahren mit 14 PreAmp-Zyklen führt zu einer deutlichen Erhöhung der Sensitivität der real-time RT-PCR von circa 7 Ct-Werten, mit PreAmp Uniformitätswerten zwischen -1,5 bis +1,5 sowohl in PBMC als auch EMB cDNA (mit Ausnahme der gene assays HPRT-ABI und CD56). Die geringen intra- und inter-assay Varianzen auch aus der cDNA von EMBs (<4%, einschließlich CD56) implizieren eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit der T-PreAmp-Technik. Ferner zeigen diese Daten, dass die PreAmp-Uniformität über eine breite Palette von Ct-Werten in der direkten real-time RT-PCR, einschließlich der niedrigen Ct-Bereiche (Ct > 35 in direkter real-time RT-PCR) erhalten bleiben (177). Dies gilt sowohl für Taqman® ABI inventarisierte sowie selbstentwickelte *gene assays*, die nach den ABI Empfehlungen designt sind. Wie hier gezeigt werden konnte, müssen nur die *forward / reverse* Primer der selbst entworfenen

gene assays in die PreAmp Master Mix Reaktion eingebracht werden. Sie arbeiten nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen Taqman® *gene assays*, von denen sowohl Primer als auch Sonde in die T-PreAmp Reaktion eingehen, bezüglich der PreAmp Uniformität.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die PreAmp-Uniformität auch im Hinblick auf die *gene assays* mit einem gemeinsamen reverse Primer und einer gemeinsamen Fluoreszenz-Sonde, aber unterschiedlichen *forward* Primern (TRBV Primer) sowie *wobbled* Primer Designs (TRBV5, 6 und 7 *forward* Primer) erhalten bleibt. Diese zahlreichen Vorteile konnten nicht durch die SSRT-PreAmp erfüllt werden. Erstens ist diese Technik nicht für kommerziell erhältliche Taqman® *gene expression assays* anwendbar, da die Sequenzen dieser Assays nicht zugänglich sind, und daher die Primergestaltung für die SSRT-PreAmp nicht möglich ist. Zweitens zeigten die SSRT-PreAmp Ergebnisse auf PBMC und EMB cDNA sehr unterschiedliche PreAmp Uniformitäten, mit Werten unterhalb des vorgeschlagenen Bereiches von -1,5 bis 1,5 in Bezug auf CD3z, IFN γ , T-bet und Perforin, obwohl die gleichen *gene assays*, unter Nutzung des Taqman® PreAmp Master Mixes, innerhalb der vorgeschlagenen PreAmp Uniformität von -1,5 bis 1,5 liegen.

Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass beide PreAmp-Verfahren ohne deutlich unterschiedliche PreAmp Uniformitätswerte über eine breite Palette von Ct-Werten in der direkten real-time RT-PCR, einschließlich der niedrig vorkommenden Ct-Bereiche (Ct > 35 in direkter real-time RT-PCR) (177) funktionieren. Dies impliziert eine potentielle Anwendung in der präklinischen Diagnostik für das T-PreAmp Verfahren aufgrund seiner zahlreichen Vorteile (z.B. stabile PreAmp Uniformitätswerte für die meisten *gene assays*, einfache Anwendung, die Erweiterung der möglichen real-time RT-PCR Analysen von begrenzter RNA / cDNA).

Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist das Fehlen von nachweisbarer Expression in cDNA und T-PreAmp cDNA für die Ziel-Gene und Proben, bei denen auch durch direkte real-time RT-PCR keine messbaren Ct-Werte in cDNA aus PBMCs und EMBs nachgewiesen wurden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sowohl die T-PreAmp als auch SSRT-PreAmp Techniken zuverlässige Ergebnisse liefern und keine falsch-positiven Werte produzieren. Eine Einschränkung der Studie ist, dass der Vergleich der PreAmp-Uniformitätswerte der untersuchten *gene assays* zwischen T-PreAmp und SSRT-PreAmp nur basierend auf HPRT-CCM durchgeführt wurde, und nicht auf CDKN1B, da letzteres ein inventarisiertes Applied Biosystems Taqman® *gene assay* ist und somit nicht für die SSRT-PreAmp eingesetzt werden kann. Allerdings, weisen die T-PreAmp Ergebnisse von HPRT-CCM darauf hin, dass dieser *gene assay* ebenso als Referenzgen für die Berechnung der PreAmp Uniformität dienen kann. Dies folgert, dass nicht die Design Merkmale dieser *gene assays* (z.B. PCR Effizienz), sondern eher das PreAmp Verfahren per se der entscheidend wichtige Punkt ist, der zu den beobachteten Abweichungen der PreAmp Uniformitätswerte führt. Es ist möglich, dass Interaktionen zwischen Primern der verschiedenen *gene assays*, während des SSRT-PreAmp Verfahren zu den beobachteten Verzerrungen in der PreAmp Uniformität führen. Dies steht im Einklang mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen über die noch ausgeprägteren Verzerrungen der PreAmp Uniformitätswerte, wenn weitere *gene assays* in die SSRT-PreAmp Reaktionen hinzugeführt werden

(Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der höheren Komplexität des SSRT-PreAmp Verfahrens und der zu erwartenden höheren Möglichkeit von Primer-Wechselwirkungen während der PreAmp, haben wir nicht die PreAmp Eigenschaften der *gene assays* mit gemeinsamen reverse Primer / Sonden und diversen *forward* Primern, noch *wobbled* Primer-Designs (TRBV Primer), mittels des SSRT-PreAmp Verfahrens untersucht.

Im Vergleich mit non-nested PCR haben nested PCR (nPCR) Techniken eine höhere Spezifität (197). Für die real-time RT-PCR ist bekannt, dass sie eine höhere Spezifität im Vergleich zur nested PCR hat (198). Deshalb könnte der Vorteil des SSRT-PreAmp Ansatzes eine höhere Spezifität aufgrund des *nested* Primer Designs sein.

Die Ergebnisse zeigen, dass die T-PreAmp Uniformität von den *gene assays* abhängig ist, daher sollte vor der Aufnahme von seriellen Untersuchungen immer die Uniformität bestimmt werden. CD56 und HPRT-ABI (beides ABI inventarisierte *gene assays*) liegen nicht in den vorgegebenen Uniformitätsgrenzen, was zu veränderten Expressionsprofilen aller Zielgene führen würde, wenn HPRT-ABI als *housekeeping* Gen verwendet werden würde. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen haben Denning et. al. für den ABI inventarisierten *gene assay* GAPDH gezeigt, dass es die vorgeschlagenen Uniformitätswerte nicht einhält. Deswegen normalisierten sie die Genexpression auch auf CDKN1B (199).

Wie an CD56 gezeigt, sprechen niedrige intra- und inter-assay CVs für die Stabilität und Reproduzierbarkeit der T-PreAmp, obwohl die Uniformität von CD56 nicht eingehalten wird. Ein weiterer wichtiger Faktor, den man nicht vernachlässigen sollte, ist die PCR-Effizienz. Denn mit abfallender PCR-Effizienz steigt die Uniformität. Außerdem spielt möglicherweise auch die Kontamination mit DNA bei so niedrigen Expressionsniveaus eine Rolle. Das Intron-überspannende Primerdesign verhindert die Ko-Amplifikation von genomischer DNA bei den selbstentworfenen und ABI inventarisierten *gene assays*. Es wurde an gDNA von PBMCs gezeigt, dass es keine Kreuzreaktivität der Primer mit genomischer DNA gibt.

Die Untersuchungen zeigen weiterhin, dass die T-PreAmp-Leistung nicht von der Amplikonlänge und PCR-Effizienz abhängig ist. Denning et. al. leiten von ihren Untersuchungen an GAPDH (122bp) und 12 weiteren Genen mit kürzerer Amplikonlänge her, dass die Amplikonlänge möglicherweise äußerst wichtig für die T-PreAmp Uniformität ist (199). Die hier erhaltenen Daten bestätigen diese Hypothese nicht, da insbesondere TRBV19 und TRBV29 Amplikonlängen von 260bp und 320bp (abhängig von der entsprechenden *joinig* und *diversity* Region) aufzeigen und trotzdem eine T-PreAmp Uniformität von -1,5 bis 1,5 eingehalten wurde und somit vergleichbar zu weiteren selbstentworfenen (HPRT-CCM 101bp, CD3z 108bp, TRBC 151bp) und ABI inventarisierten Assays (CD3d 92bp, NFATC3 74bp, av5b1 75bp) funktionieren. Es gab keinen Hinweis dafür, dass die PCR-Effizienz dieser *gene assays* eine Rolle für die Uniformität spielt. Im Gegensatz dazu zeigen HPRT-ABI (100bp) und CD56 (61bp) unter den gleichen Bedingungen eine deutlich schlechtere Verbesserung der Ct-Werte. Die Verzerrung der T-PreAmp Uniformität war bei HPRT-ABI über verschiedene Verdünnungsstufen stabil, CD56 hingegen zeigt eine ansteigende Uniformität mit abnehmender PCR-Effizienz. Deshalb wird vermutet, dass die Verzerrung/Verschiebung der T-PreAmp Uniformität *gene assay* spezifisch ist und nicht ein generelles

Problem der T-PreAmp-Technik darstellt. Aber es bleibt weiterhin die Frage, was die konkrete Ursache für die unverhältnismäßige T-PreAmp Performance bestimmter gene assays ist. Nichtsdestotrotz heben diese Ergebnisse hervor, wie wichtig Vortests vor seriellen Untersuchungen sind. Zum Sammeln, Vergleichen und Diskutieren der Erfahrungen mit der T-PreAmp hinsichtlich bestimmter gene assays empfiehlt sich ein *open access* Forum. In dieser vorläufigen Studie wurden EMBs von 10 DCM Patienten mit EMBs von 10 Patienten mit immunhistologisch bestätigter DCMi verglichen. Beide Patientengruppen hatten vergleichbar niedrige LVEF, was eine mögliche Tendenz zu generellen sekundären Herzinsuffizienz-assoziierten Mechanismen verringert.

Die vorläufigen Daten der T-PreAmp real time RT-PCR Analysen zeigen eine differentielle Expression bei 27/90 (30%) der untersuchten Zielgene. Diese Untersuchungen bestätigen, dass die immunhistologisch diagnostizierte DCMi mit signifikant erhöhten Expressionen von T-Zell verwandten Genen (CD3d, CD3z, TRBC und NFATC3) einhergeht. Die Hochregulation von bestimmten TRBV-Familien (TRBV2, 4, 6, 10, 20, 23, 24 und 29) in EMBs von DCMi Patienten spricht für eine selektive Rekrutierung und/oder Expansion und somit eine Restriktion der TRBV Expression der T-Zell-Infiltrate bei der DCMi (200). Die erhöhte Expression von IL-6, TNF α und CX3CL1 schließen darauf, dass T-Zellinfiltration bei DCMi parallel geschaltet ist durch unterschiedlichen Zuwachs von diesen Zytokinen, wohingegen für ein weiteres Chemokin CXCL14 bestätigt wurde, dass es bei DCMi Patienten runterreguliert wird, wie kürzlich durch microarray Analysen berichtet wurde (201). Weiterhin konnte, wie auch schon in den microarray Analysen, eine relative Abnahme der Expression von APN bestätigt werden, wobei die Rezeptoren APN-R1 und APN-R2 nicht differentiell exprimiert werden. Durch unsere Analysen konnte auch die Hochregulation von Cyr61 bestätigt werden (201).

Die Ergebnisse zu den Markern für die T-Zellaktivierung eröffnen eine bis jetzt noch nicht erkannte potentielle Rolle für Granzyme A, Granzyme B, Granulysin wie auch T-bet und Eomesodermin als Marker für zytotoxische und Th1-Zellen in der DCMi. Im Gegensatz dazu sind die Marker für Th2- Zellen, anerge und regulatorische T-Zellen (IL-4, IL-5, IL-10, TGF β , Gata3, GRAIL, FoxP3) in EMBs von DCMi Patienten nicht erhöht. Dies weist möglicherweise auf eine fehlende Gegenregulation der T-Zellantwort in der DCMi hin. Das Fehlen einer differentiellen Expression von Toll-like Rezeptoren (TLRs) und Signalfaktoren, die in TLR downstream Signalwegen involviert sind, favorisiert/befürwortet nicht die Hypothese einer vorrangigen Rolle von TLRs in der DCMi. Die hier durchgeführten Analysen bestätigen weiterhin die Abnahme der relativen Expression von tissue factor (TF) bei DCMi Patienten im Vergleich mit DCM Patienten (168). Während veränderte Expressionen von etlichen Komponenten der extrazellulären Matrix in DCM und weiteren nicht-DCM Kardiomyopathien (202, 203) bekannt sind, wurde bis jetzt noch kein direkter Bezug zu Entzündung oder kardiotropen Virusinfektionen beschrieben. Die Daten zeigen keine veränderte Expression von Kollagen Typ I, III, IV, MMPs 2, 8, 9, TIMPs 1, 4 und uPA in EMBs von DCMi versus DCM Patienten. Die erhöhten Expressionen von β 1-Integrinen und weiteren Adhäsionsmolekülen wie CD62E wurden mittels immunhistologischer Analysen (174) bestätigt, was mit den Daten über α 5 β 1 und CD62E übereinstimmt. GDF15 ist ein neu erkannter Marker für Herzversagen und die Daten implizieren auf Grund der erhöhten

Expression (204) eine zusätzliche Rolle bei der DCMi.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die T-PreAmp neben der technischen Anwendbarkeit an Biopsien auch in der Lage ist, signifikant unterschiedlich exprimierte Gene bei Patienten mit DCMi aufzudecken. Obwohl zahlreiche Berichte eine enge Assoziation zwischen RNA und Proteinexpression bestätigen, wurde eine Diskrepanz zwischen diesen beiden Expressionslevel in einigen Untersuchungen aufgeklärt, z.B. bezüglich posttranslationaler Modifikationen (205, 206). Es zeigt sich hier eine signifikante Assoziation zwischen der Expression von T-Zellmarkern (CD3d, CD3z, TRBC, NFATC3) und der DCMi, die über immunhistologisch quantifizierte CD3+ Infiltrate bestimmt wird. Die mittels T-PreAmp signifikant unterschiedlich ermittelten Genexpressionen sollten idealerweise auch auf Proteinebene bestätigt werden, z.B. durch immunhistologische Verfahren. Weitere Analysen an größeren Patienten-Kohorten würden es gewährleisten Folgendes zu untersuchen: Assoziation mit verschiedenen kardiotropen Viren (13, 14), den Einfluss der LVEF, die Akuität der Erkrankung (akute Myokarditis versus DCMi), die prognostische Rolle der Genexpression für den diversen natürlichen Verlauf der Krankheit (Verbesserung vs. weiterer Verschlechterung unter konventioneller Herzinsuffizienz-Medikation) (15), wie auch Veränderungen der Genexpression in DCMi Patienten unter immunmodulatorischer Behandlung (Immunsuppression, Immunadsorption, antivirale Behandlung (165, 192-194, 196)). Die breite Anwendung der T-PreAmp Methode könnte auch insbesondere im Hinblick auf die kürzlich publizierten und breit akzeptierten EMB Richtlinien (207) in Aussicht gestellt werden, da diese eine deutliche Steigerung der Entnahmehäufigkeit von EMBs aus diagnostischen Zielstellungen im nordamerikanischen Raum, auch unter Berücksichtigung der anerkanntermaßen nahezu vernachlässigbaren periprozeduralen Komplikationsrate der EMBs Entnahme erwarten lassen (208). Nach den negativen Studienergebnissen der US Myocarditis Immunosuppression Treatment Studie war die EMB Entnahme im nordamerikanischen Raum bis zuletzt aus Gründen der fraglichen diagnostischen Wertigkeit und insbesondere wegen der fehlenden therapeutischen Konsequenz für die Patienten stark rückläufig (191, 209, 210). Letztlich könnte das T-PreAmp Verfahren auch Anwendung für weitere Fragestellungen, die durch die limitierte RNA Menge beschränkt werden, z.B. den *Laser Capture Microdissection* Präparaten aus diversen Organen (199, 211), sinnvoll eingesetzt werden.

Schlussendlich werden erste Hinweise gezeigt, dass CDKN1B, zusätzlich zu seiner Funktion als Referenzgen für die T-PreAmp Uniformität auch als relevantes housekeeping Gen für die relative Quantifizierung der Genexpression in Myokardgewebe dienen könnte. Wohingegen die Tumorsuppressorgenfunktion von CDKN1B in anderen Geweben und pathologischen Bedingungen (212, 213) hinreichend bekannt ist, ist die physiologische Rolle und das Expressionsmuster von CDKN1B in myokardialem Gewebe bis jetzt noch nicht untersucht. Übereinstimmend mit den hier erhaltenen Beobachtungen haben Denning et. al. zuvor bestätigt, dass CDKN1B als housekeeping Gen in Schilddrüsengewebe dienen kann (199).

4.2.2 TRBV- und FTZM-Expression in der experimentellen CVB-induzierten Myokarditis bei SWR-Mäusen

Zur Ergründung der TRBV- und FTZM-Expression in der murinen CVB-induzierten Myokarditis wurde das etablierte SWR-Maus-Modell verwendet. Dieser Mausstamm ist für eine myokardiale CVB Replikation empfänglich, und für die Entwicklung einer chronischen Viruspersistenz auch bei d28 nach der akuten Myokarditis bei d7 bekannt (214-217). Am d7 p.i. waren die Infiltrate durch eine ausgeprägte TRBV3 Dominanz gekennzeichnet, die auch bei d28 persistierte. Diese Daten sind mit Publikationen von Seko et al. bei der akuten CVB-Myokarditis am Balb/c Maus-Modell der Virus-induzierten akuten Myokarditis vereinbar, die eine Dominanz von TCRV β 10 zeigten. Kawagishi et al. zeigten, dass die Enzephalo-Myokarditis-Virus-induzierte Myokarditis durch eine Dominanz von TCRV β 8 bei Balb/c Mäusen gekennzeichnet ist. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse, dass die T-Zell-Antwort bei einer Infektion durch ein definiertes Agens in einem homogenen, genetischen *background* zu einer klonalen Expansion der spezifisch reaktiven TRBV führen, und damit letztlich eine Restriktion des TRBV Repertoires der infiltrierenden T-Zellen bedingen. Letztlich treffen diese Grundsätze auch auf die Myosin-induzierte Autoimmun-Myokarditis der Maus zu, in der eine Dominanz von TCRV β 8, 10 und 16 gezeigt werden konnte (218). Matsumoto et al. zeigten ferner, dass sich aus diesen Einsichten auch spezifische therapeutische Ansätze ableiten lassen, indem die pathogenen T-Zell Klone durch Antikörper oder DNA-Vakzinen eliminiert, und der Erkrankungsverlauf insgesamt abgemildert werden kann (150, 219).

Die Charakterisierung der analysierten funktionellen T-Zell-Marker bei der CVB-induzierten Myokarditis an SWR-Mäusen zeigte insgesamt eine Th1- und CTL-dominierte T-Zell-Antwort am d7 p.i., dem Tag der maximalen Infiltration. Des Weiteren war diese Infiltration mit einer erhöhten Expression des generellen Entzündungsmarkers IL-6 assoziiert. Hingegen waren Markergene, die Th2-, regulatorische und anerge T-Zellen charakterisieren, nicht reguliert. Eine derart umfassende funktionelle Charakterisierung der T-Zell-Antwort bei der CVB-induzierten Myokarditis der Maus liegt nicht vergleichend vor. Aus der Literatur ist bekannt, dass die antivirale Immunantwort bei der CVB-induzierten Myokarditis der Maus signifikant von Interferon abhängt, und dass diese Th1-Antwort maßgeblich für das folgenlose Ausheilen der Erkrankung, und die Viruselimination ist (72, 215, 220-222). Des Weiteren ist bekannt, dass die T-Zell-Infiltrate bei der akuten CVB-induzierten Myokarditis auch CTL enthalten. Diese spielen allerdings für die Viruselimination nur eine untergeordnete Rolle, und haben insbesondere für die Entstehung der myokardialen Fibrose eine entscheidende Bedeutung, die letztlich zum dauerhaften funktionellen Organschaden beiträgt (223). Die Rolle der immunregulatorischen Einflüsse von TGF β bei der CVB-induzierten Myokarditis der Maus wurde von Huber et al. erkannt, noch bevor FoxP3 als spezifischer Marker von Treg bekannt war (224). Hinsichtlich anergischer T-Zellen gibt es bislang keine abrufbaren Publikationen im Zusammenhang mit der CVB-induzierten Myokarditis. Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen zur Charakterisierung der T-Zell-Infiltrate bei der CVB-induzierten Myokarditis der SWR-Maus dass eine funktionell differenzierte T-Zell-Antwort mit Dominanz von TRBV3 im dynamischen Verlauf nach der Infektion stattfindet.

Diskussion

Diese Einsichten ergeben mannigfaltige Ansätze für spezifische therapeutische Interventionen. So sind detaillierte Untersuchungen der Effekte einzelner T-Zell-Subtypen in *knock out*, in transgenen Tieren, Behandlungsversuche mit Antikörpern oder zusätzlicher Administration von bestimmten Zytokinen denkbar (152, 219, 223-225).

4.3 TRBV-Expression bei *in vitro* expandierten humanen T-Zellen unter Verwendung von feeder cells – Einflüsse von Zellkulturmedien

T-Zellen, ausgehend von einer geringen Zellzahl können durch polyklonale Stimulation mit anti-CD3-Antikörper, IL-2 und feeder Zellen *in vitro* expandiert werden. Durch Erfahrung wurden T-Zellexpansionstechniken entwickelt und eine Vielfalt von Medien wurde dafür verwendet. Hypothetisch wäre die Zellexpansion in serumfreien Medien bevorzugt, um potentielle immunstimulatorische Effekte z.B. durch Lipopolysaccharide und *inter-batch* Variationen zu vermeiden. Bis heute wurden die Effekte von verschiedenen Medien inklusive serumfreien Lymphozyten-spezifischen Medien auf die Reproduzierbarkeit der T-Zellexpansion, der Expansions-effizienz und Änderungen der TRBV-Expression nicht aufgeklärt.

Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden inaktivierte, autologe aus peripherem Blut gewonnene CD3-depletierte *feeder* Zellen verwendet. Diese Expansionstechnik löst eine polyklonale T-Zellexpansion in der Anwesenheit von anti-CD3-Antikörpern in Langzeit *in vitro* Kulturen von bis 28 Tagen aus (272). Die interzellulären Kontakte der T-Zellen wird über die CD3/TCR-interaktion und die Kostimulation mittels CD28 vermittelt und induziert somit die T-Zellproliferation (273). Solche Interaktionen sind auch *in vivo* an Orten der T-Zellbildung und Aktivierung (274) zu beobachten und sind wahrscheinlich für die Klusterbildung der *in vitro* T-Zellexpansionen unter FC und CD3-Antikörper verantwortlich. Die Immunhistologischen Färbungen von Cytospins bestätigen eine enge räumliche Assoziierung der CD3+ T-Zellen um die FC.

Eine TRBV-Dominanz in infiltrierenden und/oder peripheren Lymphozyten wurde bei diversen Autoimmunkrankheiten, virusinduzierten Krankheiten und in den Infiltraten von malignen Erkrankungen beobachtet. Diese Konditionen können Ansätze für immunmodulatorische Therapien bieten (153, 178-180, 275). Bisher ist nur wenig über die Funktionen oder Antigen-spezifität von infiltrierenden T-Zellen bekannt, da die Anzahl von T-Zellen, die z. B. aus Biopsien gewonnen werden können zu gering ist, um Untersuchungen durchführen zu können, die relativ hohe Zellzahlen von ungefähr 10^6 Zellen, wie ein Antigen-spezifitätstest mittels Petidbanken benötigen (159). Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass RPMI-Medien, supplementiert mit 10% Humanserum (HS) oder fötalem Rinderserum (FBS) eine hohe Expansionsrate hervorbringt. Zusätzlich zu der hohen Expansionsleistung verursacht HS-RPMI die wenigsten Veränderungen in der TRBV-Expression bis zum Tag 28, was für eine geringe Verzerrung der expandierten T-Zellpopulation bzw. Klone spricht, und somit als Indiz für die Einhaltung der polyklonalen Expansion ohne wesentlichen bias für bestimmte TRBVs gilt. Autologes Serum in Kombination mit FC (und Phytohaemagglutinin) unterstützt effizient die Expansionskapazität der T-Zellen (276). Humane T-Zellen, die mit FBS kultiviert werden, können durch xenogene Antigenepitope zu HLA Klasse I und HLA Klasse II limitierten FBS-spezifischen T-Zellen gerichtet werden (277-279).

Es kann geschlussfolgert werden, dass für die Expansion von T-Zellen unter der Nutzung eines CD3 spezifischen monoklonalen Antikörpers und FC, Serum-supplementierte, RPMI-basierte Medien eine wesentlich höhere Expansionseffizienz über einen Kulturzeitraum von 28 Tagen ermöglichen als die serumfreien Lymphozyten-spezifischen Medien PanserinTM413 und X-Vivo 15TM. Des Weiteren ist HS-RPMI am besten geeignet, um das initiale TRBV Repertoire zu erhalten. Somit ist HS-RPMI mit der höchsten T-Zellexpansionseffizienz, Reproduzierbarkeit und den geringsten Änderungen der TRBV-Expression das Medium der Wahl für Versuchsansätze, die mehr als 10^6 vitale T-Zellen benötigen.

Nach den vergleichenden *in vitro* Expansionsstudien von T-Zellen mittels *feeder cells* (FC), einem anti-CD3-Antikörper und IL2 sind die aussichtsreichsten Bedingungen für eine effektive, reproduzierbare und das initiale TRBV-Expressionsmuster nicht wesentlich beeinflussenden durch den Einsatz von mit humanem Serum supplementiertem RPMI gegeben. Hingegen führen Expansionen mit fetalem Kälberserum bei vergleichbarer Expansionseffizienz zur Verschiebung des TRBV-Expressionsmusters, und serumfreie, lymphozytenspezifische synthetische Medien erwirken eine ungleich geringere Expansionseffizienz nach 28 Tagen Kultur (ca. 70xfach versus >1,000xfach mit Serum-supplementiertem RPMI). Die Umsetzung dieser methodischen Vorarbeiten an infiltrierenden T-Zellen aus EMBs muss zeigen, ob die zumindest aus diesen Vorarbeiten als hinreichend berechnete Expansionseffizienz ausreichend ist, um mindestens 10^6 T-Zellen zu expandieren, die dann z.B. zur Antigen-spezifitätsprüfung der T-Zell-Infiltrate von DCMi Patienten nach publizierten Methoden eingesetzt werden könnten.

Im Vergleich zu der TRBV-Expression von nicht-expandierten Donor-PBMCs konnten nur in RPMI-HS *in vitro* expandierte T-Zellen ein dem Ausgangszustand vergleichbares TRBV-Expressionsmuster anzeigen, während die RPMI-FCS, und die mit synthetischen, serumfreien Medien geführten T-Zell-Kulturen zu erheblichen (>2-fachen) Verschiebungen der Expression mehrerer TRBV Familien führten.

Diese Untersuchungen zeigen erstmalig den bedeutsamen Einfluss von Medien bei der *in vitro* Expansion von T-Zellen. Die untersuchten serumfreien, synthetischen, Lymphozyten-spezifischen Medien (PanserinTM413 und X-Vivo 15TM) können zumindest für die *in vitro* Expansion von T-Zellen unter Anwendung von FC und den hier gewählten Bedingungen nicht die Expansionseffizienz und die Vitalität der expandierten T-Zellen erreichen, die unter Anwendung von Serum-supplementiertem RPMI-Medium erzielt werden kann. Die deutliche Expressionsverschiebung der TRBV Familien unter X-Vivo 15TM könnte auf den Selektionsbias von CLA (*cutaneous lymphocyte-associated antigen*) exprimierenden T-Zellen zurückzuführen sein, bzw. T-Zellen, die unter X-Vivo 15TM CLA induzieren. Serum hingegen kann die CLA Induktion durch bislang nicht identifizierte Mechanismen inhibieren (283, 284). Die Verschiebung der TRBV-Expression unter RPMI-FCS könnte auf nicht näher identifizierte xenogene Substanzen von FCS zurückzuführen sein, die einen Selektions-Bias der expandierten T-Zellen bedingen könnten (277-279). Die aussichtsreichsten Bedingungen für eine effektive, reproduzierbare und das initiale TRBV-Expressionsmuster nicht wesentlich beeinflussenden *in vitro* Expansion von T-Zellen sind durch den Einsatz von mit humanem Serum supplementiertem RPMI gegeben. Die Umsetzung dieser methodischen Vorarbeiten an infiltrierenden T-Zellen aus Myokardbiopsien

Diskussion

muss zeigen, ob die zumindest aus diesen Vorarbeiten als hinreichend berechnete Expansions-effizienz ausreichend ist, um mindestens 10^6 T-Zellen zu expandieren, die dann z.B. zur Antigen-spezifitätsprüfung der T-Zell-Infiltrate von DCMi Patienten nach publizierten Methoden (159, 249) eingesetzt werden könnten.

4.4 Analyse der Expression der funktionellen T-Zellmarker (FTZM) und des T-Zellrezeptor Vbeta (TRBV) in EMBs

Die T-Zellinfiltration ist ein hauptsächliches, pathogenetisches und diagnostisches Kennzeichen von AMC und DCM, was seit kurzem auch nachteilige, prognostische Auswirkungen aufzeigt (156, 157, 164, 195). Dieser intramyokardiale, inflammatorische Prozess wurde konstant in ca. 50% der Patienten mit AMC und DCM nachgewiesen, was für eine kontinuierliche Auswirkung auf die Krankheitsentwicklung von einer AMC zu einer DCM sprach (18, 25, 226). Gleichmaßen deutet der häufige Nachweis von diversen kardiotropen Viren, wie B19V, HHV6 und CVB in EMBs von AMC- und DCM-Patienten auf eine verursachende Rolle für den Beginn und die Aufrechterhaltung einer DCMi hin (13-15).

Derzeit fehlen immer noch ausführliche Analysen des funktionellen Status der T-Zell-Infiltrate in AMC und DCM, wie auch der direkte Nachweis von antiviralen T-Zellantworten. Solche Analysen würden mehr als nur die bloße Quantifizierung der T-Zell-Infiltrate erfordern und waren bis heute zu großen Teilen durch die geringe, erhältliche EMB-Gewebsmenge limitiert. Eine phänotypische Charakterisierung der entzündlichen Infiltrate ist auch durch immunhistologische Techniken möglich (16, 156, 227), ist aber durch das begrenzte EMB-Gewebe limitiert. Weiterhin kann die Spezifität von Antikörpern nicht mit molekularbiologischen Methoden verglichen werden, noch entspricht die Quantifizierungspräzision der Immunhistochemie den Fähigkeiten der real-time RT-PCR.

Basierend auf einer etablierten, hoch präzisen und reproduzierbaren Präamplifikationstechnik (228), bei der auch die housekeeping Genfunktion von HPRT und CDKN1B für myokardiales Gewebe erarbeitet wurde, war es ein Ziel dieser Arbeit diagnostische Grenzwerte für signifikant erhöhte Genexpression der T-Zell-Gene CD3d, CD3z und TRBC zu bestimmen.

Zweitens wurde eine breite, allgemeine, phänotypische Charakterisierung der T-Zell-Infiltrate in AMC- und DCM-Patienten durch eindeutige, funktionelle T-Zellgene, bestehend aus Th1 (IFN γ , T-bet, Il27, Eomesodermin), Th2 (Il-4, Il-5, GATA-3), Th17 (Il-17), Treg (FoxP3, TGF β , Il-10), Tanerg (GRAIL) und cytotoxischen T-Zellen (CTLs; Perforin, Granulysin und Granzyme A) angestrebt.

Drittens sollten differentielle TRBV-Expressionen mit verschiedenen Viren (B19V, HHV6 und CVB), die in EMBs von AMC- und DCM-Patienten nachweisbar sind, assoziiert werden, da Dominanzen von bestimmten TRBVs antigen-gesteuerte Restriktionen des T-Zellrepertoires widerspiegeln (229).

4.4.1 Potentielle diagnostische Relevanz einer erhöhten Expression von CD3d, CD3z und TRBC in DCMi

Basierend auf der oberen 90-Perzentil Expression von CD3d, CD3z und TRBC in Kontrollen (normalisiert auf HPRT und CDKN1B) konnten signifikante Assoziationen mit dem etablierten immunhistologischen Nachweis einer DCMi gefunden werden. Diese Assoziationen waren vorhanden, obwohl die immunhistologischen und die Genexpressions-Quantifizierungen an 2 verschiedenen EMBs eines Patienten durchgeführt wurden. Es ist hinreichend bekannt, dass der *sampling error* bei immunhistologischen Nachweisen einer DCMi wesentlich niedriger ist im Vergleich zur histologischen Diagnose einer aktiven Myokarditis nach Dallas-Kriterien (156, 158, 191, 230). Jedoch könnten diese Effekte wahrscheinlich einen Einfluss auf diese vergleichende Analyse gehabt haben. Diese Annahme wird durch die höheren Wechselbeziehungen zwischen CD3d, CD3z und TRBC Expressionen gegenüber den Korrelationen dieser T-Zell-assoziierten Gene mit CD3⁺ Infiltraten durch Immunhistologie veranschaulicht. Die Grenzwerte der Genexpressionen, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, können neben der immunhistologischen Diagnose einer DCMi eine relevante Basis für eine molekularbiologische Quantifizierung von T-Zell-Genen in EMBs sein.

4.4.2 Funktionelle Charakterisierung der T-Zell-Infiltrate bei DCMi

Die Daten dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal eine breite phänotypische und funktionelle Charakterisierung der T-Zell-Infiltrate in EMBs von AMC- und DCM-Patienten. Während die T-Zell-assoziierten Gene CD3z und TRBC in AMC- und DCM-Patienten mit erhöhter CD3d Expression signifikant erhöht sind, zeigten die untersuchten FTZM, dass in DCM-Patienten eine Dominanz von TH1, Treg und CTL-Markern vorherrscht. Die verstärkte Expression von Il-4, einem der drei untersuchten Th2 Markergene, spricht dafür, dass auch die Th2 Immunantwort an der T-Zellinfiltration bei der DCMi beteiligt sein könnte. Nichtsdestotrotz war GATA-3 (231, 232), als entscheidender Marker einer Th2-Antwort sowie Il-5 nicht differentiell exprimiert. Die Unterdrückung des Th2-Musters in diesen Patienten könnte auf die bekannten Effekte von TGF β (233), welches signifikant erhöht vorlag, zurückzuführen sein. Das Fehlen einer differentiellen FTZM-Expression in AMC-Patienten könnte auf den Umstand zurückzuführen sein, dass in diesen Patienten keine akute virale Infektionsphase vorliegt (26, 234, 235). Deswegen sind Untersuchungen von T-Zellantworten über definierte Zeitverläufe nach der initialen viralen Infektion, wie bei der experimentellen Myokarditis bei der humanen AMC schwer zu etablieren. Man könnte auf Grund der Daten darauf schließen, dass die T-Zell-Infiltrate bei der humanen AMC keine spezielle funktionelle Dominanz haben, zumindest nicht innerhalb der für diese Untersuchungen ausgesuchten Gene. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit der experimentellen Myokarditis überein. Es wurde eine weitere Diskrepanz zur experimentellen Myokarditis gefunden und zwar das Fehlen einer Th17 Antwort, von welcher vor kurzem gezeigt wurde, dass sie entscheidend in der experimentellen Autoimmun-Myokarditis involviert ist (236). Eine Diskussion, ob Autoimmunität

eine zentrale Rolle in der humanen AMC, basierend auf dem Fehlen von IL-17 in EMBs spielt, bleibt bis jetzt unklar, aber die erhaltenen Ergebnisse sprechen nicht für eine vorrangige Bedeutung der Th17-Antwort in der humanen DCMi. Andererseits kann das Fehlen von IL-17 mit den Beobachtungen von Rangachari et al. übereinstimmen, die zeigen, dass die Autoimmun-Myokarditis und IL-17 durch T-bet unterdrückt werden (237). Das könnte auch für die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sprechen, denn es wurde eine differentielle T-bet Expression in EMBs von DCMi-Patienten gefunden. Das gleiche gilt für Eomesodermin, welches als Schlüssel-molekül zur Th1-Antwort und als wirksamer Inhibitor von IL-17 entdeckt wurde (238). Die Ergebnisse zur differentiellen Expression der FTZM-Gene in der humanen DCMi können bisher nur mit Erkenntnissen der experimentellen viralen Myokarditis diskutiert werden, da Expressionsdaten aus EMBs sehr rar sind. Die Dominanz der Th1-Markergene (IFN γ , T-bet, Eomesodermin, IL-27) im Vergleich zur Th2 T-Zellantwort stimmt mit den Erkenntnissen der CVB-induzierten Myokarditis, in der die entscheidende Rolle von IFN γ und T-bet bekannt ist, überein. Die antivirale T-Zellantwort wird entscheidend durch IFN vermittelt und Tiere, denen die IFN-Antwort fehlt, haben eine sehr schlechte Prognose (45, 222, 239, 240).

Übereinstimmende Einsichten lassen sich von serologischen Studien bei humanen AMC-Patienten herleiten (241). Die Rolle der regulatorischen T-Zellantwort in der experimentellen Myokarditis wurde früh von Loudon et al. (242) behauptet, aber zu dieser Zeit war das wichtigste Gen der Treg FoxP3 noch nicht bekannt. In der experimentellen CVB-induzierten Myokarditis zeigt sich wie wichtig die Treg für den Schutz vor einer übermäßigen Th1 dominierten T-Zellantwort sind (243). In diesem Zusammenhang kann aus den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen abgeleitet werden, dass die erhöhte Expression von FoxP3 und seinem induzierenden Zytokin TGF β in der humanen DCMi möglicherweise mit der generellen Hypothese, dass die Th1-T-Zellantwort durch die Treg ausgeglichen wird und dadurch vor einer potentiellen zerstörenden unbändigen Th1-Antwort, die für die Viruseliminierung entscheidend ist, schützt (244, 245). Das Fehlen einer differentiellen GRAIL Expression unterstützt nicht die Hypothese, dass anerge T-Zellen (Tanerg) entscheidend in die *counter-balance* der humanen DCMi eingreifen. Cytotoxische T-Zellen sind mit einer verstärkten inflammatorischen Antwort, einer stärker ausgeprägten Fibrose und einer kontinuierlichen Myozytolyse in der experimentellen CVB-induzierten Myokarditis und der humanen DCMi assoziiert (42, 223, 246-248). Bis jetzt ist es unklar, ob CTLs durch Treg reguliert werden. Die Charakterisierung der FTZM-Expressionsmuster der DCMi deckt sich interessanterweise mit der differentiellen FTZM-Expression von B19V-antigen spezifischen T-Zellen in einem Patienten nach akuter B19V Virämie (249), was eine Rolle von durch Th1, Treg und CTLs dominierte T-Zellantwort bei der viralen Elimination impliziert. Weitere Studien sind erforderlich, um die Rolle der differentiellen FTZM-Expression bei der antiviralen und Autoimmun-Pathogenese an der humanen DCMi zu entschlüsseln.

4.4.3 Virus-assoziierte differentielle TRBV-Expression

Die differentielle Dominanz bestimmter funktioneller TRBV-Familien in Assoziation mit verschiedenen kardiotropen Viren spricht für eine antivirale Spezifität oder eine virus-induzierte T-Zellantwort in den betreffenden Patientengruppen. In B19V positiven Patienten liegen TRBV11 und 24, in HHV6 positiven Patienten TRBV4, 10 und 28 und in CVB positiven Patienten liegt TRBV14 dominant vor. Interessanterweise wurde auch eine TRBV11 Dominanz in den antigenspezifischen T-Zellen eines Patienten nach einer akuten B19V Virämie nachgewiesen (249). Die zusätzlich nachgewiesene TRBV24 Dominanz ist vermutlich auf die größere genetische Heterogenität der Patientengruppe zurückzuführen.

Während die prognostische Bedeutung einer B19V Persistenz in ausgewählten DCM-Patienten mit B19V Persistenz gezeigt werden konnte, fehlt in dieser Arbeit der Beweis einer prognostischen Relevanz des bloßen nPCR Nachweises von B19V Genomen in AMC-Patienten. Die Relevanz des P19V Genomnachweises in AMC ist bis jetzt umstritten, auf Grund der Unfähigkeit zwischen Fällen mit akuten replizierenden B19V Infektionen und Fällen mit einer asymptomatischen lebenslangen B19V Persistenz nur durch nPCR zu unterscheiden (195, 250). Das Fehlen einer B19V assoziierten TRBV-Dominanz in AMC-Patienten mit einer erhöhten TRBC-Expression dürfte durch die zuvor beschriebene Situation begründet sein. Potentiell wichtige zusätzliche Untersuchungen wie die B19V Proteinexpression und die Differenzierung von anti-B19V humoralen Mustern (234, 251) war für diese Patienten nicht möglich. Gegenwärtig können die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nicht direkt mit anderen humanen Daten verglichen werden. Daten zu HHV6-assoziierten TRBV Dominanzen sind nicht erhältlich.

Bis jetzt sind nur begrenzte Daten zur TCR Vbeta Dominanz bei humaner DCM verfügbar. Luppi et al. beschreiben eine eingeschränkte Verwendung von V β 3, 7 und 13,1 Familien (153). Diese Daten sind nicht direkt mit den hier ermittelten Daten zu vergleichen, aufgrund der diversen Unterschiede in der angewandten Methodik und Patientenauswahl. Luppi et al. wendeten verschiedene Nachweistechniken basierend auf den bekannten TCR Vbeta Sequenzen und der Nomenklatur von Rowen et al. an (252). Diese wurden durch die Immunogenetics Nomenklatur (<http://imgt.cines.fr>), welche in dieser Arbeit für das Design der verwendeten Genexpressions-Assays für die präamplifizierte real-time RT-PCR genutzt wurden, ersetzt (228, 249, 253, 254). CDR3 spectratyping erfüllt nicht die Präzision der Genexpressions-Quantifizierung der real-time RT-PCR. Das CDR3 spectratyping hängt stark von den PCR-Ergebnissen von 24 verschiedenen TCR- β PCRs ab. Das eingeschränkte TCR-V β Expressionsprofil wird als relativer Anstieg der bestimmten PCR-Produkte in den entsprechenden Geweben interpretiert. Aber das CDR3 *spectratyping* zielt auf die Analyse der TCR Vbeta Klonalität ab.

Unsere Untersuchungen befassten sich hauptsächlich mit der präzisen Quantifizierung der funktionellen TRBV Familien. Weiterhin untersuchten Luppi et al. nur drei Kinder mit fulminanter Myokarditis. Eine differentielle Assoziation der TRBV Dominanz mit verschiedenen kardiotropen Viren wurde in deren Analyse nicht durchgeführt. Was die FTZM betrifft, sind weitere Studien erforderlich, um die Beteiligung der differentiellen TRBV-Expression bei der antiviralen und der

Diskussion

Autoimmunpathogenese- an der humanen DCMi zu entschlüsseln. Wesentlich für das letztere wäre unter anderem die Assoziation mit dem Nachweis von bestimmten antikardialen Antikörpern (255-259).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit Schwellenwerte für eine erhöhte Genexpression von T-Zell-assoziierten Genen geboten werden, die möglicherweise einen diagnostischen Einfluss erlangen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die chronischen T-Zell-Infiltrate von DCMi-Patienten von Th1 T-Zellen und CTLs dominiert werden, welche wahrscheinlich durch Tregs ausgeglichen werden. Demgegenüber bestätigen die Daten nicht, dass Th17 und Treg eine überragende Rolle in der humanen DCMi spielen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die B19V Persistenz in DCMi Patienten mit einer TRBV11 und 24 Dominanz assoziiert ist, wohingegen HHV6 mit einer TRBV4, 10 und 28, und CVB mit einer TRBV14 Dominanz assoziiert sind. Diese Einsichten bilden die Basis für weitere Studien, um die klinische und prognostische Bedeutung für das diagnostische Vorgehen bei unterschiedlichen natürlichen Verläufen der Krankheit aufzuklären

4.5 TRBV-Dominanz und funktionelle Charakterisierung von B19V-antigenspezifischen T-Zellen aus PBMCs bei B19V-assoziiierter DCMi

Der Patient, bei welchem B19V-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden konnten, präsentierte sich mit Anzeichen und Symptomen, die auf eine akute Myokarditis hinweisen (13, 18). Die DCMi wurde durch Immunhistologie (3, 174) bestätigt. Laut Dallas-Kriterien (260) gab es keine aktive Myokarditis. Die stimmt mit der wesentlich höheren Sensitivität der immunhistologischen EMB Bewertung im Vergleich mit den Dallas-Kriterien (174, 191, 261) überein. Parvovirus B19 (B19V) ist der am häufigsten nachgewiesene Virus in Patienten mit einer akuten Myokarditis oder DCM/DCMi (13, 14, 17, 262). Bei den meisten der seriell untersuchten DCMi-Patienten wird das B19V Genom in EMBs, aber nicht in PBMCs oder Seren nachgewiesen. In diesem besonderen Fall war die B19V Viruslast in den EMBs und PBMCs zum Zeitpunkt der initialen Präsentation fast gleich hoch, was einer akuten B19V Virämie mit einer aktiven Virusreplikation hindeutet. Während es bekannt ist, dass IgG komplexierte Virenpartikel von mononukleären Phagozyten durch den Fc-Rezeptor oder rezeptorvermittelter Phagozytose aufgenommen werden, spricht der Fakt, dass das B19V Genom mit einer quantifizierbaren Anzahl von Viruskopien im Serum vorkommt für das Vorhandensein einer Virämie. Bei den Nachfolgeuntersuchungen hingegen wurde das B19V Genom nur noch in den EMBs und nicht mehr in den PBMCs oder dem Serum nachgewiesen. Die B19V Viruslast nahm in den EMBs über die Zeit deutlich ab, war aber zu jedem Untersuchungszeitpunkt nachweisbar. Unter konventioneller Herzinsuffizienzmedikation nahm die LVEF zu und der LVEDD nahm ab, während die intramyokardiale Entzündung am zweiten Zeitpunkt der Untersuchung abgenommen hat und am dritten Zeitpunkt nicht mehr nachzuweisen war. Die Änderungen der Herzfunktionswerte über die Zeit und die EMB Befunde stimmen mit der Hypothese überein, dass die initiale antivirale Immunantwort in einer massiven Reduktion oder Eliminierung des Virus mit einer anschließenden Verbesserung der LV Funktion und einer Abnahme der LV Dilatation resultiert (15, 23). Der Zeitablauf der B19V Infektion spiegelt sich ebenfalls in den serologischen B19V Befunden wider. Der B19V IgM Titer zur initialen Präsentation weist auf eine akute B19V Infektion mit einer Serokonversion an den Folgezeitpunkten hin, während das Auftreten der NS1-spezifischen IgG eine persistierende B19V Infektion 6 und 12 Monate nach der akuten Phase indiziert (263, 264).

Es wurde zuvor berichtet, dass die CD8⁺ T-Zellantwort mehrere Peptide hauptsächlich innerhalb des nicht-strukturellem (non-structural) Proteins 1 (NS1) in Erwachsenen mit symptomatischer B19V Infektion als Ziel hat und dass diese Antworten für mehr als 2 Jahre nach der akuten Erkrankung persistieren können (265, 266). In Übereinstimmung damit sind die Haupt-T-Zellantworten dieses Patienten gegen Peptide des NS1 Proteins gerichtet. Übereinstimmend mit Berichten über die Entwicklung der B19V spezifischen zellulären Antwort in Erwachsenen mit einer akuten Infektion wurde in dieser Arbeit eine spezifische CD8⁺ T-Zellantwort mit mehreren Ausprägungen, welche über die Zeit abnahmen [5,10]. Da die Antworten nur nach 10 und 12 Monaten gemessen wurden, mit einer Abnahme der Antwort bei 12 Monaten, wird davon aus-

gegangen, dass die Höchstwerte sogar noch höher als an Monat 10 gemessen sind. Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Studien überein, die zeigen, dass die T-Zellantwort trotz Rückgang der klinischen Symptome zunimmt und hauptsächlich NS1 angreift (267). Die Demonstration von zusätzlichen Effektor-Funktionen dieser B19V spezifischen T-Zellen stimmt überein mit einer erhöhten Transkription der Th1 (s. Ergebnis-Teil) und CTL-Marker in SALK- und GLCP-spezifischen Zellen, wie es in dieser Arbeit gezeigt wird. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die beobachtete anhaltende CD8⁺ T-Zellantwort durch eine B19V Persistenz oder eine verzögerte Elimination des Virus im Endomyokard stimuliert wird. Die anhaltende Präsenz des Virus im Gewebe, obwohl die Viruslast sinkt, war eine wahrscheinliche Quelle für die kontinuierliche Antigenexposition der CD8⁺ T-Zellen in diesem Patienten. Die hohe Viruslast in den EMBs deutet an, dass das Myokard ein Ziel für B19V spezifische T-Zellen ist. Es kann im Gesamtkontext davon ausgegangen werden, dass die B19V antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen entscheidend für die Eliminierung des Virus in den PBMCs und der deutlichen Abnahme der B19V Viruslast in den EMBs ist. Der Mechanismus der Viruseliminierung ist nicht vollständig klar, aber wahrscheinlich funktioniert es über die Zytotoxizität, auf Grund der in den SALK- und GLCP-spezifischen Zellen gefundenen Typ-1 und CTL-Dominanzen.

Es wurden neben den stark ausgeprägten CD8⁺ auch CD4⁺ T-Zellantworten durch die 13 AS Peptide IQSALK und den darin befindlichen Sequenzen SALK und QSAL ausgelöst. Diese Antworten wurden ursprünglich mit einer 10 AS Peptidbibliothek identifiziert, was nicht optimal zu Stimulation von CD4⁺ T-Zellen ist. Es sind zuvor niedrige Frequenzen von spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten nach einer akuten B19V Infektion beschrieben (268). Diese Ergebnisse, sowie die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine Rolle von CD4⁺ T-Zellen in der B19V Eliminierung und möglicherweise in der Pathogenese von Autoimmunphänomenen hin.

Ein zusätzliches Ziel dieser Analyse war die Charakterisierung von B19V-reaktiven T-Zellen hinsichtlich der TRBV Verwendung und Funktionalität. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen überein mit einem stark eingeschränkten TRBV Repertoire von Virus-induzierten Memory T-Zellen und einer Typ-1/CTL Polarisation der T-Zell-vermittelten antiviralen Immunantwort (229, 267, 269). Die Unterschiede in der Typ-1/Typ-2, CTL und Treg Markerexpression resultiert höchstwahrscheinlich aus der Dominanz der CD8⁺ T-Zellen in der sortierten Subpopulation im Vergleich zu den unselektierten oder negativ selektierten Populationen und spiegelt die Zusammensetzung der B19V reaktiven Population wider. Die T-Zellvermittelten Antworten werden von reaktiven TRBV Familien über Interaktionen mit HLA-präsentierenden Antigenen vermittelt (229). Ein stark eingeschränktes TRBV Repertoire der CD8⁺ T-Zellantwort in persistierenden B19V Infektionen wurde von Kasproicz et al. berichtet (TRBV5.1 in HLA-A*2402 positiven Individuen) (269). Meine Ergebnisse bestätigen ein stark eingegrenztes TRBV11 Repertoire von NS1-spezifischen CD8⁺ Effektor-T-Zellen in diesem HLA-A*02, A*11, B*07 Patienten mit einer B19V assoziierten DCMi.

Es ist zuvor gezeigt worden, dass B19V Genome in mehreren humanen Geweben in gesunden Individuen und Patienten persistieren (270). Daher bleibt die biologische Signifikanz der bloßen Anwesenheit des B19V Genoms in myokardialen Gewebe ohne klinische Beweise für eine fortgeschrittene myokardiale Erkrankung und/oder Beweise einer antiviralen Immunantwort bis jetzt

unklar. Nichtsdestotrotz wurde die klinische Bedeutung von B19V in DCMi in einer progressiven Studie gezeigt, in der sich die LVEF von DCMi Patienten mit einer viralen Eliminierung deutlich verbesserte, wohingegen sich die LVEF in Patienten mit bewiesener Viruspersistenz weiter verschlechterte (15). Weiterhin hat die virale Infektion einschließlich B19V einen unabhängig nachteiligen prognostischen Einfluss bei Patienten mit EMB-bestätigter Myokarditis (271). Diese Untersuchungen bieten einen indirekten Beweis dafür, dass die Viruseliminierung für eine funktionelle Verbesserung in der DCMi erforderlich ist. Wenn die antivirale Immunantwort, wie in dieser Arbeit gemessen, ein Korrelat der effektiven B19V Eliminierung war, dann sind solche Untersuchungen frühzeitig im Krankheitsverlauf möglicherweise ein nützlicher Ersatzmarker, für einen günstigen Verlauf der B19V assoziierten DCMi.

Die identifizierten Epitope mit den höchsten B19V CD8⁺ IFN γ Antworten (SALK und QSAL) bieten die Grundlage für die Entwicklung von Tetrameren oder Pentameren, die letztlich bei HLA 02 Patienten (ca. 40% der weißen / „caucasian“ Bevölkerung) für eine methodisch relativ einfach umzusetzende Identifizierung von B19V-NS1 antigenspezifischen T-Zellen in PBMCs, aber letztlich auch in EMBs, eingesetzt werden könnten.

5 Zusammenfassung

Die akute Myokarditis (AMC) und die erworbene dilatative Kardiomyopathie (DCM) sind in den westlichen Ländern überwiegend auf eine Virus-induzierte intramyokardiale Entzündung zurückzuführen. Die am häufigsten in Endomyokardbiopsien (EMBs) von Patienten mit der klinischen Präsentation einer AMC oder DCM nachgewiesenen Virusgenome sind insbesondere Parvovirus B19 (B19V), das humane Herpes Virus Typ 6 (HHV6), Enteroviren (EV, vor allem Coxsackieviren Typ B /CVB), Adenoviren (ADV) und das Epstein-Barr-Virus (EBV). Abgeleitet von tierexperimentellen Einblicken der CVB induzierten murinen Myokarditis wird davon ausgegangen, dass eine initial starke zelluläre Immunantwort im Rahmen einer AMC zur schnellen Viruselimination und Ausheilung führt, während eine protrahierte oder abgeschwächte Immunantwort in Erregerpersistenz und Chronifizierung der Entzündung resultiert. Diese chronifizierte intramyokardiale Entzündung kann sich bei genetisch prädisponierten Individuen sekundär durch molekulares Mimikry auch gegen kryptische myokardiale Antigene richten, was unabhängig von der Viruselimination oder –persistenz zu einer Chronifizierung der nunmehr auch anti-kardialen Immunantwort und zur Entwicklung einer inflammatorischen Kardiomyopathie (DCMi) beiträgt. Eine chronische Aktivierung des Immunsystems, die sich gegen ein spezifisches (virales oder Auto-) Antigen richtet, kann zu einer deutlichen Einschränkung der Zahl spezifisch reaktiver T-Zellen in den Zielorganen führen (oligoklonale Expansionen), die mit modernen molekularbiologischen Methoden detektiert werden kann.

Die für die Detektion von klonalen TRBV-Umlagerungen in Lymphomen etablierten BIOMED-2 Primersysteme haben sich in Vorversuchen als nicht anwendbar auf die TRBV-Untersuchungen bei Herzmuskelgewebe von DCM-Patienten herausgestellt, weil aus der relativ geringen T-Zell-Infiltration Pseudomonoklonalitäten mittels dieses methodischen Ansatzes resultieren. Eine Zielstellung dieser Doktorarbeit war es daher, ein alternatives, valides System zur TRBV-Expressionsanalyse zu entwickeln. Es wurde ein TRBV real-time RT-PCR Primer-/Sondensystem für die Quantifizierung der funktionellen humanen und murinen TRBV-Familien etabliert, das zur sensitiven und spezifischen Erfassung der relativ gering ausgeprägten T-Zellinfiltration bei DCMi geeignet ist. In diesem Rahmen sind auch neben einer effektiven RNA-Extraktion und cDNA Umschreibung der relativ geringen RNA-Mengen aus EMBs auch Präamplifikationsverfahren getestet und etabliert worden. Als effektives, präzises, reproduzierbares und die Präamplifikationsuniformität nur geringfügig verschiebendes Präamplifikations-(PreAmp) Verfahren hat sich hierbei das auf der Basis des Taqman® *preamplification* Kits modifizierte T-PreAmp Verfahren erwiesen, das eine Genexpressionsanalyse von rechnerisch bis zu 784 Zielgenen aus jeweils einer EMB ermöglicht. Unter Einsatz dieses T-PreAmp Verfahrens konnte eruiert werden, dass auch das komplexe TRBV/TRBC gene assay Design, bestehend aus einem gemeinsamen TRBV reverse primer und 24 verschiedenen TRBV *forward* Primern den Präamplifikationsuniformitätsvorgaben zwischen -1,5 bis +1,5 bezogen auf das Referenz *gene assay* CDKN1B entspricht. Erste Ergebnisse zeigten eine mit der immunhistologischen Diagnostik der DCMi assoziierte Regulation von 32 der 91 untersuchten Zielgene. Der Einsatz

Zusammenfassung

der T-PreAmp real-time RT-PCR zur exakten Quantifizierung einer breiten Auswahl von u.a. immunkompetenten und an der Immunregulation beteiligten Genen ist somit methodisch etabliert, und steht für weitere Untersuchungen inflammatorischer Prozesse bei der DCMi, z.B. zur Ergreifung der prognostischen Wertigkeit der Genexpression im variablen natürlichen Erkrankungsverlauf sowie dem Einfluss immunmodulatorischer Therapieregimes bei DCMi-Patienten offen.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit zur quantitativen Erfassung der Dominanz von funktionellen TRBV Familien an einem definierten Tiermodell der CVB induzierten chronischen Myokarditis Untersuchungen an SWR-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der CVB-Infektion durchgeführt. Die Untersuchungen sollen exemplarisch aufzeigen, welche TRBV-Dominanzen in diesem Myokarditis-Tiermodell unter identischem genetischen Hintergrund entstehen, und welchen dynamischen Verlauf diese TRBV Dominanzen im Verlauf nach der akuten Virus-induzierten Myokarditis aufweisen. Diese TRBV-Expressionsanalysen vermitteln wichtige Aspekte der T-Zell-Antwort bei der CVB-induzierten murinen und der humanen DCMi. Insbesondere bei der CVB-induzierten Myokarditis ergeben sich mannigfaltige Potentiale zur experimentellen Intervention, z.B. durch gezielte Suppression der TRBV3-Expression, zur Bedeutung von TRBV3 bei transgenen oder *knock out* SWR Mäusen, und ferner auch den Einflüssen von immunmodulatorischen (z.B. antiviralen IFN) Therapien. Künftigen longitudinalen Studien bleibt es zu klären, welche prognostische Bedeutung die Dominanz von bestimmten TRBVs hat, und wie sich die TRBV Expression im natürlichen Verlauf der Erkrankung, sowie unter immunmodulatorischen Therapieregimes (pharmakologische Immunsuppression mit Kortikosteroiden, Immunadsorption, antivirale IFN-Therapie) entwickelt.

Bei einem Patienten mit akuter B19V Virämie und B19V assoziierter AMC konnten in PBMCs antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden, die sich mit einer hohen Frequenz gegen die NS1-Peptide SALKLAIYKA257-266 (SALK; 19,7%) und QSALKLAIYK256-265 (QSAL; 10%), und mit einer niedrigeren Frequenz gegen GLCPHCINVG613-622 (GLCP; 0,71%) und LLHTDFEQVM276-285 (LLHT; 0,06%) richten. Die Charakterisierung der SALK- und GLCP-reaktiven T-Zellen zeigte eine deutliche TRBV11 Dominanz bei diesem HLA A*02, A*11, B*07 typisierten Patienten, sowie eine Th1- (IFN γ , IL2, IL27, T-bet) und eine CTLs-dominierte (Perforin, Granzyme B) funktionelle Zuordnung der zellulären Immunität, während Markergene, die Th2- und regulatorische T-Zellen charakterisieren (GATA3, IL4, FoxP3), keine differentielle Expression zeigten. Die identifizierten Epitope mit den höchsten B19V CD8⁺ IFN γ Antworten (SALK und QSAL) bieten die Grundlage für die Entwicklung von Tetrameren oder Pentameren, die letztlich bei HLA 02 Patienten für eine methodisch einfach umzusetzende Identifizierung von B19V-NS1 antigenspezifischen T-Zellen in PBMCs aber letztlich auch in EMBs eingesetzt werden könnten.

Nach den vergleichenden *in vitro* Expansionsstudien von T-Zellen aus PBMCs mittels *feeder cells* (FC), einem anti-CD3-Antikörper und IL2 sind die aussichtsreichsten Bedingungen für eine effektive, reproduzierbare und das initiale TRBV-Expressionsmuster nicht wesentlich beeinflussenden durch den Einsatz von mit humanem Serum supplementiertem RPMI gegeben. Hinge-

Zusammenfassung

gen führen Expansionen mit fetalem Kälberserum bei vergleichbarer Expansionseffizienz zur Verschiebung des TRBV-Expressionsmusters, und serumfreie, lymphozytenspezifische synthetische Medien erwirken eine ungleich geringere Expansionseffizienz nach 28 Tagen Kultur (ca. 70xfach versus >1,000xfach mit Serum-supplementiertem RPMI). Die Umsetzung dieser methodischen Vorarbeiten an infiltrierenden T-Zellen aus EMBs muss zeigen, ob die zumindest aus diesen Vorarbeiten als hinreichend berechnete Expansionseffizienz ausreichend ist, um mindestens 10^6 T-Zellen zu expandieren, die dann z.B. zur Antigen-spezifitätsprüfung der T-Zell-Infiltrate von DCMi Patienten nach publizierten Methoden eingesetzt werden könnten.

6 Summary

Acute myocarditis (AMC) and acquired dilative cardiomyopathy (DCM) are predominantly caused by virus induced intramyocardial inflammation in western civilisation. The most frequently detected viruses in EMBs of patients with clinical presentation of AMC or DCM are Parvovirus B19 (B19V), human herpesvirus type 6 (HHV6), enteroviruses (EV, especially Coxsackievirus B/CVB), adenovirus (ADV) and Epstein-Barr-virus (EBV). Based on insights of the CVB induced murine myocarditis it is expected that an initially strong cellular immune response according to an AMC leads to fast virus elimination and healing whereas a decelerated or weakened immune response results in virus persistence and chronic inflammation. These chronic intramyocardial inflammations can lead to an inflammatory cardiomyopathy (DCMi). A chronic activation of the immune system can result in a considerable restriction of the reactive T cells in the target organs (oligoclonal expansion), which can be detected with modern biomolecular methods.

Preliminary tests showed that the BIOMED-2 primer system is not applicable for the detection of clonal TRBV rearrangements in myocardial tissue from DCM patients. Because of the relatively low T cell infiltration mostly pseudo monoclonalities were detected. One goal of this dissertation was to develop an alternative valid system for TRBV expression analysis. A TRBV real-time RT-PCR system for the quantification of functional human and murine TRBV families has been established, which is suited for sensitive and specific detection of relatively low pronounced T-cell infiltrations in DCMi. In this matter besides an effective RNA extraction and cDNA synthesis of low RNA amounts a preamplification method was tested and established. Based on the Taqman® preamplification kit, the modified T-PreAmp procedure showed to be an effective, precise, reproducible and the preamplification uniformity only marginally shifting preamplification method, which allows a gene expression analysis of up to 784 target genes from one EMB. First results show that in immunohistologically diagnosed DCMi 32 out of the 91 investigated target genes are regulated. The application of the T-PreAmp real-time RT-PCR for exact quantification of a broad range of immunocompetent and immunoregulating genes is therefore methodically established and is available for further investigations of inflammatory processes in DCMi patients.

Furthermore, in this work, investigations for the quantitative detection of the dominance of functional TRBV families in a defined animal model of CVB-induced chronic myocarditis in SWR mice at various times after infection with CVB were carried out. These studies are to show which TRBV dominances arise in this myocarditis model under an identical genetic background and which dynamic progress these TRBV dominances show in the course of the virus induced myocarditis.

These TRBV expression analyses provide important aspects of T-cell response in the CVB-induced murine and human DCMi. Particularly in the CVB-induced myocarditis many potentials for experimental intervention arise, such as targeted suppression of TRBV4 expression, the importance of TRBV4 in transgenic or knock out SWR mice, and also the influence of immuno-

Summary

modulatory (eg antiviral IFN) therapies. It remains future longitudinal studies to clarify the prognostic significance of the dominance of certain TRBVs, and how the TRBV expression develops in the natural course of the disease, as well as under immunomodulatory therapy regime (pharmacologic immunosuppression with corticosteroids, immunoadsorption, antiviral IFN-therapy).

In PBMCs of a patient with acute B19V viraemia and B19V associated AMC antigen-specific CD8⁺ T-cells could be detected which target with a high frequency against NS1 peptides SALK-LAIYKA257-266 (SALK; 19,7%) and QSALKLAIYK256-265 (QSAL; 10%), and lower frequencies against GLCPHCINVG613-622 (GLCP; 0,71%) and LLHTDFEQVM276-285 (LLHT; 0,06%). The characterization of the SALK and GLCP-reactive T cells showed a clear dominance of TRBV11 in this HLA A*02, A*11, B*07 typified patient and a Th1-(IFN γ , IL2, IL27, T-bet) and CTLs-dominated (Perforin, Granzyme B) functional mapping of the cellular immunity, while marker genes which characterise Th2- and regulatory T cells (GATA3, IL4, FoxP3) showed no differential expression. The identified epitopes with the highest B19V CD8⁺ IFN γ answers (SALK and QSAL) provide the basis for the development of tetra- or pentameres that in HLA 02 patients could be used for a simple identification of B19V-NS1 antigen-specific T cells in PBMCs but ultimately, in EMBs.

According to comparative *in vitro* expansion studies of T cells from PBMCs using feeder cells (FC), an anti-CD3 antibody and IL2 the most promising conditions for an effective, reproducible, and the initial TRBV expression patterns not significantly influencing are given by the use of RPMI supplemented with human serum. In contrast, expansions with fetal calf serum with similar expansion efficiencies lead to a displacement of the TRBV expression pattern, and serum-free, synthetic lymphocyte-specific media obtain a much lower efficiency of expansion after 28 days of culture (approximately 70 fold versus > 1.000 fold with serum supplemented RPMI). The implementation of this methodic preliminary work on infiltrating T-cells from EMBs must show whether the calculated expansion efficiency is sufficiently adequate to expand at least 10⁶ T-cells which then could be used to examine for example the antigen specificity of T-cell infiltrates of DCMi patients after published methods.

7 Literatur

References:

1. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Waltz DA, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report--2006. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25 (8):869-79.
2. Olbrich HG. [Epidemiology-etiology of dilated cardiomyopathy]. *Z Kardiol* 2001; 90 Suppl 1 2-9.
3. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93 (5):841-2.
4. Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiß HP, Kühl U. Diagnosis, Etiopathogenic Differentiation and Immunomodulatory Treatment of Inflammatory Cardiomyopathy. In: Columbus F, ed. Progress in Inflammation Research. Vol. in press. New York: Nova Science Publishers, 2004.
5. Schulz-Menger J, Maisch B, Abdel-Aty H, Pankuweit S. Integrated biomarkers in cardiomyopathies: cardiovascular magnetic resonance imaging combined with molecular and immunologic markers--a stepwise approach for diagnosis and treatment. *Herz* 2007; 32 (6):458-72.
6. Pankuweit S, Funck R, Grimm W, Maisch B. [Diagnosis and treatment of inflammatory heart diseases: role of endomyocardial biopsy]. *Herz* 2006; 31 (4):361-5.
7. Schultheiss HP, Kühl U. [State of diagnostics and therapy of inflammatory cardiomyopathie.]. *Internist (Berl)* 2008; 49 (1):7-16.
8. Staudt A, Felix SB. Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy. *Transfus Apher Sci* 2007; 37 (2):187-90.
9. Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schonian U, Maisch B. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results. *Herz* 2000; 25 (3):279-85.
10. Coletta AP, Clark AL, Cleland JG. Clinical trials update from the Heart Failure Society of America and the American Heart Association meetings in 2008: SADHART-CHF, COMPARE, MOMENTUM, thyroid hormone analogue study, HF-ACTION, I-PRESERVE, {beta}-interferon study, BACH, and ATHENA. *Eur J Heart Fail* 2009; 11 (2):214-9.
11. Why HJ, Meany BT, Richardson PJ, Olsen EG, Bowles NE, Cunningham L, Freeke CA, Archard LC. Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1994; 89 (6):2582-9.

12. Fujioka S, Kitaura Y, Ukimura A, Deguchi H, Kawamura K, Isomura T, Suma H, Shimizu A. Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36 (6):1920-6.
13. Kühl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CP, Seeberg B, Krautwurm L, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108 (8):945-50.
14. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 2005; 111 (7):887-93.
15. Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005; 112 (13):1965-70.
16. Angelini A, Calzolari V, Calabrese F, Boffa GM, Maddalena F, Chioin R, Thiene G. Myocarditis mimicking acute myocardial infarction: role of endomyocardial biopsy in the differential diagnosis. *Heart* 2000; 84 (3):245-50.
17. Pankuweit S, Moll R, Baandrup U, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Hum Pathol* 2003; 34 (5):497-503.
18. D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, Sinagra G, Di Lenarda A, Silvestri F, Di Sciascio G. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart* 2001; 85 (5):499-504.
19. McCarthy RE, 3rd, Boehmer JP, Hruban RH, Hutchins GM, Kasper EK, Hare JM, Baughman KL. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med* 2000; 342 (10):690-5.
20. Poller W, Fechner H, Noutsias M, Tschoepe C, Schultheiss HP. Highly variable expression of virus receptors in the human cardiovascular system Implications for cardiotropic viral infections and gene therapy. *Z Kardiol* 2002; 91 (12):978-91.
21. Woodruff JF. Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol* 1980; 101 (2):425-84.
22. Maisch B, Richter A, Sandmoller A, Portig I, Pankuweit S. Inflammatory dilated cardiomyopathy (DCMI). *Herz* 2005; 30 (6):535-44.
23. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 2001; 104 (9):1076-82.
24. Parrillo JE. Inflammatory cardiomyopathy (myocarditis) : which patients should be treated with anti-inflammatory therapy? *Circulation* 2001; 104 (1):4-6.
25. Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC, Schultheiss HP, Kuhl U. Immunomodulatory treatment strategies in inflammatory cardiomyopathy: current status and future perspectives. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004; 2 (1):37-51.
26. Dennert R, Crijns HJ, Heymans S. Acute viral myocarditis. *Eur Heart J* 2008.
27. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 1999; 99 (8):1091-100.

28. Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, Lawson CM, Rose NR. From infection to autoimmunity. *J Autoimmun* 2001; 16 (3):175-86.
29. Wilson FM, Miranda QR, Chason JL, Lerner AM. Residual pathologic changes following murine coxsackie A and B myocarditis. *Am J Pathol* 1969; 55 (2):253-65.
30. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation* 1996; 94 (11):2930-7.
31. Matsumori A. Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cardiomyopathy--role of viruses, cytokines, and nitric oxide. *Jpn Circ J* 1997; 61 (4):275-91.
32. Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, Takaku F, Yazaki Y. Expression of perforin in infiltrating cells in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Circulation* 1991; 84 (2):788-95.
33. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 2000; 343 (19):1388-98.
34. Chow LH, Beisel KW, McManus BM. Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Lab Invest* 1992; 66 (1):24-31.
35. Herzum M, Ruppert V, Kuytz B, Jomaa H, Nakamura I, Maisch B. Coxsackievirus B3 infection leads to cell death of cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26 (7):907-13.
36. McManus BM, Chow LH, Wilson JE, Anderson DR, Gulizia JM, Gauntt CJ, Klingel KE, Beisel KW, Kandolf R. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68 (2):159-69.
37. Melnick JL. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology*. Philadelphia: Lipincott-Raven publishers, 1996:655-71.
38. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton KU. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med* 1999; 5 (3):320-6.
39. Herzum M, Weller R, Jomaa H, Wietzychowski F, Pankuweit S, Mahr P, Maisch B. Left ventricular hemodynamic parameters in the course of acute experimental coxsackievirus B 3 myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27 (8):1573-80.
40. Godeny EK, Gauntt CJ. Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol* 1987; 139 (3):913-8.
41. Godeny EK, Gauntt CJ. Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis. *J Immunol* 1986; 137 (5):1695-702.
42. Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Evidence of perforin-mediated cardiac myocyte injury in acute murine myocarditis caused by Coxsackie virus B3. *J Pathol* 1993; 170 (1):53-8.
43. Henke A, Mohr C, Sprenger H, Graebner C, Stelzner A, Nain M, Gemsa D. Coxsackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 in human monocytes. *J Immunol* 1992; 148 (7):2270-7.
44. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7 145-73.

45. Seko Y, Takahashi N, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus b3. *J Pathol* 1997; 183 (1):105-8.
46. Seko Y, Tsuchimochi H, Nakamura T, Okumura K, Naito S, Imataka K, Fujii J, Takaku F, Yazaki Y. Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3. *Circ Res* 1990; 67 (2):360-7.
47. Seko Y, Matsuda H, Kato K, Hashimoto Y, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J Clin Invest* 1993; 91 (4):1327-36.
48. Huber SA, Polgar J, Schultheiss P, Schwimbeck P. Augmentation of pathogenesis of coxsackievirus B3 infections in mice by exogenous administration of interleukin-1 and interleukin-2. *J Virol* 1994; 68 (1):195-206.
49. Nakano A, Matsumori A, Kawamoto S, Tahara H, Yamato E, Sasayama S, Miyazaki JI. Cytokine gene therapy for myocarditis by in vivo electroporation. *Hum Gene Ther* 2001; 12 (10):1289-97.
50. Neumann DA, Lane JR, Allen GS, Herskowitz A, Rose NR. Viral myocarditis leading to cardiomyopathy: do cytokines contribute to pathogenesis? *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68 (2):181-90.
51. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 2002; 106 (1):130-5.
52. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 1986; 163 (5):1037-50.
53. Ruppert J, Peters JH. IL-6 and IL-1 enhance the accessory activity of human blood monocytes during differentiation to macrophages. *J Immunol* 1991; 146 (1):144-9.
54. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8 253-78.
55. Kanda T, McManus JE, Nagai R, Imai S, Suzuki T, Yang D, McManus BM, Kobayashi I. Modification of viral myocarditis in mice by interleukin-6. *Circ Res* 1996; 78 (5):848-56.
56. Tanaka T, Kanda T, McManus BM, Kanai H, Akiyama H, Sekiguchi K, Yokoyama T, Kurabayashi M. Overexpression of Interleukin-6 Aggravates Viral Myocarditis: Impaired Increase in Tumor Necrosis Factor- alpha. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33 (9):1627-35.
57. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257 (5068):387-9.
58. Suthanthiran M, Li B, Song JO, Ding R, Sharma VK, Schwartz JE, August P. Transforming growth factor-beta 1 hyperexpression in African-American hypertensives: A novel mediator of hypertension and/or target organ damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97 (7):3479-84.
59. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Hamaoki M, Kato H, Yazaki Y. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of en-

- dothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159 (3):1435-40.
60. Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A, Kawai C. Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7 (4):868-72.
61. Lodge PA, Herzum M, Olszewski J, Huber SA. Coxsackievirus B-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms. *Am J Pathol* 1987; 128 (3):455-63.
62. Kishimoto C, Kuribayashi K, Masuda T, Tomioka N, Kawai C. Immunologic behavior of lymphocytes in experimental viral myocarditis: significance of T lymphocytes in the severity of myocarditis and silent myocarditis in BALB/c-nu/nu mice. *Circulation* 1985; 71 (6):1247-54.
63. Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol* 1995; 69 (11):6720-8.
64. Kishimoto C, Abelmann WH. Monoclonal antibody therapy for prevention of acute coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Circulation* 1989; 79 (6):1300-8.
65. Schwimbeck PL, Huber SA, Schultheiss HP. Roles of T cells in coxsackievirus B-induced disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997; 223 283-303.
66. Woodruff JF, Woodruff JJ. Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackie virus B3 heart disease. *J Immunol* 1974; 113 (6):1726-34.
67. Huber SA, Job LP, Woodruff JF. In vitro culture of coxsackievirus group B, type 3 immune spleen cells on infected endothelial cells and biological activity of the cultured cells in vivo. *Infect Immun* 1984; 43 (2):567-73.
68. Kishimoto C, Kuribayashi K, Fukuma K, Masuda T, Tomioka N, Abelmann WH, Kawai C. Immunologic identification of lymphocyte subsets in experimental murine myocarditis with encephalomyocarditis virus. Different kinetics of lymphocyte subsets between the heart and the peripheral blood, and significance of Thy 1.2+ (pan T) and Lyt 1+, 23+ (immature T) subsets in the development of myocarditis. *Circ Res* 1987; 61 (5):715-25.
69. Estrin M, Huber SA. Coxsackievirus B3-induced myocarditis. Autoimmunity is L3T4+ T helper cell and IL-2 independent in BALB/c mice. *Am J Pathol* 1987; 127 (2):335-41.
70. Matsumori A, Kawai C. An animal model of congestive (dilated) cardiomyopathy: dilatation and hypertrophy of the heart in the chronic stage in DBA/2 mice with myocarditis caused by encephalomyocarditis virus. *Circulation* 1982; 66 (2):355-60.
71. Cronin ME, Love LA, Miller FW, McClintock PR, Plotz PH. The natural history of encephalomyocarditis virus-induced myositis and myocarditis in mice. Viral persistence demonstrated by in situ hybridization. *J Exp Med* 1988; 168 (5):1639-48.
72. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89 (1):314-8.
73. Huber SA, Lodge PA. Coxsackievirus B-3 myocarditis in Balb/c mice. Evidence for autoimmunity to myocyte antigens. *Am J Pathol* 1984; 116 (1):21-9.

74. Blay R, Simpson K, Leslie K, Huber S. Coxsackievirus-induced disease. CD4+ cells initiate both myocarditis and pancreatitis in DBA/2 mice. *Am J Pathol* 1989; 135 (5):899-907.
75. Leslie KO, Schwarz J, Simpson K, Huber SA. Progressive interstitial collagen deposition in Coxsackievirus B3-induced murine myocarditis. *Am J Pathol* 1990; 136 (3):683-93.
76. Neu N, Beisel KW, Traystman MD, Rose NR, Craig SW. Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to Coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Immunol* 1987; 138 (8):2488-92.
77. Neu N, Klieber R, Fruhwirth M, Berger P. Cardiac myosin-induced myocarditis as a model of postinfectious autoimmunity. *Eur Heart J* 1991; 12 Suppl D 117-20.
78. Smith SC, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *J Immunol* 1991; 147 (7):2141-7.
79. Lane JR, Neumann DA, Lafond-Walker A, Herskowitz A, Rose NR. Interleukin 1 or tumor necrosis factor can promote Coxsackie B3-induced myocarditis in resistant B10.A mice. *J Exp Med* 1992; 175 (4):1123-9.
80. Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM. Differential effects of myocarditic variants of Coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage. *Lab Invest* 1991; 64 (1):55-64.
81. Wee L, Liu P, Penn L, Butany JW, McLaughlin PR, Sole MJ, Liew CC. Persistence of viral genome into late stages of murine myocarditis detected by polymerase chain reaction. *Circulation* 1992; 86 (5):1605-14.
82. Kandolf R, Sauter M, Aepinus C, Schnorr JJ, Selinka HC, Klingel K. Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus Res* 1999; 62 (2):149-58.
83. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Regulation of Immune Responses. Cellular and Molecular Immunology. Vol. Chapter Ten. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994:206-11.
84. Janeway CA, Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (13):7461-8.
85. Arai M, Masui Y, Goldschmidt-Clermont P, DiPaula A, Siu C, Kondo T, Becker LC. P-selectin inhibition prevents early neutrophil activation but provides only modest protection against myocardial injury in dogs with ischemia and forty-eight hours reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34 (1):280-8.
86. Mackay IR. Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity. *Bmj* 2000; 321 (7253):93-6.
87. Krutzik SR, Sieling PA, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in host defense against microbial infection. *Curr Opin Immunol* 2001; 13 (1):104-8.
88. Zuniga-Pflucker JC, Lenardo MJ. Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Curr Opin Immunol* 1996; 8 (2):215-24.
89. Strasser A. Life and death during lymphocyte development and function: evidence for two distinct killing mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1995; 7 (2):228-34.

90. Scott B, Bluthmann H, Teh HS, von Boehmer H. The generation of mature T cells requires interaction of the alpha beta T-cell receptor with major histocompatibility antigens. *Nature* 1989; 338 (6216):591-3.
91. Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Bluthmann H, von Boehmer H. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 1988; 335 (6187):229-33.
92. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987; 49 (2):273-80.
93. Sprent J, Webb SR. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr Opin Immunol* 1995; 7 (2):196-205.
94. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology - The Immune System in Health and Disease. Vol. 6th edition. New York: Garland Science Publishing, 2005.
95. von Boehmer H. Positive selection of lymphocytes. *Cell* 1994; 76 (2):219-28.
96. Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994; 76 (2):229-39.
97. Singer A, Bosselut R, Bhandoola A. Signals involved in CD4/CD8 lineage commitment: current concepts and potential mechanisms. *Semin Immunol* 1999; 11 (4):273-81.
98. Sprent J, Tough DF. Lymphocyte life-span and memory. *Science* 1994; 265 (5177):1395-400.
99. Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 1999; 402 (6759):255-62.
100. Garcia KC, Degano M, Speir JA, Wilson IA. Emerging principles for T cell receptor recognition of antigen in cellular immunity. *Rev Immunogenet* 1999; 1 (1):75-90.
101. Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 2000; 290 (5489):92-7.
102. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343 (1):37-49.
103. Havran WL, Boismenu R. Activation and function of gamma delta T cells. *Curr Opin Immunol* 1994; 6 (3):442-6.
104. Jiang S, Lechler RI, He XS, Huang JF. Regulatory T cells and transplantation tolerance. *Hum Immunol* 2006; 67 (10):765-76.
105. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 1999; 283 (5403):857-60.
106. Zinkernagel RM, Hengartner H. Antiviral immunity. *Immunol Today* 1997; 18 (6):258-60.
107. Griffiths GM. The cell biology of CTL killing. *Curr Opin Immunol* 1995; 7 (3):343-8.
108. Vukmanovic-Stejic M, Vyas B, Gorak-Stolinska P, Noble A, Kemeny DM. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 2000; 95 (1):231-40.

109. Gyulai Z, Endresz V, Burian K, Pincus S, Toldy J, Cox WI, Meric C, Plotkin S, Gonczol E, Berencsi K. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J Infect Dis* 2000; 181 (5):1537-46.
110. Hopkins JI, Fiander AN, Evans AS, Delchambre M, Gheysen D, Borysiewicz LK. Cytotoxic T cell immunity to human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Med Virol* 1996; 49 (2):124-31.
111. Wang R, Abrams SI, Loh DY, Hsieh CS, Murphy KM, Russell JH. Separation of CD4+ functional responses by peptide dose in Th1 and Th2 subsets expressing the same transgenic antigen receptor. *Cell Immunol* 1993; 148 (2):357-70.
112. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 2000; 1 (3):199-205.
113. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136 (7):2348-57.
114. Romagnani S. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 1991; 12 (8):256-7.
115. Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE, Glasebrook AL. A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol* 1989; 143 (2):518-25.
116. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260 (5107):547-9.
117. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (21):10188-92.
118. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995; 154 (10):5071-9.
119. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996; 26 (3):659-68.
120. Rogers PR, Croft M. Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *J Immunol* 1999; 163 (3):1205-13.
121. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85 (1):9-18; quiz 18, 21.
122. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6 (11):1123-32.

123. Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; 19 (3):281-6.
124. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007; 13 (2):139-45.
125. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008; 8 (5):337-48.
126. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; 28 (4):454-67.
127. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441 (7090):235-8.
128. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007; 448 (7152):484-7.
129. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 148 (1):32-46.
130. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2 (9):816-22.
131. Waldmann H, Cobbold S. Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells? *Immunity* 2001; 14 (4):399-406.
132. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6 (4):338-44.
133. Borst J, Jacobs H, Brouns G. Composition and function of T-cell receptor and B-cell receptor complexes on precursor lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1996; 8 (2):181-90.
134. Davis MM, Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334 (6181):395-402.
135. Whetsell M, Mosley RL, Whetsell L, Schaefer FV, Miller KS, Klein JR. Rearrangement and junctional-site sequence analyses of T-cell receptor gamma genes in intestinal intraepithelial lymphocytes from murine athymic chimeras. *Mol Cell Biol* 1991; 11 (12):5902-9.
136. Weiss A. Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. *Annu Rev Genet* 1991; 25 487-510.
137. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 1999; 286 (5441):958-61.
138. Schwartz RH. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1985; 3 237-61.
139. Yague J, White J, Coleclough C, Kappler J, Palmer E, Marrack P. The T cell receptor: the alpha and beta chains define idiootype, and antigen and MHC specificity. *Cell* 1985; 42 (1):81-7.

140. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 1974; 248 (450):701-2.
141. Assaf C, Hummel M, Dippel E, Goerdts S, Muller HH, Anagnostopoulos I, Orfanos CE, Stein H. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. *Blood* 2000; 96 (2):640-6.
142. Hofbauer M, Wiesener S, Babbe H, Roers A, Wekerle H, Dornmair K, Hohlfeld R, Goebels N. Clonal tracking of autoaggressive T cells in polymyositis by combining laser microdissection, single-cell PCR, and CDR3-spectratype analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 (7):4090-5.
143. Lafon M, Lafage M, Martinez-Arends A, Ramirez R, Vuillier F, Charron D, Lotteau V, Scott-Algara D. Evidence for a viral superantigen in humans. *Nature* 1992; 358 (6386):507-10.
144. Hemmer B, Jacobsen M, Sommer N. Degeneracy in T-cell antigen recognition - implications for the pathogenesis of autoimmune diseases. *J Neuroimmunol* 2000; 107 (2):148-53.
145. Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 2003; 198 (6):889-901.
146. Lugo-Villarino G, Maldonado-Lopez R, Possemato R, Penaranda C, Glimcher LH. T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 (13):7749-54.
147. Li-Weber M, Krammer PH. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nat Rev Immunol* 2003; 3 (7):534-43.
148. Anandasabapathy N, Ford GS, Bloom D, Holness C, Paragas V, Seroogy C, Skrenta H, Hollenhorst M, Fathman CG, Soares L. GRAIL: an E3 ubiquitin ligase that inhibits cytokine gene transcription is expressed in anergic CD4+ T cells. *Immunity* 2003; 18 (4):535-47.
149. Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003; 19 (2):165-8.
150. Matsumoto Y. Characterization of T cell receptor (TCR) of organ-specific autoimmune disease-inducing T cells and TCR-based immunotherapy with DNA vaccines. *J Neuroimmunol* 2000; 110 (1-2):1-12.
151. Seko Y, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. T-cell receptor V beta gene expression in infiltrating cells in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Circulation* 1994; 89 (5):2170-5.
152. Matsumoto Y, Jee Y, Sugisaki M. Successful TCR-based immunotherapy for autoimmune myocarditis with DNA vaccines after rapid identification of pathogenic TCR. *J Immunol* 2000; 164 (4):2248-54.

153. Luppi P, Rudert WA, Zanone MM, Stassi G, Trucco G, Finegold D, Boyle GJ, Del Nido P, McGowan FX, Jr., Trucco M. Idiopathic dilated cardiomyopathy: a superantigen-driven autoimmune disease. *Circulation* 1998; 98 (8):777-85.
154. Varela-Calvino R, Sgarbi G, Wedderburn LR, Dayan CM, Tremble J, Peakman M. T cell activation by coxsackievirus B4 antigens in type 1 diabetes mellitus: evidence for selective TCR Vbeta usage without superantigenic activity. *J Immunol* 2001; 167 (6):3513-20.
155. van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurig E, Garcia-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, Gonzalez D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzalez M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17 (12):2257-317.
156. Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kühl U. Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99 (16):2124-31.
157. Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Kühl U. Advances in the immunohistological diagnosis of inflammatory cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2002; Supplement 4 (I):154-162.
158. Noutsias M, Pauschinger M, Ostermann K, Escher F, Blohm JH, Schultheiss H, Kühl U. Digital image analysis system for the quantification of infiltrates and cell adhesion molecules in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 2002; 8 (5):MT59-71.
159. Kern F, Surel IP, Brock C, Freistedt B, Radtke H, Scheffold A, Blasczyk R, Reinke P, Schneider-Mergener J, Radbruch A, Walden P, Volk HD. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med* 1998; 4 (8):975-8.
160. Schultheiss HP. Dilated Cardiomyopathy - Management, Prognosis and Outcome. In: Camm AJ, Lüscher, T. F., Serruys, P., ed. *The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine*: Blackwell Publishing, 2006.
161. Schultheiss HP, Kühl U. Overview on chronic viral cardiomyopathy/chronic myocarditis. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006 (55):3-18.
162. Schultheiss HP, Noutsias M, Kühl U, Lassner D, Gross U, Poller W, Pauschinger M. [Cardiomyopathies. Part I: classification - dilated cardiomyopathy.]. *Internist (Berl)* 2005; 46 (11):1245-58.
163. De Cobelli F, Pieroni M, Esposito A, Chimenti C, Belloni E, Mellone R, Canu T, Perseghin G, Gaudio C, Maseri A, Frustaci A, Del Maschio A. Delayed gadolinium-enhanced cardiac magnetic resonance in patients with chronic myocarditis presenting with heart failure or recurrent arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47 (8):1649-54.
164. Gutberlet M, Spors B, Thoma T, Bertram H, Denecke T, Felix R, Noutsias M, Schultheiss HP, Kühl U. Suspected chronic myocarditis at cardiac MR: diagnostic accuracy and association with immunohistologically detected inflammation and viral persistence. *Radiology* 2008; 246 (2):401-9.

165. Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, Glanowska G, Wilczewski P, Niklewski T, Zembala M, Polonski L, Rozek MM, Wodniecki J. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation* 2001; 104 (1):39-45.
166. World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *Cardiovasc Res* 1997; 35 (1):2-3.
167. Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol* 1996; 266 383-402.
168. Szotowski B, Goldin-Lang P, Antoniak S, Bogdanov VY, Pathirana D, Pauschinger M, Dorner A, Kühl U, Coupland S, Nemerson Y, Hummel M, Poller W, Hetzer R, Schultheiss HP, Rauch U. Alterations in myocardial tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45 (7):1081-9.
169. Noutsias M, Rohde M, Block A, Klippert K, Lettau O, Blunert K, Hummel M, Kuhl U, Lehmkuhl H, Hetzer R, Rauch U, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Volk HD, Kotsch K. Pre-amplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC Mol Biol* 2008; 9 (1):3.
170. Peixoto A, Monteiro M, Rocha B, Veiga-Fernandes H. Quantification of multiple gene expression in individual cells. *Genome Res* 2004; 14 (10A):1938-47.
171. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001; 25 (4):402-8.
172. Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med* 2006; 84 (11):901-10.
173. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 2001; Appendix 3 Appendix 3B.
174. Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP, Kuhl U. Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation* 1999; 99 (16):2124-31.
175. Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, Wang X, Dekkers D, Houtsmuller AB, Pauschinger M, Bergelson J, Warraich R, Yacoub M, Hetzer R, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W. Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins $\alpha(v)\beta(3)$ and $\alpha(v)\beta(5)$ on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 2001; 104 (3):275-80.
176. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 2003; 339 (1):62-6.
177. Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austerhammer B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY, Ma Y, Maqsoodi B, Papallo A, Peters EH, Poulter K, Ruppel PL, Samaha RR, Shi L, Yang W, Zhang L, Goodsaid FM. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol* 2006; 24 (9):1115-22.

178. Seko Y, Ishiyama S, Nishikawa T, Kasajima T, Hiroe M, Kagawa N, Osada K, Suzuki S, Yagita H, Okumura K, et al. Restricted usage of T cell receptor V alpha-V beta genes in infiltrating cells in the hearts of patients with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1995; 96 (2):1035-41.
179. Pluschke G, Taube H, Krawinkel U, Pfeffer K, Wagner H, Classen M, Deusch K. Oligoclonality and skewed T cell receptor V beta gene segment expression in in vivo activated human intestinal intraepithelial T lymphocytes. *Immunobiology* 1994; 192 (1-2):77-93.
180. Hu M, Zhang GY, Walters G, Sartor M, Watson D, Knight JF, Alexander SI. Matching T-cell receptors identified in renal biopsies and urine at the time of acute rejection in pediatric renal transplant patients. *Am J Transplant* 2004; 4 (11):1859-68.
181. Frisman DM, Hurwitz AA, Bennett WT, Boyle LA, Fallon JT, Dec GW, Colvin RB, Kurnick JT. Clonal analysis of graft-infiltrating lymphocytes from renal and cardiac biopsies. Dominant rearrangements of TcR beta genes and persistence of dominant rearrangements in serial biopsies. *Hum Immunol* 1990; 28 (2):208-15.
182. Kaufman CL, Zeevi A, Kormos RL, Zerbe TR, Keenan RJ, Uretsky BF, Griffith BP, Hardesty RL, Duquesnoy RJ. Propagation of infiltrating lymphocytes and graft coronary disease in cardiac transplant recipients. *Hum Immunol* 1990; 28 (2):228-36.
183. Hand SL, Hall BL, Finn OJ. T-cell receptor gene usage and expression in renal allograft-derived T-cell lines. *Hum Immunol* 1990; 28 (2):82-95.
184. Wang YC, Kanter K, Lattouf O, Rodey GE, Sell KW, Ansari AA. Characterization of human cardiac infiltrating cells posttransplantation: II. CD4+ cloned T-cell lines with "anti-idiotypic"-like reactivity. *Hum Immunol* 1990; 28 (2):141-52.
185. Kennedy-Nasser AA, Bollard CM, Rooney CM. Adoptive immunotherapy for Hodgkin's lymphoma. *Int J Hematol* 2006; 83 (5):385-90.
186. Costa RP, Gollob KJ, Fonseca LL, Rocha MO, Chaves AC, Medrano-Mercado N, Araujo-Jorge TC, Antas PR, Colley DG, Correa-Oliveira R, Gazzinelli G, Carvalho-Parra J, Dutra WO. T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: differential frequencies of Vbeta5 expressing T cells. *Scand J Immunol* 2000; 51 (5):511-9.
187. Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B, Habedank D, Hetzer R, Cherepnev G, Proesch S, Reinke P, Volk HD, Lehmkuhl H, Kern F. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 2005; 201 (7):1031-6.
188. Tesfa L, Koch FW, Pankow W, Volk HD, Kern F. Confirmation of Mycobacterium tuberculosis infection by flow cytometry after ex vivo incubation of peripheral blood T cells with an ESAT-6-derived peptide pool. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 60 (1):47-53.
189. Kelsen J, Agnholt J, Hoffmann HJ, Kaltoft K, Dahlerup JF. Increased expression of TCR vbeta5.1 and 8 in mucosal T-cell lines cultured from patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39 (3):238-45.

190. Pauschinger M, Doerner A, Kühl U, Schwimmbeck PL, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation* 1999; 99 (7):889-95.
191. Baughman KL. Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria. *Circulation* 2006; 113 (4):593-5.
192. Kühl U, Schultheiss HP. Treatment of chronic myocarditis with corticosteroids. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl O):168-72.
193. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation* 2003; 107 (6):857-63.
194. Staudt A, Schaper F, Stangl V, Plagemann A, Bohm M, Merkel K, Wallukat G, Wernecke KD, Stangl K, Baumann G, Felix SB. Immunohistological changes in dilated cardiomyopathy induced by immunoabsorption therapy and subsequent immunoglobulin substitution. *Circulation* 2001; 103 (22):2681-6.
195. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bultmann B, Muller T, Lindinger A, Bohm M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008; 118 (6):639-48.
196. Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2003; 107 (22):2793-8.
197. Baier G, Telford D, Gulbins E, Yamada N, Kawakami T, Altman A. Improved specificity of RT-PCR amplifications using nested cDNA primers. *Nucleic Acids Res* 1993; 21 (5):1329-30.
198. Alvarez-Martinez MJ, Miro JM, Valls ME, Moreno A, Rivas PV, Sole M, Benito N, Domingo P, Munoz C, Rivera E, Zar HJ, Wissmann G, Diehl AR, Prolla JC, de Anta MT, Gatell JM, Wilson PE, Meshnick SR. Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jiroveci* in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56 (2):153-60.
199. Denning KM, Smyth PC, Cahill SF, Finn SP, Conlon E, Li J, Flavin RJ, Aherne ST, Guenther SM, Ferlinz A, O'Leary J J, Sheils OM. A molecular expression signature distinguishing follicular lesions in thyroid carcinoma using preamplification RT-PCR in archival samples. *Mod Pathol* 2007.
200. Luppi P, Licata A, Haluszczak C, Rudert WA, Trucco G, McGowan FX, Jr., Finegold D, Boyle GJ, Trucco M. Analysis of TCR Vbeta repertoire and cytokine gene expression in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Autoimmun* 2001; 16 (1):3-13.
201. Wittchen F, Suckau L, Witt H, Skurk C, Lassner D, Fechner H, Sipo I, Ungethum U, Ruiz P, Pauschinger M, Tschöpe C, Rauch U, Kühl U, Schultheiss HP, Poller W. Genomic expression profiling of human inflammatory cardiomyopathy (DCMi) suggests novel therapeutic targets. *J Mol Med* 2007; 85 (3):253-67.

202. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kühl U, Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999; 99 (21):2750-6.
203. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002; 90 (5):520-30.
204. Kempf T, Horn-Wichmann R, Brabant G, Peter T, Allhoff T, Klein G, Drexler H, Johnston N, Wallentin L, Wollert KC. Circulating concentrations of growth-differentiation factor 15 in apparently healthy elderly individuals and patients with chronic heart failure as assessed by a new immunoradiometric sandwich assay. *Clin Chem* 2007; 53 (2):284-91.
205. Annoni G, Luvara G, Arosio B, Gagliano N, Fiordaliso F, Santambrogio D, Jeremic G, Mircoli L, Latini R, Vergani C, Masson S. Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in the rat myocardium. *Mech Ageing Dev* 1998; 101 (1-2):57-72.
206. Schedel J, Distler O, Woenckhaus M, Gay RE, Simmen B, Michel BA, Muller-Ladner U, Gay S. Discrepancy between mRNA and protein expression of tumour suppressor maspin in synovial tissue may contribute to synovial hyperplasia in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63 (10):1205-11.
207. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kühl U, Levine GN, Narula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. *Circulation* 2007; 116 (19):2216-33.
208. Holzmann M, Nicko A, Kuhl U, Noutsias M, Poller W, Hoffmann W, Morguet A, Witzembichler B, Tschope C, Schultheiss HP, Pauschinger M. Complication rate of right ventricular endomyocardial biopsy via the femoral vein approach - A retrospective and prospective study analyzing 3,048 diagnostic procedures over an 11-year period. *Circulation* 2008 (in press).
209. Veinot JP. Diagnostic endomyocardial biopsy pathology: secondary myocardial diseases and other clinical indications - a review. *Can J Cardiol* 2002; 18 (3):287-96.
210. Noutsias M, Pauschinger M, Kühl U, Schultheiss HP. Diagnostic endomyocardial biopsy interpretation. *Can J Cardiol* 2003; 19 (1):98-9; author reply 99-100.
211. Kube DM, Savci-Heijink CD, Lamblin AF, Kosari F, Vasmatzis G, Cheville JC, Connelly DP, Klee GG. Optimization of laser capture microdissection and RNA amplification for gene expression profiling of prostate cancer. *BMC Mol Biol* 2007; 8 25.
212. Ma H, Jin G, Hu Z, Zhai X, Chen W, Wang S, Wang X, Qin J, Gao J, Liu J, Wang X, Wei Q, Shen H. Variant genotypes of CDKN1A and CDKN1B are associated with an increased risk of breast cancer in Chinese women. *Int J Cancer* 2006; 119 (9):2173-8.
213. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Yamaji T, Loda M, Fuchs CS. Loss of nuclear p27 (CDKN1B/KIP1) in colorectal cancer is correlated with microsatellite instability and CIMP. *Mod Pathol* 2007; 20 (1):15-22.

214. Zhang H, Yousef GE, Ouyang X, Archard LC. Characterization of a murine model of myocarditis induced by a reactivated coxsackievirus B3. *Int J Exp Pathol* 1994; 75 (2):99-110.
215. Klingel K, Stephan S, Sauter M, Zell R, McManus BM, Bultmann B, Kandolf R. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J Virol* 1996; 70 (12):8888-95.
216. Klingel K, Kandolf R. The role of enterovirus replication in the development of acute and chronic heart muscle disease in different immunocompetent mouse strains. *Scand J Infect Dis Suppl* 1993; 88 79-85.
217. Ouyang X, Zhang H, Bayston TA, Archard LC. Detection of Coxsackievirus B3 RNA in mouse myocarditis by nested polymerase chain reaction. *Clin Diagn Virol* 1995; 3 (3):233-45.
218. Hanawa H, Inomata T, Sekikawa H, Abo T, Kodama M, Izumi T, Shibata A. Analysis of heart-infiltrating T-cell clonotypes in experimental autoimmune myocarditis in rats. *Circ Res* 1996; 78 (1):118-25.
219. Hanawa H, Kodama M, Inomata T, Izumi T, Shibata A, Tuchida M, Matsumoto Y, Abo T. Anti-alpha beta T cell receptor antibody prevents the progression of experimental autoimmune myocarditis. *Clin Exp Immunol* 1994; 96 (3):470-5.
220. Huber SA, Pfaeffle B. Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J Virol* 1994; 68 (8):5126-32.
221. Huber S, Shi C, Budd RC. Gammadelta T cells promote a Th1 response during coxsackievirus B3 infection in vivo: role of Fas and Fas ligand. *J Virol* 2002; 76 (13):6487-94.
222. Deonarain R, Cerullo D, Fuse K, Liu PP, Fish EN. Protective role for interferon-beta in coxsackievirus B3 infection. *Circulation* 2004; 110 (23):3540-3.
223. Gebhard JR, Perry CM, Harkins S, Lane T, Mena I, Asensio VC, Campbell IL, Whitton JL. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance. *Am J Pathol* 1998; 153 (2):417-28.
224. Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, Protschka M, Galle PR, Neurath MF, Blessing M. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2004; 173 (11):6526-31.
225. Li J, Leschka S, Rutschow S, Schwimmbeck PL, Husmann L, Noutsias M, Westermann D, Poller W, Zeichhardt H, Klingel K, Tschöpe C, Schultheiss HP, Pauschinger M. Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine myocarditis. *Eur J Pharmacol* 2007; 554 (1):60-8.
226. Luk A, Metawee M, Ahn E, Gustafsson F, Ross H, Butany J. Do clinical diagnoses correlate with pathological diagnoses in cardiac transplant patients? The importance of endomyocardial biopsy. *Can J Cardiol* 2009; 25 (2):e48-54.

227. Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss H, Kühl U. Phenotypic characterization of infiltrates in dilated cardiomyopathy - diagnostic significance of T-lymphocytes and macrophages in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 2002; 8 (7):CR478-87.
228. Noutsias M, Rohde M, Block A, Klippert K, Lettau O, Blunert K, Hummel M, Kühl U, Lehmkuhl H, Hetzer R, Rauch U, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Volk HD, Kotsch K. Preamplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. *BMC Mol Biol* 2008; 9 3.
229. Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 2002; 111 (6):837-51.
230. Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clin Proc* 1989; 64 (10):1235-45.
231. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89 (4):587-96.
232. Jiang Z, Xu W, Li K, Yue Y, Xu L, Ye F, Xiong S. Remission of CVB3-induced viral myocarditis by in vivo Th2 polarization via hydrodynamics-based interleukin-4 gene transfer. *J Gene Med* 2008; 10 (8):918-29.
233. Heath VL, Murphy EE, Crain C, Tomlinson MG, O'Garra A. TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur J Immunol* 2000; 30 (9):2639-49.
234. Escher F, Modrow S, Sabi T, Kuhl U, Lassner D, Schultheiss HP, Noutsias M. Parvovirus B19 profiles in patients presenting with acute myocarditis and chronic dilated cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 2008; 14 (12):CR589-597.
235. Lindner J, Barabas S, Saar K, Altmann D, Pfister A, Fleck M, Deml L, Modrow S. CD4(+) T-cell responses against the VP1-unique region in individuals with recent and persistent parvovirus B19 infection. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52 (7-8):356-61.
236. Valaperti A, Marty RR, Kania G, Germano D, Mauermann N, Dirnhofer S, Leimenstoll B, Blyszczuk P, Dong C, Mueller C, Hunziker L, Eriksson U. CD11b+ monocytes abrogate Th17 CD4+ T cell-mediated experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol* 2008; 180 (4):2686-95.
237. Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, Dirnhofer S, Kurrer MO, Komnenovic V, Penninger JM, Eriksson U. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med* 2006; 203 (8):2009-19.
238. Yang Y, Xu J, Niu Y, Bromberg JS, Ding Y. T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T cell differentiation to Th1 versus Th17. *J Immunol* 2008; 181 (12):8700-10.
239. Okura Y, Yamamoto T, Goto S, Inomata T, Hirono S, Hanawa H, Feng L, Wilson CB, Kihara I, Izumi T, Shibata A, Aizawa Y, Seki S, Abo T. Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29 (2):491-502.

240. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA, Barrett MA, Davis SE, Gatewood SJ, Njoku DB, Rose NR. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart. *Am J Pathol* 2004; 165 (6):1883-94.
241. Fuse K, Kodama M, Aizawa Y, Yamaura M, Tanabe Y, Takahashi K, Sakai K, Miida T, Oda H, Higuma N. Th1/Th2 balance alteration in the clinical course of a patient with acute viral myocarditis. *Jpn Circ J* 2001; 65 (12):1082-4.
242. Loudon RP, Moraska AF, Huber SA, Schwimmbeck P, Schultheiss P. An attenuated variant of Coxsackievirus B3 preferentially induces immunoregulatory T cells in vivo. *J Virol* 1991; 65 (11):5813-9.
243. Huber SA, Feldman AM, Sartini D. Coxsackievirus B3 induces T regulatory cells, which inhibit cardiomyopathy in tumor necrosis factor-alpha transgenic mice. *Circ Res* 2006; 99 (10):1109-16.
244. Thum T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA, Volk HD, Anker SD. The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46 (10):1799-802.
245. Zhai Y, Shen XD, Lehmann M, Busuttill R, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW. T cell subsets and in vitro immune regulation in "infectious" transplantation tolerance. *J Immunol* 2001; 167 (9):4814-20.
246. Koike H, Kanda T, Sumino H, Yokoyama T, Arai M, Motooka M, Suzuki T, Tamura J, Kobayashi I. Reduction of viral myocarditis in mice lacking perforin. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 110 (3-4):229-37.
247. Badorff C, Noutsias M, Kühl U, Schultheiss HP. Cell-mediated cytotoxicity in hearts with dilated cardiomyopathy: correlation with interstitial fibrosis and foci of activated T lymphocytes. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29 (2):429-34.
248. Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Kühl U. Cytotoxic perforin+ and TIA-1+ infiltrates are associated with cell adhesion molecule expression in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2003; 5 (4):469-79.
249. Streitz M, Noutsias M, Volkmer R, Rohde M, Brestrich G, Block A, Klippert K, Kotsch K, Ay B, Hummel M, Kühl U, Lassner D, Schultheiss HP, Volk HD, Kern F. NS1 specific CD8+ T-cells with effector function and TRBV11 dominance in a patient with parvovirus B19 associated inflammatory cardiomyopathy. *PLoS ONE* 2008; 3 (6):e2361.
250. Lindner J, Noutsias M, Lassner D, Wenzel J, Schultheiss HP, Kuehl U, Modrow S. Adaptive immune responses against parvovirus B19 in patients with myocardial disease. *J Clin Virol* 2009; 44 (1):27-32.
251. Escher F, Kühl U, Sabi T, Suckau L, Lassner D, Poller W, Schultheiss HP, Noutsias M. Immunohistological detection of Parvovirus B19 capsid proteins in endomyocardial biopsies from dilated cardiomyopathy patients. *Med Sci Monit* 2008; 14 (6):CR333-338.
252. Rowen L, Koop BF, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 1996; 272 (5269):1755-62.

253. Folch G, Lefranc MP. The human T cell receptor beta variable (TRBV) genes. *Exp Clin Immunogenet* 2000; 17 (1):42-54.
254. Block A, Rohde M, Erben U, Hammer M, Hummel M, Blunert K, Schultheiss HP, Volk HD, Noutsias M. Impact of cell culture media on the expansion efficiency and T-cell receptor Vbeta (TRBV) repertoire of in vitro expanded T cells using feeder cells. *Med Sci Monit* 2008; 14 (5):BR88-95.
255. Caforio AL, Mahon NG, Baig MK, Tona F, Murphy RT, Elliott PM, McKenna WJ. Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. *Circulation* 2007; 115 (1):76-83.
256. Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail* 2002; 4 (4):411-7.
257. Schulze K, Becker BF, Schauer R, Schultheiss HP. Antibodies to ADP-ATP carrier--an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy--impair cardiac function. *Circulation* 1990; 81 (3):959-69.
258. Goser S, Andrassy M, Buss SJ, Leuschner F, Volz CH, Ottl R, Zittrich S, Blaudeck N, Hardt SE, Pfitzer G, Rose NR, Katus HA, Kaya Z. Cardiac troponin I but not cardiac troponin T induces severe autoimmune inflammation in the myocardium. *Circulation* 2006; 114 (16):1693-702.
259. Jahns R, Boivin V, Hein L, Triebel S, Angermann CE, Ertl G, Lohse MJ. Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2004; 113 (10):1419-29.
260. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol* 1987; 18 (6):619-24.
261. Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC, Schultheiss HP, Kühl U. Current insights into the pathogenesis, diagnosis and therapy of inflammatory cardiomyopathy. *Heart Fail Monit* 2003; 3 (4):127-35.
262. Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G, Vogelsberg H, Fritz P, Dippon J, Bock CT, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation* 2006; 114 (15):1581-90.
263. Pfrepper KI, Enders M, Motz M. Human parvovirus B19 serology and avidity using a combination of recombinant antigens enables a differentiated picture of the current state of infection. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52 (7-8):362-5.
264. Modrow S, Dorsch S. Antibody responses in parvovirus B19 infected patients. *Pathol Biol (Paris)* 2002; 50 (5):326-31.
265. Norbeck O, Isa A, Pohlmann C, Broliden K, Kasprovicz V, Bowness P, Klenerman P, Tolfvenstam T. Sustained CD8+ T-cell responses induced after acute parvovirus B19 infection in humans. *J Virol* 2005; 79 (18):12117-21.
266. Mitchell LA, Leong R, Rosenke KA. Lymphocyte recognition of human parvovirus B19 non-structural (NS1) protein: associations with occurrence of acute and chronic arthropathy? *J Med Microbiol* 2001; 50 (7):627-35.

267. Isa A, Kasprowicz V, Norbeck O, Loughry A, Jeffery K, Broliden K, Klenerman P, Tolfvenstam T, Bowness P. Prolonged activation of virus-specific CD8+T cells after acute B19 infection. *PLoS Med* 2005; 2 (12):e343.
268. Kasprowicz V, Isa A, Tolfvenstam T, Jeffery K, Bowness P, Klenerman P. Tracking of peptide-specific CD4+ T-cell responses after an acute resolving viral infection: a study of parvovirus B19. *J Virol* 2006; 80 (22):11209-17.
269. Kasprowicz V, Isa A, Jeffery K, Broliden K, Tolfvenstam T, Klenerman P, Bowness P. A highly restricted T-cell receptor dominates the CD8+ T-cell response to parvovirus B19 infection in HLA-A*2402-positive individuals. *J Virol* 2006; 80 (13):6697-701.
270. Norja P, Hokynar K, Aaltonen LM, Chen R, Ranki A, Partio EK, Kiviluoto O, Davidkin I, Leivo T, Eis-Hubinger AM, Schneider B, Fischer HP, Tolba R, Vapalahti O, Vaheri A, Soderlund-Venermo M, Hedman K. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103 (19):7450-3.
271. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, Tona F, Vinci A, Bottaro S, Ramondo A, Carturan E, Iliceto S, Thiene G, Daliento L. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *Eur Heart J* 2007; 28 (11):1326-33.
272. Sakagawa H, Azuma H, Fujihara M, Ikeda H. Clinical-scale expansion of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells requiring single-peptide stimulation and feeder cells but not additional antigen-presenting cells. *Transfusion* 2006; 46 (4):516-22.
273. Herndon TM, Pirone DM, Tsokos GC, Chen CS. T cell-to-T cell clustering enhances NF-kappaB activity by a PI3K signal mediated by Cbl-b and Rho. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332 (4):1133-9.
274. Takahashi K, Kenji A, Norihiro T, Eisaku K, Takashi O, Kazuhiko H, Tadashi Y, Tadaatsu A. Morphological interactions of interdigitating dendritic cells with B and T cells in human mesenteric lymph nodes. *Am J Pathol* 2001; 159 (1):131-8.
275. Arons E, Sorbara L, Raffeld M, Stetler-Stevenson M, Steinberg SM, Liewehr DJ, Pastan I, Kreitman RJ. Characterization of T-cell repertoire in hairy cell leukemia patients before and after recombinant immunotoxin BL22 therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55 (9):1100-10.
276. Roth A, Schneider L, Himmelreich H, Baerlocher GM, Duhrsen U. Impact of culture conditions on the proliferative lifespan of human T cells in vitro. *Cytotherapy* 2007; 9 (1):91-8.
277. Torsteinsdottir S, Masucci MG, Brautbar C, Lenoir G, Klein G, Klein E. Differential recognition of tumor-derived and in vitro Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines by fetal calf serum-specific T4-positive cytotoxic T-lymphocyte clones. *Cell Immunol* 1986; 98 (2):453-66.

278. Misko IS, Soszynski TD, Kane RG, Pope JH. Factors influencing the human cytotoxic T cell response to autologous lymphoblastoid cell lines in vitro. *Clin Immunol Immunopathol* 1984; 32 (3):285-97.
279. Misko IS, Sculley TB, Schmidt C, Moss DJ, Soszynski T, Burman K. Composite response of naive T cells to stimulation with the autologous lymphoblastoid cell line is mediated by CD4 cytotoxic T cell clones and includes an Epstein-Barr virus-specific component. *Cell Immunol* 1991; 132 (2):295-307.
280. Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, McKenna EA, Yanik GA, Levine JE, Chang AE, Braun TM, Mule JJ. Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. *Cancer Res* 2001; 61 (23):8513-9.
281. Tuettenberg A, Jonuleit H, Tuting T, Bruck J, Knop J, Enk AH. Priming of T cells with Ad-transduced DC followed by expansion with peptide-pulsed DC significantly enhances the induction of tumor-specific CD8+ T cells: implications for an efficient vaccination strategy. *Gene Ther* 2003; 10 (3):243-50.
282. Carlens S, Gilljam M, Remberger M, Aschan J, Christensson B, Dilber MS. Ex vivo T lymphocyte expansion for retroviral transduction: influence of serum-free media on variations in cell expansion rates and lymphocyte subset distribution. *Exp Hematol* 2000; 28 (10):1137-46.
283. Armerding D, Kupper TS. Functional cutaneous lymphocyte antigen can be induced in essentially all peripheral blood T lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119 (3):212-22.
284. Akdis M, Klunker S, Schliz M, Blaser K, Akdis CA. Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on human CD4(+) and CD8(+) Th2 cells. *Eur J Immunol* 2000; 30 (12):3533-41.
285. Meinel E, Lengenfelder D, Blank N, Pirzer R, Barata L, Hivroz C. Differential requirement of ZAP-70 for CD2-mediated activation pathways of mature human T cells. *J Immunol* 2000; 165 (7):3578-83.
286. Albrecht JC, Muller-Fleckenstein I, Schmidt M, Fleckenstein B, Biesinger B. Tyrosine phosphorylation of the Tio oncoprotein is essential for transformation of primary human T cells. *J Virol* 2005; 79 (16):10507-13.
287. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283 (5405):1183-6.

8 Publikationen

Diese Dissertation wurde in Teilen in folgender Publikation veröffentlicht:

Noutsias M, **Rohde M**, Block A, Klippert K, Lettau O, Blunert K, Hummel M, Kühl U, Lehmkuhl H, Hetzer R, Rauch U, Poller W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Volk HD, Kotsch K. Preamplification techniques for real-time RT-PCR analyses of endomyocardial biopsies. BMC Mol Biol. 2008 Jan 14;9:3.

Block A, **Rohde M**, Erben U, Hammer M, Hummel M, Blunert K, Schultheiss HP, Volk HD, Noutsias M. Impact of cell culture media on the expansion efficiency and T-cell receptor Vbeta (TRBV) repertoire of in vitro expanded T cells using feeder cells. Med Sci Monit. 2008 May;14(5):BR88-95

Streitz M, Noutsias M, Volkmer R, **Rohde M**, Brestrich G, Block A, Klippert K, Kotsch K, Ay B, Hummel M, Kühl U, Lassner D, Schultheiss HP, Volk HD, Kern F. NS1 specific CD8+ T-cells with effector function and TRBV11 dominance in a patient with parvovirus B19 associated inflammatory cardiomyopathy. PLoS ONE. 2008 Jun 4;3(6):e2361.

Weitere Publikationen:

Antoniak S, Boltzen U, Riad A, Kallwellis-Opara A, **Rohde M**, Dörner A, Tschöpe C, Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss HP, Rauch U. Viral myocarditis and coagulopathy: increased tissue factor expression and plasma thrombogenicity. J Mol Cell Cardiol. 2008 Jul;45(1):118-26. Epub 2008 Mar 29.

9 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heinz-Peter Schultheiss und Dr. Michel Noutsias, für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung und die Betreuung während der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser möchte ich herzlich für seine Bereitschaft danken, die Betreuung der Arbeit am Fachbereich Pharmazie der Freien Universität Berlin zu übernehmen.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich meinen Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die wertvollen Anregungen zur praktischen Arbeit und die gegenseitige Unterstützung aussprechen.

Besonders bedanke ich mich bei der „Kleenen“, denn ohne Katja wäre es nicht möglich gewesen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Mittags- und Kaffeerunden bedanken. Ihr alle habt mir den Forschungsalltag recht amüsant gestaltet. Mir fehlen die doch sehr interessanten Gesprächsthemen ;o).

Mein weiterer Dank gilt den Mitgliedern und Doktoranden des Sonderforschungsbereiches Transregio 19, die eine bereichernde Zusammenarbeit und interessante Diskussionen ermöglichten, sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung des Forschungsvorhabens.

Ich danke meinen Freunden, besonders Ulrike, Katja und Mareike, die mich in den teilweise schwierigen Phasen meiner Promotion begleiteten und mit ihrem Zuspruch halfen, die vorliegende Arbeit letztendlich erfolgreich abzuschließen.

Der größte Dank gilt schließlich meiner Familie und Gregor, auf deren Unterstützung ich mich während der gesamten Zeit der Promotion immer verlassen konnte.

10 Lebenslauf

Aufgrund datenrechtlicher Bestimmungen ist der Lebenslauf in der Onlineversion der Dissertation nicht verfügbar.

Anhang

Zusammensetzung von Medien, Puffern und Lösungen

5 x DNA-Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau
	0,25% Xylencyanol
	15% Glycerin
	in 50 ml H ₂ O
1 x TBST	0,02 M Tris/HCL, pH 8,8
	0,14 M NaCL
	0,1 % Tween-20
5x TBE-Puffer	0,45 M Tris/HCL, pH 8,0
	0,45 M Borsäure
	0,01 M EDTA

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
Abb.	Abbildung
AMC	akute Myokarditis
AS	Aminosäure
AV	Adenovirus
B19V	Parvovirus B19
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	zur RNA komplementäre DNA

Anhang

CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
CV	<i>coefficient of variation</i>
CVB	Coxsackievirus B
Cyr61	<i>cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
DCM	dilatative Kardiomyopathie
DCMi	inflammatorische Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid 5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
EMB	Endomyokardbiopsie
EV	Enterovirus
FAM	Fluorescein
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
HHV6	humane Herpesvirus 6
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
M	Molarität
mA	Milliampere
min	Minute
mg, µg, ng	Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
mM, µM, pM	Millimolar, Micromolar, Pikomolar
mm, cm, nm	Millimeter, Zentimeter, Nanometer

Anhang

mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
OD	optische Dichte
PBMC	periphere Mononukleäre Zellen
PBS	„phosphat buffer saline“ phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
p.i.	<i>post infection</i>
pM	Picomolar
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
TRBC	T-Zellrezeptor β konstante Kette
TRBV	T-Zellrezeptor β variable Kette
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV-	Ultraviolett-
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge

Abbildungen

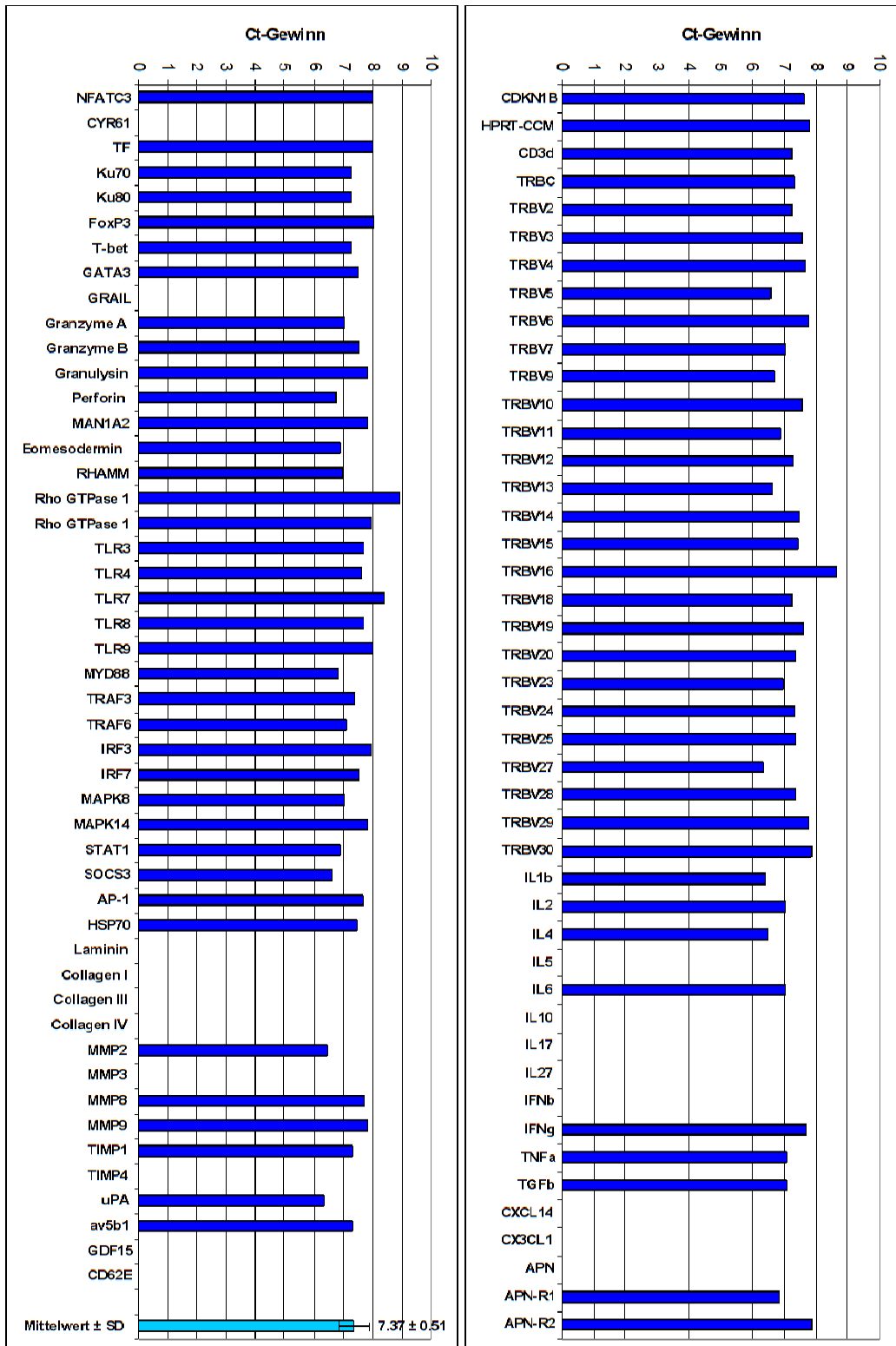


Abb. 1: Mittlerer Ct-Gewinn durch T-PreAmp an PBMCs. In türkis ist der Mittelwert ± SD der untersuchten gene assays dargestellt.

Anhang

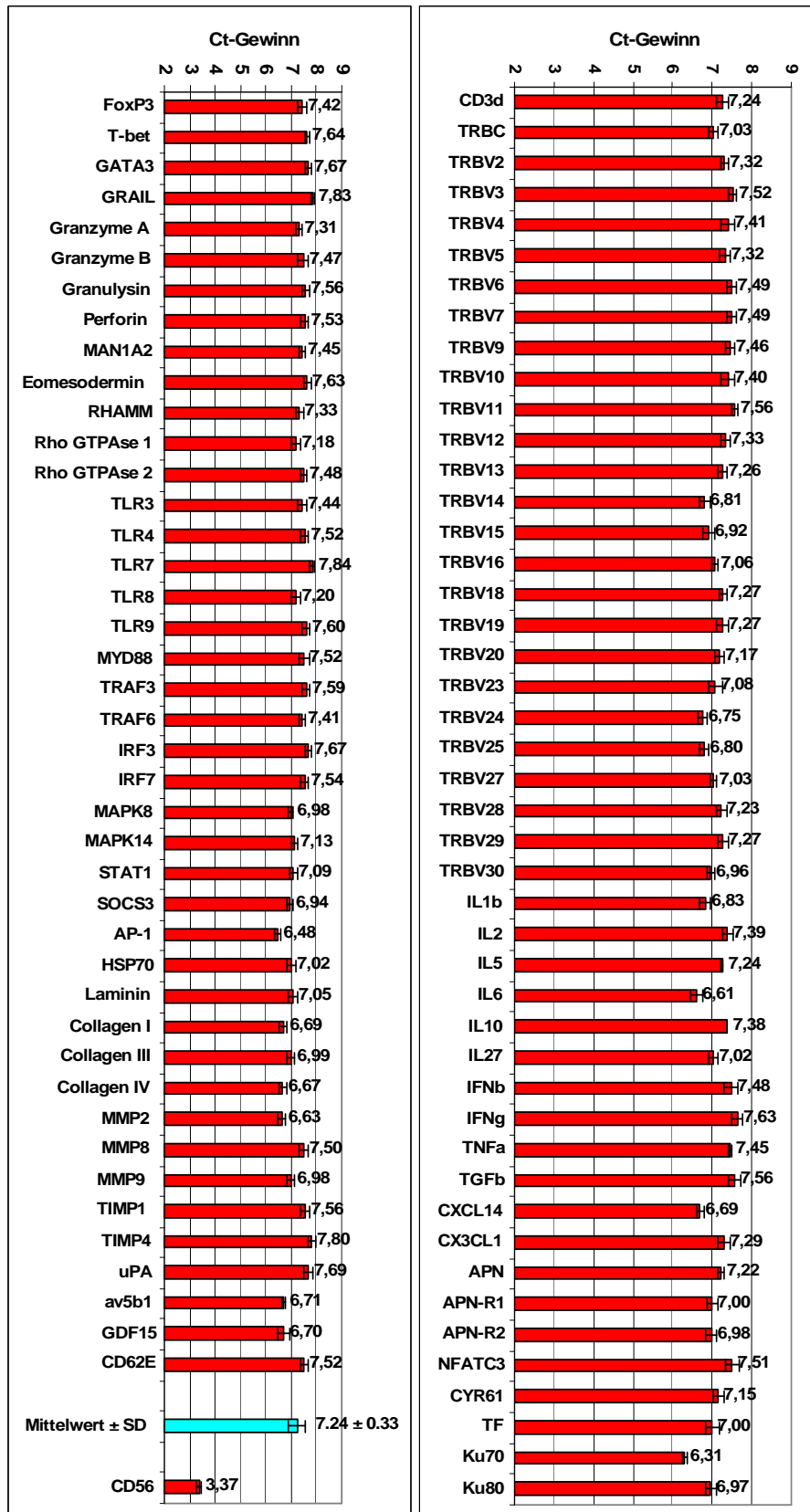


Abb. 2: Ct-Gewinn durch T-PreAmp an cDNA von EMBs. Der türkise Balken stellt den Mittelwert ± SD der untersuchten gene assays dar.

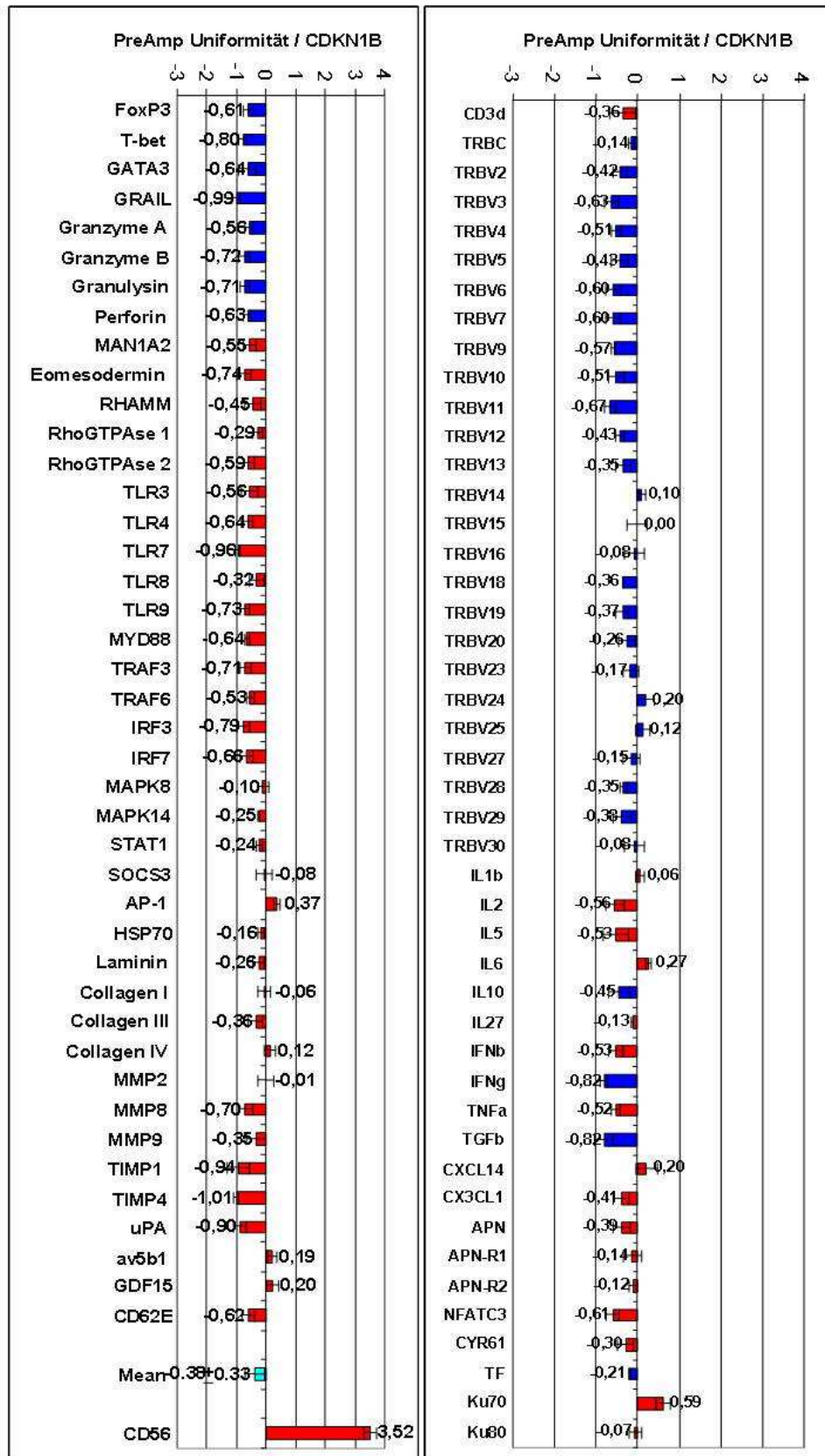


Abb. 3: T-PreAmp Uniformität an EMBs in Bezug auf das *housekeeping* Gen CDKN1B. In den blauen Balken sind die selbstentwickelten *gene assays*, in den roten Balken die inventarisierten ABI Taqman® *Genexpressionsassays* dargestellt.

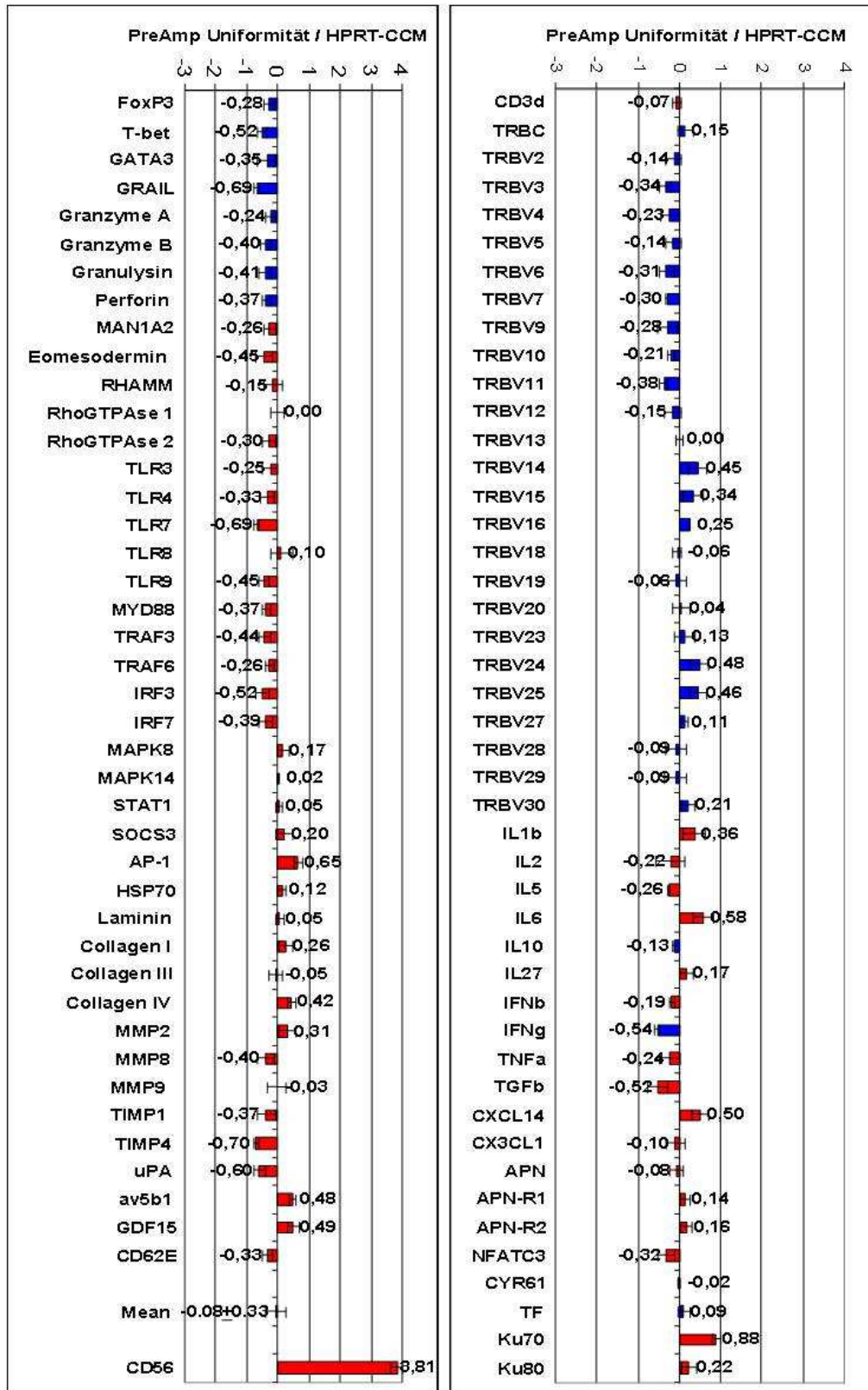


Abb. 4: T-PreAmp Uniformität an EMBs in Bezug auf das *housekeeping* Gen HPRT CCM.

In den blauen Balken sind die selbstentwickelten *gene* assays, in den roten Balken die inventarisierten ABI Taqman® Genexpressionsassays dargestellt.

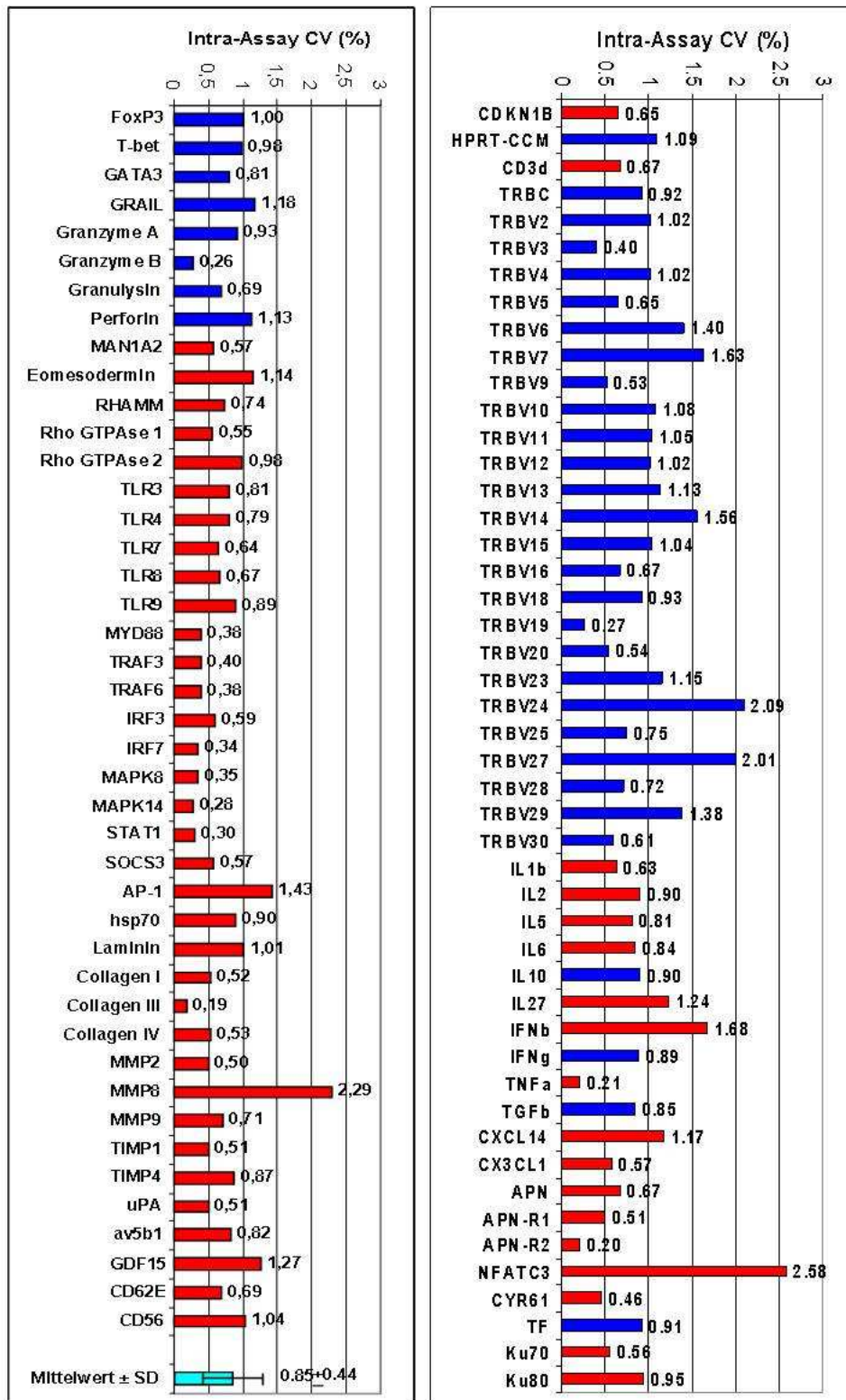


Abb. 5: Intra-Assay Varianzkoeffizienten des T-PreAmp Verfahrens an cDNA von EMBs. Inter-assay CV der T-PreAmp Methode, resultierend aus 5 unterschiedlichen T-PreAmp Reaktionen aus der cDNA der identischen EMBs. ABI inventarisierte Taqman® Genexpressionsassays sind durch rote Balken, selbst entwickelte Genexpressionsassays durch blaue Balken markiert. Der türkisfarbene Balken zeigt den Mittelwert±SD aller Bestimmungen an.

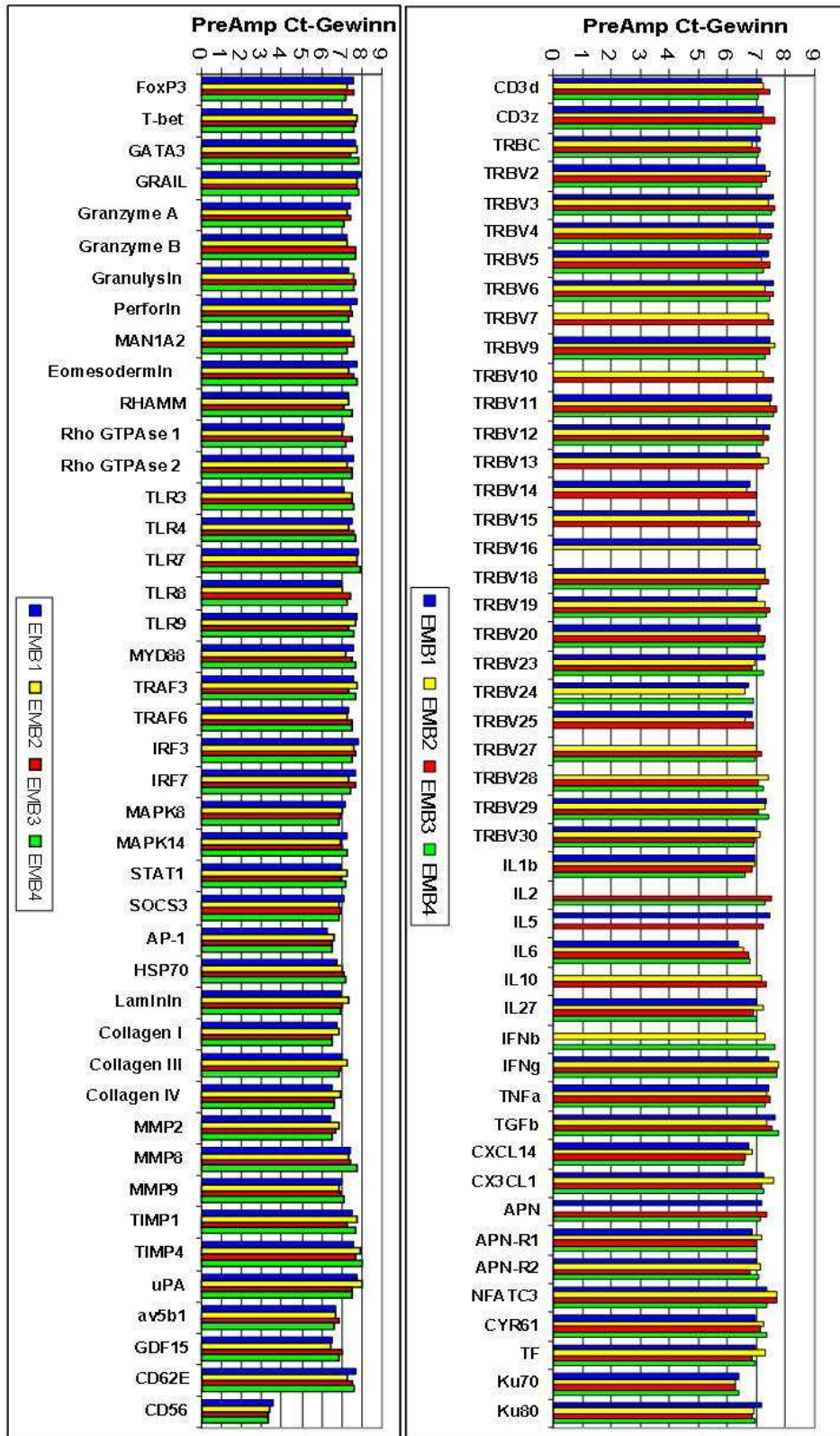


Abb. 6: Inter-Assay Varianz des Ct-Gewinns des T-PreAmp Verfahrens an cDNA von EMBs. Ct-Gewinn durch das T-PreAmp Verfahren aus 4 separat präamplifizierten EMBs (markiert durch 4 verschiedene Farben). Die einzelnen Ct-Werte von CDKN1B und HPRT-CCM sind nicht gezeigt, da diese in allen 38 präamplifizierten EMBs bestimmt wurden.

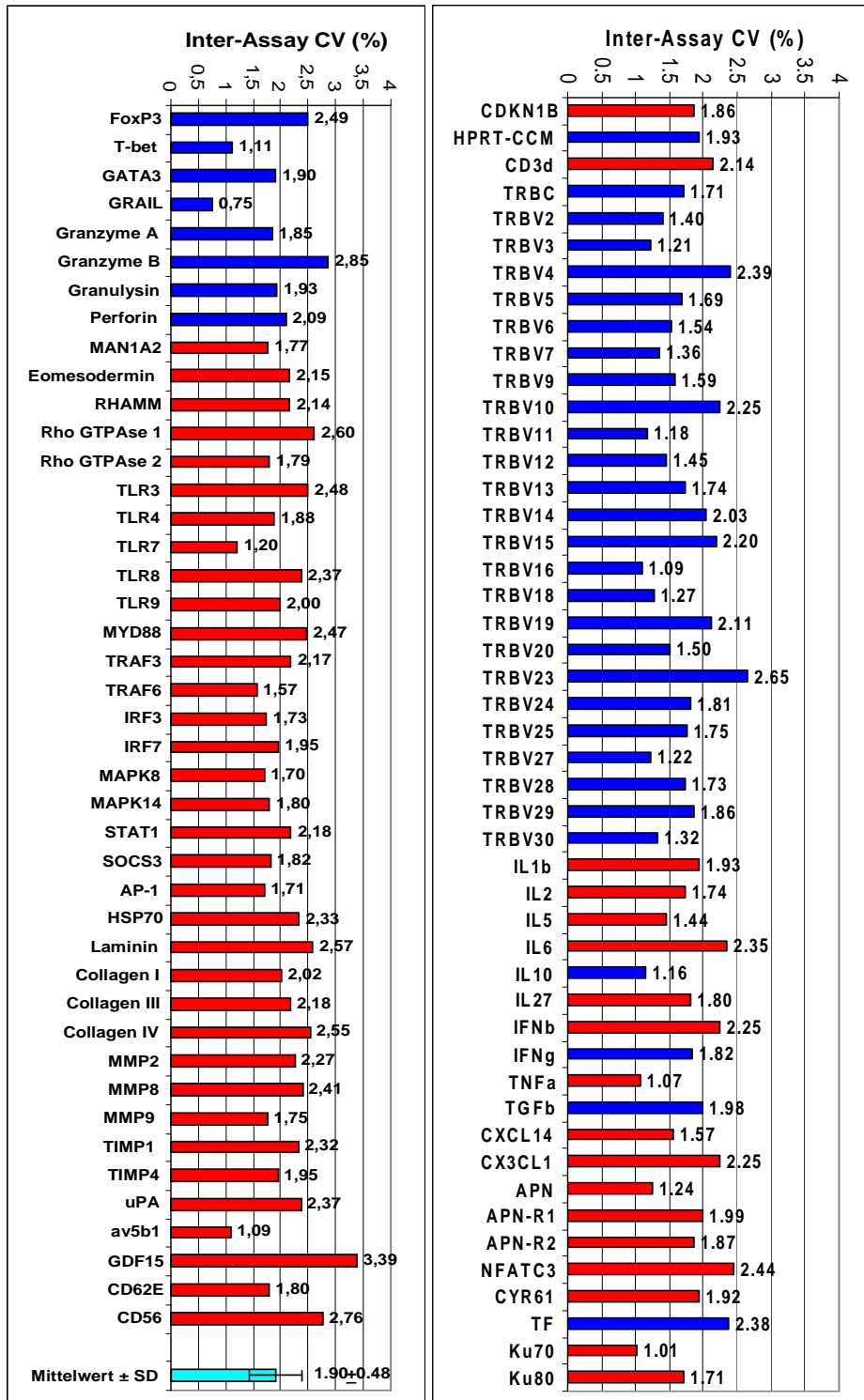


Abb. 7: Inter-Assay Varianzkoeffizienten des T-PreAmp Verfahrens an cDNA von EMBs. Inter-assay CV der T-PreAmp Methode, resultierend aus den T-PreAmp Reaktionen von 4 unterschiedlichen EMBs. ABI inventarisierte Taqman® Genexpressionsassays sind durch rote Balken, selbst entwickelte Genexpressionsassays durch blaue Balken markiert. Der türkisfarbene Balken zeigt den Mittelwert±SD aller Bestimmungen an

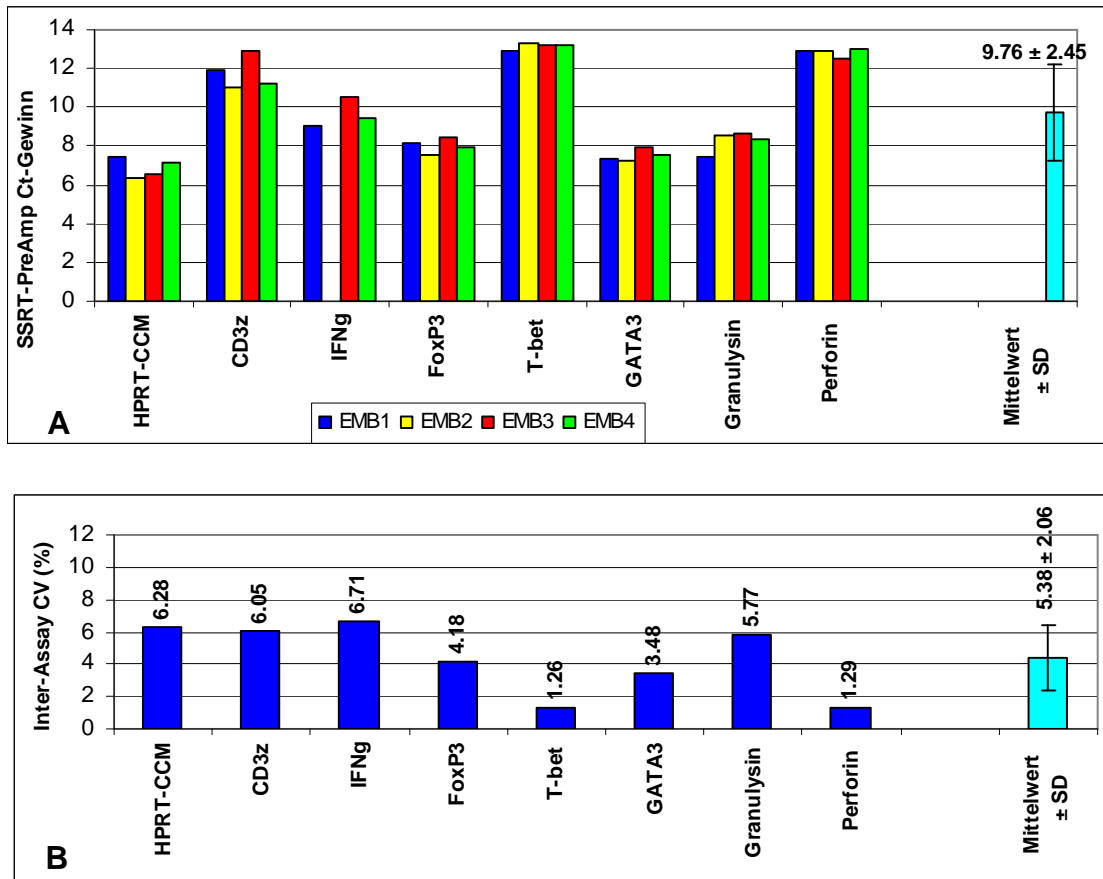


Abb. 8: Inter-Assay Varianz des SSRT-PreAmp Verfahrens an RNA aus 4 EMBs **A)** Ct Gewinn aus RNA von 4 EMBs (dargestellt durch unterschiedliche Balkenfarben) mittels SSRT-PreAmp. **B)** Inter-Assay CV der untersuchten Genexpressionsassays, resultierend aus den 4 mittels SSRT präamplifizierten EMBs. Der türkisarbene Balken zeigt den Mittelwert±SD aller Bestimmungen an.

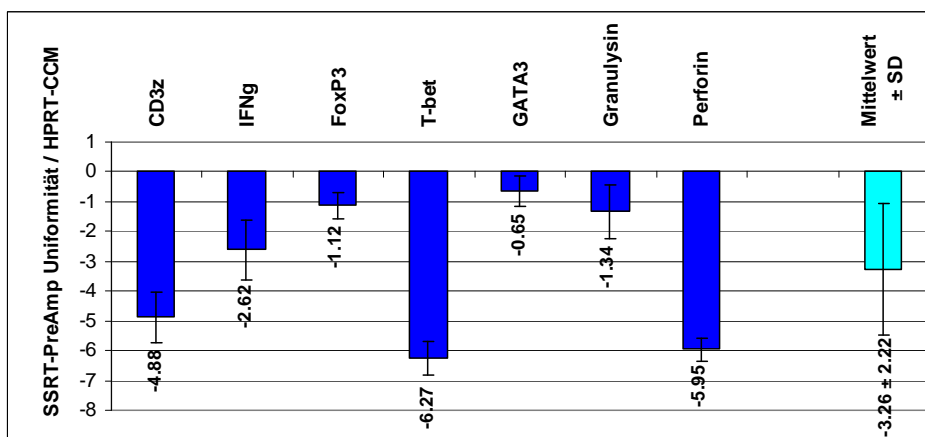


Abb. 9: SSRT-PreAmp Uniformität an RNA aus EMBs in Bezug auf HPRT-CCM. Die Werte sind als Mittelwert±SD angegeben. Die blauen Balken zeigen die PreAmp Uniformitäten der Zielgene an. Der türkisarbene Balken zeigt den Mittelwert±SD aller Bestimmungen an.

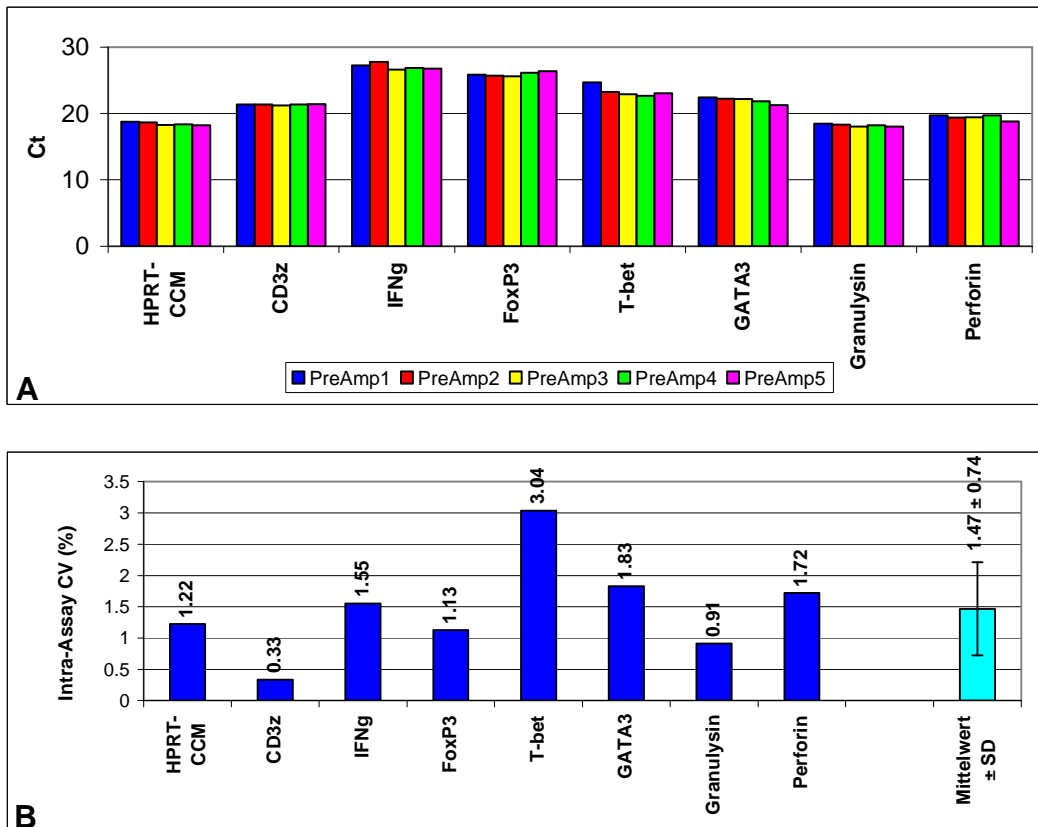


Abb. 10: Intra-Assay Varianz des SSRT-PreAmp Verfahrens an RNA aus EMBs **A)** Ct Gewinn aus 5 unabhängig durchgeführten SSRT-PreAmp Reaktionen aus der RNA einer EMBs (dargestellt durch unterschiedliche Balkenfarben). **B)** Intra-Assay CV der untersuchten Genexpressionsassays, resultierend aus den 5 SSRT PreAmp Reaktionen. Der türkisfarbene Balken zeigt den Mittelwert±SD aller Bestimmungen an.

Tab. 1: Differentielle Genexpressionsanalysen in EMBs von Patienten mit immunhistologisch gesicherter DCMi mittels T-PreAmp real-time RT-PCR, normalisiert auf das Gen CDKN1B

Gen	DCM	DCMi	p Wert
HPRT-CCM	0,299240±0,045955	0,310031±0,112730	n,s,
CD3d	0,005313±0,003732	0,013202±0,003592	<0,0001
CD3z	0,015746±0,004887	0,026458±0,005847	0,0062
TRBC	0,004886±0,002290	0,007917±0,002221	0,0050
TRBV2	0,000540±0,000401	0,001312±0,000675	0,0045
TRBV4	0,000471±0,000376	0,000471±0,000901	0,0039
TRBV6	0,001088±0,000896	0,001932±0,000751	0,0450
TRBV10	0,000081±0,000080	0,000269±0,000258	0,0336
TRBV20	0,001409±0,000978	0,006499±0,007088	0,0290
TRBV23	0,000134±0,000077	0,001520±0,001829	0,0208
TRBV24	0,000103±0,000109	0,001022±0,000972	0,0055
TRBV29	0,000460±0,000343	0,001011±0,000610	0,0248
IL6	0,000652±0,000427	0,001199±0,000569	0,0276
TNFα	0,009038±0,004486	0,016878±0,010029	0,0165
CXCL14	0,044727±0,039035	0,016396±0,014341	0,0197
CX3CL1	0,310451±0,136292	0,480034±0,317710	0,0170
APN	0,109132±0,143038	0,011442±0,017685	0,0057
NFATC3	0,339242±0,117685	0,722471±0,255529	0,0063
CYR61	0,275270±0,138329	0,927302±0,688838	<0,0001
TF	0,927613±0,127482	0,609946±0,235874	0,0158
T-bet	0,004867±0,001658	0,009905±0,004872	0,0275
Granzyme A	0,006380±0,002616	0,016283±0,003742	0,0003
Granzyme B	0,024523±0,010114	0,047780±0,011263	0,0038
Granulysin	0,119557±0,050672	0,279193±0,127406	0,0124
Eomesodermin	0,004603±0,003034	0,010941±0,002335	0,0041
av5β1	0,324506±0,088420	0,537818±0,296695	0,0061
GDF15	0,007592±0,005663	0,013882±0,009277	0,0348
CD62E	0,000879±0,000591	0,003719±0,002605	0,0187

Signifikant unterschiedliche Expressionen von Zielgenen, normalisiert auf CDKN1B, in EMBs von DCM-Patienten mit immunhistologisch gesicherter DCMi (>7,0 CD3⁺ T-Lymphozyten/mm²) verglichen mit DCM-Patienten ohne immunhistologischen DCMi Nachweis. HPRT-CCM zeigte in diesem Vergleich, ebenso wie die anderen bestimmten Gene, keinen signifikanten Expressionsunterschied (n.s.: nicht-signifikant) auf. Es sind die Mittelwerte±SD der auf das Gen CDKN1B normalisierten Expressionen angegeben.

Anhang

Tab. 2: T-PreAmp real-time RT-PCR Genexpressionsergebnisse aller untersuchter Gene an EMBs von DCM und DCMi Patienten in Bezug auf HPRT.

Gene	DCM	DCMi	p value
CDKN1B	3,12755±1,57223	3,73352±1,68606	n.s.
CD3d	0,014163±0,008761	0,045395±0,015252	<0,0001
CD3z	0,043139±0,010119	0,060631±0,007718	0,0023
TRBC	0,015027±0,010150	0,027622±0,010532	0,0098
TRBV2	0,001487±0,001300	0,004503±0,002881	0,0053
TRBV3	0,002057±0,001900	0,003093±0,001438	n.s.
TRBV4	0,001501±0,001432	0,005441±0,003850	0,0047
TRBV5	0,002831±0,001945	0,003372±0,001318	n.s.
TRBV6	0,002926±0,002154	0,005478±0,002562	0,0307
TRBV7	0,000171±0,000123	0,000499±0,000628	n.s.
TRBV9	0,001394±0,000978	0,00298±0,003142	n.s.
TRBV10	0,000186±0,000127	0,000905±0,000967	0,0245
TRBV11	0,001264±0,000845	0,002763±0,002110	n.s.
TRBV12	0,006053±0,008008	0,008183±0,005067	n.s.
TRBV13	0,000763±0,000856	0,000724±0,000544	n.s.
TRBV14	0,000452±0,000543	0,000806±0,000679	n.s.
TRBV15	0,000163±0,000113	0,001143±0,001657	n.s.
TRBV16	0,000067±0,000070	0,000064±0,000035	n.s.
TRBV18	0,001177±0,000969	0,002859±0,002871	n.s.
TRBV19	0,005453±0,00884	0,006189±0,005485	n.s.
TRBV20	0,003935±0,003140	0,019818±0,018318	0,0105
TRBV23	0,000408±0,000269	0,006402±0,008324	0,0270
TRBV24	0,000282±0,000265	0,004754±0,006232	0,0075
TRBV25	0,000201±0,000147	0,000765±0,00085	n.s.
TRBV27	0,000522±0,000428	0,000870±0,000652	n.s.
TRBV28	0,003027±0,003362	0,004337±0,003937	n.s.

Anhang

TRBV29	0,001302+0,001168	0,002815+0,00138	0,0192
TRBV30	0,001026+0,003524	0,003524+0,003524	n.s.
IL1b	0,013854+0,016054	0,012714+0,004540	n.s.
IL2	0,000102+0,000071	0,000144+0,000092	n.s.
IL5	0,000038+0,000029	0,000064+0,000047	n.s.
IL6	0,002020+0,001246	0,004133+0,002452	0,0094
IL10	0,001182+0,000779	0,004259+0,000316	n.s.
IL27	0,002125+0,001724	0,004983+0,009014	n.s.
IFNb	0,001815+0,001220	0,001300+0,000648	n.s.
IFNg	0,000193+0,000158	0,000343+0,000181	n.s.
TNFa	0,028511+0,014230	0,052024+0,017001	0,0049
TGFb	1,30737+0,30945	1,63956+1,19337	n.s.
CXCL14	0,151853+0,145437	0,054158+0,052000	0,0299
CX3CL1	0,96874+0,431717	1,39651+0,790158	0,0245
APN	0,390377+0,555952	0,035850+0,058782	0,0092
APN-R1	3,53288+0,45195	4,99193+0,73804	n.s.
APN-R2	1,19250+0,55202	1,33647+1,07774	n.s.
NFATC3	1,29493+0,479396	2,56855+0,776956	0,0052
CYR61	0,85785+0,47640	2,94840+2,33843	<.0001
TF	3,59608+1,01046	2,14158+0,53169	0,0109
Ku70	6.59481+2,22542	6.46788+1,66238	n.s.
Ku80	5.67282+2,03474	6.66986+2,80126	n.s.
FoxP3	0,003726+0,001700	0,004675+0,001079	n.s.
T-bet	0,014431+0,005826	0,022267+0,008127	0,0355
GATA3	0,036669+0,014794	0,035425+0,012985	n.s.
GRAIL	0,000360+0,000344	0,000882+0,000673	n.s.
Granzyme A	0,014704+0,006914	0,035028+0,011726	0,0004
Granzyme B	0,062487+0,022406	0,105532+0,026082	0,0027

Anhang

Granulysin	0,206285+0,186560	0,532339+0,327002	0,0183
Perforin	0,174231+0,065640	0,222637+0,025587	n.s.
MAN1A2	1,71415+0,708471	1,25648+0,296617	n.s.
Eomesodermin	0,014428+0,007246	0,036024+0,007900	0,0011
RHAMM	0,003246+0,002201	0,002402+0,000121	n.s.
Rho GTPase 1	0,025522+0,012113	0,024687+0,007481	n.s.
Rho GTPase 2	0,095418+0,085820	0,087212+0,036425	n.s.
TLR3	0,283233+0,192424	0,175524+0,093475	n.s.
TLR4	0,119932+0,031982	0,097289+0,032813	n.s.
TLR7	0,033287+0,012271	0,035395+0,022657	n.s.
TLR8	0,002743+0,003041	0,001718+0,000684	n.s.
TLR9	0,026647+0,013467	0,019119+0,004807	n.s.
MYD88	0,338701+0,138731	0,363109+0,309805	n.s.
TRAF3	0,705678+0,141575	0,592868+0,276950	n.s.
TRAF6	0,283120+0,102816	0,219573+0,053252	n.s.
IRF3	0,929970+0,303027	0,749030+0,318643	n.s.
IRF7	0,243138+0,139050	0,156422+0,044073	n.s.
MAPK8	1,79372+0,16447	1,56295+0,15802	n.s.
MAPK14	2,55389+1,12504	2,30904+0,40677	n.s.
STAT1	2,79895+1,36936	2,23812+0,81226	n.s.
SOCS3	0,059504+0,103335	0,025227+0,022936	n.s.
AP-1	4,07092+2,48069	3,01740+0,87571	n.s.
HSP70	3,14543+0,88026	2,76154+1,07441	n.s.
Laminin	0,061661+0,030909	0,064347+0,036184	n.s.
Collagen I	2,26194+1,59476	1,71738+0,99188	n.s.
Collagen III	1,87043+1,30297	2,53042+1,48650	n.s.
Collagen IV	2,49675+0,949609	2,20450+0,773285	n.s.
MMP2	5,27479+3,61284	3,94349+1,55918	n.s.

Anhang

MMP8	0,008292+0,012456	0,000689+0,001448	n.s.
MMP9	0,086567+0,02957	0,018575+0,02831	n.s.
TIMP1	3,38820+2,04022	2,45604+1,00193	n.s.
TIMP4	0,846876+0,401468	0,656733+0,291593	n.s.
uPA	0,082603+0,026158	0,072779+0,020283	n.s.
av5b1	1,04571+0,283760	1,71316+0,844310	0,0033
GDF15	0,020984+0,013187	0,041715+0,028283	0,0127
CD62E	0,002714+0,001093	0,012877+0,008890	0,0119
CD56	0,003084+0,001365	0,002686+0,001000	n.s.

Tab. 3: T-PreAmp real-time RT-PCR Genexpressionsergebnisse aller untersuchter Gene an EMBs von DCM und DCMi Patienten in Bezug auf CDKN1B.

Gene	E / CDKN1B DCM	E / CDKN1B DCMi	p value
HPRT-CCM	0,299240±0,045955	0,310031±0,112730	n.s.
CD3d	0,005313±0,003732	0,013202±0,003592	<0,0001
CD3z	0,015746±0,004887	0,026458±0,005847	0,0062
TRBC	0,004886±0,002290	0,007917±0,002221	0,0050
TRBV2	0,000540±0,000401	0,001312±0,000675	0,0045
TRBV3	0,000775±0,000589	0,001102±0,000664	n.s.
TRBV4	0,000471±0,000376	0,000471±0,000901	0,0039
TRBV5	0,001023±0,000769	0,001066±0,000527	n.s.
TRBV6	0,001088±0,000896	0,001932±0,000751	0,0450
TRBV7	0,000074±0,000071	0,000144±0,000119	n.s.
TRBV9	0,108572±0,077673	0,108497±0,086295	n.s.
TRBV10	0,000081±0,000080	0,000269±0,000258	0,0336
TRBV11	0,000439±0,000296	0,000751±0,000438	n.s.
TRBV12	0,002041±0,002092	0,002505±0,001481	n.s.

Anhang

TRBV13	0,000284±0,000345	0,000230±0,000122	n.s.
TRBV14	0,000189±0,000283	0,000257±0,000240	n.s.
TRBV15	0,000067±0,000063	0,000330±0,000433	n.s.
TRBV16	0,000038±0,000042	0,000020±0,000008	n.s.
TRBV18	0,000471±0,000443	0,000681±0,000544	n.s.
TRBV19	0,001797±0,002304	0,001888±0,001510	n.s.
TRBV20	0,001409±0,000978	0,006499±0,007088	0,0290
TRBV23	0,000134±0,000077	0,001520±0,001829	0,0208
TRBV24	0,000103±0,000109	0,001022±0,000972	0,0055
TRBV25	0,000082±0,000071	0,000189±0,000179	n.s.
TRBV27	0,000169±0,000098	0,000264±0,000226	n.s.
TRBV28	0,000944±0,000925	0,001511±0,001434	n.s.
TRBV29	0,000460±0,000343	0,001011±0,000610	0,0248
TRBV30	0,000302±0,000307	0,000966±0,000952	n.s.
IL1b	0,004484±0,005270	0,003918±0,001778	n.s.
IL2	0,000040±0,000028	0,000044±0,000029	n.s.
IL5	0,000013±0,000009	0,000018±0,000012	n.s.
IL6	0,000652±0,000427	0,001199±0,000569	0,0276
IL10	0,000444±0,000277	0,000383±0,000114	n.s.
IL27	0,000697±0,000544	0,001469±0,002114	n.s.
IFNb	0,000539±0,000373	0,000408±0,000124	n.s.
IFNg	0,000077±0,000082	0,000167±0,000103	n.s.
TNFa	0,009038±0,004486	0,016878±0,010029	0,0165
TGFb	0,446927±0,100948	0,694076±0,345378	n.s.
CXCL14	0,044727±0,039035	0,016396±0,014341	0,0197
CX3CL1	0,310451±0,136292	0,480034±0,317710	0,0170
APN	0,109132±0,143038	0,011442±0,017685	0,0057
APN-R1	1,09161±0,241260	1,43347±0,853256	n.s.

Anhang

APN-R2	0,363759±0,133625	0,427120±0,332245	n.s.
NFATC3	0,339242±0,117685	0,722471±0,255529	0,0063
CYR61	0,275270±0,138329	0,927302±0,688838	<.0001
TF	0,927613±0,127482	0,609946±0,235874	0,0158
Ku70	1,98543±0,321460	2,15458±0,580389	n.s.
Ku80	1,69723±0,478514	2,03516±0,539191	n.s.
FoxP3	0,001458±0,000992	0,002031±0,000569	n.s.
T-bet	0,004867±0,001658	0,009905±0,004872	0,0275
GATA3	0,014280±0,004380	0,015729±0,008063	n.s.
GRAIL	0,002158±0,002814	0,002076±0,001870	n.s.
Granzyme A	0,006380±0,002616	0,016283±0,003742	0,0003
Granzyme B	0,024523±0,010114	0,047780±0,011263	0,0038
Granulysin	0,119557±0,050672	0,279193±0,127406	0,0124
Perforin	0,075309±0,00788	0,093023±0,00932	n.s.
MAN1A2	0,532779±0,203600	0,398876±0,143717	n.s.
Eomesodermin	0,004603±0,003034	0,010941±0,002335	0,0041
RHAMM	0,001071±0,001039	0,000742±0,000141	n.s.
Rho GTPase 1	0,008398±0,004888	0,007812±0,003404	n.s.
Rho GTPase 2	0,026812±0,019056	0,026619±0,011481	n.s.
TLR3	0,076626±0,050145	0,058470±0,035159	n.s.
TLR4	0,457398±0,196947	0,385117±0,094412	n.s.
TLR7	0,009547±0,004128	0,011503±0,006589	n.s.
TLR8	0,000767±0,000837	0,000581±0,000263	n.s.
TLR9	0,076597±0,057265	0,055819±0,016446	n.s.
MYD88	0,094490±0,020615	0,108869±0,057315	n.s.
TRAF3	0,217706±0,046471	0,188967±0,041840	n.s.
TRAF6	0,080386±0,015606	0,075971±0,015030	n.s.
IRF3	0,261461±0,042617	0,240426±0,048446	n.s.

Anhang

IRF7	0,067211±0,00666	0,052814±0,00613	n.s.
MAPK8	0,592280±0,139968	0,521065±0,119595	n.s.
MAPK14	0,757344±0,125538	0,676438±0,128872	n.s.
STAT1	0,804401±0,231204	0,840088±0,500526	n.s.
SOCS3	0,019162±0,038797	0,008718±0,007042	n.s.
AP-1	1,08880±0,538690	1,02269±0,314771	n.s.
HSP70	1,00170±0,493614	0,95446±0,318767	n.s.
Laminin	0,017334±0,008134	0,020180±0,008664	n.s.
Collagen I	0,666100±0,511388	0,615157±0,424001	n.s.
Collagen III	0,620918±0,460926	0,760717±0,520429	n.s.
Collagen IV	0,735370±0,362891	0,752105±0,304101	n.s.
MMP2	1,40084±0,808405	1,36931±0,518494	n.s.
MMP8	0,002316±0,003422	0,000230±0,000435	n.s.
MMP9	0,029770±0,041028	0,006372±0,006333	n.s.
TIMP1	0,869000±0,387152	0,804672±0,253732	n.s.
TIMP4	0,231838±0,096896	0,214803±0,085051	n.s.
uPA	0,023840±0,007039	0,024350±0,008948	n.s.
av5b1	0,324506±0,088420	0,537818±0,296695	0,0061
GDF15	0,007592±0,005663	0,013882±0,009277	0,0348
CD62E	0,000879±0,000591	0,003719±0,002605	0,0187
CD56	0,000800±0,000334	0,000825±0,000260	n.s.

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: UNTERSCHIEDLICHE KLINISCHE PRÄSENTATIONEN DER AKUTEN MYOKARDITIS (AMC) UND DIFFERENTE KLINISCHE VERLÄUFE UNTER KONVENTIONELLER HERZINSUFFIZIENZ-THERAPIE.....	3
ABB. 2: PATHOGENESE UND PHASEN DER MYOKARDITIS.....	5
ABB. 3: WIRKUNGSWEISE DER VERSCHIEDENEN T-ZELLEN (CTL, TH1- UND TH2-ZELLEN) (94).....	11
ABB. 4: STRUKTUR DES T-ZELLREZEPTORS (TCR); AUS (84, 94).	13
ABB. 5: T-ZELL REZEPTOR α UND β GEN-REARRANGEMENT (UMLAGERUNG) AUS (84, 94). 14	14
ABB. 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES T-PREAMP-VERFAHRENS (ÜBERSETZT AUS (169)).....	29
ABB. 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES SSRT-PREAMP-VERFAHRENS (169). ...	30
ABB. 8: RNA-KONZENTRATIONEN VON EXPLANTIERTEM HERZMUSKELGEWEBE NACH VERSCHIEDENEN RNA-ISOLIERUNGSMETHODEN.....	40
ABB. 9: RNA-RATIO OD_{260NM}/OD_{280NM} DER VERSCHIEDENEN RNA-ISOLIERUNGSMETHODEN AUS EXPLANTIERTEM HERZMUSKELGEWEBE.....	41
ABB. 10: VERGLEICH DER CT-WERTE AUS EXPLANTIERTEN HERZMUSKELPROBEN NACH VERSCHIEDENEN RNA-ISOLIERUNGSMETHODEN.....	42
ABB. 11: AUSSCHLUSS EINER DNA-KREUZREAKTIVITÄT DER TRBV/TRBC PRIMER-/SONDENSYSTEME.	44
ABB. 12: UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT DER TRBV-PRIMERSYSTEME AN LYMPHOMZELLINIEN.....	45
ABB. 13: UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT DER TRBV-PRIMERSYSTEME AN LYMPHOMZELLINIEN.....	46
ABB. 14: DARSTELLUNG DER EXPRESSION IN BEZUG AUF DAS <i>HOUSE KEEPING</i> GEN DER VERMISCHUNGSVERSUCHE AN ZELLINIEN.....	47
ABB. 15: BESTIMMUNG DER PCR EFFIZIENZ DER TRBV/TRBC <i>GENE</i> ASSAYS.....	48
ABB. 16: VERGLEICH VON HPRT-ABI, HPRT-CCM UND CDKN1B AN ADJUSTIERTER RNA AUS DONOR- UND EXPLANTIERTEN DCM-HERZEN.	50
ABB. 17: VERGLEICH DES CT-GEWINNS AN HPRT-CCM UND HPRT-ABI NACH PRÄAMPLIFIKATION (T-PREAMP) AN PBMCS.	51
ABB. 18: PCR EFFIZIENZ UND PREAMP UNIFORMITÄT AN PBMCS MITTELS T-PREAMP.....	52
ABB. 19: MITTLERER CT-WERT DER DIREKTEN REAL-TIME RT-PCR VON DER GEPOOLTEN PBMCS CDNA (BLAUE BALKEN) UND DER T-PREAMP CDNA (ROTE BALKEN).....	53
ABB. 20: T-PREAMP PRÄAMPLIFIKATIONSUNIFORMITÄT AN PBMCS.	55

Anhang

ABB. 21:	INTRA-ASSAY VARIANZ DES T-PREAMP VERFAHRENS AN CDNA VON EMBS.	57
ABB. 22:	CT-GEWINN DURCH SSRT-PREAMP AN CDNA VON PBMCS.	58
ABB. 23:	VERGLEICH DER CT-WERTE MIT UND OHNE SSRT-PREAMP.....	59
ABB. 24:	SSRT-PREAMP UNIFORMITÄT AN PBMCS..	59
ABB. 25:	TRBV 3 DOMINANZ IM AKUTEN UND CHRONISCHEN STADIUM BEI CVB3 INFIZIERTEN SWR-MÄUSEN.	64
ABB. 26:	VERGLEICH DER TRBV EXPRESSION BEI CVB3 INFIZIERTEN SWR-MÄUSEN	65
ABB. 29:	VERLAUF DER CLUSTERBILDUNG IN <i>IN VITRO</i> T-ZELLKULTUREN.	70
ABB. 30:	IMMUNHISTOCHEMISCHE DARSTELLUNG VON KULTUREN MIT ERFOLGREICHER UND KEINER CLUSTERBILDUNG.....	71
ABB. 31:	ZELLZAHLEN UND VITALITÄT WÄHREND DER LÄNGERFRISTIGEN KULTIVIERUNG VON CD3 ⁺ T-ZELLEN IN HS-RPMI, FBS-RPMI, PANSERIN 413 TM UND X-VIVO15 TM	72
ABB. 32:	IMMUNFÄRBUNG VON T-ZELLEN UND MONOZYTEN/MAKROPHAGEN NACH 14 TAGEN (A) UND 28 TAGEN (B).....	73
ABB. 33:	VERGLEICH DER TRBV EXPRESSION IN VIER VERSCHIEDENEN ZELLKULTURMEDIEN.....	75
ABB. 34:	HISTOLOGISCHE (A, B, C) UND IMMUNHISTOLOGISCHE (D-I) FÄRBUNG (CD3: D-F, HLA KLASSEI EXPRESSION: G-I) DER BIOPSIEN ZUM ZEITPUNKT DER INITIALEN PRÄSENTATION UND DER FOLGEUNTERSUCHUNGEN NACH 6 UND 12 MONATEN.....	87
ABB. 35:	FACS ANALYSE DER ZWEI B19V NS1-SPEZIFISCHEN CD8 ⁺ T-ZELLANTWORTEN UND EINER CD4 ⁺ T-ZELLANTWORT 10 MONATE NACH DER INITIALEN PRÄSENTATION.....	89
ABB. 36:	TRBV EXPRESSION DER B19V NS1-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN.....	90
ABB. 37:	EXPRESSION DER EFFEKTOR-T-ZELLMARKER VON B19V NS1-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN.....	91
ABB. 1:	MITTLERER CT-GEWINN DURCH T-PREAMP AN PBMCS.	IV
ABB. 2:	CT-GEWINN DURCH T-PREAMP AN CDNA VON EMBS..	V
ABB. 3:	T-PREAMP UNIFORMITÄT AN EMBS IN BEZUG AUF DAS <i>HOUSEKEEPING</i> GEN CDKN1B.	VI
ABB. 4:	T-PREAMP UNIFORMITÄT AN EMBS IN BEZUG AUF DAS <i>HOUSEKEEPING</i> GEN HPRT CCM.	VII
ABB. 5:	INTRA-ASSAY VARIANZKOEFFIZIENTEN DES T-PREAMP VERFAHRENS AN CDNA VON EMBS.....	VIII
ABB. 6:	INTER-ASSAY VARIANZ DES CT-GEWINNS DES T-PREAMP VERFAHRENS AN CDNA VON EMBS.....	IX
ABB. 7:	INTER-ASSAY VARIANZKOEFFIZIENTEN DES T-PREAMP VERFAHRENS AN CDNA VON EMBS.....	X

Anhang

ABB. 8: INTER-ASSAY VARIANZ DES SSRT-PREAMP VERFAHRENS AN RNA AUS 4 EMBS.....	XI
ABB. 9: SSRT-PREAMP UNIFORMITÄT AN RNA AUS EMBS IN BEZUG AUF HPRT-CCM...	XI
ABB. 10: INTRA-ASSAY VARIANZ DES SSRT-PREAMP VERFAHRENS AN RNA AUS EMBS	XII

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den