

5. DISKUSSION

Die enterovirale Herzerkrankung des Menschen ist von großer klinischer Relevanz. Unter Verwendung klonierter CVB3-cDNA als Enterovirusgruppen-spezifische DNA-Sonde konnte mittels *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, daß enterovirale RNA in allen Stadien einer akuten und chronischen Myokarditis sowie bei Patienten mit terminaler dilatativer Kardiomyopathie nachweisbar ist (Kandolf & Hofschneider, 1985; Kandolf et al., 1993). Die Persistenz enteroviraler RNA in endomyokardialen Verlaufsbiospien von Patienten spricht für eine ätiologische Beteiligung von Enteroviren hinsichtlich der Pathogenese einer chronischen Herzmuskelerkrankung. Andere Arbeitsgruppen diskutieren eine vornehmlich autoimmun-vermittelte Zerstörung des Myokards und Aufrechterhaltung des entzündlichen Prozesses, wobei in der enteroviralen Infektion nur die auslösende Ursache für eine nachfolgende Autoimmunreaktion zu sehen ist (Huber & Lodge, 1984; Seko et al., 1993). Mit der Etablierung von Tiermodellen der Enterovirus-induzierten Myokarditis in der Maus konnten wichtige Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese der chronischen Herzerkrankung gewonnen werden (Klingel et al., 1992). Es konnte gezeigt werden, daß bei permissiven Mausstämmen, wie zum Beispiel A.CA/J-Mäusen (H-2^f), die chronische Herzmuskelentzündung durch eine persistierende Virusinfektion im Myokard induziert und aufrecht erhalten wird (Klingel et al., 1992). Durch die Verfügbarkeit transgener knock out Mäuse kann nun gezielt die Aufgabe einzelner Komponenten des Immunsystems im Verlauf der CVB3-Myokarditis *in vivo* untersucht werden, wobei vor allem die Bedeutung von Effektormechanismen der erworbenen Immunabwehr diskutiert wird (Chow et al., 1992; Kandolf et al., 1987).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Aspekte der zellulär vermittelten Zytotoxizität im Verlauf der CVB3-induzierten Myokarditis untersucht. Hierfür wurden zwei transgene knock out Mausstämmen ausgewählt, deren zytotoxische Effektormechanismen beeinträchtigt sind. β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse sind nicht in der Lage, MHC Klasse I zu exprimieren. Dies führt dazu, daß keine MHC Klasse I restringierten, zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten ausgebildet werden können (Zijlstra et al., 1990). Perforin-defiziente Mäuse verfügen zwar über zytotoxische T-Lymphozyten und Natural-Killer-Zellen, können aber keine Perforin-abhängige Zytolyse ihrer Zielzellen bewirken (Kägi et al., 1994). Die Perforin-vermittelte Zytotoxizität stellt den einzigen bislang bekannten zytotoxischen Mechanismus dar, über den

CD8⁺ T-Lymphozyten und Natural Killer Zellen verfügen (Shiver & Henkart, 1992). Diese beiden immundefizienten Mausstämme sowie C57BL/6J Wildtypmäuse wurden mit CVB3 infiziert und der Verlauf der Infektion verglichen.

Die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen und der *in situ* Hybridisierungen zum Nachweis der enteroviralen Infektion zeigen, daß C57BL/6J Wildtypmäuse infolge der CVB3-Inokulation eine akute Myokarditis entwickeln, welche einhergeht mit mäßiggradiger Schädigung des Myokards. Im Verlauf der generalisierten CVB3-Infektion ist nicht ausschließlich das Herz als Manifestationsorgan betroffen. Während der akuten Phase der Infektion lässt sich enterovirale RNA auch in Milz und Pankreas nachweisen. Ein ähnliches Infektionsmuster der Organe wurde bei CVB3-infizierten SWR/J Mäusen (H-2^q) beschrieben (Klingel et al., 1996). Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es bei den C57BL/6J Mäusen zur Eliminierung des Virus aus dem Organismus und zu reparativen Prozessen in den geschädigten Geweben. 28 Tage p.i. kann weder im Myokard noch in anderen Organen virale RNA nachgewiesen werden. Die C57BL/6J Mäuse entsprechen somit dem Typ eines resistenten Mausstammes, in welchem die Infektion zur Ausheilung gelangt. Resistenz bzw. Permissivität der Mäuse im Hinblick auf die Entwicklung einer chronischen Herzerkrankung ist abhängig vom Genotyp, jedoch nicht vom H-2 Haplotyp des jeweiligen Mausstammes (Rose et al., 1988; Klingel et al., 1992). So konnte gezeigt werden, daß DBA/1J Mäuse (H-2^q) im Gegensatz zu SWR/J Mäusen (H-2^q) in der Lage sind, das Virus während der akuten Phase der Infektion erfolgreich aus dem Organismus zu eliminieren (Klingel & Kandolf, 1993).

Perforin knock out Mäuse zeigen im gesamten Verlauf der Infektion ein dem Wildtyp nahezu identisches Bild, sowohl die Ausdehnung der Infektion als auch das Infektionsmuster der Organe betreffend. Obwohl die Perforin-defizienten Mäuse 8 Tage p.i. eine geringfügig großflächigere Virus-induzierte Myokardschädigung im Vergleich zu den immunkompetenten Kontrollmäusen aufweisen, gelingt ihnen im weiteren Verlauf der Infektion die Eliminierung des Virus sowohl aus dem Myokard als auch aus Milz und Pankreas. Im Gegensatz dazu zeigen β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse den für einen permissiven Mausstamm typischen Verlauf der CVB3-Infektion, welcher einhergeht mit einer akut schwer verlaufenden Herzmuskelentzündung. Diese ist charakterisiert durch großflächige Zerstörung des Myokards in Gegenwart zahlreicher CVB3-infizierter Myozyten und mononukleärer Infiltratzellen. In Korrelation zu den C57BL/6J und Perforin knock out Mäusen lässt sich auch bei den β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen während der akuten Phase der Infektion virale RNA in Milz und Pankreas nachweisen. Jedoch gelingt es den β_2

Mikroglobulin knock out Mäusen nicht, den Infektionserreger aus dem Organismus zu eliminieren und den Entzündungsprozess in Herz und Pankreas einzudämmen. 28 Tage p.i. haben diese immundefizienten Tiere eine chronische Myokarditis und chronische Pankreatitis entwickelt, welche jeweils mit der Persistenz enteroviraler RNA einhergehen. Der Verlauf der CVB3-Infektion im Myokard der β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse entspricht im wesentlichen dem eines permissiven Mausstammes wie er bei den immunkompetenten SWR/J-, DBA/2J-, A.BY/SnJ-, A.CA/SnJ- und A.SW/SnJ-Mäusen beschrieben wurde (Klingel et al., 1996; Klingel et al., 1993; Albrecht, 1991). In der chronischen Phase der Infektion lässt sich bei den β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen auch in der Milz und in ortständigen Immunzellen des Zentralnervensystems virale RNA nachweisen. Von permissiven SWR/J-Mäusen ist bekannt, daß in der chronischen Phase der Infektion enterovirale RNA in Milz und Lymphknoten persistiert (Klingel et al., 1996).

Durch verschiedene Arbeitsgruppen wurde die These postuliert, daß der Myozytenuntergang in der akuten Phase der CVB3-induzierten Myokarditis durch $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten mit Hilfe der Perforin-Granzym-vermittelten Zytotoxizität hervorgerufen wird (Huber et al., 1984; Guthrie et al., 1984; Seko et al., 1992). Hinweise für eine mögliche Beteiligung MHC Klasse I-restringierter zytotoxischer Effektormechanismen an der myokardialen Gewebeschädigung im Verlauf der enteroviralen Myokarditis ergaben sich aus der Beobachtung, daß Myozyten ab dem 3 Tag p.i. verstärkt MHC Klasse I exprimieren (Seko et al., 1990). Die Anwesenheit von $CD8^+$ T-Lymphozyten sowie der Nachweis der Perforinexpression im Myokard während der akuten Phase der enteroviralen Herzerkrankung führte zur Theorie der Perforin-vermittelten Myozytolyse (Young et al., 1990; Seko et al., 1991; Seko et al., 1992). Eine Bestätigung dieser Hypothese würde erwarten lassen, daß die Gewebeschädigung im Myokard akut infizierter Perforin-defizienter Mäuse geringere Ausmaße erreicht als in den immunkompetenten Kontrolltieren. Tatsächlich zeigte sich jedoch bei den Perforin knock out Mäusen 8 Tage p.i. eine etwas stärkere Myokardschädigung im Vergleich zu den C57BL/6J Mäusen. Das histopathologische Bild und der Verlauf der CVB3-Infektion in den Perforin knock out Mäusen macht deutlich, daß die Perforin-Granzym vermittelte Zytotoxizität keinen wesentlichen Faktor für die Gewebeschädigung im Myokard akut infizierter Tiere darstellt. Vielmehr sprechen diese Befunde dafür, daß die bei den CVB3-infizierten Perforin knock out Mäusen beobachtete Myozytolyse durch die zytolytische Aktivität des Virus bedingt ist.

Zahlreiche Untersuchungen anhand anderer Virusinfektionen haben gezeigt, daß die zelluläre Zytotoxizität einen entscheidenden Beitrag zur effektiven Eliminierung viraler Infektionserreger aus einem Organismus leisten kann. Die zelluläre Zytotoxizität kann über zwei verschiedene Mechanismen vermittelt werden. Bei Infektionen mit nicht-zytopathogenen Viren, wie dem lymphozytären Choriomeningitisvirus oder Theiler's Virus, spielt der Perforin-Granzym-Mechanismus, welcher von CD8⁺ T-Lymphozyten und Natural Killer Zellen vermittelt wird, eine herausragende Rolle für die Eliminierung der Erreger (Kägi et al., 1994; Dethlefs et al., 1997). Der Fas/FasLigand-Mechanismus stellt einen zweiten Mechanismus zur Vermittlung zellulärer Zytotoxizität dar. Dieses System wird hauptsächlich von CD4⁺ T-Lymphozyten genutzt, aber auch CD8⁺ T-Lymphozyten und Natural Killer Zellen können den FasLiganden zu exprimieren (Stalder et al., 1994; Arase et al., 1995). Die Fas/FasLigand-vermittelte Zytotoxizität ist für die Regulierung des physiologischen Zelltodes in regenerativen Zellpopulationen wie Immunzellen, Epithelzellen, Fibroblasten ect. bedeutsam und Fas wird in größeren Mengen auch im Herzmuskel exprimiert (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Bis heute gibt es noch keinen eindeutigen Nachweis, daß der Fas/FasLigand-Mechanismus eine Bedeutung hat bei der Eliminierung von Infektionserregern aus einem Organismus (Hahn et al., 1995). Sowohl der Fas/FasLigand-Mechanismus als auch die Perforin-Granzym vermittelte Zytotoxizität führen zum apoptotischen Untergang der Zielzelle. Zur Darstellung eventueller Unterschiede zwischen den immundefizienten Stämmen und dem Wildtypstamm in der Apoptosehäufigkeit, bzw. der Art der apoptotischen Zellen, wurde an dem Myokardgewebe CVB3-infizierter und nicht-infizierter Tiere aller drei Mausstämmen der TUNEL-Assay durchgeführt. Die Befunde diesbezüglich waren in allen drei Mausstämmen identisch. Bei den TUNEL-positiven Zellen handelt es sich hauptsächlich um Infiltratzellen, welche vermutlich im Rahmen des physiologischen Rückgangs der Infiltrate im Verlauf der Infektion oder aufgrund von Alterungsvorgängen apoptotisch eliminiert werden. Die apoptotischen Endothelzellen in der frühen Phase der CVB3-Infektion stellen einen interessanten Befund dar. Da die nicht-infizierten Kontrolltiere keine TUNEL-positiven Endothelzellen aufwiesen, ist die Annahme berechtigt, daß dieser Vorgang Virus-induziert ist. Es ist bislang unklar, ob die apoptotischen Endothelzellen infiziert sind und welcher Mechanismus für diesen Vorgang verantwortlich ist. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, daß Endothelzellen *in vivo* produktiv mit CVB3 infizierbar sind (Klingel et al., 1998). Diese Beobachtungen geben erste Hinweise auf Strategien, mit deren Hilfe Enteroviren die Blutbahn-Gewebe-Barriere überwinden. Sowohl bei den Perforin- und β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen als auch beim Wildtypstamm C57BL/6J konnten während der akuten Phase der CVB3-Infektion einige wenige apoptotische Myozyten

identifiziert werden. Diese Beobachtung korreliert mit den Untersuchungen von Peng (Peng et al., 2001), der bei permissiven SWR-Mäusen während der akuten Phase der CVB3-Infektion 15 apoptotische Myozyten pro Schnittebene fand. Die Anzahl der apoptotischen Myozyten ist jedoch im Vergleich zu einer Anzahl von mehr als 250 infizierten Myozyten pro Schnittebene bei akut infizierten permissiven A.CA/SnJ-Mäusen (Mall et al., 1991) sehr gering und weist darauf hin, daß die Mehrzahl der infizierten Herzmuskelzellen durch Virus-induzierte Myozytolyse zugrunde geht. Dahingegen stellt die Apoptose von Myozyten ein seltenes Ereignis dar, welches die großflächige Schädigung des Myokards während der akuten Phase der Infektion nicht bedingen kann.

Die Befunde in den Perforin knock out Mäusen machen zudem deutlich, daß Perforin weder für die Schädigung des Myokards verantwortlich gemacht werden kann, wie von einigen Untersuchern vermutet (Young et al. 1990, Seko et al. 1992), noch eine protektive Rolle im Verlauf der CVB3-Myokarditis spielt. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Perforin knock out Mäuse zwar eine geringfügig höhere Viruslast tragen und daraus resultierend auch eine etwas größere Nekrosefläche aufweisen, die Tiere jedoch insgesamt einen den C57BL/6J Wildtypmäusen sehr ähnlichen Verlauf gezeigt haben und in der Lage waren, die Infektion zu eliminieren und die Entzündungsreaktion in der akuten Phase der Erkrankung einzudämmen. Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, daß eine funktionelle Perforin-Granzym-vermittelte Zytotoxizität nicht notwendig ist für die Eliminierung der CVB3-Infektion aus dem Organismus. Diese Beobachtung befindet sich im Einklang mit Untersuchungen über die Bedeutung der zellulären Zytotoxizität bei anderen viralen Infektionen. Es hat sich gezeigt, daß die Perforin-Granzym vermittelte Zytotoxizität bei der Eliminierung von nicht-zytolytischen Viren, wie dem lymphozytären Choriomeningitisvirus, eine herausragende Rolle spielt. Die Eliminierung lytischer Viren, wie dem Vaccinia Virus, dem vesikulären Stomatitis Virus und dem Rotavirus bedarf nicht der Perforin-Granzym vermittelten Zytotoxizität, wohl aber CD8⁺ zytotoxischer Effektorzellen, welche z. B. durch die Sekretion von Zytokinen, wie Interferon- γ , antiviral wirken (Kägi et al., 1995; Franco et al., 1996). Auch bei den Coxsackieviren handelt es sich um klassische zytolytische Viren. Unsere Untersuchungsergebnisse sowie die Befunde in der Literatur (Chow et al., 1992; Klingel et al., 1993; McManus et al., 1993) unterstreichen, daß während der akuten Phase der enteroviralen Herzerkrankung die Virus-induzierte Zytolyse für die Myozytenschädigung verantwortlich ist und die zellulär vermittelte Zytotoxizität eine untergeordnete Rolle sowohl hinsichtlich der Gewebeschädigung als auch hinsichtlich der Eliminierung infizierter Zellen spielt.

Der Verlauf der CVB3-Infektion in den β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen unterstützt die Theorie, daß die initiale Virusbeladung des Organismus während der akuten Phase der Infektion einen entscheidenden Faktor hinsichtlich viraler Persistenz und Chronizität der Erkrankung darstellt. Vergleicht man während der akuten Phase die Ausdehnung der CVB3-Infektion im Myokard permissiver und resistenter Mausstämmen, so zeigt sich, daß die permissiven Stämme initial eine sehr viel höhere Viruslast aufweisen (Klingel et al., 1993). Dies trifft auch im Fall der β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse zu. Die infizierte Fläche im Myokard der β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse war 8 Tage p.i. circa 7 mal so groß wie die der C57BL/6J Mäuse. Ein noch deutlicherer Unterschied ergab die Messung der Fläche der Gewebeschädigung, welche bei den β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen 20fach über der des Wildtyps lag. Offensichtlich spielen Effektoren der Immunantwort während der frühen Phase der Infektion (2.-6. Tag p.i.) eine wesentliche Rolle bezüglich der Eingrenzung der Virusreplikation und Terminierung einer chronischen Herzerkrankung. Das defiziente Immunsystem der β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse ist verantwortlich für die hohe Viruslast während der akuten Phase der CVB3-Infektion, welche im weiteren Verlauf der Erkrankung nicht wirkungsvoll eingedämmt werden kann. Daraus ergibt sich die Persistenz viraler RNA im Myokard sowie die Chronizität der Herzerkrankung bei den β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen. Der Verlauf der CVB3-Infektion in den β_2 Mikroglobulin-defizienten Tieren ist dem Verlauf in immunkompetenten permissiven Mausstämmen sehr ähnlich, während die C57BL/6J-Wildtypmäuse dem Typ eines resistenten Mausstammes entsprechen. Dabei stellt sich die Frage, welche Faktoren in diesen immundefizienten Tieren zu einem permissiven Phänotyp geführt haben. Eine Analyse dieser Faktoren kann wertvolle Hinweise auf Immunmechanismen geben, welche auch in einem immunkompetenten Organismus die Terminierung einer chronischen Erkrankung bedingen. Ursprünglich wurden die β_2 Mikroglobulin-defizienten Tiere als gesunder, fertiler Phänotyp beschrieben, der keine MHC Klasse I-Oberflächenproteine und TCR $\alpha\beta$ CD4 $^-$ CD8 $^+$ T-Zellen aufweist (Zijlstra et al., 1990). Hierbei wurde gezeigt, daß die MHC Klasse I-Moleküle zwar kritisch sind für die Entwicklung von CD8 $^+$ T-Zellen, ihnen jedoch keine nennenswerte Rolle während der Embryonalentwicklung und der Genese der lymphatischen Organe zukommt. Inzwischen haben Untersuchungen über den Verlauf der LCMV-Infektion in β_2 Mikroglobulin defizienten Tieren und CD8 $^+$ knock out Mäusen signifikante Unterschiede aufgezeigt (Fung-Leung et al., 1991; Lehmann-Grube, 1993) und es konnte nachgewiesen werden, daß schwere Ketten der MHC Klasse I unter Umständen auch ohne β_2 Mikroglobulin an die Zelloberfläche gelangen (Bix & Raulet, 1992). Inwieweit diese Moleküle Antigenpeptide präsentieren können, ist unklar (Lehmann-Grube et al., 1994). Sie bieten jedoch eine

Erklärungsmöglichkeit für die Anwesenheit der wenigen CD8⁺ T-Zellen in den β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen, da mit Hilfe dieser schweren Ketten eventuell eine gewisse Selektionierung von CD8⁺ Zellen im Thymus erfolgen kann. Im folgenden wird näher darauf eingegangen, inwieweit die bei den β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen beschriebenen Immundefekte (Raulet, 1993) auf die Entwicklung einer persistierenden CVB3-Infektion Einfluß nehmen könnten.

Die Hauptaufgabe der CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten liegt in der MHC Klasse I-restringierten Erkennung und Zerstörung Antigen-präsentierender Zielzellen (Zinkernagel & Doherty, 1974). Das Auftreten einer persistierenden CVB3-Infektion in β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen weist darauf hin, daß CD8⁺ T-Lymphozyten protektiv wirken. Die Befunde aus den CVB3-infizierten Perforin knock out Mäusen machen deutlich, daß nicht die Perforin-Granzym vermittelte Zytotoxizität, sondern andere wichtige Effektormechanismen der CD8⁺ T-Lymphozyten protektive Effekte vermitteln. Hierzu gehört die Fähigkeit der CD8⁺ T-Lymphozyten, verschiedene Zytokine und Chemokine zu sezernieren, welche sowohl eine Modulation der Immunantwort als auch eine direkte Wirkung auf die Zellen der Manifestationsorgane entfalten. CD8⁺ T-Lymphozyten sind in der Lage, Interferon- α und - γ , Tumor Nekrose Faktor- α und - β sowie die Chemokine Rantes, MIP-1 α und MIP-1 β zu synthetisieren (Janeway & Travers, 1997; Cocchi et al., 1995). Interferon- γ kommt bei der Abwehr zahlreicher Infektionskrankheiten eine Schlüsselrolle zu (Feduchi & Carrasco, 1991; Yang et al., 1995; Tay & Welsh, 1997). Es konnte gezeigt werden, daß die Replikation von CVB3 in Zellkulturen humaner, fötaler Herzzellen durch Zugabe von Interferon- γ gehemmt werden kann (Kandolf, 1985). Dieser Befund deutet auf eine wichtige Rolle von Interferon- γ bei der Immunabwehr der CVB3-Infektion hin. *In vivo* stellt sich Interferon- γ als potenter Makrophagenaktivator dar und bewirkt eine Induktion der Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) in den Makrophagen (Dalton et al., 1993; Huang et al., 1993). TNF- α und - β üben einen synergistischen Effekt auf diese Vorgänge aus (Nathan, 1992). NO, das Produkt der Stickstoffmonoxidsynthetase, hat eine hervorragende antimikrobielle Wirkung und ist beteiligt an der Abwehr zahlreicher viraler Infektionen durch die Hemmung der Virusreplikation (Green & Nacy, 1993; Karupiah et al., 1993). Es gibt Hinweise, daß NO auch im Verlauf der CVB3-Myokarditis eine inhibierende Wirkung auf die Virusreplikation ausübt (Lowenstein et al., 1996). Diese Befunde konnten durch Untersuchungen an CVB3-infizierten iNOS-defizienten Mäusen verifiziert werden (Zaragoza et al., 1998). Der Vergleich zwischen permissiven und resistenten Mausstämmen hat gezeigt, daß die resistenten DBA/1J Mäuse während der akuten Phase der CVB3-Myokarditis relativ mehr iNOS

synthetisieren als permissive SWR/J Mäuse und somit die Virusreplikation hemmen, wodurch die Zell-zu-Zell Ausbreitung der Infektion limitiert werden kann (Klingel et al., 1998a).

Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß CD8⁺ T-Lymphozyten *in vivo* nicht die einzige Zellpopulation darstellt, die in der Lage ist, Interferon- γ zu sezernieren. Gleiches gilt für die anderen Zytokine und Chemokine. Auch Natural Killer Zellen produzieren bereits sehr früh während einer Infektion, noch bevor eine T-Zellantwort erfolgt, große Mengen an Interferon- γ . Im weiteren Verlauf einer Immunantwort synthetisieren nach Aktivierung der T-Zellen unter anderen auch Th1 Zellen Interferon- γ (Janeway & Travers, 1997). Bei der murinen Rotavirusinfektion konnte gezeigt werden, daß CD8⁺ T-Lymphozyten aus Perforindefizienten Mäusen nach adoptivem Transfer in persistent infizierte Rag2 knock out Mäuse eine Eliminierung der Rotaviren bewirkt haben. Für diesen Effekt wurde vor allem das von den transferierten CD8⁺ T-Zellen synthetisierte Interferon- γ und TNF- α verantwortlich gemacht, da mit Rotavirus infizierte Interferon- γ knock out Mäuse das Virus ebenso schnell und effizient aus dem Organismus eliminieren können wie der Wildtypstamm (Franco et al., 1997). Bei Rag2 knock out Mäusen handelt es sich um Tiere, die weder über B- noch über T-Lymphozyten verfügen, so daß die transferierten CD8⁺ T-Zellen die einzige Quelle für Zytokine lymphozytären Ursprungs darstellen. Welche Rolle die von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten sezernierten Zytokine bei den β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen, ist bislang allerdings unklar, da diese Mäuse, im Gegensatz zu den Rag2 knock out Mäusen, über B- und T-Lymphozyten verfügen, die als potentielle Zytokinquelle ebenfalls in Frage kommen. Die Befunde von Franco et al. lassen allerdings Spekulationen über bislang unbekannte, CD8⁺ vermittelte Effektormechanismen zu, bei denen es sich beispielsweise um noch nicht identifizierte, CD8⁺ T-Zell-spezifische Zytokine handeln könnte.

Neben ihrem Einfluß auf CD8⁺ T-Lymphozyten hat die Abwesenheit von MHC Klasse I Molekülen auch Auswirkungen auf die Funktionalität der Natural Killer Zellen. Bis heute ist nicht bekannt, ob und wie Natural Killer Zellen eine Prägung hinsichtlich "eigen" und "fremd" erfahren. Auch bezüglich der Erkennung ihrer Zielzellen gibt es viele ungeklärte Fragen. Man weiß aber, daß die Expression von MHC Klasse I Zellen vor einem Angriff durch Natural Killer Zellen schützt. Je weniger MHC Klasse I eine Zelle exprimiert, desto empfänglicher ist sie für eine Natural Killer Zell-vermittelte Lyse (Ljunggren & Karre, 1990). Die β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse weisen eine dem Wildtyp vergleichbare Anzahl an Natural Killer Zellen auf und es hat sich gezeigt, daß β_2 Mikroglobulin-defiziente Zellen sehr sensitiv sind gegenüber einer Zellyse durch Wildtyp Natural Killer Zellen (Liao et al., 1991).

Wäre die Aktivität der Natural Killer Zellen der β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse vergleichbar mit der Aktivität der Natural Killer Zellen in Wildtypmäusen, könnte man einen autoimmunen Angriff auf die MHC-defizienten Zellen erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Vielmehr fand sich, daß die Natural Killer Zellen der β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse eine verminderte Aktivität entfalten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, YAC-1 Zellen zu töten (Liao et al., 1991). Die Natural Killer Zellantwort *in vivo* gegenüber viralen Infektionen scheint allerdings weniger beeinträchtigt zu sein, als die *in vitro* Daten vermuten lassen. Danach konnten β_2 Mikroglobulin defiziente Mäuse eine Infektion mit dem Natural Killer Zell-sensitiven murinen Zytomegalievirus ebenso effizient eliminieren wie der Wildtypstamm (Tay et al., 1995). Da die Natural Killer Zellen während der akuten Phase der CVB3-Infektion bei allen drei Mausstämmen in großer Anzahl im Myokard nachweisbar sind, fungieren sie vermutlich als frühe Zytokinquelle, da sie in der Lage sind, Interferon- γ und TNF- α zu sezernieren (Paya et al., 1988). Infektionsversuche mit scid-Mäusen, welche weder über B- noch über T-Lymphozyten verfügen, haben gezeigt, daß Natural Killer Zellen und die weiteren Effektoren der angeborenen Immunität ohne Mitwirkung von T- und B-Lymphozyten nicht in der Lage sind, die CVB3-Infektion zu beherrschen. Alle CVB3-infizierten scid Mäuse starben während der akuten Phase der Infektion (Chow et al., 1992). Dies legt die Vermutung nahe, daß Natural Killer Zellen von untergeordneter Bedeutung für die Eliminierung infizierter Zellen sind, jedoch aufgrund der Produktion von Zytokinen, wie Interferon- γ , als frühe Zytokinquelle wichtig für die Aktivierung anderer Immunzellpopulationen sind.

Aus einer Reihe von Untersuchungen ist bekannt, daß β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse nicht nur defizient in der Expression von MHC Klasse I-Molekülen sind, sondern ebenfalls nicht in der Lage sind, CD1 zu exprimieren (Brossay et al., 1997). Die CD1 Familie umfasst eine Reihe von Oberflächenproteinen, welche wie MHC Klasse I aus einer schweren Kette und β_2 Mikroglobulin bestehen. Sie weisen strukturell große Ähnlichkeit mit MHC Klasse I auf (Porcelli, 1995). Gleichwohl unterscheiden sie sich in mehreren Punkten von MHC Klasse I-Molekülen: die Gene für die schwere CD1-Kette liegen außerhalb des Bereiches, der für MHC Klasse I kodiert (Calabi & Bradbury, 1991) und die CD1 Moleküle weisen nicht den Polymorphismus der MHC Klasse I Moleküle auf (Lantz & Bendelac, 1994). CD1 wird hauptsächlich von T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Knochenmarkzellen exprimiert, wobei vor allem B-Lymphozyten größere Mengen an CD1 auf ihrer Oberfläche aufweisen (Brossay et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, daß CD1 in der Lage ist, Peptide zu binden und zu präsentieren (Castano et al., 1995). Diese Fähigkeit und die selektive Expression durch vorwiegend klassische Antigen-präsentierende Zellen

lassen eine Aufgabe als weitere Antigen-präsentierende Moleküle neben MHC Klasse I und II vermuten (Porcelli, 1995). Tatsächlich wurde in Zusammenhang mit CD1 eine Zellpopulation identifiziert, bei der es sich um CD4⁺NK1⁺ T-Zellen handelt (Bendelac et al., 1995). CD4⁺NK1⁺ T-Zellen weisen sowohl Charakteristika von CD4⁺ T-Zellen als auch von Natural Killer Zellen auf (Arase et al., 1992) und sind in der Lage, neben Th1- und Th2-typischen Zytokinen große Mengen Interleukin-4 zu sezernieren. Damit scheint ihnen eine wichtige immunmodulatorische Funktion hinsichtlich der Regulierung der T-Helferzellantwort zuzukommen (Yoshimoto & Paul, 1994). Interleukin-4 induziert eine Th2 Antwort, welche wiederum eine Aktivierung der humoralen Immunantwort bewirkt. Bei den β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen findet sich keine CD1 Expression (Brossay et al., 1997) und es konnte gezeigt werden, daß die Anzahl der CD4⁺NK1.1⁺ Zellen signifikant reduziert ist (Yoshimoto et al., 1995). Obwohl in den β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen eine spontane Th2 Antwort im Verlauf der murinen Leishmaniose auch ohne CD4⁺NK1.1⁺ Zellen induziert werden konnte, gibt es gewisse Abnormalitäten in der Antikörperantwort dieser immundefizienten Tiere (Brown et al., 1996). β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse, welche mit Vaccinia Virus infiziert wurden, entwickelten niedrigere IgG-Antikörpertiter im Serum als die Wildtypmäuse (Spriggs et al., 1992). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse im Verlauf der LCMV-Infektion eine verspätete Antikörperantwort entwickelten (Lehmann-Grube et al., 1993). Die CD1-Defizienz und die damit verbundene reduzierte Anzahl an CD4⁺NK1.1⁺ Zellen bieten einen Erklärungsansatz für diese Befunde, da die Immundefekte eine Imbalanz zwischen Th1- und Th2-Zellen zu Ungunsten einer effizienten humoralen Immunantwort verursachen könnten. Im Verlauf zahlreicher viraler, bakterieller und parasitärer Infektionen vermittelt eine Th1 Antwort Protektion, während eine Th2 Antwort häufig zu Permissivität und Fortschreiten der Erkrankung führt. Dies konnte unter anderem gezeigt werden bei Infektionen mit dem respiratorischen Synzytialvirus, dem murinen acquired immunodeficiency syndrome, im Verlauf der Lepra und der Leishmaniose (Tang & Graham, 1994; Kanagawa et al., 1993; Yamamura et al., 1991; Heinzl et al., 1989). Untersuchungen zur CVB3-induzierten Myokarditis weisen aber darauf hin, daß eine Th2 Antwort auch protektive Wirkungen entfalten kann. Es konnte gezeigt werden, daß Balb/c Mäuse, welche mit einer wenig pathogenen, plaque-gereinigten CVB3-Variante infiziert wurden eine leichte Myokarditis in Verbindung mit einer Th2 Antwort entwickelten. Wurden die Mäuse hingegen mit einer pathogenen, plaque-gereinigten CVB3-Variante infiziert, so entwickelten sie eine schwere Myokarditis einhergehend mit einer Th1 Antwort (Huber et al., 1994). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß Mausstämme mit einer frühen Antikörperantwort weniger schwere Myokardläsionen entwickeln als Mausstämme mit

leicht verzögerter Antikörperantwort (Herskowitz et al., 1985; Wolfgram et al., 1986). Dieses Ergebnis wird gestützt von der Beobachtung, daß die zellulär-vermittelte Zytotoxizität keine erhebliche Auswirkung auf den Verlauf der CVB3-Infektion ausübt. Ausgehend von der These, daß die initiale Virusbeladung kritisch ist für die Entwicklung einer persistierenden Infektion, kommt den neutralisierenden Antikörpern während der virämischen Phase und der nachfolgenden Manifestation der Infektion im Herz vermutlich eine herausragende Rolle zu. Eine Defizienz im Bereich der humoralen Immunabwehr bei den β_2 Mikroglobulin knock out Mäusen könnte ursächlich am chronischen Verlauf der CVB3-Infektion beteiligt sein. Ein weiterer wichtiger Hinweis auf die Bedeutung der Antikörperantwort im Verlauf der CVB3-Infektion liegt in der Beobachtung, daß enterovirale RNA hauptsächlich in B-Lymphozyten nachweisbar ist, sowohl in der akuten, als auch in der chronischen Phase der Infektion (Klingel et al., 1996). Eine Infektion von B-Lymphozyten durch CVB3 kann verschiedene Auswirkungen auf die Immunantwort haben. Die B-Lymphozyten können sowohl direkt durch die Virusreplikation als auch indirekt durch zytotoxische T-Lymphozyten eliminiert werden, was zu einer Verminderung des Titers der Virus-neutralisierender Antikörper führen würde.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Dissertation haben einen Beitrag zur Bedeutung der Perforin-Granzym vermittelten Zytotoxizität für den Verlauf der CVB3-Infektion im Mausmodell geleistet. Zusammenfassen können zwei wesentliche Aussagen getroffen werden. Zum einen ist die Perforin-Granzym vermittelte Zytotoxizität nicht notwendig für die Eliminierung von CVB3 aus dem Organismus. Zum anderen kann die Perforin-Granzym vermittelten Zytotoxizität nicht verantwortlich gemacht werden für die Schädigung des Herzmuskels im Verlauf der Infektion.

Eine Analyse der verschiedenen bis heute bekannten Immundefekte der β_2 Mikroglobulin knock out Mäuse hat Möglichkeiten aufgezeigt bezüglich der Terminierung einer chronischen Herzerkrankung und myokardialen Viruspersistenz. Dabei ist vor allem die humorale Immunantwort in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Eine eingehende Untersuchung der humoralen Immunantwort könnte wichtige Einblicke über immunologische Effektormechanismen erbringen, welche den Übergang der akuten Enterovirus-Myokarditis in eine chronische Verlaufsform kontrollieren. Da CVB3 offensichtlich einen Tropismus für B-Lymphozyten hat (Klingel et al., 1996), wäre eine funktionelle Charakterisierung infizierter B-Lymphozyten in permissiven und resistenten Mausstämmen im Verlauf der Myokarditis von großer Relevanz. Eine eingehende Untersuchung der T-Helferzellantwort in resistenten und permissiven Tieren könnte Aufschluß geben über Zytokinimbilanzen und die Beteiligung weiterer Zellpopulationen an einer eventuellen Beeinträchtigung der humoralen

Immunabwehr. Daraus könnten sich therapeutische Ansätze mit der Möglichkeit ergeben, einen permissiven Phänotyp durch exogene Zytokingabe in einen resistenten Phänotyp zu modulieren.