

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus der Medizinischen Klinik II, Kardiologie und Pulmologie

DISSERTATION

Analyse der Zusammenhänge und Verläufe der Zytokine, Interleukine und der extrazellulären Matrix bei akuter und chronischer viraler Myokarditis bei SWR/J-Mäusen.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
von
Anneke Verlohren, geb. Weitz
aus Fulda

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Pauschinger
2. Prof. Dr. med. K. Stangl
3. Prof. Dr. med. P. Schwimmbeck

Datum der Promotion: 03.06.2012

**Für meine
Eltern
Reinhard und Mechthilde**

Inhaltsverzeichnis	4
1. Einleitung	8
1.1 Die Myokarditis	8
1.1.1 Zusammenhang Myokarditis / dilatative Kardiomyopathie	9
1.2 Coxsackieviren	10
1.3 Allgemeine Pathogenese der Myokarditis	12
1.3.1 Auslösende Faktoren der Immunantwort der viralen Myokarditis	12
1.3.2 Autoimmunität	12
1.3.2.1 Autoreaktive T-Lymphozyten	13
1.3.2.2 Zytokinaktivierung	13
1.3.2.3 Determinanten der humoralen Autoreaktivität	14
1.4 Verlauf der experimentellen viralen Myokarditis im Mausmodell	15
1.5 Die Aufgaben der T-Lymphozyten	18
1.6 Die myokardiale extrazelluläre Matrix	20
1.7 Kardiales Remodeling	21
1.8 Die Regulation des myokardialen Remodelings	23
1.8.1 Die Wirkung der Zytokine	23
1.8.2 Die Degradation der Kollagene und deren Einfluss	24
1.8.3 Regulation des myokardialen Remodelings durch die MMP-Aktivität	24
1.9 Hämodynamische Veränderungen	25
2. Problemstellung	27
3. Material und Methoden	29
3.1 Mausmodell	29
3.1.1 Das Virus	29
3.1.2 Versuchstiere	29
3.1.3 Gruppeneinteilung der Versuchstiere	29
3.2 Versuchsablauf	31
3.2.1 Hämodynamische Messungen	31

Einleitung

3.2.2	Präparation der Herzen	33
3.3	Molekularbiologische Methoden	33
3.3.1	RNA-Extraktion mittels TRIZOL [®]	33
3.3.2	DNase-Verdau	34
3.3.3	Reverse Transkription	35
3.3.4	Agarosegelelektrophorese	37
3.3.5	Etablierung der PCR-Bedingungen der unterschiedlichen Primer	38
3.3.6	RT-PCR und nested-RT-PCR	41
3.3.7	Semiquantitative RT-PCR	41
3.3.8	Sequenzierung der PCR-Produkte	43
3.4	Histomorphologische Analyse der extrazellulären Matrix	43
3.4.1	Einbettvorgang des Gewebes	43
3.4.2	Ausgießvorgang und Anfertigung der Paraffinschnitte	44
3.5	Sirius red-Färbung	45
3.5.1	Allgemein	45
3.5.2	Herstellung der Färbelösung	45
3.5.3	Ablauf der Färbung	45
3.5.4	Morphometrische Analyse	46
3.5.5	Auswertung der Sirius red-Färbung	47
3.6	Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse	48
3.7	Eingesetzte Arbeitsmittel	49
4.	Ergebnisse	53
4.1	Krankheitssymptome der Versuchstiere	53
4.2	Körper- und Herzgewichte der Versuchstiere	53
4.2.1	Darstellung der Mausgewichte	54
4.2.2	Darstellung der Herzgewichte	54
4.3	Ergebnisse der hämodynamisch erhobenen Parameter	55
4.3.1	Herzfrequenz (HF)	56
4.3.2	Endsystolischer linksventrikulärer Druck (LVESP)	56
4.3.3	Enddiastolischer linksventrikulärer Druck (LVEDP)	57
4.3.4	Linksventrikuläre Kontraktilität (dP/dt-max) und linksventrikuläre Relaxation (dP/dt-min)	57

Einleitung

4.3.5	Ejektionsfraktion (EF)	59
4.3.6	Linksventrikuläres endsystolisches Volumen (LVESV) und linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV)	59
4.3.7	Schlagvolumen (SV)	60
4.4	Nachweis enteroviraler RNA des CVB3-Genoms	62
4.5	Analyse der mRNA-Expression	62
4.5.1	Analyse der mRNA-Expression der Metalloproteinasen sowie der Proteaseinhibitoren	63
4.5.1.1	MMP-2	63
4.5.1.2	MMP-3	64
4.5.1.3	MMP-8	65
4.5.1.4	TIMP-1	66
4.5.1.5	MMP-3/TIMP-1-Ratio	67
4.5.2	Analyse der mRNA-Expression der Kollagene	68
4.5.2.1	Kollagen I	68
4.5.2.2	Kollagen III	69
4.5.2.3	Kollagen IV	70
4.5.2.4	Kollagen I/Kollagen III-Ratio	71
4.5.3	mRNA-Expressionsanalyse der pro- u. antiinflammatorischen Zytokine	72
4.5.3.1	Interleukin-1 β	72
4.5.3.2	Interleukin-6	73
4.5.3.3	Interleukin-10	74
4.5.3.4	Tumornekrosefaktor- α	75
4.5.3.5	Interferon- γ	76
4.6	Korrelationen	77
4.7	Kollagennachweis mittels Sirius red-Färbung	78
5.	Diskussion	81
5.1	Allgemein	81
5.2	Morbidität und Mortalität der SWR/J-Mäuse	81
5.3	Körper- u. Herzgewichte der SWR/J-Mäuse	82
5.4	Myokardiale Immunreaktion	83

Einleitung

5.5	Die extrazelluläre Matrix und deren Veränderung im Rahmen der Myokarditis	86
5.6	Die Kollagendegradation	89
5.7	Bedeutung der Persistenz des Coxsackie-B3-Virus im Rahmen der Myokarditis	92
5.8	Analyse der Hämodynamik	93
6.	Zusammenfassung	98
7.	Literaturverzeichnis	100
8.	Abkürzungen	127
9.	Danksagung	129
10.	Lebenslauf	130
11.	Publikationsliste	130
12.	Selbständigkeitserklärung	132

Einleitung

1. Einleitung

1.1 Die Myokarditis

Die Myokarditis (MC) ist eine entzündliche Herzmuskelerkrankung, die in Verbindung mit einer kardialen Dysfunktion 1995 von der World Health Organisation (WHO) und der International Society and Federation of Cardiology (ISFC) als inflammatorische Kardiomyopathie definiert wurde. Sie kann Herzmuskelzellen, Interstitium und Herzgefäße betreffen. Unter den Kardiomyopathien (CM) stellt die Gruppe der entzündlich viralen Herzmuskelerkrankungen den größten Anteil dar. Der Begriff Myokarditis wurde von Sobernheim im Jahre 1837 eingeführt (Sobernheim J.F., 1837) und in den 50-er Jahren erstmals als virale Erkrankung anerkannt (Van Creveld et al., 1956). Die Entwicklung des Herzmuskelbiotoms (Sakakibara et al., 1962) ermöglichte die Erweiterung des Wissens über die Pathogenese der viralen Myokarditis in sofern, dass man nun Viren im entnommenen Myokard nachweisen konnte. Erst durch ausgereifte molekularbiologische Techniken gelang es, das Virusgenom im Myokard zu analysieren. Diese Ergebnisse konnten Bowles et al. mit Hilfe der Filterhybridisierungstechnik (Slot-Blot) verifizieren, da sie enterovirales Genom detektierten (Bowles et al., 1986). Diese Ergebnisse konnten durch In-situ-Hybridisierung (Kandolf R., 1995) und Polymerase-Chain-Reaction (PCR) (Pauschinger et al., 1998) bestätigt werden. Die Entzündung des Myokards wird aber nicht nur mit kardiotropen Viren, z.B. mit dem Coxsackie-B3-Virus (CVB3, Kühl and Schultheiss, 1996) assoziiert, sondern auch mit anderen infektiösen Agenzien wie z.B.: Bakterien, Pilzen, Parasiten, Allergene und Autoantigene.

Durch histologische und immunhistologische (Kühl et al., 1994; Kühl et al., 1997) Untersuchungen endomyokardialer Biopsien, ließen sich bei Myokarditiden verschiedene Varianten kardialer Entzündungsmuster nachweisen. Bei der fokalen und auch diffusen kardialen Entzündung werden Myozyten, interstitielles und perivaskuläres Bindegewebe, Kapillaren und Koronararteriolen in den Entzündungsprozeß mit einbezogen (Richardson PJ, 1985). In der Fachliteratur wird auf verschiedene Phasen der viralen MC verwiesen. So wurde in der vergangenen Zeit die Diagnose einer MC ausschließlich mit Hilfe der Dallas-Klassifikation definiert. Man unterteilte in aktive, fortbestehende, abheilende, chronische und Borderline MC. Mittlerweile hält man die histopathologische Klassifikation nach den Dallas-Kriterien für veraltet, da sie keinen

Einleitung

prognostischen Wert besitzen, eine hohe Variabilität der Interpretation vorliegt und eine niedrige Sensitivität der Methode besteht (Chow et al., 1989, Baughman KL, 2006). Eine alternative Klassifikation bietet aktuell die zellspezifische Färbung der Immunperoxidase der Oberflächenantigene wie z.B.: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD20 und anti-human Leukozytenantigen (Herskowitz et al., 1990). Diese Kriterien besitzen sowohl eine höhere Sensitivität als auch einen möglichen prognostischen Wert (Kindermann et al., Circulation 2008).

Die Myokardbiopsie wurde bezüglich der Diagnostik einer MC lange Zeit als alleiniger Goldstandard angesehen. In vielversprechenden Studien wird nun aber auch über die nicht-invasive Methode mittels MRT berichtet, die unkompliziert zur Ermittlung der Diagnose beitragen kann (Friedrich et al., JACC 2009).

Der klinische Verlauf der MC ist sehr variabel und reicht von einem asymptomatischen oder milden Verlauf bis zu einem fulminanten Verlauf mit tödlichem Ausgang. Chronische Verläufe mit Übergang in eine dilatative Kardiomyopathie werden beschrieben. Die DCM ist durch eine Dilatation des linken Ventrikels oder beider Ventrikel, gestörte Kontraktilität und reduzierte systolische Funktion des Herzens gekennzeichnet. Aufgrund der überwiegend unspezifischen Symptome bleibt die MC in der Mehrzahl der Fälle sowohl vom Patienten als auch vom Arzt unbemerkt (Mall G, 1995; Schwartzkopff et al., 1995). Dies führt wiederum dazu, dass eine sichere Inzidenz der viralen MC nicht erhoben werden kann. Das klinische Beschwerdebild der MC wird durch zahlreiche Symptome wie Müdigkeit, Leistungsknick, Tachykardie, Extrasystolie, AV-Blockierung, Palpitationen, Brustschmerz und Dyspnoe (Hufnagel et al., Herz 2000) definiert. Bei 80-85% der Erwachsenen, die eine akute MC haben heilt die Krankheit ohne Restfolgen aus (Kühl et al., 1996). Männer scheinen von der Erkrankung wesentlich häufiger betroffen zu sein als Frauen (Caforio et al., 2007).

1.1.1 Zusammenhang Myokarditis / dilatative Kardiomyopathie

In der Literatur ist oft die Rede von einem möglichen Übergang einer akuten MC in eine chronische Kardiomyopathie mit und ohne Viruspersistenz (Kandolf R, 1998 sowie Schultheiss et al., 1992 u. 1998). Meistens heilt die akute MC spontan aus, wobei zum Teil kardiale Restschäden zurückbleiben. Es ist sehr schwierig eine akute MC von einer DCM zu unterscheiden, da sie weder histologische noch klinische eindeutige

Einleitung

Abweichungen voneinander aufweisen (Kühl et al., 1996). Die exakte Charakterisierung der myokardialen Entzündungsreaktion bzw. einer Viruspersistenz (Strauer B.E., 1995) lässt sich erst durch immunhistologische sowie molekularbiologische Analysen ermöglichen. So postulierten viele Studien den Zusammenhang zwischen MC und DCM bzw. die Möglichkeit eines Überganges einer viralen MC in eine DCM aufgrund einer Vielzahl von Nachweisen von Enteroviren in endomyokardialen Biopsien von DCM-Patienten und akuter MC-Patienten (Archard et al., 1991, Baboonian et al., 1997, Kereiakes DJ and Parmley W, 1984; MacArthur et al., 1984). Ein Problem in der Beurteilung der Kausalität zwischen Nachweisen von Virusgenom und MC bzw. DCM besteht jedoch darin, dass andere Untersucher auch in herzgesunden Kontrollen Virusgenom nachweisen konnten, sodass die pathogenetische Relevanz der Anwesenheit von Virusgenom im Myokard von Patienten mit MC bzw. DCM noch nicht abschließend geklärt ist (Olbrich H.-G., 2000). Badorff und Knowlton (1999) zeigten in ihrer Studie, dass spezifische coxsackievirale Proteasen sarkoglykane Komplexe der Myozyten direkt modifizieren können. Diese Beobachtung ist eine mögliche Erklärung für in Frage kommende Mechanismen, die eine signifikante ventrikuläre Dilatation kurz nach viraler Infektion erklären. Sei zeigten auch, dass Mäuse, die das CVB-Genom exprimieren, aber die Fähigkeit zu dessen Replikation verloren haben, eine DCM entwickeln, was unter anderem durch die oben angesprochene virale Protease erklärt werden kann. Die andauernde virale Genexpression im Myozyten trotz abgeklungener Infektion gilt ebenso als Grund für eine entstehende DCM.

1.2 Coxsackieviren

Eine große klinische Bedeutung bezüglich der Ätiologie der infektiösen Myokarditis hat bewiesenermaßen das Coxsackie-B3-Virus (Why H, 1995 und Melnick JL, 1990), das zum Genus der Enteroviren innerhalb der Familie der Picornaviren gehört. Die Bezeichnung „Picorna“ ist ein Akronym aus *pico* (pico = klein) und *RNA* (RNA = ribonucleic acid). Das Coxsackie-B3-Virus wurde zwischen 1947-1955 das erste Mal von Dalldorf in der Stadt Coxsackie in den USA isoliert und 1957 mit Polioviren und ECHO-Viren zu Enteroviren zusammengefasst.

Coxsackieviren gehören zur Gruppe der einzelsträngigen RNA-Viren (7500 bp lang, Durchmesser etwa 30 nm) positiver Polarität, die nach rezeptorvermittelter Endozytose

Einleitung

die RNA- und Proteinsynthese der befallenen Wirtszelle inhibieren und sie dazu veranlassen, ausschließlich die viruseigene Proteinbiosynthese durchzuführen (Kandolf R, 1996). Mit Hilfe von Zelloberflächen-Molekülen binden die Viren an spezifische Rezeptoren wie CAR (coxsackieadenoviral receptor) und DAF (decay accelerating factor, CD55), damit die Virusreplikation erfolgen kann (Bergelson et al., 1997). Ähnlich wie mRNA-Moleküle besitzt das virale Genom einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende. Allerdings fehlt dem 5'-Ende die für die eukaryotische mRNA typische „cap“- Struktur. Stattdessen ist die virale RNA kovalent mit einem kurzen viruskodierten Peptid, dem VPg (3B) verknüpft (Kandolf R. u. K. Klingel., 1993). Das Viruskapsid besteht aus den vier Proteinen VP1 – VP4. Wobei VP1–VP3 die Oberfläche des Virions bilden, woraus mögliche antigene Determinanten resultieren. VP4, das kleinste der Kapsidproteine, dient hingegen zur Stabilisation des Kapsids und der Interaktion zwischen Kapsid und Virusgenom (Clements GB, 1993). Da die Coxsackieviren mauspathogen sind und somit das Myokard der Mäuse befallen können (Tracy et al., 1991), werden sie oft zu Studienzwecken verwendet (Kawai C, 1999). Die Herzerkrankung der Mäuse, speziell der SWR-Mäuse, gleicht z.B. auf histologischer Ebene eindeutig der des Menschen, so dass sie ein gutes Tiermodell zum Studium der Virusmyokarditis sind (Godman et al., 1952).

Das Krankheitsspektrum der Coxsackieviren der Gruppe B1-B6 reicht von subklinischen Infektionen über klinisch wahrnehmbare Infektionen mit unspezifischen grippeähnlichen Symptomen. Die Inkubationszeit variiert zwischen ein bis drei Wochen. Die Übertragung findet auf fäkal-oralem oder aerogenem Wege (Mertens T, 1995, Strauer B.E. 1995) statt. Nach lokaler Vermehrung kommt es zur generalisierten Ausbreitung und später zur sekundären Ansiedlung in den Zielorganen (Herz, Meningen, Pankreas, Muskel und Haut).

Einleitung

1.3 Allgemeine Pathogenese der Myokarditis

1.3.1 Auslösende Faktoren der Immunantwort der viralen Myokarditis

Bei den meisten viral induzierten Krankheiten besteht eine enge Beziehung zwischen der Infektion durch das Virus und der begleitenden Immunantwort. Besonders relevant ist diese Beziehung bei der durch Enteroviren bedingter MC. Insbesondere bei der myokardialen Infektion durch das Coxsackievirus-B3 besteht während des gesamten Entzündungsprozesses eine direkte Interaktion des Virus mit dem Immunsystem (Klingel et al., 1992). Das Eindringen des Virus in den menschlichen Körper geschieht meist über den Weg des Darms oder des Respirationstraktes (Liu et al., 2001). In der Folge nistet sich das Virus in Immunzellen und Immunorganen des Körpers ein, in denen es bis zum Transport in andere Organe z.B.: Pankreas und Herz verweilt (Martino et al., 1995). Das Immunsystem wird aktiviert, indem zum einen der Corezeptor-assoziierte Signalweg über DAF/CAR (Yanagawa et al., 2003; Martino et al., 2000) angesprochen wird und zum anderen virale Antigene die an der Zelloberfläche auf MHC haften, präsentiert werden. Diese erste Phase der Erkrankung wird also dominiert vom Eintritt und der Proliferation des Virus im Myokard. Wenn das Immunsystem aktiviert ist, folgt die zweite Phase: der autoimmune Prozeß.

1.3.2 Autoimmunität

Die Aktivierung des Immunsystems des Wirts schwächt auf der einen Seite die Proliferation des Virus ab, fördert aber im Gegenzug den vermehrten Eintritt des CVB3 in die Wirtszelle. Wenn sich die virale Proliferation unter der Kontrolle des Immunsystems befindet, wird im Normalfall die Aktivität des Immunsystems in einen Ruhezustand versetzt. Wenn die Immunreaktion des Wirtes trotz Viruseliminierung uneingeschränkt fortläuft, resultiert daraus eine Autoimmunerkrankung. Tritt dieser Fall ein, greifen in dieser Phase die T-Lymphozyten das körpereigene Gewebe durch den Mechanismus des „molekularen Mimikry“ an. Die Zytokinaktivierung und kreuz-reagierende Antikörper beschleunigen den Prozeß weiter.

Einleitung

1.3.2.1 Autoreaktive T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten werden im Rahmen der viralen Infektion des Myokards durch die klassische zelluläre Immunantwort aktiviert. Nachdem die viralen Antigene im Golgi-Apparat der infizierten Zelle zu kleinen Peptidfragmenten prozessiert wurden, werden sie auf die MHC-kodierten Proteine aufgeladen und der peptidbeladene MHC auf die Zelloberfläche ausgestülpt. Das Peptid, das ein Epitop des Antigens repräsentiert, wird so auf der Oberfläche der infizierten Zelle auf dem MHC-Protein präsentiert. Nun kann der T-Lymphozyt mit einem speziellen Oberflächenrezeptor, dem T-Zell-Rezeptor (TZR), die Gesamtheit von MHC und Peptid als körperfremd erkennen. Dieser Rezeptor besteht aus zwei verschiedenen miteinander assoziierten Proteinketten, die durch ihren Aufbau der schweren Ketten an Immunglobuline erinnern. In den meisten Fällen besteht der TZR aus einer α - und β -Kette. Einige T-Lymphozyten tragen einen TZR, der aus einer γ - und δ -Kette besteht (Mak TW, 1994). Der TZR $\alpha\beta$ besitzt als corezeptor-Moleküle CD4+ und CD8+. CD4+ ist ein Molekül, durch das die T-Lymphozyten vom Helfertyp charakterisiert sind. Durch den Kontakt mit Makrophagen werden sie aktiviert und schütten Zytokine aus. CD8+ findet sich auf T-Lymphozyten vom zytotoxischen Typ und vom Suppressortyp. Sie erkennen ihre Peptidantigene nur in Assoziation mit MHC-I-Proteinen. Daraus folgt die antigenspezifische Zytolyse (Suda et al., 1993). TZR $\gamma\delta$ T-Lymphozyten vermitteln die zytotoxische Antwort und die Aktivierung von B-Lymphozyten, resultierend in Antikörperproduktion im Falle der viralen Infektion. Zusätzlich können sie Effektorzellen via Zytokinexpression beeinflussen (Opavsky et al., 1999). Folglich führt die überschwängliche Aktivierung der T-Lymphozyten zu einer Schädigung des Herzgewebes. Diese Schädigung kann sowohl über Zytokine, als auch über T-Lymphozyten vermittelt werden. Somit kommt es zu einer Reduktion von kontraktile Einheiten und damit zu einem Langzeit-Remodeling, welches eine DCM entwickeln kann.

1.3.2.2 Zytokinaktivierung

Der Hauptvermittler der Immunaktivierung und deren Aufrechterhaltung sind die Zytokine. Als Beispiel hierzu dient die Studie von Matsumori et al. (1994), die zeigte, daß Patienten mit MC eine rege Zytokinaktivität mit Beteiligung von TNF α , Interleukin-6

Einleitung

und Interleukin-1 aufwiesen. Das Aktivierungsmuster bestimmt den Typ der T-Zell-Reaktion und ebenso die folgende „autoimmune Erhaltung“ (Penninger et al., 1997). Es werden oft ähnliche Muster der Zytokinaktivierung bei Myokarditis in Mausmodellen beschrieben, in denen Zytokine direkt im Herzgewebe nachweisbar waren (Yamada et al., 1994). Man postuliert, dass Zytokine am stärksten zu pathologischen Phenotypen beitragen. So fand man heraus, dass Mäuse, die einen fehlerhaften TNFp55-Rezeptor aufwiesen, eine mildere Form der MC entwickelten (Bachmaier et al., 1997). Andere Ergebnisse zeigten, dass bei Patienten mit schwerer linksventrikulärer Dysfunktion, die nur kurzfristig einer Zytokinaktivität ausgesetzt waren, eine komplette Genesung eintrat.

1.3.2.3 Determinanten der humoralen Autoreaktivität

Zu den wichtigsten antigenen Determinanten gehören solche, die gegen das Sarkolemm oder Myolemm und seine Bestandteile gerichtet sind (Maisch 1986;1989; Obermeyer et al.1987). Antigene für zelluläre Immunreaktionen sind bisher weniger gut definiert; sarkolemmale Proteine, Kanäle, Myosin, mitochondriale und endoplasmale Proteine, MHC-Antigene und Rezeptoren werden auch hier als relevante Determinanten diskutiert (Maisch B, 1989). Bei den Antikörpern spielen komplementabhängige mit dem verursachenden pathologischen Agens kreuzreagierende Antikörper, zytotoxische komplementunabhängige Antikörper wie z.B.: gegen den Ca-Kanal (Schultheiß HP, 1988) oder auch protektive Antikörper eine wichtige Rolle (Maisch B, 1989; 1989; Maisch et al., 1987).

Auf der molekularen Ebene stellt das antigene Mimikry ein wesentliches pathogenetisches Prinzip autoreaktiver kardialer Prozesse dar. Untersuchungen belegen, dass es bei einer Entzündungsreaktion des Herzens zu einer polyklonalen Stimulation verschiedener Antikörper kommt, für das wie bei der Coxsackievirus-B induzierten Myokarditis (Maisch et al., 1993) antigenes Mimikry verantwortlich gemacht wird. Bei einer aktiven Myokarditis zeigen sich nicht nur Antikörper gegen Membranantigene sondern auch gegen mitochondriale Proteine (Anti-M7; Anti-Ant) und gegen Myosin (Neu et al., 1987; Kodama et al., 1994). Dabei ist die Kreuzreaktivität zwischen Anti-ANT-Antikörper und dem Kalziumkanal der Zellmembranen sowie dem Connexon (Samsonov et al., 1991) von besonderem pathogenetischem Interesse.

1.4 Verlauf der experimentellen viralen Myokarditis im Mausmodell

Die virale Myokarditis kann im Mausmodell in drei verschiedene Phasen aufgeteilt werden (Kawai C, 1999). Die akute Phase beginnt am Tag der Virusinjektion und endet am 3. Tag p.i.. Danach folgt die subakute Phase (4.-14. Tag p.i.), die in die chronische Phase übergeht (> 15.Tag p.i.).

Zu Beginn der akuten Phase (0.-3.Tag p.i.) der Virusmyokarditis zeigte sich im Mausmodell eine virusinduzierte Zytotoxizität mit fokalen Nekrosen der Myofibrillen ohne einen Nachweis von Entzündungszellen. Das Virus lässt sich bereits vor dem Erscheinen histopathologischer Veränderungen des Myokards nachweisen (Wee et al., 1992). Zeitgleich am dritten Tag p.i. werden von Myozyten und Endothelzellen verstärkt pro-inflammatorische Zytokine wie z.B.: IL-1 β , TNF- α und IFN- γ exprimiert (Shioi T, 1996; Matsumori A, 1997). Vereinzelt zelluläre Infiltrate sind ab dem 3. Tag zu erkennen. Sie bestehen anfangs aus wenigen natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen (Feldman AM, 2000; Seko et al., 1991). Myokardschäden in der Frühphase können demnach nur direkt viral durch das Abtöten infizierter Zellen im Rahmen des intrazellulären Vermehrungszyklus bedingt sein (Melnick JL, 1990).

In der subakuten Phase (4.-14. Tag p.i.) der Myokarditis zeigt sich eine beginnende Infiltration des Myokards, die von natürlichen Killerzellen dominiert wird. Die, durch das in dieser Phase stark exprimierte Interleukin-2 aktivierten natürlichen Killerzellen, haben zu diesem Zeitpunkt einen protektiven Charakter, da sie die Virusreplikation limitieren können (Godeny EK, 1986 und 1987). Die Hypothese, dass NK-Zellen als protektiv gegen virale Infektionen angesehen werden, bestätigte sich darin, dass Mausstämme mit schwacher NK-Zellantwort nicht nur einen höheren Virustiter aufwiesen, sondern auch im Vergleich zu Mäusen mit intakter NK-Zellantwort eine schwerere Myokarditis ausbildeten (Godeny EK, 1987). NK-Zellen können durch die alleinige Freisetzung von Perforin Kardiomyozyten abtöten, interagieren jedoch nur mit virusinfizierten Zellen (Seko et al., 1993; Godeny EK, 1987). Der Nachweis eines T-Zell-Infiltrates zwischen dem 7. und 14.Tag p.i. korreliert mit den schweren pathologischen Veränderungen im Myokard (Kishimoto et al., 1985). Zahlreiche Studien unterstützten die Hypothese, dass alleinig die T-Lymphozyten nach Elimination der Viren für den Grad der myokardialen Schädigung und die Entwicklung der MC verantwortlich sind, da sie die zelluläre Immunantwort kontrollieren (Woodruff JF, 1980; Huber et al. 1984 und 1980). Sie erkennen virale Antigene auf infizierten Kardiomyozyten, woraufhin zytotoxische T-

Einleitung

Lymphozyten diese Zellen lysieren können (Kishimoto et al., 1987; Huber et al., 1984). Kishimoto et al. bewiesen durch ihre Studie, dass sich bei Mausstämmen, die mit anti-T-Zell-Antikörpern behandelt wurden, die Krankheit nicht vollständig ausbildete. Die Reduktion der myokardialen Schädigung war dabei unabhängig von der CVB3-Replikation, da sich der Virustiter nicht sichtbar veränderte. Somit postulierte man, dass die Viruselimination unabhängig von der T-Zell-Funktion und vorwiegend durch die B-Zell vermittelte humorale Immunität vermittelt sei. B-Lymphozyten nehmen zwischen dem 7. und 14. Tag p. i. 10 -20% des Anteils des Lymphozyteninfiltrates im Myokard ein (Kishimoto et al., 1985). Es wurden ebenso Makrophagen, Fibroblasten sowie Plasmazellen nachgewiesen. Makrophagen dominieren im mononuklearen Zellinfiltrat zwischen dem 5. und dem 10.Tag p.i. (Woodruff JF, 1970). In einer Studie wurde postuliert, dass Makrophagen die virale Replikation hemmen, da man bei BALB/c-Mäusen, denen man peritoneal Makrophagen injiziert hatte zeigen konnte, dass sie dadurch vor einem ausgeprägten und letalen Verlauf geschützt wurden (Rager-Zisman, 1973).

Neutrale Antikörper (AK) können nach dem 5. Tag p.i. nachgewiesen werden (Woodruff JF, 1979), woraufhin meist die Beendigung der Virämie zu beobachten ist (Rabin et al., 1964). Das „peak“ der Antikörper am 7.Tag nach der Injektion korreliert mit dem Zeitpunkt, an dem der Virustiter signifikant gesunken ist (Woodruff JF, 1970). Diese zeitig produzierten AK scheinen unabhängig von T-Lymphozyten nachweisbar zu sein. Eine Studie, bei der man Mäusen T-Lymphozyten entzog und sie dennoch eine physiologische Menge an neutralisierenden AK, während der ersten Woche der Infektion entwickelten, verifizierte diese Hypothese (Woodruff JF, 1974; Burns et al., 1975). Diese Ergebnisse implizieren, dass neutralisierende AK sowie Makrophagen eine wichtige Rolle im Kampf gegen das Virus während der frühen coxsackieviralen Infektion innehaben. Der Virustiter erreicht am vierten Tag p.i. (bei Behandlung von BALB/c Mäusen mit EMCV) sein Maximum (Tomioka N, 1986). Dieser „peak“ stellt sich parallel zu einer starken zellulären Infiltration des Gewebes und mit myokardialen Nekrosen dar (Wee et al., 1992). Zu dieser Zeit können jedoch keine neutralisierenden AK nachgewiesen werden. Der Titer sinkt bereits am 8.Tag p.i., bis er letztlich nicht mehr zu ermitteln ist (Tomioka et al., 1986).

Einen großen Einfluß auf die Entwicklung der MC haben die Zytokine. Man unterscheidet hier zwischen pro-inflammatorischen Zytokinen wie z.B.: IL-1 und IL-2, TNF- α , die eine Entzündung auslösen oder verstärken können (Huber et al., 1994) und

Einleitung

den anti-inflammatorischen Zytokinen wie z.B.: IL-10 und IL-4. Einige Interleukine haben sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Eigenschaften. So ist IL-6 ein sehr starkes pro-inflammatorisches Interleukin und spielt eine Rolle bei der Vermittlung der sogenannten Akute-Phase-Reaktion und der systemischen Entzündung, andererseits hemmt es wiederum die Expression von TNF- α und IL-1.

Die Virusinfektion triggert die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine in Myozyten und Endothelzellen (Matsumori A, 1997; Schmidtke et al., 2000; Seko et al., 1997). So konnten ab dem 7.Tag p.i. neben massiven Zellinfiltrationen deutlich erhöhte Konzentrationen von IL-2, IL-4 und IL-10 nachgewiesen werden (Seko et al., 1990; Seko et al., 1991). Zeitgleich dazu zeigte sich eine vermehrte Expression von TNF- α und IFN- γ . Es ist bisher noch nicht geklärt, ob dies durch eine virale Induktion oder durch die gesteigerte Zellzahl im Myokard bedingt ist (Seko et al., 1993 u. 1997).

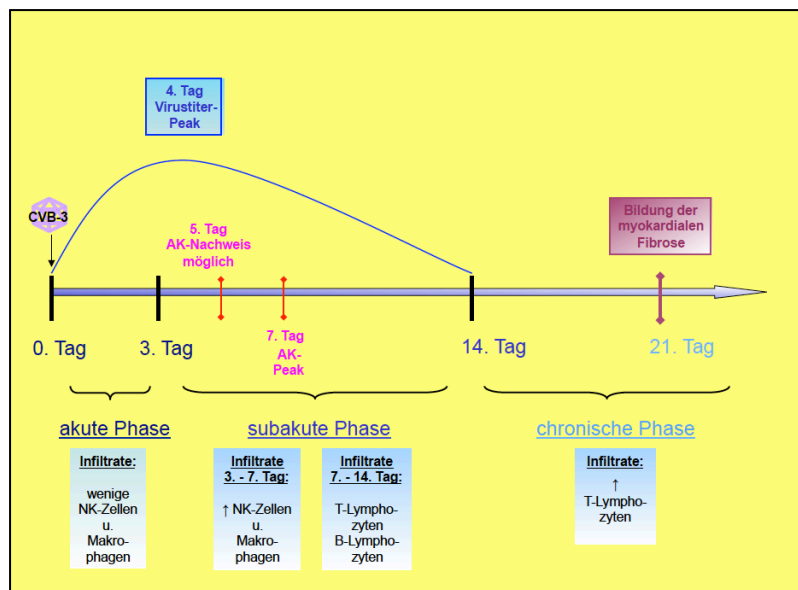


Abb. 1.4: Schematischer Verlauf der experimentellen viralen Myokarditis (modifiziert nach Liu P und Mason JW, Circulation 2001).

In der chronischen Phase (>15. Tag p.i.) der viralen Myokarditis lässt sich kein Virus und kein Viruskapsidprotein mehr nachweisen. Trotzdem schreitet die Entzündung immer weiter voran und es bildet sich eine myokardiale Fibrose (> 21.Tag p.i.) aus, die

Einleitung

sich nachweislich ab dem 28. Tag p.i. zu einer chronischen dilatativen Myokarditis entwickeln kann. Diese Trennung zwischen Virusnachweisbarkeit im Gewebe des Herzens und den dazu unabhängig verlaufenden entzündlichen Prozessen beruht auf der Aktivierung von Autoimmunprozessen welche während der viralen Infektion beginnen (Huber SA, 1988; Craighead et al., 1990). Mittels PCR konnte in verschiedenen Arbeitsgruppen im Mausmodell persistierende virale RNA zwischen 42 und 90 Tagen p.i. nachgewiesen werden (Kyu et al., 1992). Die persistierende virale RNA gilt als potentieller Promotor einer fortbestehenden Gewebeeinfiltration des Myokards durch T-Lymphozyten in der chronischen Phase der Myokarditis, was daran belegt wurde, dass drei verschiedene immunkompetente Mausstämme (z.B.: SWR-Mäuse), in denen enterovirale RNA persistiert, eine chronische Myokarditis entwickeln. DBA/1-Mäuse hingegen, die virale RNA früh eliminieren und somit den inflammatorischen Prozess beenden können, scheinen nicht zu einer Chronifizierung zu neigen (Klingel et al., 1992). Eine Viruspersistenz ist jedoch nicht obligat mit der Entwicklung einer chronischen Myokarditis verknüpft (Henke et al., 1995). Somit scheint die Art der Immunantwort auf das Virus von entscheidender Bedeutung zu sein. Es kommt zur persistierenden Interaktion von immunkompetenten Zellen mit den Gewebszellen, was zum Zytokin- und Interleukinanstieg, zur erhöhten Fibroblastensynthese, zur progressiven Fibrose und zum myokardialen Remodeling führt (Gluck et al., 2001).

1.5 Die Aufgaben der T-Lymphozyten

Bei entzündlichen Erkrankungen wie der Virusmyokarditis, geht das Immunsystem mit Hilfe von Interaktionen von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen und anderen Effektorzellen gegen das Virus vor. Aufgrund der speziellen Antigenerkennung und der Fähigkeit zur antigenstimulierten Zytokinproduktion erfüllen bei der viralen Myokarditis die T-Lymphozyten eine wichtige Abwehraufgabe. Studien ergaben, dass sowohl murine, als auch menschliche Subpopulationen von T-Helferzellen existieren (Mosmann et al., 1997). Die Differenzierung der T-Helferzelle beginnt zunächst mit der Population der TH_p-Vorläuferzelle, aus der sich folglich die naive TH₀-Zelle ausbildet. Dieser Schritt wird durch antigen-präsentierende Zellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen getriggert (Mosmann et al., 1996). Aus der

Einleitung

naiven TH₀-Zelle gehen letztlich die TH₁- und TH₂-Zellen hervor. Die Klassifizierung in TH₁- und TH₂-Zelle erfolgt anhand ihrer Zytokinexpressionsmuster, wodurch sie sich durch ihre spezifischen biologischen Funktionen unterscheiden (Mosmann et al., 1986; Romagnani et al., 1992). TH₁-Zellen aktivieren Makrophagen und die IgG-1, IgG-3-Produktion. Sie initiieren ferner eine pro-inflammatorische T-Zellantwort, die mit einer Sezernierung von IFN- γ , IL-2 und IL-12 assoziiert ist (Mosmann et al., 1989, Seder et al., 1994). TH₂-Zelle aktivieren bevorzugt B-Zellen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten (Mosmann et al., 1989; Seder et al., 1994) sowie die Produktion von IgG-4, IgE und IgA (Huber et al., 1994). TH₂-Zellen produzieren folgende Interleukine: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 (Leipner et al., 2000). TH₁-und TH₂ -Antwort haben die Möglichkeit, sich gegenseitig zu kontrollieren. Dementsprechend fördern IL-2 und IFN- γ die TH₁-Antwort, IL-10 und IL-4 die TH₂ -Antwort. Wohingegen IL-2 und IFN- γ wiederum in der Lage sind, die TH₂-Antwort supprimieren zu können (Dalton et al., 1993). Die TH₁-Antwort kann durch die Produktion von IL-4 und IL-10 gehemmt werden (Fiorentino et al., 1991). Diese Hypothesen wurden durch die Ergebnisse eines A/J-Mausmodells verifiziert, welches bei TH₂-indizierter Krankheit verdeutlichte, dass IL-4 eine MC begünstigte und im Gegensatz dazu IFN- γ eine protektive Eigenschaft besaß (Naparstek Y, 1993; Smith S, 1991). Ebenso fand man heraus, dass IL-12 die Differenzierung der TH₁-Zellen und IL-4 die Entwicklung der TH₂-Zellen unterstützt (Seder et al., 1993). Zum aktuellen Zeitpunkt kann man noch nicht eindeutig sagen, ob eine dominante TH₁-Antwort oder eine entsprechende TH₂-Antwort zur Verbesserung bzw. Verschlechterung der experimentellen Myokarditis im Tiermodell beitragen. So zeigte Seko et al. (1997), dass während der frühen Phase der Infektion im murinen Modell mit CVB3 induzierter akuter Myokarditis die TH₁-spezifischen Zytokine (IL-2 und IFN- γ) überwogen. Eine Verbesserung der chronischen Myokarditis konnte durch dominierende TH₂-Zellen in einer Studie, bei der man Antikörper gegen Corezeptoren der Antigenpräsentierung B7-1 der TH₁-Zellen in A/J-Mäusen applizierte, hervorgerufen werden (Seko et al., 1998). Eine Behandlung mit IL-10, welches gegen die TH₁-Antwort und für die TH₂-Antwort arbeitet, zeigte eine reduzierte Inflammation und myokardiale Läsionen (Watanabe et al., 2001), was auch durch die Arbeitsgruppe von Nishio et al. (1999) bestätigt wurde. In dieser Studie konnte zusätzlich noch eine verminderte Expression von IL-2 detektiert werden, was auf eine weitere TH₁-Depression schließen lässt (Nishio et al., 1999). Durch eine Behandlung mit anti-IL-4-Antikörpern erreichten Afanasyeva et al. (2001) bei BALB/c Mäusen eine Reduktion der Virusmyokarditis,

Einleitung

wobei man davon ausgehen kann, dass die schädigende Wirkung vonseiten der TH₂ - Antwort stammte.

1.6 Die myokardiale extrazelluläre Matrix

Unter der extrazellulären Matrix (EZM) versteht man ein dreidimensionales Netzwerk, das aus verschiedenen Bestandteilen zusammengesetzt wird. Hierzu zählen unter anderem Proteoglykane, Glukosaminoglykane, Fibronectin, Elastin und Laminin. Den größten Anteil an der EZM haben die Kollagene (Bishop JE, 1995). Neben dem kontraktilem Apparat stellen sie gemeinsam mit der EZM einen bedeutenden Faktor für die Dehnbarkeit bzw. Elastizität des Myokards und damit auch für die systolische und diastolische Funktion des Herzmuskels dar (Borg TK, 1981). Die EZM spielt nicht nur bei der Beschaffenheit des Myokards eine wichtige Rolle, sie dient außerdem als Substrat zur Zelladhäsion. Sie kann die zellulären Funktionen von Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Immunzellen beeinflussen, indem sie an Integrinrezeptoren an deren Oberfläche bindet (Libby P, 2000). Bei wichtigen Herzmuskelerkrankungen kommt es zur Dysregulation der EZM (Bishop et al., 1990; Pickering et al., 1990; Chello et al., 1996), da sich durch pathologische Prozesse im Myokard das Gleichgewicht der Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteasen verschiebt.

Das Kollagen Typ I stellt mit ca. 80% der Gesamtkollagene den Hauptbestandteil der bindegewebigen Matrix im Myokard dar. Das Kollagen Typ III folgt mit ca. 5-9% (Bishop et al., 1995). Die physikalischen Eigenschaften der Kollagene Typ I (steif) tragen zur Zugfestigkeit und zur Starrheit des Herzmuskels bei. Sie sind vorrangig dicke, parallel angeordnete Fibrillen. Das Kollagen Typ III bildet hingegen ein feines fibrilläres Netzwerk aus und sorgt im Myokard für Elastizität (Weber et al., 1988, Chello et al., 1996). Auf Grund der bereits präsentierten Differenzen zwischen den beiden Kollagenarten ist es wichtig, die Veränderung des Quotienten Kollagen Typ I und Kollagen Typ III zu analysieren, da er besonders großen Einfluß auf die Funktion der EZM hat (Pauschinger et al., 1999).

Einleitung

1.7 Kardiales Remodeling

Unter Remodeling versteht man strukturelle Umbau- und Anpassungsvorgänge des Herzens, die z.B. nach einem Herzinfarkt oder entzündlichen Herzmuskelerkrankungen auftreten können. Dabei verändert sich die EZM sowohl auf quantitativer als auch auf qualitativer Ebene. Man findet zusätzlich z.B. Myozytenhypertrophien, Fibroblastenproliferationen, Apoptosen und Nekrosen (Tan et al., 1991, Olivetti et al., 1997). Die ebenso beeinflusste Synthese der Kollagene sowie der modifizierte Kollagenabbau führen zu einer Änderung der Kollagenquantität. Diese Ereignisse der Kollagenexpressionsveränderungen bei akuter MC und DCM, konnten durch viele Studien belegt werden (Pauschinger et al., 1998; Marijjanowski et al., 1995).

An diesem Prozess sind nicht nur kardiale Myozyten beteiligt, sondern auch wichtige Komponenten wie z.B.: Fibroblasten, koronare Blutgefäßverteilung, oxidativer Streß, mechanischer Streß, Zytokine und Proteine der EZM. Man kann das Remodeling als Antwort auf pathologische Vorgänge im Herzen sehen. Es soll dazu beitragen, dass die normale kardiale Funktion trotz einer Beeinträchtigung aufrechterhalten wird. Kommt es nicht zu solch einer Adaption, führt dies zu dem klinischen Bild der kardialen Dekompensation. Aus diesem Grund ist es äußerst relevant, die molekularen Mechanismen des Remodelings zu erforschen. Somit könnten durch gezielte Eingriffe in dieses System, neue Therapiemöglichkeiten und eine evtl. Vermeidung einer Herzinsuffizienz erreicht werden.

Den größten Einfluss auf Umbaumechanismen haben Proteinasen und ihre Inhibitoren. Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) werden von Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Tumorzellen gebildet (Ries et al., 1995). Die Klassifikation der MMPs erfolgt nach ihrem jeweiligen spezifischen Substrat. Mit zunehmend genauerer Charakterisierung der MMPs wurde eine starke Überlappung der Substrate deutlich. Bisher sind 28 verschiedene MMPs nachgewiesen worden, die allesamt an der Degradierung von Kollagenen beteiligt sind. Trotz der Vielzahl wurde an der Klassifikation anhand der Substratspezifität in Kollagenasen, Stromelysin, Gelatinasen und Matrilysine festgehalten. So degradieren Kollagenasen wie MMP-1, MMP-8 und MMP-13 die Trippelhelix der Kollagenfibrillen in einzelne Gelatinfragmente (Knauper et al., 1996). Diese Fragmente werden wiederum von Gelatinasen, wie MMP-2 und MMP-9 abgebaut. Stromelysine (MMP-3 und MMP-10) degradieren Kollagene (He et al., 1989), Gelatinfragmente, Fibronectin und Laminin

Einleitung

(Murphy et al., 1992). Erweitert wurde die MMP-Familie durch die sogenannten membrangebundenen MMPs (Sato H, 1996; Takino T, 1995) von denen bisher vier Subtypen kloniert wurden (MT1-MMP bis MT4-MMP). Sie spielen insbesondere bei der Zymogenaktivierung eine wichtige Rolle.

Die Tissue-inhibitors-of-metalloproteinases (TIMPs) kontrollieren die Aktivität der MMPs (Woessner JF, 1991). In der Familie der spezifischen Inhibitoren fällt besonders TIMP-4 ins Auge, da er der einzige bekannte MMP-Inhibitor ist, der eine kardiale Spezifität aufweist (Greene et al., 1996) und somit einen großen Einfluß auf das kardiale Remodeling besitzt. Neben TIMP-4 wurden bisher noch drei weitere Typen von TIMP nachgewiesen. Alle vier identifizierten Subtypen der TIMPs binden in einem 1:1 Verhältnis an aktivierte MMPs (Murphy G, 1997). Dabei erfolgt die spezifische Inhibition der MMPs durch eine N-terminale Domäne der TIMPs, die mit der zinkbindenden Region der MMPs interagiert und dadurch zu einer direkten Hemmung der MMP-Aktivität führt. Die vier verschiedenen Subtypen der TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) können jeweils spezifische MMPs blockieren. So kann TIMP-4 beispielsweise MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 inhibieren (Li et al., 2000). Es konnte durch einige Studien bewiesen werden, dass pathologische Remodelingprozesse durch veränderte MMP- bzw. TIMP- Expressionen induziert wurden. Aufgrund dieser Erkenntnisse führte man Versuche durch, welche die Ergebnisse dadurch verifizieren konnten, indem sie aufzeigten, dass wiederum durch Eingriffe in das TIMP/MMP-System das Remodeling beeinflusst wird (Spinale et al., 1999; Peterson et al., 2001). Somit wurde die enge funktionelle Verbindung zwischen Remodeling und MMPs in Bezug auf die Struktur des Herzens und die Herzfunktion dargestellt. Durch tierexperimentelle Studien konnte der Zusammenhang zwischen der myokardialen MMP-Expression und dem linksventrikulären Remodelingprozesses nachgewiesen werden (Kim et al., 2000). Spinale et al. (1999) zeigte, dass eine vollständige MMP-Inhibition zu einer erhöhten Steifheit des Herzens führte, die wiederum durch eine Vermehrung des interstitiellen Kollagens entstanden war. Eine komplette Hemmung der MMPs beinhaltet dementsprechend einen negativen Effekt auf das Kollagenturnover. Bei selektiver MMP-Inhibition konnten kompensatorische Anstiege anderer MMP-Typen beobachtet werden. Es ist scheinbar nicht nur eine kontrollierte Balance zwischen TIMP- und MMP- Expression bedeutsam, sondern auch das Gleichgewicht zwischen den einzelnen MMP-Subtypen.

1.8 Die Regulation des myokardialen Remodelings

1.8.1 Die Wirkung der Zytokine

Nicht nur bei der Expression von Bestandteilen der EZM, sondern auch bei deren Degradation durch MMPs spielen Zytokine eine übergeordnete Rolle. So nimmt der Transforming growth factor- β (TGF- β) bezüglich der Expression von extrazellulären Matrixbestandteilen einen wichtigen Platz ein, indem es die Fibronektin-, Elastin-, Proteoglykan- u. Kollagenexpression erhöht (Roberts et al., 1986; Ignatz et al., 1987). TGF- β senkt über inhibitorische Gene (TIE) die Transkription von MMP-1 und MMP-3 (Wahl et al., 1993), triggert aber die Synthese von MMP-2 und MMP-9 (Mauviel A, 1993) und weist dadurch eine ambivalente Funktion auf. IL-1 β und TNF- α besitzen beide die Fähigkeit, TGF- β zu aktivieren und somit die indirekte Möglichkeit, ihren starken vorangegangenen Effekt auf die MMP-Synthese zu kompensieren (Chao et al., 1995; Dollery et al., 1995)). So zeigten Forschungsergebnisse, dass bei einer Überexpression von TNF- α ein entsprechender Anstieg nur von Seiten der MMPs (MMP-2 und MMP-9) erfolgte, auf die TGF- β keine senkende Wirkung ausüben konnte. TNF- α gilt ebenso als wichtiges Zytokin für regulatorische Prozesse der EZM. TNF- α wird unter anderem von NK-, B- und T-Lymphozyten und unter bestimmten Bedingungen auch von Kardiomyozyten produziert (Kapadia et al., 1995). Virusinfektionen, IL-1, IL-2 oder INF- γ triggern die Expression von TNF- α . TNF- α besitzt einen starken positiven Effekt auf die MMP-Expression. Durch die Stimulation des Aktivatorproteins AP1 (Conca et al., 1989), das vor der Promotorregion der MMP-Gene liegt, kann TNF- α deren Transkription kontrollieren und somit die MMP-Synthese beeinflussen (Vincenti et al., 1996). Arbeitsgruppen fanden heraus, dass nicht nur TNF- α einen starken Effekt auf MMPs besitzt, sondern wiederum von MMPs aktiviert werden kann. Diese Aktivierung konnte sowohl durch Gabe von MMP-Inhibitoren blockiert, als auch durch Gabe von MMPs wieder hergestellt werden (McGeehan et al., 1995; Gearing et al., 1994). Inflammatorische Zytokine wie TNF- α führen zu einer verminderten Kollagensynthese in Tierversuchen mit Ratten und in *in vitro*-Studien mit kardialen Fibroblasten (Bozkurt et al., 1998; Rezzonico et al., 1998). Weiterhin ist für TNF- α ein negativ-inotroper Effekt auf die myokardiale Kontraktilität beschrieben. Bei Patienten mit einer manifesten Herzinsuffizienz konnte TNF- α erhöht nachgewiesen

Einleitung

werden, was auf einen modulatorischen Effekt von TNF- α auf die EZM schließen lässt (Katz et al., 1994).

1.8.2 Die Degradation der Kollagene und deren Einfluss

Lediglich MMP-1 (fibroblast-type collagenase) (Gross J, 1962), MMP-8 (neutrophil-type collagenase) und MMP-13 (collagenase 3) (Factor et al., 1986) sind in der Lage, die für die Funktion und Struktur des Myokards bedeutsamen fibrillären Typ-I- und Typ-III-Kollagene bei neutralem pH-Wert zu hydrolysieren. Die jeweiligen MMPs weisen dabei eine unterschiedliche Substrataffinität auf. So besitzen MMP-1 und MMP-8 eine hohe Affinität für Typ-I- und Typ-III-Kollagen (Hasty et al., 1987). Homotrimeres Typ-III-Kollagen, sowie heterotrimeres Typ-I-Kollagen werden an spezifischen Punkten durch die jeweiligen MMPs gespalten. So wird Typ-I-Kollagen insbesondere durch MMP-1/MMP-8 gespalten (Birkedal-Hansen et al., 1993). MMP-2 hingegen besitzt eine hohe Affinität zu Kollagen-IV (Stetler-Stevenson W, 1996). TGF- β erhöht nicht nur den Proteingehalt, sondern auch die mRNA-Expression von Kollagen Typ-I und Typ-III (Roberts et al., 1986, Ignatz RA, 1986). TNF- α hingegen hat eine inhibitorische Wirkung auf die Kollagensynthese (Pauschinger et al., 2002). Verschiedene Faktoren führen zu einer Induktion der Kollagensynthese in den kardialen Fibroblasten. Diese Faktoren sind neben Zytokinen (TGF- β) auch PDGF, Angiotensin II (Lijne et al., 2001), Aldosteron (Neumann et al., 2002) und mechanischer Stretch (Lee et al., 1999).

1.8.3 Regulation des myokardialen Remodelings durch die MMP-Aktivität

Die Regulation des myokardialen Remodelings erfolgt sowohl auf transkriptioneller, als auch auf posttranslationeller Ebene. MMPs werden in Form inaktiver Proenzyme, sogenannter Zymogene unter anderem von kardialen Fibroblasten synthetisiert und können mit Ausnahme von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen nicht gespeichert werden. Die Aktivierung der Proenzyme in vivo erfolgt unter anderem durch bereits aktivierte MMPs, insbesondere durch Stromelysin und Plasmin (Woessner JF, 1991). Die Aktivierung von Zymogenen zu aktivierten MMPs wird darüber hinaus durch Komponenten der EZM reguliert. So wird beispielsweise proMMP-2 sowohl durch

Einleitung

membrangebundenes MMP-1 (Kinoshita et al., 1996), als auch durch $\alpha V\beta 3$ -Integrin zu aktivem MMP-2 umgewandelt (Brooks et al., 1996). Zymogene werden durch den sogenannten „Cystein-switch“- Mechanismus aktiviert, bei dem durch die Abspaltung von Zystein das zinkhaltige, aktive Zentrum des Enzyms demaskiert wird (Springmann et al., 1990). Interleukin-6, TNF- α sowie Interferon-1 β (Emonard H, 1990) sind bedeutsame Stimulatoren der MMP-Transkription.

1.9 Hämodynamische Veränderungen

Bei kardialen Erkrankungen gehören Untersuchungen zu hämodynamischen Veränderungen zur Standarddiagnostik. Sie dienen zur Diagnosestellung und zur Überwachung des Verlaufs der Erkrankung.

Das Herzzeitvolumen (HZV) ist ein wichtiger Indikator für die Pumpfunktion des Herzens und lässt sich aus dem Produkt von Schlagvolumen (SV) und Herzfrequenz (HF) nach der Formel $\text{HZV [l/min]} = \text{SV [l]} \times \text{HF [min}^{-1}\text{]}$ berechnen. Dabei ist die Pumpfunktion des Herzens abhängig von der Kontraktilität (Inotropie), der Nachlast und der Herzfrequenz. Die Inotropie des Herzens wiederum ist abhängig von der Vorlast (Frank-Starling-Mechanismus), der Frequenz (Bowditch-Effekt) und der sympathoadrenergen Aktivierung. Der Frank-Starling-Mechanismus beschreibt die Beziehung zwischen dem linksventrikulärem enddiastolischen Füllungsdruck (LVEDD) und dem Schlagvolumen (SV). Nach dieser Kraft-Spannungs-Beziehung führt ein Anstieg des Füllungsdrucks über eine vermehrte Vordehnung des Ventrikels zu einer Zunahme der Muskelfaserverkürzung und damit zu einer Anhebung des Schlagvolumens (Busse, 1995). Im Rahmen der Herzinsuffizienz ist die Frank-Starling-Kurve allerdings nach unten verschoben, sodass eine Zunahme des Schlagvolumens nur durch einen stärkeren Anstieg des Füllungsdrucks erreicht werden kann.

Der Zusammenhang zwischen der verringerten Pumpleistung des Herzens und der Kardiomegalie, zwei typische Merkmale der dilatativen Kardiomyopathie, lässt sich aus dem Laplace-Gesetz ableiten. Zwischen der muskulären Wandspannung K (Kraft pro Querschnitt der Wand) und dem Innendruck P eines kugelförmigen Hohlkörpers vom Radius r und der Wanddicke d gilt: $K = (P \times r) / 2d$. Demnach muss zur Erzeugung eines bestimmten intraventrikulären Druckes umso mehr Kraft aufgewendet werden je größer der Innendurchmesser des Ventrikels ist. Gleichzeitig nimmt die muskuläre

Einleitung

Wandspannung in Abhängigkeit des ventrikulären Radius zu. Mit zunehmender ventrikulärer Dilatation steigt demnach die benötigte Kraft für eine suffiziente Pumpleistung bei zugleich zunehmender muskulärer Wandspannung. Das Schlagvolumen und damit auch das Herzzeitvolumen als Indikatoren der ventrikulären Förderleistung des Herzens nehmen ab (Antonio H, 1995).

Der Bowditch-Effekt beschreibt die Kraft-Frequenz-Beziehung am Herzen. Mit zunehmender Herzfrequenz steigt am gesunden Herzen die Kontraktionskraft. Am insuffizienten Herzen führt dieser Mechanismus allerdings nicht zu einer gesteigerten Inotropie sondern eher zu einer Abnahme der Pumpleistung.

Weiterhin ist das Schlagvolumen vom peripheren Gefäßwiderstand (der Nachlast) abhängig. Die Nachlast des Herzens bestimmt den Auswurfwiderstand, gegen den der Ventrikel arbeiten muss. Von ihr ist die maximale ventrikuläre systolische Wandspannung abhängig. Die Nachlast repräsentiert also im Wesentlichen den arteriellen Blutdruck, der vom Herzzeitvolumen (HZV) und dem totalen peripheren Widerstand (TPR) nach der Formel $RR = HZV \times TPR$ abhängig ist. Nach dem Frank-Starling-Gesetz kann ein gesundes Herz auch bei Zunahme der Nachlast das Schlagvolumen in einem breitem Rahmen konstant halten. Bei einem insuffizienten Herzen führt allerdings schon ein geringer Anstieg des peripheren Widerstandes zu einem drastischen Abfall des Schlagvolumens.

Watanabe et al. (2001) zeigten, dass die Art der Immunantwort auf die Infektion einen deutlichen Einfluss auf die hämodynamische Funktion des Herzens hat. Dabei wurde durch Gentransfer von IL-10 in Lewis-Ratten mit Autoimmunmyokarditis die Herzfunktion deutlich verbessert. Dass die Virusinfektion nicht zwingend für die kardiale Dysfunktion notwendig ist, zeigt eine Untersuchung bei Übertragung einer Myokarditis durch Transfer peripherer Blutleukozyten aus Patienten mit viraler Myokarditis auf immuninkompetente SCID-Mäuse, die dabei kardiale Funktionsstörungen aufzeigten (Schwimmbeck et al., 1995). Letztlich wurde die Rolle der Matrixdegradation durch Gendeletion von TIMP-1 demonstriert, wobei es zu einer fulminanten Verschlechterung der Herzfunktion bei viraler Myokarditis kam (Roten et al., 2000). Herzum et al. (1995) fanden in EMCV-infizierten DBA/2-Mäusen eine direkte Korrelation zwischen zellulärem Infiltrat und kardialer Dysfunktion, dabei zeigte sich eine verschlechterte Herzfunktion ab dem 5. Tag p.i., die zum Zeitpunkt maximaler, zellulärer Infiltration am 7.–10. Tag p.i. die schlechtesten Werte erreichte.

Problemstellung

2. Problemstellung

Enteroviren, vor allem Coxsackie-B3-Viren verursachen eine akute virale Myokarditis. Die detaillierten Mechanismen, welche zu einer chronischen linksventrikulären Dysfunktion und zu einer Dilatation führen, sind weiterhin schwer zu erfassen. Die Pathogenese der Myokarditis stellt ein komplexes Zusammenspiel vieler Mechanismen dar. Die virusinduzierte chronische Inflammation und die virale Persistenz sind z.B. Faktoren, die die extrazelluläre Matrix dahingehend beeinflussen können, sodass sich eine linksventrikuläre Dysfunktion mit einem dilatierten Ventrikel und einer reduzierten systolischen Pumpfunktion entwickelt. Dieser Zusammenhang kann bei Patienten mit viraler Myokarditis zu tragischen klinischen Verläufen führen. Nur wenige Studien untersuchten bisher diese einzelnen Komponenten in einem Mausmodell genauer. Die hieraus erworbenen Kenntnisse könnten folglich einen Erklärungsansatz der Pathogenese und eine daraus resultierende Therapie für erkrankte Patienten bieten. So bestehen bis zum heutigen Zeitpunkt ausschließlich Empfehlungen aber keine suffiziente Therapie für eine Virusmyokarditis. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der myokardialen Inflammation und der matrixmodifizierenden Faktoren auf das kardiale Remodeling und die daraus resultierenden hämodynamischen Veränderungen untersucht. Für diese Studie wurde im Gegensatz zu vergleichbaren Veröffentlichungen bewusst der SWR/J-Mausstamm gewählt. Es konnte nachgewiesen werden, dass SWR/J-Mäuse im Gegensatz zu einem BALB/c-Mausstamm eine persistierende Myokarditis bis zu mehreren Monaten ausbilden konnten. Ebenso besteht durch die hohe Sensitivität der SWR/J-Mäuse zu CVB3, eine Korrelation zwischen der Ausprägung der Myokarditis und der Dosis des Virus in SWR/J-Mäusen (Zhang et al., 1994). Diese Vorteile ermöglichten im zeitlichen Verlauf eine besonders gute Beurteilung aller zu analysierenden Parameter.

Problemstellung

Am Model der CVB3-induzierten viralen Myokarditis von SWR/J-Mäusen wurden folgende Punkte untersucht:

- Wie ändern sich die mRNA-Expressionsmuster der Zytokine und der einzelnen Bestandteile der extrazellulären Matrix in Bezug auf die drei Phasen der viralen Myokarditis bei SWR/J-Mäusen?
- Spielt ein Missverhältnis von MMPs und deren Inhibitoren im Rahmen einer viralen Myokarditis beim kardialen Remodeling eine Rolle?
- Ist eine Korrelation der Veränderungen der extrazellulären Matrix mit den hämodynamischen Veränderungen postulierbar?
- Welchen Einfluss hat die virale Persistenz des Coxsackievirus im Rahmen der murinen Myokarditis?
- Wie stellen sich die hämodynamischen Veränderungen im Verlauf der Virusmyokarditis dar?

Material und Methoden

3. Material und Methoden

3.1 Mausmodell

3.1.1 Das Virus

Die virale Myokarditis wurde bei den Mäusen durch das Coxsackievirus-B3 (Nancy Strain, ATCC VR-30) indiziert. Das Virus wurde in einer Konzentration von 1×10^5 Plaque forming units (PFU) in HeLa-Medium bei -80°C gelagert. Vor der intraperitonealen Verabreichung des Virus wurden die Infektionsdosen in 0,5ml 1x Phosphate buffered saline (PBS) gelöst (150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4) und im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

3.1.2 Versuchstiere

Für die Studie wurden 60, sechs Wochen alte, männliche SWR/J-Mäuse aus dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen. Ein genehmigter Tierversuchsantrag lag bereits vor. Die Versuche an den Mäusen wurden laut der Genehmigung gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Mäuse hielten wir in 10er Gruppen in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Makrolol III) auf staubfreiem Weichholzgranulat. Um den natürlichen Lebensrhythmus, wie z.B. Nahrungsaufnahme und Stoffwechsel der Mäuse zu gewährleisten, wurden die Umweltbedingungen konstant gehalten. An die relative Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$, Raumtemperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$ und an die Belichtung im Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden konnten sich die Versuchstiere vor Beginn der Studie zwei Wochen lang gewöhnen. Die Nahrung wurde pelletiert und kontinuierlich verabreicht. Den Tieren war außerdem jederzeit steriles Leitungswasser in Tränkflaschen verfügbar.

3.1.3 Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Für die Studie wurde ein Grundgerüst von 30 infizierten Mäusen und 30 Kontrollmäusen festgelegt (s. Abb. 3.1). Diese zwei Gruppen ließen sich jeweils in drei Untergruppen

Material und Methoden

aufteilen, d.h. in jeder Mausgruppe, infiziert oder nichtinfiziert, werden die Unterschiede der Infektion am 4., 7. und 28. Tag analysiert. Die Gruppengröße verläuft sich auf n=10 pro Versuchsgruppe (siehe Tabelle 3.1).

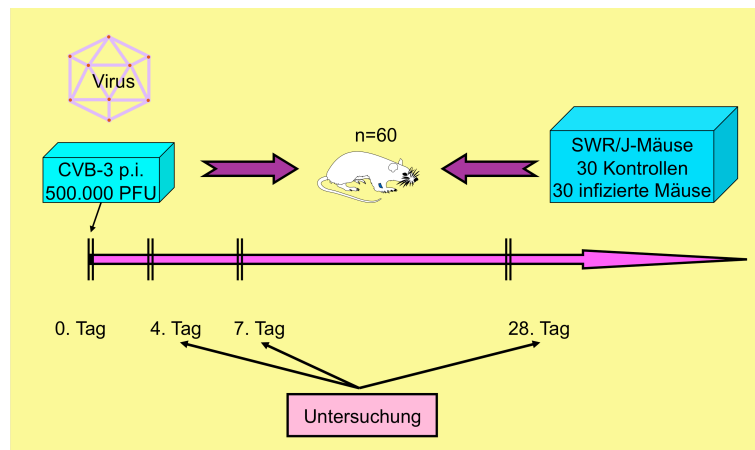


Abb. 3.1: Darstellung des Versuchsablaufes.

Zu sehen ist die Zeitachse der Untersuchungen der infizierten Mäuse und der Kontrollgruppe. Intraperitoneale Injektion des CVB3 am 0. Tag.

VERSUCHSGRUPPEN	INFEKTIONSPHASE
Gruppe I ₄ (n = 10; B01-B10)	infizierte Gruppe (CVB3), 4.Tag nach Infektion
Gruppe I ₇ (n = 10; B11-B20)	infizierte Gruppe (CVB3), 7.Tag nach Infektion
Gruppe I ₂₈ (n = 10; B21-B30)	infizierte Gruppe (CVB3), 28.Tag nach Infektion
Gruppe K ₄ (n = 10; B31-B40)	Kontrollgruppe unbehandelt, 4.Tag nach Infektion
Gruppe K ₇ (n = 10; B41-B50)	Kontrollgruppe unbehandelt, 7.Tag nach Infektion
Gruppe K ₂₈ (n = 10; B51-B60)	Kontrollgruppe unbehandelt, 28.Tag nach Infektion

Tab. 3.1: Versuchsgruppeneinteilung.

Material und Methoden

3.2 Versuchsablauf

Die Injektion der SWR/J-Mäuse mit Hilfe des CVB3 wurde von Herrn Prof. Dr. med. M. Pauschinger (derzeit Chefarzt der Medizinischen Klinik 8, Schwerpunkt Kardiologie des Klinikums Nürnberg Süd) durchgeführt. Die Mäuse der infizierten Versuchsgruppen I₄, I₇ und I₂₈ wurden am ersten Tag der Studie mit 5×10^5 PFU Coxsackievirus B3 (Nancy strain), welches vorher in 0,5ml x PBS gelöst wurde, intraperitoneal behandelt. Im Vergleich dazu applizierten wir den Kontrolltieren K₄, K₇ und K₂₈ 0,2 ml 1x PBS ohne CVB3.

3.2.1 Hämodynamische Messungen

Die hier beschriebene Methode der hämodynamischen Messungen wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Carsten Tschöpe (Institut für Kardiologie und Pulmologie, Charité Campus Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin) durchgeführt. Die infizierten Tiere und die Kontrollgruppen wurden sowohl am vierten, siebten sowie am achtundzwanzigsten Tag (Versuchsgruppen s. Tabelle 3.2.1) der Infektion jeweils anästhesiert, intubiert und maschinell beatmet. Nachdem man mit großer Vorsicht (zur Vermeidung von Blutverlusten) den Thorax eröffnet und die störenden, ventralen Rippen auf der linken Seite entfernt hatte, wurde der linke Ventrikel mit einer 20G Plastikkanüle punktiert. Diese Kanüle ermöglichte auf diese Weise das Einführen eines Millar-tip Katheters über den Apex des Herzens in den linken Ventrikel. Die kardialen Funktionen, die man über die Messungen am Herzen erhielt, wurden von einem Mark VII Linearrecorder (Graphtec Corp., Tokyo, Japan) bildlich dargestellt und zu Parametern weiterverarbeitet, die z.B. über die linksventrikuläre Kontraktilität des Herzens Aufschluss geben.

Material und Methoden

Kontrollgruppe	4. Tag	n= 6
Kontrollgruppe	7. Tag	n= 6
Kontrollgruppe	28. Tag	n= 6
infizierte Gruppe (CVB3)	4. Tag	n= 7
infizierte Gruppe (CVB3)	7. Tag	n= 7
infizierte Gruppe (CVB3)	28. Tag	n= 9

Tabelle 3.2.1: Anzahl der hämodynamisch analysierten Versuchstiere.

Berechnet wurden folgende Parameter:

- **dP/dt max:** maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit des linken Ventrikels in der isovolumetrischen Anspannungsphase zur Zeit (mmHg/s)
⇒ *Kontraktilität des linken Ventrikels*
- **dP/dt min:** negative Druckanstiegsgeschwindigkeit des linken Ventrikels (mmHg/s)
⇒ *Relaxationsfähigkeit oder Compliance des linken Ventrikels*
- **LVESP:** linksventrikulärer endsystolischer Druck (mmHg)
⇒ *Maß für die linksventrikuläre Wandspannung des Herzens*
⇒ *Nachlast des Herzens*
- **LVEDP:** linksventrikulärer enddiastolischer Druck (mmHg)
⇒ *Vorlast des Herzens*
- **HF:** Herzschläge pro Minute, angegeben in min^{-1}
- **LVESV:** linksventrikuläres endsystolisches Volumen in μl angegeben
- **LVEDV:** linksventrikuläres enddiastolisches Volumen in μl angegeben
- **SV:** Schlagvolumen in μl angegeben
- **EF:** systolische Ejektionsfraktion in % angegeben

Material und Methoden

3.2.2 Präparation der Herzen

Nach Beenden der hämodynamischen Messungen, wurden den untersuchten Tieren das Herz, die Leber und die Milz steril entnommen. Leber und Milz wurden direkt in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dem Herzen entfernte man vor dem Wiegen das intrakardiale Blut, um das Gewicht nicht zu verfälschen. Das Herz wurde wie folgt präpariert: die Apex wurde vom Rest des Herzens geteilt und zur späteren Verwendung für Protein- und RNA-Extraktion in Stickstoff gefroren. Dem Restgewebe trennte man die Vorhöfe ab und erstellte einen Querschnitt aus dem übriggebliebenen Herzens für die Immunhistochemie. Dieser Querschnitt wurde in Formalin gegeben, um daraus später histologische Schnitte machen zu können. Alle präparierten Proben wurden dann bei -80°C gelagert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Alle Methoden und molekularbiologische Arbeiten, wie z.B.: die RNA-Präparation verliefen unter strengen sterilen Bedingungen, um Verunreinigungen der Proben zu verhindern. Es wurden immer RNase-freie Substanzen und Materialien verwendet. Selbst hergestellte Lösungen wurden mit DEPC-Wasser behandelt. Die RNase-freien Bedingungen wurden durch Autoklavieren der Glasgegenstände und der Materialien sowie durch die Benutzung von RNase-Zap bei der Arbeitsfläche und den Einmal-Handschuhen erreicht. In den folgenden Kapiteln wurde steril und mit sauberen Materialien und Substanzen gearbeitet.

3.3.1 RNA-Extraktion mittels TRIZOL[®]

Die RNA-Präparation wurde mit TRIZOL[®] Reagent und den dazugehörigen Protokollen der Firma GibcoBRL durchgeführt. Die bei -80°C gelagerten Proben (mit einer Herzmasse zwischen 74mg und 100mg) wurden vor der Präparation in ein Stickstoffbehälter gegeben. Von dort aus gelangten die Gewebestücke direkt in ein mit 400 μl Trizol vorbereitetes Tube. In diesem Tube wurde die Probe gewogen und vollständig homogenisiert. Das Endvolumen von 800 μl wurde danach durch nochmalige Zugabe von 400 μl Trizol ergänzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

Material und Methoden

Zugabe von 160µl Chloroform und 15 sec. Schütteln, folgte wieder eine 2-3min. Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000g und 4°C bildeten sich aus dem Ansatz drei separate Phasen. Die Oberphase (klare Flüssigkeit) mit dem RNA-Anteil wurde Schritt für Schritt in ein neues, steriles Tube pipettiert. Die überschüssige Unterphase (proteinhaltig, rosafarben) und Interphase (DNA-haltig, weißlich) wurde für die Proteinextraktion bei -20°C gelagert. Zur Fällung der RNA mischte man die obere Phase durch leichtes Schütteln mit 400µl Isopropanol und inkubierte wiederholt alles für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 1200g und 4°C, bildete sich aus der RNA am Boden des Reaktionsgefäßes ein Pellet. Dieses Pellet wurde daraufhin im Gefäß vom Überstand freipipettiert und mit 800µl 75%igem Ethanol bei 7500g und 4°C für 5 Minuten in der Zentrifuge gewaschen. Nach Verwerfung des Überstandes folgte eine 10-15 minütige Trockenzeit des Pellets. In dieser Zeit veränderte sich jenes Aussehen von weiß zu durchsichtig und glasig. Erst diese Veränderung machte die Lösung in der ausgerechneten Menge des DEPC-behandelten Aqua bidest. möglich. Die Lösemenge wurde nach folgender Formel berechnet: Lösemenge in µl H₂O = Gewebemasse der Herzproben in mg x 1,6. Um das Pellet vollständig zu lösen, wurde es für 10 Minuten bei 58°C inkubiert. Durch photometrische Analyse bei 260 und 280nm konnte dann die Konzentration der RNA gemessen werden. Die Proben, deren A_{260/280}-Ratio zwischen 1,6 und 1,8 lagen, wurden als qualitativ gut beurteilt.

3.3.2 DNase-Verdau

Um bei der RT-PCR eine unverfälschte Aussage über die RNA-Expression machen zu können, wurde vor der Umschreibung von RNA in cDNA ein Verdau zur Eliminierung chromosomaler DNA mit Hilfe von DNase I[®] und den Protokollen der Firma Roche durchgeführt. 8µg RNA wurden in einem 30µl Reaktionsgemisch 2h bei 37°C inkubiert (Zusammensetzung des Reaktionsgemisches: 24µl RNA/DEPC-Lösung + 3µl 10x DNase-Puffer + 3µl DNase I (10U/ µl)). Zur Inaktivierung der DNase wurden die Ansätze anschließend für 5 Minuten bei 90°C inkubiert und dann 3 Minuten auf Eis gestellt. Zur Kontrolle der vollständigen DNA-Eliminierung wurde eine β-Aktin-PCR durchgeführt (siehe Abb. 3.3). In dem Fall, dass noch DNA in den Proben vorhanden war, wurde nochmals ein Verdau für diesmal 1h bei 37°C und 2,5µl DNase

Material und Methoden

vorgenommen. Auch hier wurde abschließend eine β -Aktin-PCR durchgeführt. Die vollständig verdauten Proben wurden wiederholt photometrisch gemessen, um die Konzentration zu bestimmen, die für die Durchführung der reversen Transkription wichtig ist.

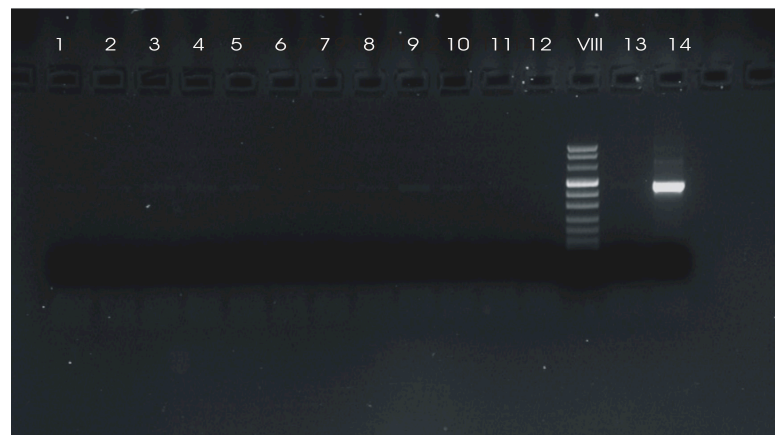


Abb. 3.3: β -Aktin-PCR zur Kontrolle der verdauten Proben.

Spuren 1-12: verdauten Proben; VIII = DNA-Längenstandart

Spur 13: Negativkontrolle; Spur 14: Positivkontrolle

3.3.3 Reverse Transkription

Für die Methode der Reversen Transkription wurden die Protokolle und das cDNA-Synthese Kit der Firma Promega benutzt. Wir lösten jeweils 2 μ g der DNase-verdauten RNA-Proben in 20 μ l Diethylpyrocarbonat-behandeltem (DEPC) Aqua bidest., die 10 Minuten bei 70°C denaturiert wurden. Anschließend erfolgte die Transkription in einem 40 μ l-Reaktions-gemisch (20 μ l gelöste RNA, 4 μ l 25mM MgCl₂, 2 μ l 10xReverse Transcription Buffer, 2 μ l 10mM dNTPs, 0,5 μ l RNAsin[®], 0,5 μ l AMV Reverse Transcriptase, 1 μ l Oligo(dt)₁₅ Primer und 10 μ l DEPC-behandeltes Aqua bidest.) bei 48°C für 45 Minuten. Um die AMV-Reverse-Transcriptase zu inaktivieren, inkubierte man die Proben bei 95°C für 5 Minuten und auf Eis für 3 Minuten. Die umgeschriebene cDNA konnte nun direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt werden. Da in dieser Studie auch ein enteroviraler RNA-Nachweis wichtig war, um z.B. bei den infizierten Mäusen die tatsächliche Anwesenheit des CVB3 nach der Infektion zu verifizieren, wurde das

Material und Methoden

Protokoll so modifiziert, dass man statt des Oligo (dt)₁₅-Primers einen Randomprimer einsetzte und den Ansatz sonst beibehielt (s. Tabelle 3.3).

Amplifikat	Primersequenzen 5' → 3'	Annealing-Temperatur	Zykluszahl
CVB-3 (1) RT-PCR	SE: 5' - AGGGAATCGTGCGTGACAT - 3' AS: 5' - CATCTGCTGGAAGGTGGACA - 3'	60,0 °C	30
CVB-3 (2) nested-PCR	SE: 5' - CGGTACCTTTGTGCGCCTGT - 3' AS: 5' - CAGGCCGCCAACGCAGCC - 3'	55,0 °C	35

Tabelle 3.3: Verwendete Primer für den Nachweis des enteroviralen Genoms.

Amplifikat	Primersequenzen 5' → 3'	Annealing-Temperatur	Zykluszahl
Kollagen Typ I	SE : 5' - CTGGAAGAGCGGAGAGTA - 3' AS: 5' - TAAACTCCCTCCACCCCA - 3'	62,2°C	31
Kollagen Typ III	SE : 5' - CCCAGAACATTACATACCACT - 3' AS: 5' - CACCATTGAGACATTTTGAAG - 3'	59,0°C	28
Kollagen Typ IV	SE: 5'- TGG TAA AGG TGG GGA GAG TG - 3' AS: 5'- CCC TGA AAG CAG GAG ACT TG - 3'	55,0°C	30
TNF-α	SE : 5' - CAAAGGGAGAGTGGTCAGTT - 3' AS: 5' - CACTGAACCTCTGCTCCCCAC - 3'	65,5°C	34
INF-γ	SE : 5' - AGCAACAGCAAGGCGAAAAAG - 3' AS: 5' - GTTGTATCTGGGGGTGGGGGA - 3'	60,0°C	39
TIMP-1	SE : 5' - ACGAATCAACGAGACCACCTTAT - 3' AS: 5' - CGACACCCACAGCCAGCACTAT - 3'	60,0°C	31
MMP-2	SE : 5' - GGAGAAGGCTGTGTTCTTCG - 3' AS: 5' - GGAGAAGGCTGTGTTCTTCG - 3'	51,0°C	31
MMP-3	SE : 5' - GGCTTCAGTACCTTCCCAGG - 3' AS: 5' - GCAGCAACCAGGAATAGGTT - 3'	60,0°C	31
MMP-8	SE : 5' - GCAGGACTCCTTCTTCTTCTTCTCAGTG - 3' AS: 5' - AAGGTAGTAAACGGCTTGCTCTTTGTG - 3'	62,0°C	38

Material und Methoden

IL-10	SE : 5' - ACATACTGCTAACCGACTCCT - 3' AS: 5' - ACTCTTCACCTGCTCCACTGC - 3'	61,0°C	40
IL-6	SE : 5' - GAGAGGAGACTTCACAGAGG - 3' AS: 5' - GGTA CTCCAGAAGACGACAG - 3'	60,0°C	31
IL-1 β	SE : 5' - GGGATGATGATGATAACCTG - 3' AS: 5' - CCACTTTGCTCTTGACTTCT - 3'	60,0°C	33
B-Aktin	SE : 5' - CCCC GGACTGAGTATCAATA - 3' AS: 5' - GGCCGCCAACGCAGCCACCG - 3'	60,0°C	23

Tabelle 3.4: Aufzeichnung der Primersequenzen, der Annealingtemperatur und der notwendigen Zyklenzahl der verwendeten Primer.

3.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die in diesem Kapitel beschriebene Methode ist ein wichtiges Verfahren, um die PCR-Produkte sichtbar zu machen. Das Prinzip besteht im Wandern der Nucleinsäuren im elektrischen Strom. Nucleinsäuren sind lineare Makromoleküle, die aus Nucleotiden (Base + Zucker + Phosphat) aufgebaut sind. Unter elektrophoretischen Bedingungen, d.h. bei neutralem pH-Wert, sind die Phosphatgruppen im Rückgrat der beiden Nucleinsäurearten (DNA und RNA) ionisiert und die Polynucleotide liegen als Polyanionen vor. Ihre Beweglichkeiten hängen weitgehend von der Molekülgröße ab. Sie bewegen sich somit im elektrischen Feld von der Kathode zu Anode. Als Ladepuffer wurde 0,5x TBE-Puffer (45 mM Tris-borat, 1mM EDTA, pH= 8,0) benutzt. Um die Nucleinsäuren auftrennen zu können, nutzt man die Widerstandseigenschaft des Gelelektrophoresemediums aus. Zu diesem Zweck wird die Elektrophorese in Gelen durchgeführt. Im Prinzip wirkt die Gelmatrix wie ein Molekularsieb. Da größere Moleküle häufiger mit der undurchlässigen Matrix kollidieren, wandern diese langsamer als kleinere Moleküle. Die Durchlässigkeit der Gelmatrix lässt sich z.B. durch die Konzentration der Agarose variieren. Für die PCR-Produktanalysen (DNA-Fragmente zwischen 50 und 1000bp) wurde ein 2%-iges Agarosegel verwendet. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente hängt nicht nur von der Agarose-Konzentration ab, sondern auch von der Molekülgröße, der Anwesenheit von interkalierenden Farbstoffen (Ethidiumbromid: bindet DNA), der Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers (TBE) und der Spannung (Volt) in der Gelkammer. Die Auftrennung fand in einer

Material und Methoden

Horizontalelektrophoresekammer bei 200V für ca. 20 min statt. Durch gleichzeitiges Mitlaufen eines DNA-Längenmarkers kann die Größe der Fragmente beurteilt werden. Die einfachste Methode zur Visualisierung von Nukleinsäuren ist die Anfärbung mittels Ethidiumbromid (EtBr). Es wurde 0,4 µg/ml bei der Herstellung des Geles eingesetzt. Ethidiumbromid ist aufgrund seiner ausgeprägten Fluoreszenz ein sehr sensitiver Stoff. Er interkaliert zwischen den Basen der Nukleinsäuren. Die fixierte Position des Farbstoffes innerhalb der Nukleinsäuren, und die Nähe zu den Basen führen zu einer Zunahme der Fluoreszenzausbeute. Da die DNA UV- Licht bei einer Wellenlänge von 254nm absorbiert, kann man die sichtbaren Fragmente in einem UV-Transluminator bei einer Belichtungszeit von 1000ms und verschiedenen Blenden (4,0 und 5,6) digitalisieren.

3.3.5 Etablierung der PCR-Bedingungen der unterschiedlichen Primer

Bevor man signifikante Daten mittels PCR erheben kann, ist es notwendig, zunächst die optimale Annealingtemperatur des noch nicht etablierten Primers nachweisen zu können. Die Annealingtemperatur ist diejenige Temperatur, bei der sich der Primer an die cDNA anlagert. Hierzu diente der Gradienten-Thermozykler der Firma Eppendorf. Diese Maschine machte es möglich, dass während einer PCR gleich mehrere Primerannealingtemperaturen ablaufen konnten. Für jeden Primer wurde auf diesem Weg ein Temperaturoptimum zwischen 55,2°C und 65°C ermittelt (s. Abb. 3.3.1).

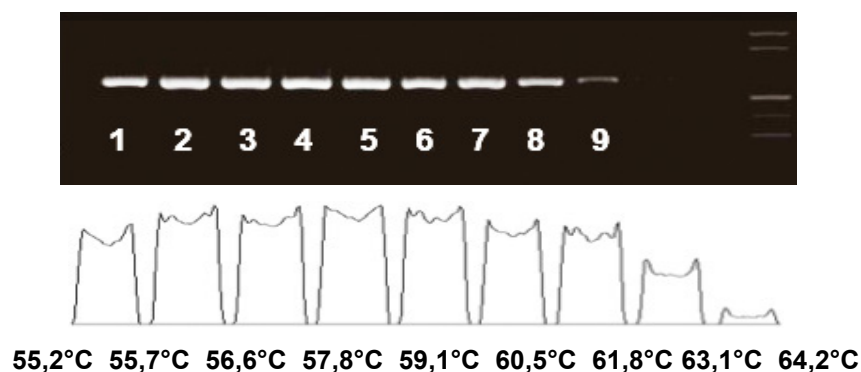


Abb. 3.3.1: Gradienten-PCR von Kollagen Typ I.

Spur 11: Negativkontrolle, Spur 12: DNA-Längenstandart.

Material und Methoden

Bei einem semiquantitativen Vergleich zwischen Proben ist es äußerst wichtig, dass sich die PCR im linear aufsteigenden Teil der DNA-Amplifikationskurve (s. Abb. 3.3.3) und sich nicht im Sättigungsbereich befindet. Um größtmögliche Unterschiede in der Genexpression zeigen zu können, wurde mit jedem Primer eine Sättigungs-PCR durchgeführt, d.h. die Reaktionsansätze und die Versuchsbedingungen waren identisch, nur die Zyklenzahlen waren unterschiedlich.

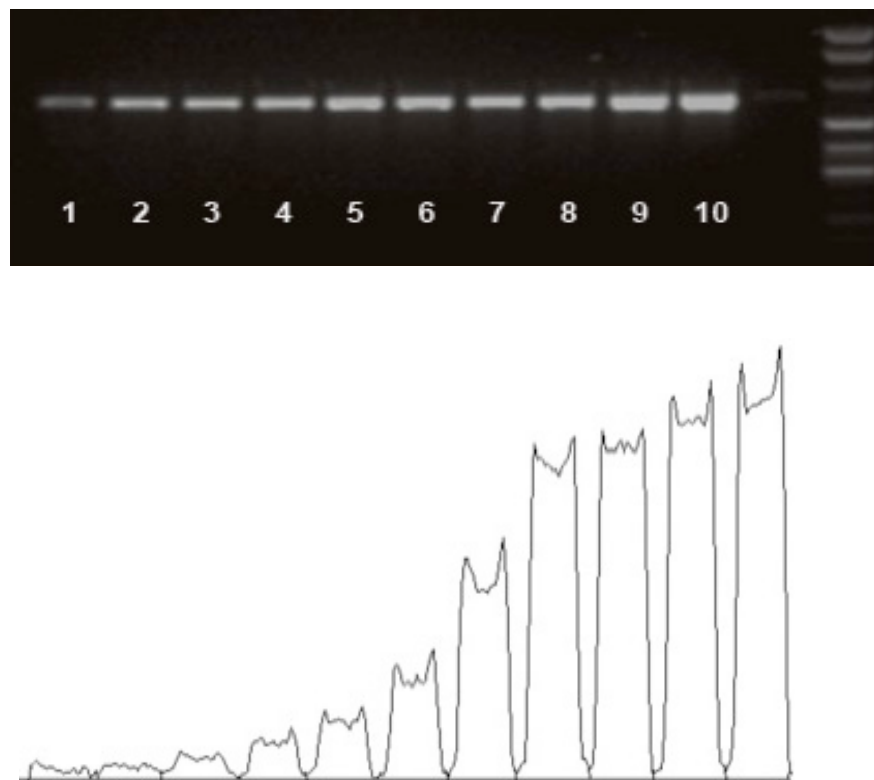


Abb. 3.3.2: Amplifikation von Kollagen Typ I bei verschiedenen Zyklenzahlen.
Ethidium-bromidgefärbtes Agarosegel unter UV-Licht.
Spur 1-10: steigende Zyklenzahlen; H₂O = Negativkontrolle, Marker VIII.

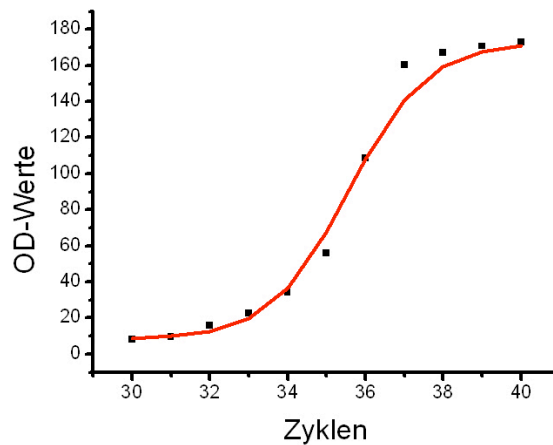


Abb. 3.3.3: Zusammenhang zwischen Zyklenzahl und Grad der Amplifikation.

Der linear aufsteigende Teil der DNA-Amplifikationskurve befindet sich zwischen 34 und 37 Zyklen.

3.3.6 RT-PCR und nested-RT-PCR

Da man einen Nachweis von enteroviraler RNA in den Herzproben durchführen wollte, modifizierte man eine RT-PCR nach Saiki et al. (1988). In der bereits genannten reversen Transkription wurde zunächst anstatt eines Oligo-Primers ein Random-Primer verwendet, um die über diesen Weg erhaltene cDNA, in eine PCR einsetzen zu können. Das Programm des verwendeten Thermozyklers der Firma Eppendorf startete mit einer einmaligen Inkubation der Proben für 7 min bei 95°C. Dieser Schritt war nötig, um die eingesetzte Gold Taq (DNA-Polymerase) zu aktivieren. Das Programm an sich umfasste 30 Zyklen, bei dem jeder einzelne Zyklus immer nach folgendem Schema aufgebaut war: Denaturierung bei 95°C und 45 sec., Annealingtemperatur bei 61°C und 45 sec. und DNA-Synthese bei 72°C für 45 sec.. Sobald alle 30 Zyklen durchlaufen waren, wurde das Programm von einer Inkubationszeit von 10 min bei 72°C zu Ende gebracht. Das gesamte Reaktionsvolumen setzte sich aus 10µl der 1:5 verdünnten cDNA und aus 10µl PCR-Mix (2µl 10x PCR-Puffer, 1,2µl 25mM MgCl₂, je 0,8µl 10µM 5' bzw. 3' CVB3-Primer, 0,4µl 10mM dNTPs, 0,1µl 5U/µl Gold-Taq und 4,7µl aqua dest.) zusammen. Zur Kontaminationskontrolle wurden 6 Wasserproben (Negativkontrollen) und zwei Positivkontrollen, die aus klonierten cDNA-Proben von CVB3 (PCV B3-Typ,

Material und Methoden

73,5ng/ μ l) bestanden, mitgeföhrt. Von den entstandenen Produkten der ersten PCR entnahm man 2 μ l, um sie mit 98 μ l TE-Puffer (1000mM Tris-Base, 10 mm EDTA, pH 7,4) zu verdünnen. Aus dieser Verdünnung wurden 4 μ l für die nested-PCR pipettiert, die mit einem Reaktionsmix von 16 μ l (2 μ l 10x Puffer, 1,2 μ l 25mM MgCl₂, je 0,8 μ l 10 μ M 5' bzw. 3' CVB3-Primer, 0,4 μ l 10mM dNTPs, 0,1 μ l 5U/ μ l Gold-Taq u. 10,7 μ l aqua bidest.) kombiniert wurden. In dieser PCR wurden alle Negativ- u. Positivkontrollen und alle Proben aus der primären PCR übernommen sowie vier für die nested-PCR spezifische Wasserproben. Die Zyklen dieser PCR waren mit dem oben erläuterten Programm bis auf die Annealingtemperatur von 57°C identisch. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über ein 2%-iges Agarosegel.

3.3.7 Semiquantitative RT-PCR

Wie bereits in Kapitel 3.2.1.3 erwähnt, wurde durch die reverse Transkriptase mit einem Oligo- (dt)₁₅- Primer cDNA hergestellt, die nun auf die Transkripte von Kollagen I, Kollagen III, Kollagen IV, MMP-2, MMP-3, MMP-8, TNF-a, INF-g, TIMP-1, IL-1 β , IL-6, IL-10 und β -Aktin untersucht wurden.

Für jede PCR setzte man 1 μ l cDNA ein, die in 31,9 μ l Wasser gelöst wurden. Der Mix für eine semiquantitative PCR bestand für jeden Primer aus einem Gesamtvolumen von 12,1 μ l (4,5 μ l 10xPuffer, 2,0 μ l 50mM dNTPs, 1,8 μ l 25mM MgCl₂, je 1,8 μ l 50ng/ μ l 5' u. 3' Primer und 0,5 μ l Biotherm –Taq- Polymerase (2,5 U)). Jeder verwendete Primer hatte die gleiche Versuchsbedingung sowie das gleiche PCR-Programm, aber immer die eigene etablierte Zyklenzahl und Annealingtemperatur.

PCR-Programm:

1. Schritt:	5min; 94°C	Denaturierung
2. Schritt:	30sec; 94°C	“
3. Schritt:	30sec; primerabhängig	Primeranlagerung
4. Schritt:	35sec; 72°C	DNA-Synthese
5. Schritt:	10min; 72°C	“
6. Schritt:	4°C	Reaktionsstopp

Material und Methoden

Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle aus Reaktionsansatz und Wasser mitgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden in einem 2%-igem Agarosegel im UV-Licht digitalisiert und mit Hilfe des Scion-Image-Programmes (© 2000 Scion Corporation) ausgewertet, indem die Stärke der Signale in OD-Werte transformiert wurden (s. Abb. 3.3.4). Um die Reproduzierbarkeit zu bestätigen, wurden die PCR mehrmals durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Die Ergebnisse aller Primer wurden an der β -Aktin-PCR abgeglichen, da β -Aktin stark exprimiert, aber während einer Infektion nicht reguliert wird.

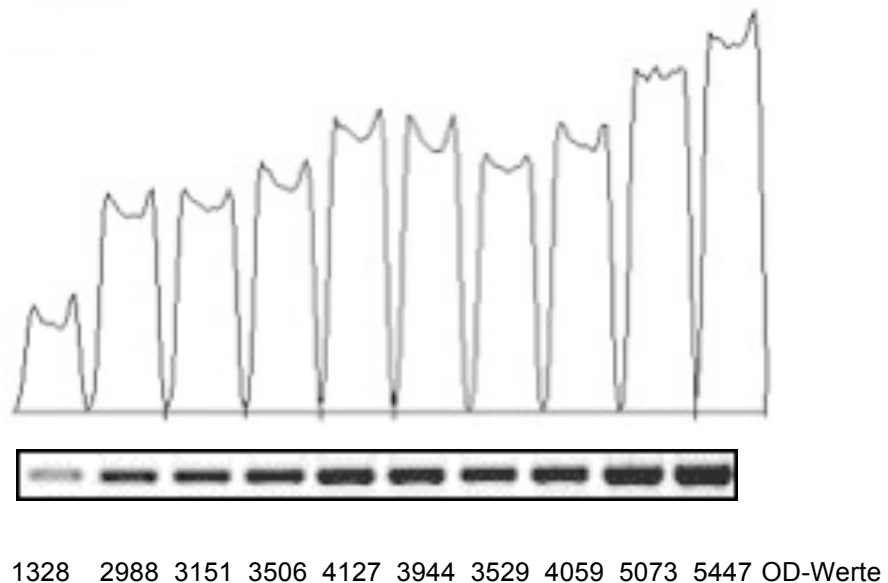


Abb. 3.3.4: Auswertung einer PCR für Kollagen Typ I mit dem Scion-Image-Programm.

3.3.8 Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die Aussagen der PCRs zu verifizieren, wurde von jedem Produkt mit dazugehörigem Primer eine Sequenzierung von der Firma SeqLab durchgeführt und die Ergebnisse mit den Literaturangaben verglichen.

3.4 Histomorphologische Analyse der extrazellulären Matrix

3.4.1 Einbettvorgang des Gewebes

Die Gewebestücke wurden nach der Präparation direkt in Formalin eingelegt, damit bis zur Einbettung keine Autolyse des Gewebes stattfinden konnte. Die maschinelle Einbettung erfolgte anhand des Einbettautomaten der Firma Shandon. Zu Beginn wurden die zuvor in Formalin aufbewahrten Gewebestücke durch mindestens halbstündiges Bewässern von Formalin befreit. Danach folgte eine aufsteigende alkoholische Reihe zur Entwässerung. Dieser Vorgang unterteilte sich in die Schritte 70% Alkohol für 1 Stunde, 80% Alkohol für 2 Stunden, 95% Alkohol I für 4 Stunden, 95% Alkohol II für ebenfalls 4 Stunden, absoluter Alkohol I für 4 Stunden und nochmals absoluter Alkohol II für ebenso 4 Stunden. Anschließend wurde der Alkohol von dem Gewebe durch Einbringen eines Intermediums entfernt, indem man zunächst die Gewebestücke für 30 Minuten in ein 1:2-Gemisch von absolutem Alkohol und dem Intermedium (Rotihistol) gab. Es folgten dann zwei Schritte: Intermedium I für eine halbe Stunde und Intermedium II ebenso. Als letzter Vorgang wurden die Proben bei 60°C in Paraffin für 30 Minuten und dann in Paraffin für 2 Stunden gegeben.

3.4.2 Ausgießvorgang und Anfertigung der Paraffinschnitte

Zunächst wurde das Paraffin in der teilautomatisierten Ausgießstation in einer Paraffinwanne mit Leitungssystem bei 60°C verflüssigt, damit entstehende Gasblasen in der Vorbereitungszeit entweichen konnten. Der erste Schritt bestand darin, flüssiges Paraffin in einen speziellen Ausgießrahmen zu geben, so dass gerade der Boden der Form bedeckt war. Dann legte man das gewünschte Gewebestück in diese Form mit Paraffin und kühlte sie kurz auf einer Kälteplatte, bis die niedrige Schicht Paraffin weißlich erschien. Durch das Auskühlen des Paraffins wurde das Gewebestück in dem Ausgießrahmen fixiert und konnte somit bei der weiteren Behandlung nicht mehr verrutschen. Die Kassette, in der das präparierte Gewebe aufbewahrt wurde, diente nun als Unterlage für den Paraffinblock. Man legte diese in den Ausgießrahmen über das Gewebe und füllte sie ebenfalls mit flüssigem Paraffin aus. Beide Paraffinschichten (Gewebe und Kassette) hafteten aneinander und bildeten nach dem Auskühlen, d.h.

Material und Methoden

nach dem Erhärten, eine Einheit. Die fertiggestellten Paraffinblöcke wurden am Rotationsmikrotom in eine Dicke von 5 µm geschnitten. Auf einem Objektträger wurden 3-5 Schnitte gebracht, indem man Serienschnitte anfertigte. Danach inkubierte man die Objektträger mit den Schnitten für 15 min bei 56°C im Trockenschrank. Dieses Verfahren ermöglichte ein gutes Antrocknen der Schnitte und verminderte die Gefahr, dass sich die Schnitte beim Färben ablösen.

3.5 Sirius red-Färbung

3.5.1 Allgemein

Der Farbstoff Sirius red bindet unter den Voraussetzungen, dass er in gesättigter Pikrinsäure gelöst wurde und ein pH-Wert von 2.0 vorliegt, stark selektiv an fibrilläre Strukturen des Kollagens, vor allem an den Subtypen I, II und III (Junqueira et al. 1979 und 1978). Die natürliche Doppelbrechung des Kollagens wird durch den Farbstoff verstärkt, indem sich ein Farbstoffmolekül über durchschnittlich 4 Azomoleküle an das Kollagen binden kann. Es bleibt jedoch unwahrscheinlich, dass solch große Moleküle wie die Sirius red-Moleküle alle Bindungsplätze erreichen (Putschler et al. 1988). Da sich die Färbung besonders für feine Fibrillen eignet (Malkusch et al. 1995) und qualitative Untersuchungen des Myokards (Why et al. 1994) ermöglicht, hat sich die Färbung zu einer weit verbreiteten Methode etabliert. Viele Arbeiten mit morphologischen Analysen bestätigten die Effizienz von Sirius red bei quantitativen Bestimmungen des Kollagengehaltes im Myokard (Chello et al. 1996; Coats et al. 1997). Neben der spezifischen Färbeeigenschaft und der einfachen Durchführbarkeit, macht die Möglichkeit der Antikörper-unabhängigen Aussage über den Gesamtkollagengehalt die Methode zusätzlich interessant.

3.5.2 Herstellung der Färbelösung

Es wurden 12g gesättigte Pikrinsäure in 1000ml Aqua dest. unter starkem Rühren aufgelöst und auf pH 2,0 adjustiert. Zu dieser Lösung gab man dann 1,0 g des Sirius red-Farbstoffes (spezifisch für Kollagen I, Kollagen II und Kollagen III) und löste alles

Material und Methoden

1,5 Stunde lang. Als abschließenden Schritt sättigte man die Lösung, indem man eine Spatelspitze Pikrinsäure dazugab, so dass Bodenkristalle ausfielen.

3.5.3 Ablauf der Färbung

Zur Entparaffinierung vor dem Färbevorgang wurden die paraffinierten Schnitte in einem Xylolbad (100%) für 10 Minuten gebadet und anschließend nochmals für 10 Minuten in frischem Xylol (100%) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach schloß sich eine absteigende Alkoholreihe an, die zur Gewöhnung der Schnitte an das wässrige Milieu des Farbstoffes diente. Die alkoholische Reihe setzte sich aus den Schritten absolutes, 90%, 70%, 30% Ethanol und Aqua bidest. zusammen, wobei die Objektträger für 1-2 Minuten in jeder Lösung geschwenkt wurden, bis sie schlierenfrei waren. Danach wurden die Objektträger in der Sirius-Red-Lösung auf dem Schüttler 60 Minuten lang gefärbt. Um die unspezifisch gebundenen Farbpartikel von den Schnitten entfernen zu können, überführte man sie in 0,01%ige Salzlösung (pH 2,0). Nach diesem Schritt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden alkoholischen Reihe (90% und 100%) dehydriert und über einen 5 minütigen Xylolschritt (100%) wieder vom Ethanol gesäubert. Als letzte Maßnahme wurden die Schnitte mit Corbit-Balsam eingedeckt.

3.5.4 Morphometrische Analyse

Die Analysen der gefärbten Schnitte wurden anhand eines Mikroskopes der Firma Leica des Typs DM RBE durchgeführt. Für jedes Gewebestück wurden 10 Gesichtsfelder mit einem 10er Objektiv, d.h. in 100facher Vergrößerung ausgewertet. Von den Analysen wurden endokardiale Strukturen, Gefäße und große bindegewebige Plaques ausgeschlossen. Mechanisch durch das Schneiden bedingte Artefakte wurden folglich nicht untersucht. Das durch die Kamera aufgenommene Bild wurde einem Bildanalysesystem der Firma Nikon zugeführt. Das halbautomatische Analysesystem Lucia G arbeitet auf einem Pentium® 90 Rechner unter dem Betriebssystem Windows 98 mit einer Auflösung von 800 x 600 Pixel. Die Bildgröße unter Lucia G beträgt 752 x 724 Pixel. Beide Teile des Analysesystems (Mikroskop und Computer) wurden vor

Material und Methoden

jedem Messen eingestellt, um für jede Objektträgerreihe die gleichen Ausgangskriterien herzustellen. Bei Messungen der Sirius red-Färbung wurden die optimalen Belichtungseinstellungen gewählt und konstant belassen. Das Analysesystem Lucia G arbeitet mit definierten Farbwerten nach dem System der subtraktiven Farbmischung. Eine Farbe, die vom System erkannt werden soll muss über die drei Grundfarben Rot, Grün und Blau definiert werden. Die möglichen Farbwerte, aus denen sich die einzelnen Farben zusammensetzen, sind bei der Firma Nikon über Farbtabelle zu erfahren und haben eine Spanne von 0 bis 256 für Rot, Grün und Blau. Die Farbe Schwarz wird in diesem System bei einem Farbwert von 0 für alle drei Farben erkannt; die Farbe Weiß bei einem Farbwert von 256. Des Weiteren ist es möglich, mehrere Farben zu erkennen, indem minimale Werte und maximale Werte für die drei Farben definiert werden. So können definitionsgemäß bei einem Wert von 0 für den minimalen Farbwert und bei einem Wert von 256 für den maximalen Farbwert für alle drei Grundfarben alle überhaupt möglichen Farben erkannt werden. Außerdem wird durch die Vorgabe einer Toleranzspanne in dem Programm noch eingestellt, wie exakt die Ermittlung der Farbwerte sein soll. Die Farbwerte für die einzelnen angefärbten Strukturen welche das Kollagen darstellen, mussten definiert werden. Damit nicht bei jedem Schnitt neue Farbwerte definiert werden mussten, wurde eine Arbeitsroutine, ein sogenanntes Makro, erstellt, das es ermöglichte, in jeder Biopsie genau die gleichen Strukturen zu erkennen. Die Auswertung der Sirius red-Färbung erfolgt im zirkular polarisierten Licht, da nur das Kollagen bei dieser Färbung das Licht polarisiert, die restlichen myokardialen Strukturen dagegen nicht. Somit entspricht die Messung der optisch aktiven Strukturen im zirkular polarisierten Licht dem Gesamtkollagengehalt.

3.5.5 Auswertung der Sirius red-Färbung

Zu Beginn jeder Messung wurde als erster Schritt in Makro der Messrahmen definiert. Zur Auswertung der mit Sirius red gefärbten Schnitte wurde eine modifizierte Methode nach P. Whittaker angewandt (Whittaker et al. 1994). Zunächst wurde ein farbiges, geschärftes Bild aufgenommen und nachdem der Flächeninhalt der rot gefärbten Strukturen (dickstes Kollagen) gemessen wurde, abgespeichert. Anschließend wurde ein geschärftes Monochrombild aufgenommen, bei dem sich das Kollagen aufgrund seiner polarisierenden Eigenschaft hell und das übrige Gewebe dunkel darstellt. Des

Material und Methoden

Weiteren wurde ein geschärftes Hellfeldbild von demselben Gewebeausschnitt aufgenommen, bei dem sich das Kollagen jetzt dunkel und das umgebende Gewebe hell darstellen. Beide Bilder wurden so voneinander subtrahiert, dass in dem resultierenden Bild alle polarisierenden Strukturen einen Farbwert größer Null hatten. Andere, das Licht nicht polarisierende Strukturen stellten sich schwarz (Farbwert = 0) dar. Von den Strukturen mit einem Farbwert größer als Null wurde der Flächeninhalt ermittelt und mit dem Flächenanteil der rot gefärbten Strukturen über eine Maskenoperation addiert. Dieser resultierende Wert stellt den gemessenen Kollagenanteil am Gesamtgewebeausschnitt dar. Außerdem wurde das Hellfeldbild mit einem für alle Auswertungen gleichen Hintergrundbild so verrechnet, dass alle gewebefreien Räume (Lücken) den Farbwert = 0 (schwarz) hatten. Die Gewebestrukturen, die einen Farbwert größer als Null hatten, wurden gleich 100% Gewebe gesetzt. Alle gemessenen Kollagenanteile wurden auf diese 100% bezogen und als anteilige Prozentwerte berechnet. Die Formel für die Berechnung lautet:

$$\text{Kollagen} = \frac{\text{Flächeninhalt des Kollagenanteils im Gesamtgewebeausschnitt}}{\text{Gewebebefläche ohne Gewebelücken}} \times 100(\%)$$

Somit gelingt es aufgrund der Doppelbrechung von Kollagen den prozentualen Flächenanteil bezogen auf den Gesamtgewebeschnitt zu ermitteln. Die entstehenden Farben dagegen geben die Dicke des Kollagens an. Diese erfolgt mit Hilfe eines weiteren Makro, welches die einzelnen Farbsubtypen, wie z.B. Rot-, Grün- und Gelbanteil, prozentual am Gesamtkollagengehalt bestimmt. Die Messung erfolgte über eine Ermittlung der einzelnen Farbpunkte unter vorheriger Festlegung der Schwellenwerte für die jeweilige Farbe.

3.6 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der beobachteten Ergebnisse erfolgte mit dem graphischen Mittel des einfachen Säulendiagramms. Der Abstand zwischen Achse und Datenpunkt wird mit einer senkrecht auf der x-Achse stehenden rechteckigen Fläche dargestellt. Die im Text angegebenen Mittelwerte wurden als Quotient aus der Summe der Beobachtungen

Material und Methoden

durch die Anzahl der Beobachtungen berechnet und zusammen mit der Standardabweichung als Maß für die Beurteilung der Streuung der Werte angegeben. Die Standardabweichung ließ sich aus der Wurzel des Quotienten der Summe der Fehlerquadrate dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen bestimmen. Für die statistische Analyse der Daten wurden nichtparametrische Tests verwendet, da zum einen die Stichprobenumfänge nicht gleich waren und zum anderen Tests auf Normalverteilung der Fehlerkomponenten und Tests auf Homogenität der Fehlervarianzen bei Gruppengrößen <10 nicht sinnvoll zu berechnen sind. Mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis wurde geprüft, ob die 6 Stichproben aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen, wobei sich diese Verschiedenheit auf die Lageparameter (Mittelwerte) bezieht. Dabei wurde jede Variable (MMP-2, MMP-3, Herzfrequenz usw.) darauf getestet, ob die einzelnen Versuchsgruppen (1.1, 1.2, 2.3 usw.) insgesamt signifikant voneinander differieren. Bei $p < 0,05$ konnte die Nullhypothese, Gleichheit zwischen den beobachteten Gruppen für eine Variable, verworfen werden. Zeigte der H-Test eine signifikante Varianz zwischen den Versuchsgruppen, wurden Einzelvergleiche zur Prüfung signifikanter Zusammenhänge zwischen zwei unabhängigen Stichprobenverteilungen (Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen) mit Hilfe des U-Tests nach Mann-Whitney durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt. Bivariate Korrelationen wurden unter der Annahme eines einseitigen Signifikanzniveaus nach Pearson aufgeführt.

3.7 Eingesetzte Arbeitsmittel

Die in den folgenden Listen enthaltenden Chemikalien, Verbrauchsartikel und technischen Geräte wurden bei der Durchführung der Versuche eingesetzt.

Arbeitsgerät	Bezeichnung	Bezug
250°C Ofen		Heraeus
Autoklaviergerät		Hartmann
Betriebssystem	Windows2000 Professional	Microsoft

Material und Methoden

Computer	Pentium III	Asus
Digitaler Grafikdrucker	Digital Graphic Printer UP-D890	Biometra
Eismaschine	AF-10	Scotsman
Elektronische Waage	DMS 580	Kern
Elektrophoresekammer	Mini-Protean® 3 Cell	Bio-Rad
Gellaufkammer		Biometra
Gelschlitten		UKBF
Homogenisiergerät	Pellet Pestle Motor	Sigma
Kühlschrank -20°C	Economic super	Bosch
Kühlschrank -20°C/4°C	Electronic (ISH)	Bosch
Kühlschrank 4°C	Cooler	Bosch
Kühlschrank -80°C	-85°C Ultralow Freezer	Nuaire
Kühlschrank -80°C	(ISH)	GFL
Magnetrühr- und Erwärmungsplatte	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik
Mikrowelle	Microwave 800	Severin
Netzgerät	Standard Power Pack P25	Biometra
PCR-Maschine	Mastercycler gradient	Eppendorf
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick
Photometer	Spectrophotometer DU 640i	Beckman
Pipetten	Reference	Eppendorf
Präzisionswaage		Sartorius
Schüttler	Swip	Edmund Bühler
Schüttler	3015 (ISH)	GFL
SPSS 11.0	Statistical Package for the Social Sciences	ZEDTA, Hochschulrechen- zentrum der Freien Universität Berlin
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Superspeed RC-2B	Sorval
UV-Transilluminator	Bio Doc Analyse System	Biometra
Vortexgerät	VF 2	IKA-Labortechnik

Material und Methoden

Zentrifuge	Megafuge 1.OR	Heraeus
Zentrifuge	Biofuge 13R (ISH)	Heraeus

Tabelle 3.7.1: Verwendete Arbeitsgeräte.

Verbrauchsartikel	Bezeichnung/Besonderheiten	Bezug
0,2 ml Reaktionsgefäße		Biozym
0,5 ml Reaktionsgefäße	RNAse-frei	Eppendorf
0,5 ml Reaktionsgefäße	Safe-Lock	
1,5 ml Reaktionsgefäße	RNAse-frei	Eppendorf
1,5 ml Reaktionsgefäße	Safe-Lock	
15 ml Reaktionsgefäße	Falcon tubes	Sarstedt
50 ml Reaktionsgefäße	Falcon tubes	Sarstedt
Einmalhandschuhe		Ansell Medical
Homogenisierstäbe	Pellet Pestles	Sigma
Photopapier	K 65 HM-CE	Mitsubishi
Pipettenspitzen 10,100,1000µl	Unsteril	Eppendorf
Pipettenspitzen 10,100,1000µl	mit Filtertipp, RNAse-frei	Biozym Diagnostik
Zentrifugationsgefäße	Polypropylen Oak Ridge Bottle	Sorval

Tabelle 3.7.2: Verwendete Verbrauchsartikel.

Abkürzung/ Formel/ Name	Erläuterung/ vollständiger Name	Bezug
Aceton	pro analysi	Merck
Agarose	SeaKem LE Agarose	BioWhittaker Molecular Applications
Aqua bidest.	Aqua Spüllösung	Delta Pharma

Material und Methoden

Borsäure	für die Molekularbiologie	Merck
Bromphenolblau		Sigma
Chloroform		Merck
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Sigma
DEPC-treated water	RNase- freies Wasser	Ambion
DNase I	RNase-frei	Roche
dNTP Set	dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Amersham
EDTA	Ethylenediaminetetracetic acid	Ambion
EDTA als Dihydrat	Ethylenediaminetetracetic acid	Merck
Ethanol absolut	pro analysi	Merck
Ethidiumbromid		Merck
Glycogen	In RNase freiem Wasser	Invitrogen
Isopropanol	= 2-Propanol	Merck
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	Ambion
Marker VIII	DNA-Längenstandard	Roche
Methanol		J.T.Baker
Nuclease free Water	Not DEPC treated	Ambion
Primer	siehe Tabelle 2.4	Tib Molbiol
Reverse Transcription System	inkl.: AMV Reverse Transkriptase, RNAsin, Oligo(dT)15 Primer, 10mM dNTP`s, Reaktionspuffer, 25mM MgCl ₂ , Random Primer	Promega
RNase Zap	zur RNase Neutralisierung	Ambion
RNAsin	RNase-Inhibitor	Promega
Saccharose		Sigma
Taq	DNA Polymerase	Amersham
Trichloressigsäure		Merck
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-	Ambion

Material und Methoden

	aminomethanhydrochlorid	
TRISMA Hydrochlorid TRISMA Base	beide zur Herstellung von Tris pH 7,5 (ISH)	Sigma
Trizol LS Reagent	zur Gewebeextraktion	Gibco BRL

Tabelle 3.7.3: Verwendete Reagenzien.

Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1 Krankheitssymptome der Versuchstiere

Die Kontrolltiere zeigten während des gesamten Versuchsablaufes keine Veränderungen ihres Trink- und Fressverhaltens, ihrer physischen Erscheinung oder ihrer Bewegungsstruktur. Untersuchte man die infizierten Tiere im Verlauf, so konnte man festhalten, dass diese Mäuse trotz CVB3-Infektion in den ersten Tagen, als kaum auffällig erschienen. Dies bedeutet, dass sich während der akuten Phase weder Trink- und Fressverhalten, noch die Struktur des Felles oder das Bewegungsmuster der Mäuse geändert hatte. Ab dem 8.Tag traten dann die ersten leichten Krankheitssymptome auf. Zunächst wurde die beginnende Veränderung des Felles deutlich, indem es seinen Glanz und seine Glätte verlor. Das Fell erschien jetzt eher struppig und matt. Im späteren Verlauf (ab dem ca. 14.Tag p.i.) konnte man ein eher verlangsamtes Bewegungsmuster beobachten. Im Rahmen des Versuchsablaufes zeichnete sich eine leichte Gewichts- und Größenzunahme bei gering eingeschränkter Bewegung und Nahrungsaufnahme ab. Keine der Mäuse verstarb an der doch eher leichten Krankheitssymptomatik innerhalb der 28 Tage.

4.2 Körper- und Herzgewichte der Versuchstiere

Zur weiteren Charakterisierung der Versuchstiere und zur Beschreibung der Effekte der CVB3-Infektion wurden die Werte für das jeweilige Gewicht der Maus und deren Herz erhoben (siehe Abb. 4.2.1 und 4.2.2).

Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab sowohl für das Mausgewicht als auch für das Herzgewicht, dass beide Wertegruppen aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen (für beide Parameter $p < 0,05$). Daher konnte eine signifikante Varianz zwischen den 6 Versuchsgruppen für diese beiden Parameter angenommen und Einzelvergleiche vorgenommen werden.

Ergebnisse

4.2.1 Darstellung der Mausgewichte

Die Mausgewichte zwischen Kontrollgruppe und infizierter Gruppe des 4. Tages p.i. zeigten keine signifikanten Veränderungen. Eine signifikante Reduktion ($p < 0,00$) der Körpergewichte stellte sich von Kontrollgruppe K7 ($20,4 \pm 1,9$) zur infizierten Gruppe I7 ($17,0 \pm 1,6$) ein. Zum spätesten Zeitpunkt der Infektion konnten keine signifikanten Veränderungen aufgezeigt werden. Innerhalb der Gruppe der infizierten Mäuse war das Körpergewicht am 28. Tag p.i. (I28 $20,6 \pm 1,71$) im Vergleich zu Tag 4 p.i. und Tag 7 p.i. signifikant ($p < 0,001$) angestiegen (I4 $17,6 \pm 1,51$).

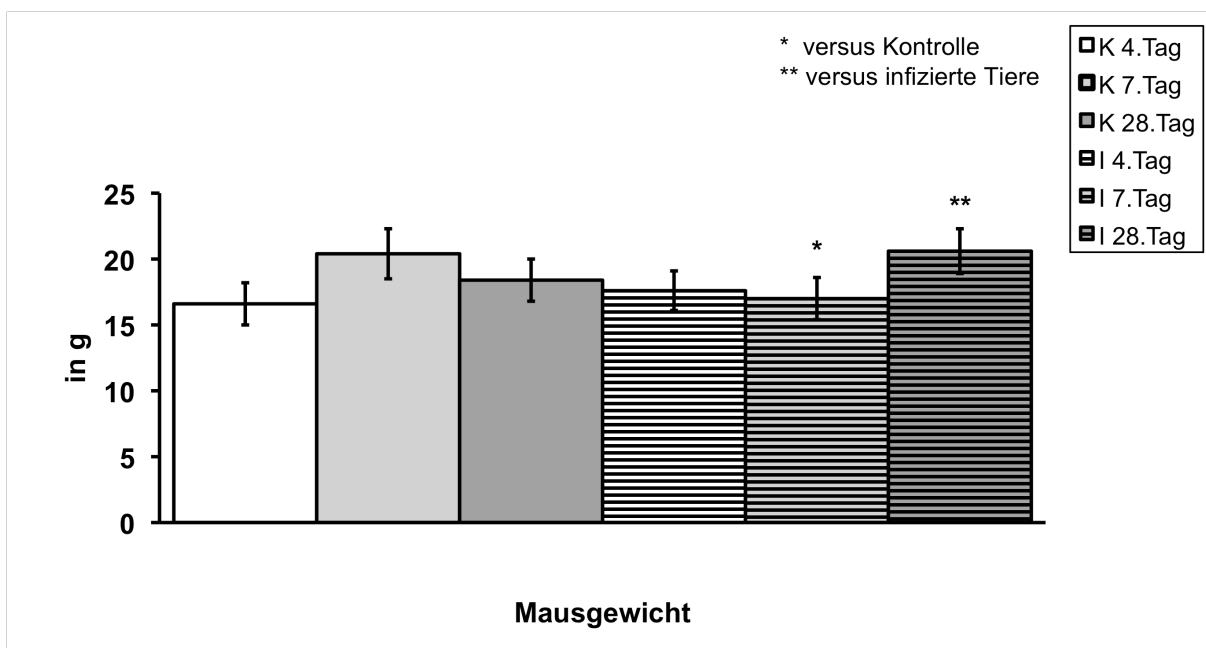


Abb. 4.2.1: Darstellung der Mausgewichte in g der verschiedenen Versuchsgruppen.

4.2.2 Darstellung der Herzgewichte

Innerhalb der Versuchsgruppen K4 und I4 konnte keine signifikante Veränderung dargestellt werden. Das Herzgewicht der infizierten Tiere am 7. Tag p.i. (I7 $89,9 \pm 4,01$) reduzierte sich signifikant ($p = 0,001$) zur Kontrollgruppe (K7 $96,8 \pm 3,3$) und stieg erneut am 28. Tag p.i. signifikant ($p < 0,003$) an (K28 $88,62 \pm 8,09$, I28 $99,57 \pm 6,94$). Das Herzgewicht der infizierten Gruppe am 28.Tag p.i. verzeichnete im Vergleich zum Herzgewicht der Tiere während der akuten Phase der Infektion I4 ($85,7 \pm 6,36$) und I7 einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$), ebenso I7 zu I4.

Ergebnisse

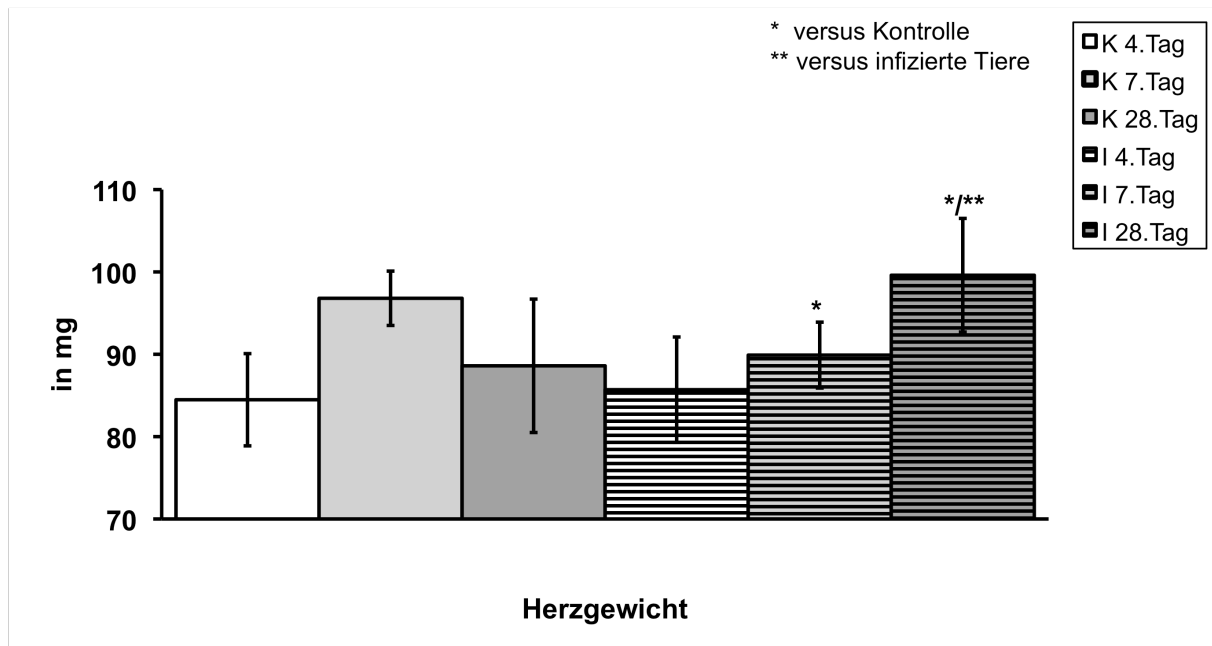


Abb. 4.2.2: Darstellung der Herzgewichte in mg der verschiedenen Versuchsgruppen.

4.3 Ergebnisse der hämodynamisch erhobenen Parameter

Für alle erhobenen Parameter der intrakardialen Druckmessung ergab der H-Test, dass die Wertegruppen aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen (für LVESP, LVEDP, LVESV, LVEDV, SV, EF, HF, dP/dt-max, dP/dt-min $p < 0,05$). Folglich konnte eine signifikante Varianz zwischen den 6 Versuchsgruppen für diese Parameter angenommen und Einzelvergleiche durchgeführt werden.

Ergebnisse

4.3.1 Herzfrequenz (HF)

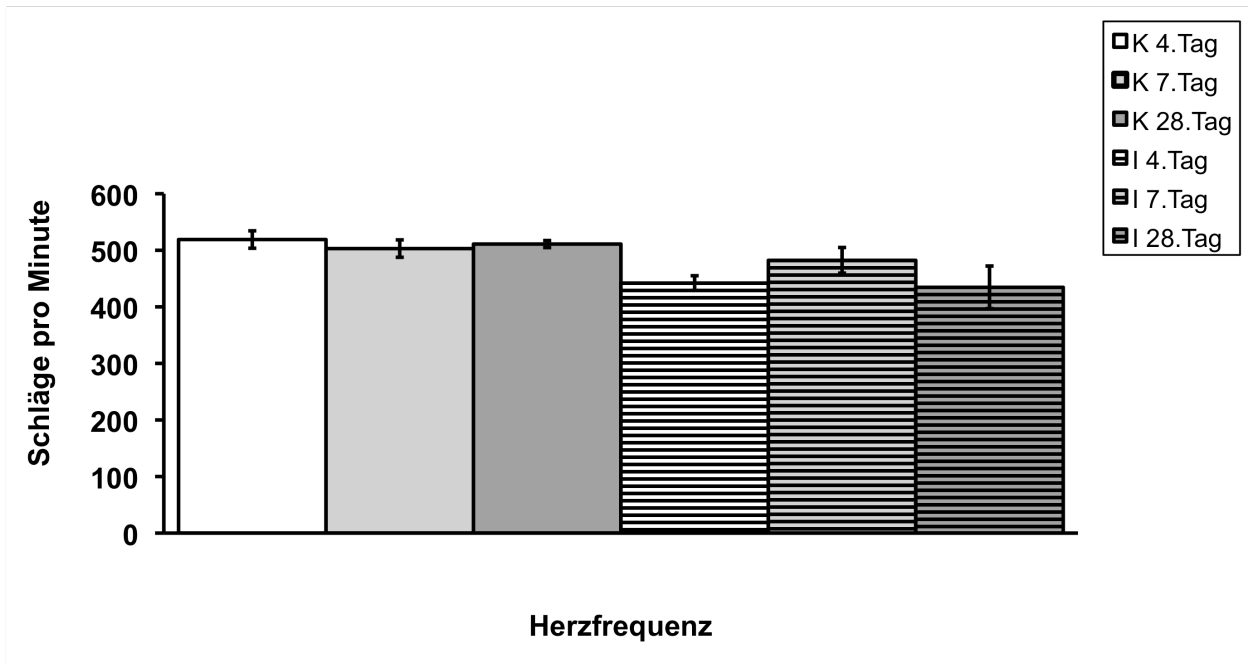


Abb. 4.3.1: Darstellung der Herzfrequenz der verschiedenen Versuchsgruppen in Schlägen pro Minute.

Bezüglich der Herzfrequenz der Mäuse konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Es stellte sich dennoch ein geringer Trend einer Herzfrequenzabnahme jeweils zwischen den Gruppen der Kontrolltiere u. der infizierten Tieren am 4. und am 28. Tag dar (K4 519±15,4; K7 503±22,4; K28 511±6,24; I4 442±13; I7 482,23± 22,71; I28 434,48±37,68).

4.3.2 Endsystolischer linksventrikulärer Druck (LVESP)

Die linksventrikuläre Wandspannung in der systolischen Phase der Herzaktion wurde als linksventrikulärer endsystolischer Druck (LVESP) als Maß für die Nachlast des Herzens ermittelt (siehe Abb. 4.3.2).

Der LVESP der Versuchsgruppe I28 (65,1±4,04) zeigte im Vergleich zur Gruppe K28 (85,07±2,19) eine signifikante ($p < 0,001$) Abnahme, wohingegen die Gruppen K4 (82,4±3,56) zu I4 (92,45±4,47) und K7 (79,62±4,45) zu I7 (73,57±2,46) keine signifikante Veränderungen aufwiesen. In der infizierten Gruppe der Tiere sank der LVESP signifikant von I4 zu I7 ($p < 0,004$) und von I4 zu I28 ($p < 0,001$) ab.

Ergebnisse

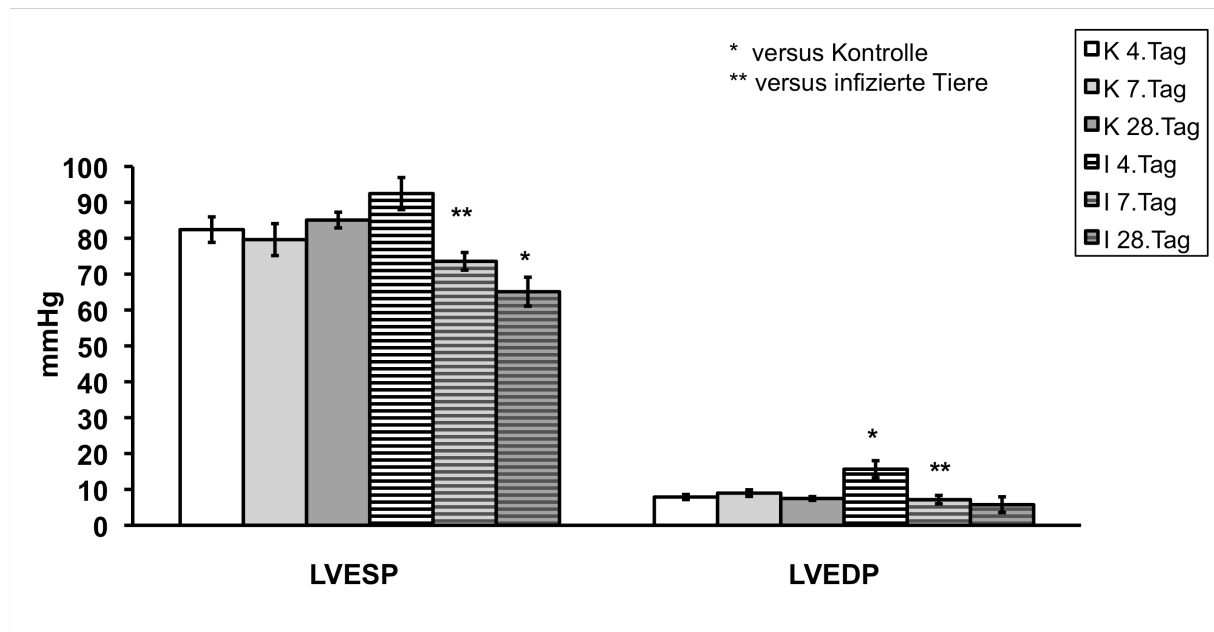


Abb. 4.3.2: Darstellung des linksventrikulären endsystolischen Drucks (LVESP) sowie des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) in mmHg der verschiedenen Versuchsgruppen.

4.3.3 Enddiastolischer linksventrikulärer Druck (LVEDP)

Der linksventrikuläre Druck während der Endphase der Wandentspannung in der Diastole der Herzaktion wurde als linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP), als Maß für die Vorlast des Herzens ermittelt (siehe Abb. 4.3.2).

Der linksventrikuläre diastolische Druck der CVB-3-infizierten Mäuse stieg am 4.Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe (K4 $7,88 \pm 0,71$; I4 $15,64 \pm 2,37$) signifikant ($p < 0,05$) an. Des Weiteren wurde eine signifikante Verringerung des enddiastolischen Druckes zwischen den infizierten Gruppen I4 und I7 ($7,16 \pm 1,18$; $p < 0,05$) sowie zwischen den Gruppen I4 und I28 ($5,75 \pm 2,19$; $p < 0,05$) dokumentiert.

4.3.4 Linksventrikuläre Kontraktilität (dP/dt-max) und linksventrikuläre Relaxation (dP/dt-min)

Die Kontraktilität des linksventrikulären Myokards wurde als Verhältnis des Druckanstiegs zur Zeit (dP/dt-max) bestimmt (siehe Abb. 4.3.3). Die diastolische

Ergebnisse

Compliance des linken Ventrikels ($dP/dt\text{-min}$) wurde durch die Kraft und Geschwindigkeit der Entspannung der Muskelfasern des linken Ventrikels bestimmt. Man betrachtet hierbei das Verhältnis des negativen Druckanstiegs zu der Zeit (siehe Abb. 4.3.3).

Die linksventrikuläre Kontraktilität der Versuchsgruppe I28 ($6637,07 \pm 744,63$) sank signifikant ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe am 28. Tag (8602 ± 374) ab. Zwischen den infizierten Mäusen und den Kontrolltieren wurde am 4. und 7. Tag tendenziell eine Reduktion von $dP/dt\text{-max}$ der infizierten Tiere nachgewiesen. Die Veränderung von $dP/dt\text{-max}$ war hier jedoch nicht signifikant (K7 7943 ± 829 ; I7 $6713,3 \pm 1037$; K4 9084 ± 817 ; I4 $7127,23 \pm 424$).

Die linksventrikuläre Relaxation der Versuchsgruppe I28 ($-4879 \pm 600,49$) verringerte sich signifikant ($p < 0,005$) zur Gruppe K28 (-7432 ± 266). Zwischen den Tiergruppen am 4. Tag konnten keine Unterschiede dargestellt werden. Am 7. Untersuchungstag wurde eine leichte Zunahme ohne Signifikanz von $dP/dt\text{-min}$ der infizierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen (K7 -5169 ± 422 ; I7 $-6491,49 \pm 748,71$).

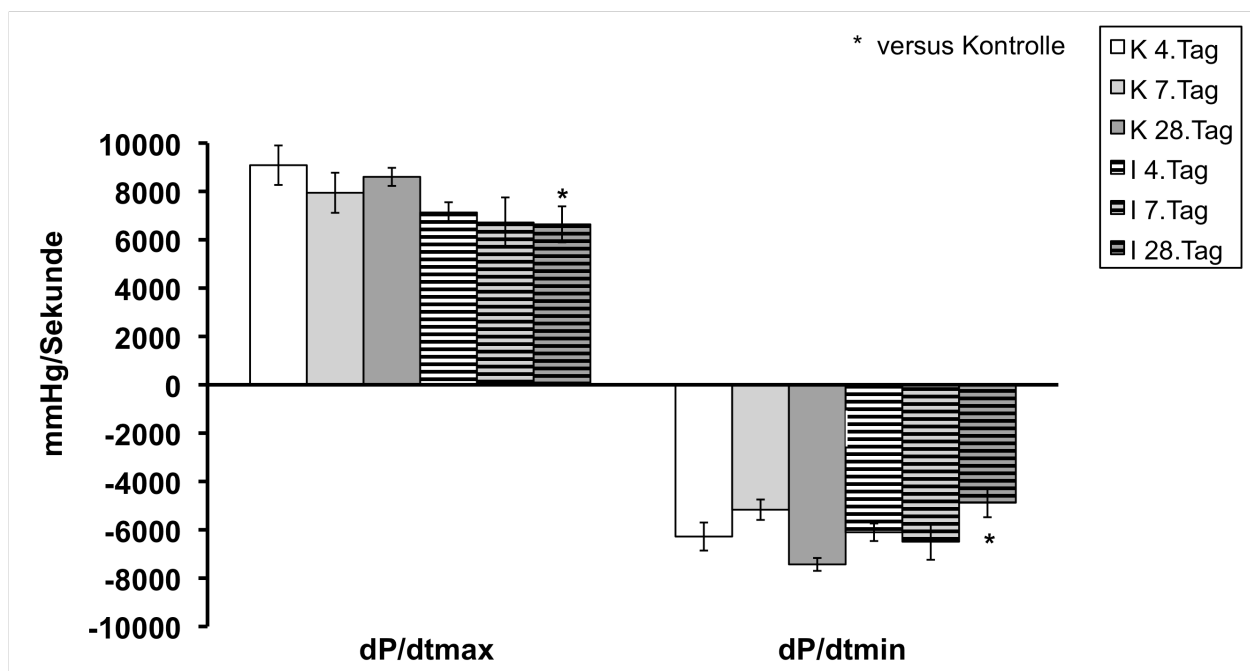


Abb. 4.3.3: Darstellung der diastolischen Herzfunktion ($dP/dt\text{-min}$) sowie der systolischen Herzfunktion ($dP/dt\text{-max}$) in mmHg/Sekunde der verschiedenen Versuchsgruppen.

Ergebnisse

4.3.5 Ejektionsfraktion (EF)

Der Anteil des Schlagvolumens an der Blutmenge (EF in %), der sich am Ende der Diastole in den Herzkammern befindet, wurde durch die Differenz von Schlagvolumen und enddiastolischem Volumen errechnet.

Die Ejektionsfraktion von I4 zeigte keine signifikante Veränderung (s. Abb. 4.3.4) zur Kontrollgruppe. Eine signifikante Reduktion ($p < 0,05$) stellte sich jedoch von den Gruppen K7 (53,58 \pm 5,9) und K28 (63,41 \pm 8,72) zu den jeweiligen Versuchsgruppen I7 (29,34 \pm 8,84) und I28 (31,3 \pm 7,93) dar. Die Versuchsgruppen I7 und I28 zeigten eine signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Ejektionsfraktion gegenüber der infizierten Gruppe am 4.Tag.

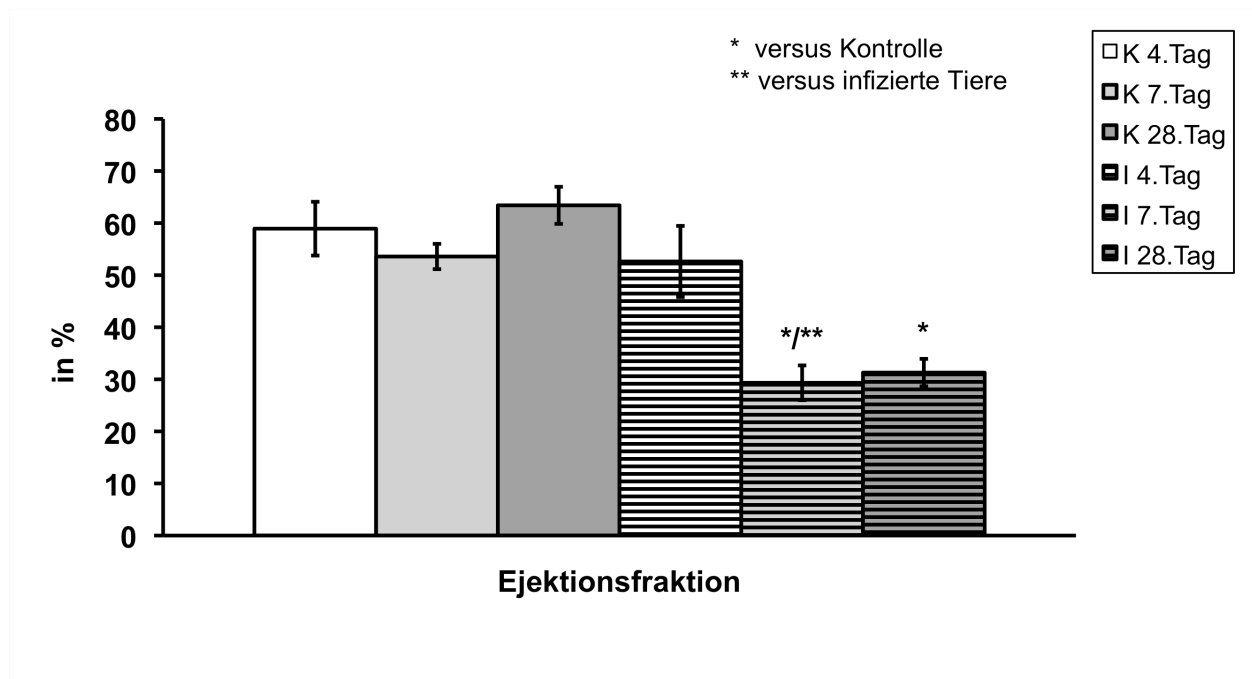


Abb. 4.3.4: Darstellung der Ejektionsfraktion der verschiedenen Versuchsgruppen in %.

4.3.6 Linksventrikuläres endsystolisches Volumen (LVESV) und linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LVEDV)

Bezüglich des linksventrikulären endsystolischen Volumens der Versuchsgruppen K4 und I4 (K4 29,26 \pm 3,17; I4 31,93 \pm 4,2) konnten keine signifikanten Unterschiede

Ergebnisse

verzeichnet werden (s. Abb. 4.3.5). Einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) zur jeweiligen Kontrollgruppe (K7 $33,01 \pm 3,4$, K28 $27,58 \pm 3,2$) zeigten die infizierte Tiere der Gruppe I7 und I28 (I7 $57,75 \pm 4,15$, I28 $57,75 \pm 4,15$). Zwischen den infizierten Gruppen I4 und I7 konnte ein signifikanter ($p < 0,02$) Anstieg dargestellt werden.

Das linksventrikuläre enddiastolische Volumen der infizierten Tiere in der Versuchsgruppe I4 ($58,17 \pm 2,6$) sank signifikant ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe K4 ($66,64 \pm 1,65$; s. Abb. 4.3.5). Es zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg ($p < 0,05$) der infizierten Gruppe I28 ($82,03 \pm 3,63$) im Vergleich zu den Kontrolltieren K28 $66,58 \pm 3,63$). Sowohl das LVEDV der Gruppe I7 ($82,08 \pm 4,29$) als auch der Gruppe I28 stieg signifikant zur Versuchsgruppe I4 an ($p < 0,02$).

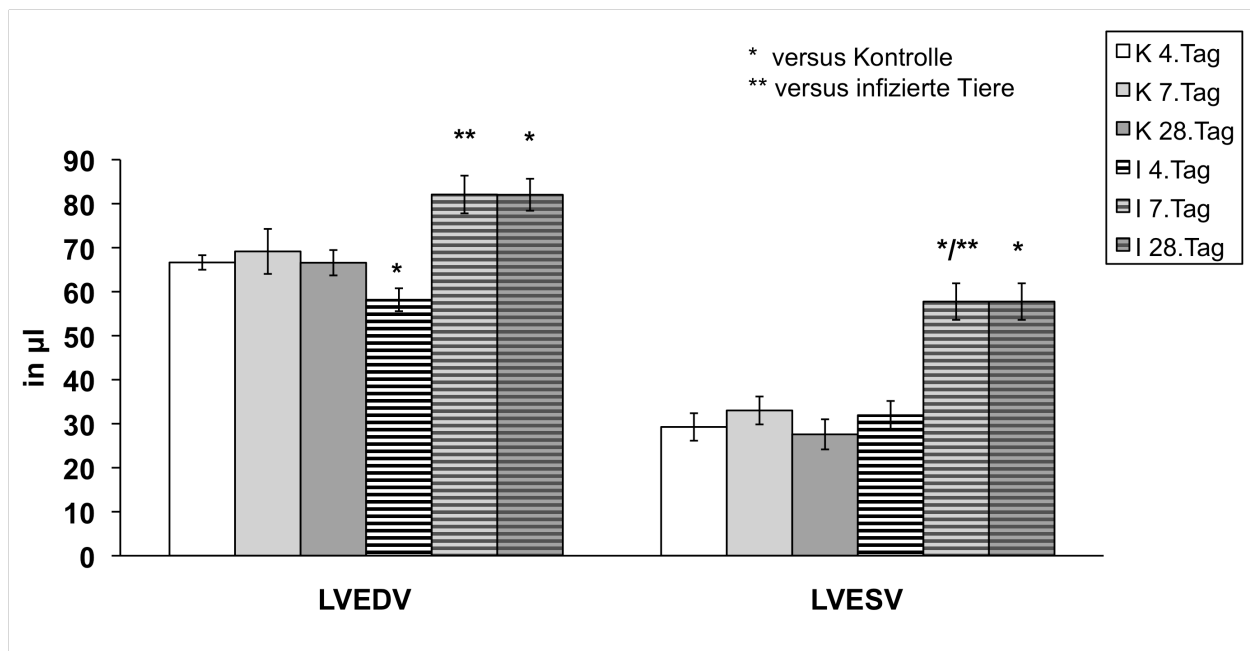


Abb. 4.3.5: Darstellung des linksventrikulären enddiastolischen Volumens (LVEDV) sowie des linksventrikulären endsystolischen Volumens (LVESV) in µl der verschiedenen Versuchsgruppen.

4.3.7 Schlagvolumen (SV)

Das Schlagvolumen in µl reduzierte sich signifikant ($p < 0,05$) in den infizierten Tiergruppen I7 u. I28 ($25,69 \pm 1,95$; $25,69 \pm 1,95$; siehe Abb. 4.3.6) im Vergleich zu den jeweils entsprechenden Kontrolltieren (K7 $36,97 \pm 3,11$; I28 $34,82 \pm 1,89$). Am 4. Untersuchungstag bestand ebenso eine Abnahme des Schlagvolumens der infizierten

Ergebnisse

Tiere jedoch ohne signifikanten Unterschied (K4 $38,43 \pm 4,01$; I4 $30,46 \pm 3,46$).

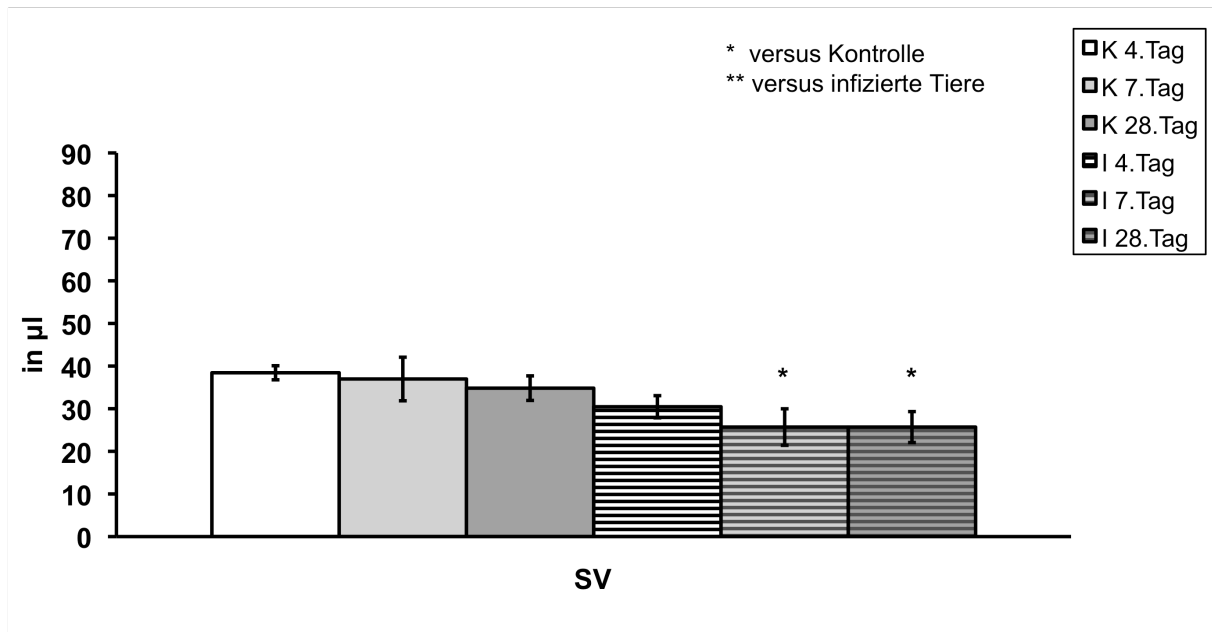


Abb. 4.3.6: Darstellung des Schlagvolumens der verschiedenen Versuchsgruppen in µl.

4.4 Nachweis enteroviraler RNA des CVB3-Genoms

Wie in Kapitel 3.3.6 bereits erläutert, wurde ein Nachweis der enteroviralen RNA mittels RT-PCR und einer nested-PCR für das CVB3-Genom durchgeführt. In der Gruppe der infizierten Mäuse konnte am 4. und 7. Tag p.i. bei allen Tieren enterovirale RNA nachgewiesen werden. Am 28.Tag der Infektion befand sich hingegen nur bei drei infizierten Tieren CVB3 im Myokard. Die gesamte Gruppe der Kontrolltiere zeigte sich CVB3 negativ (Abb.: 4.4).

Ergebnisse



Abb. 4.4: Nachweis enteroviraler RNA mittels nested RT-PCR.

1. Reihe: Marker VIII, 10 Kontrollen 4.Tag, 10 Infizierte 4.Tag, 10 Kontrollen 7.Tag, Marker VIII.
2. Reihe: VIII, 10 Infizierte 7.Tag, 10 Kontrollen 28.Tag, 10 Infizierte 28.Tag (davon 7 Ausfälle), VIII.

Darstellung in einem 2%-igen Agarosegel. Nachweis von CVB3 in den infizierten Proben B1-10 (infiziert 4.Tag), B11-20 (infiziert 7.Tag) und B21-30 (infiziert 28.Tag).

4.5 Analyse der mRNA-Expression

Es ergab sich für alle betrachteten Parameter im H-Test eine signifikante Varianz zwischen den sechs Versuchsgruppen, sodass Einzelvergleiche vorgenommen werden konnten.

Beispielhaft für die Genexpressionen aller beobachteten Templates wurde im Folgenden TNF- α und MMP-3 in einer repräsentativen PCR-Analyse in Abb. 4.5 dargestellt.

Ergebnisse

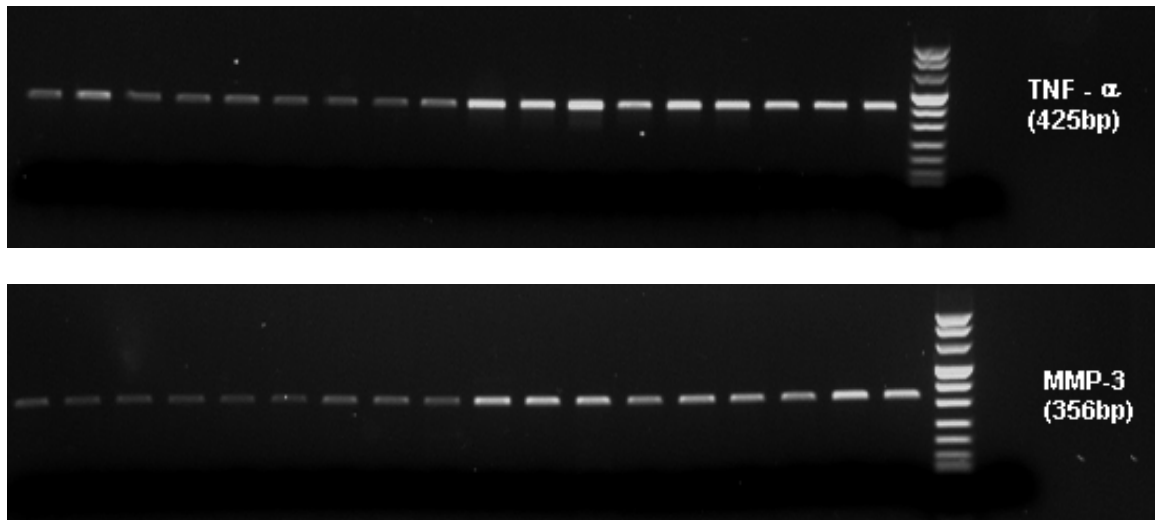


Abb. 4.5: Für jedes Template wurden jeweils 9 Proben aus der Kontrollgruppe sowie 9 Proben aus der Gruppe der infizierten Tiere vom 4. p.i. ausgewählt und auf einem 2%igen ethidiumbromidgefärbten Agarosegel dargestellt (Marker: 425 bp TNF- α u. 356bp MMP-3).

4.5.1 Analyse der mRNA-Expression der Metalloproteinasen sowie der Proteaseinhibitoren

4.5.1.1 MMP-2

Mittels RT-PCR ließ sich bei MMP-2 auf der Ebene der Genexpression ein nicht signifikanter Anstieg der mRNA-Expression am 4. Tag p.i (I4 $1,34 \pm 0,18$) gegenüber der Kontrollgruppe K4 ($1,22 \pm 0,11$) zeigen (siehe Abb.: 4.5.1). Zum Zeitpunkt des 7. und 28. Tages p.i. konnte im Vergleich K7 ($0,83 \pm 0,04$) zu I7 ($1,03 \pm 0,04$) sowie K28 ($0,78 \pm 0,11$) zu I28 ($1,11 \pm 0,08$) ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression deutlich gemacht werden ($p < 0,007$, $p < 0,035$). Gegenüber der infizierten Gruppe I4 zeigte die Gruppe der infizierten Tiere (I7) einen nicht signifikanten Abfall der mRNA-Expression von MMP-2.

Ergebnisse

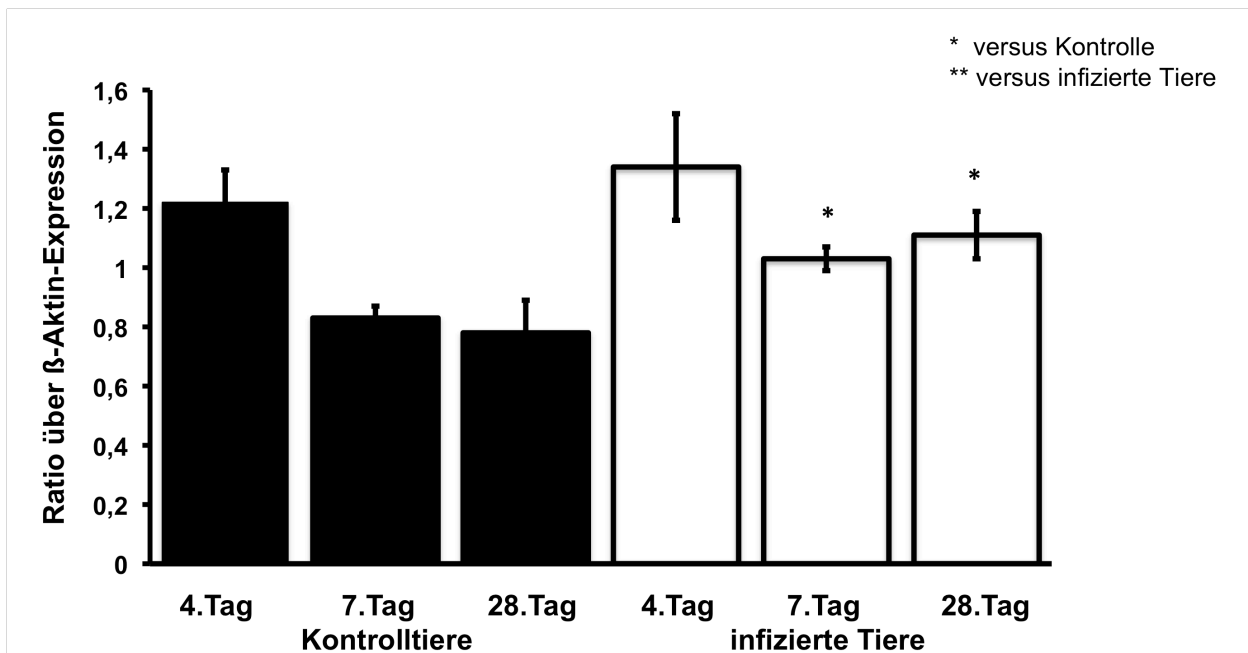


Abb. 4.5.1: Darstellung der mRNA-Expression von MMP-2 als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.1.2 MMP-3

Die Versuchstiere der Kontrollgruppen K4, K7 und K28 ($0,17 \pm 0,04$, $0,23 \pm 0,03$ und $0,21 \pm 0,04$) zeigten zur jeweils infizierten Gruppe (I4 $0,64 \pm 0,11$, I7 $1,04 \pm 0,11$, I28 $0,30 \pm 0,04$) einen Anstieg der mRNA-Expression von MMP-3 (s. Abb. 4.5.2), wobei sich nur in der Gruppe der Tiere am 4. und 7. Tag p.i. eine Signifikanz im U-Test ergab ($p < 0,002$, $p < 0,0001$). Die mRNA-Expression von MMP-3 der infizierten Gruppe I7 stieg signifikant im Verhältnis zur infizierten Gruppe I4 an ($p < 0,032$). I28 fällt signifikant im Vergleich zu I4 ($p < 0,016$) und I7 ($p < 0,001$).

Ergebnisse

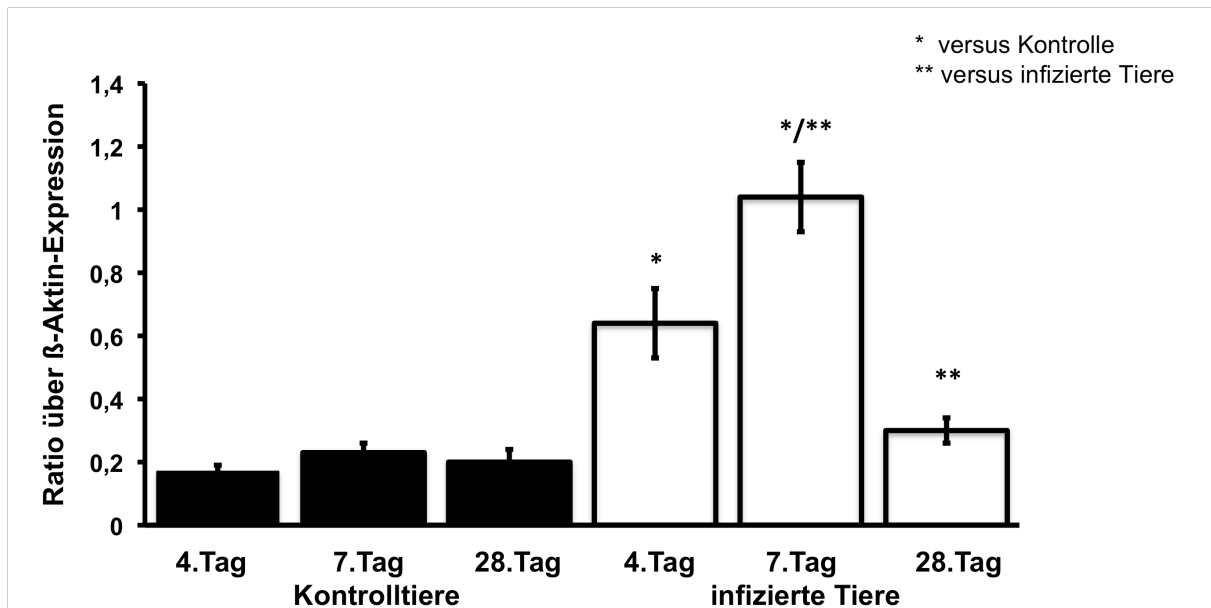


Abb. 4.5.2: Darstellung der mRNA-Expression von MMP-3 als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.1.3 MMP-8

Die CVB3-Virusinfektion in Versuchsgruppe I4 ($0,95 \pm 0,02$) führte zu einer steigenden, nicht signifikanten mRNA-Expression von MMP-8 (s. Abb. 4.5.3) gegenüber der Kontrollgruppe K4 ($0,76 \pm 0,09$). Ein signifikanter deutlicher Anstieg konnte in Versuchsgruppe I7 ($1,86 \pm 0,08$) zu K7 ($0,61 \pm 0,06$) verzeichnet werden ($p < 0,0001$). Zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe infizierter Tiere am 28.Tag p.i. zeigten sich keine signifikanten Veränderungen (K28 $0,67 \pm 0,06$ und I28 $0,51 \pm 0,08$). Es wurde ausschließlich eine geringe Abnahme der mRNA-Expression der infizierten Tiere dargestellt. Ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von MMP-8 der infizierten Gruppe I7 zu I4 ($p < 0,0001$) konnte verdeutlicht werden. Die Vergleiche zwischen den infizierten Tieren I7 und I28 sowie zwischen I4 und I28 zeigten eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression ($p < 0,0001$, $p < 0,01$).

Ergebnisse

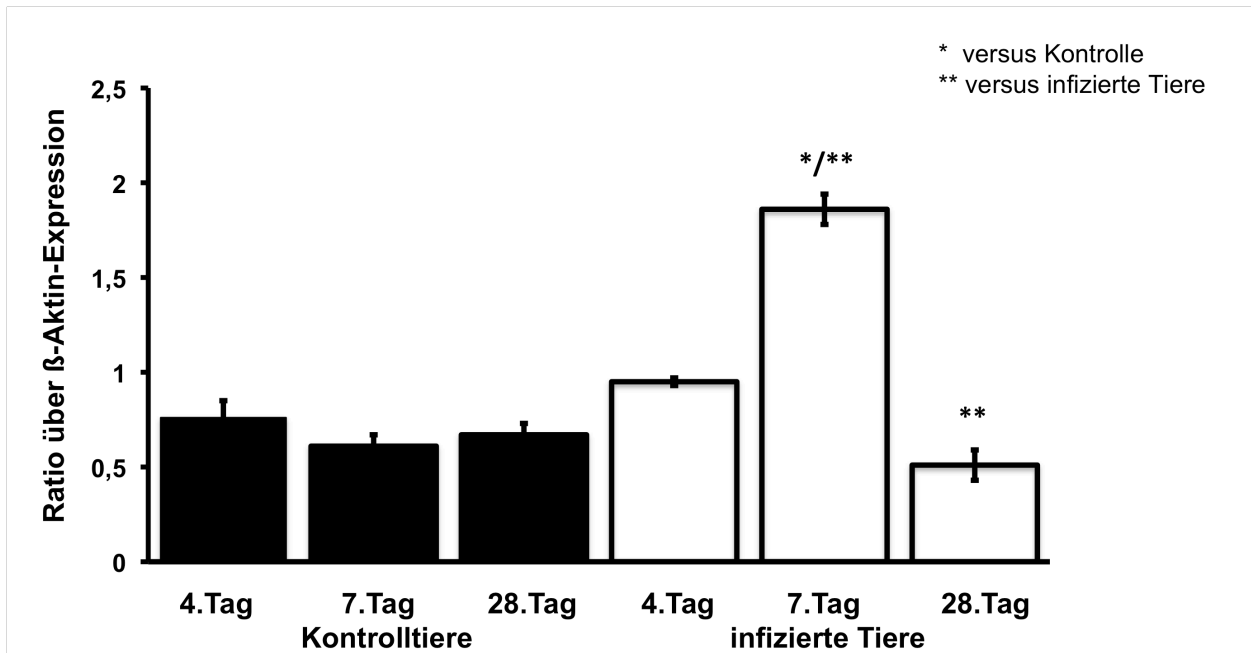


Abb. 4.5.3: Darstellung der mRNA-Expression von MMP-8 als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.1.4 TIMP-1

Zwischen den Kontrollgruppen K4 und K7 (K4 $0,31 \pm 0,03$ sowie K7 $0,33 \pm 0,04$) und den dazugehörigen Versuchsgruppen der infizierten Tiere in I4 und I7 (I4 $1,04 \pm 0,24$ sowie I7 $1,35 \pm 0,15$) konnten in beiden Vergleichen signifikante Anstiege der mRNA-Expression angeführt werden ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante Reduktion ($p < 0,0001$) der TIMP-1-Expression von K28 zu I28 ($0,34 \pm 0,02$ zu $0,25 \pm 0,02$) und der infizierten Gruppen I4 und I7 jeweils zur Versuchsgruppe I28 (jeweils $p < 0,0001$) dokumentiert (s. Abb. 4.5.4).

Ergebnisse

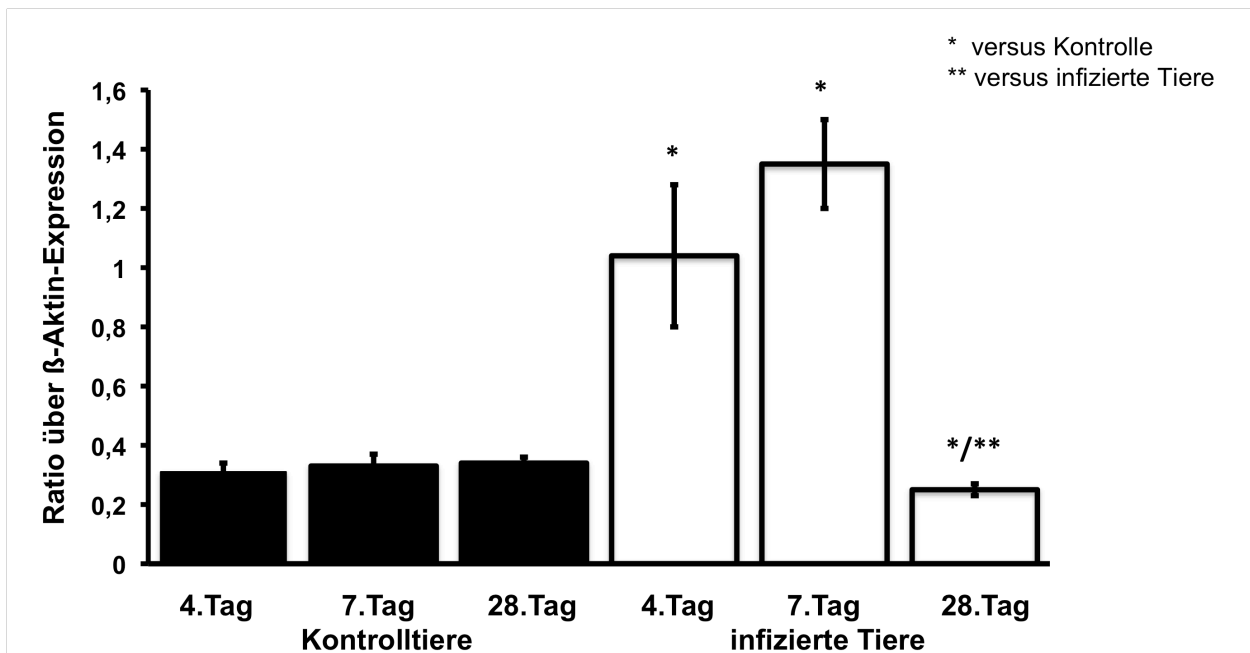


Abb. 4.5.4: Darstellung der mRNA-Expression von TIMP-1 als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.1.5 MMP-3/TIMP-1-Ratio

Zwischen den Kontrollgruppen K4 und K7 (K4 $0,55 \pm 0,03$; K7 $0,7 \pm 0,04$) und den dazugehörigen Versuchsgruppen I4 und I7 (I4 $0,62 \pm 0,18$; I7 $0,77 \pm 0,13$) stieg die Ratio der mRNA-Expression von MMP-3 über TIMP-1 der jeweiligen infizierten Tiergruppe ohne Signifikanz leicht an. Im Gegensatz dazu wurde ein signifikanter Anstieg ($p < 0,019$) der MMP-3/TIMP-1-Ratio von K28 zu I28 ($0,59 \pm 0,03$ zu $12 \pm 0,03$) (s. Abb. 4.5.5) dargestellt.

Ergebnisse

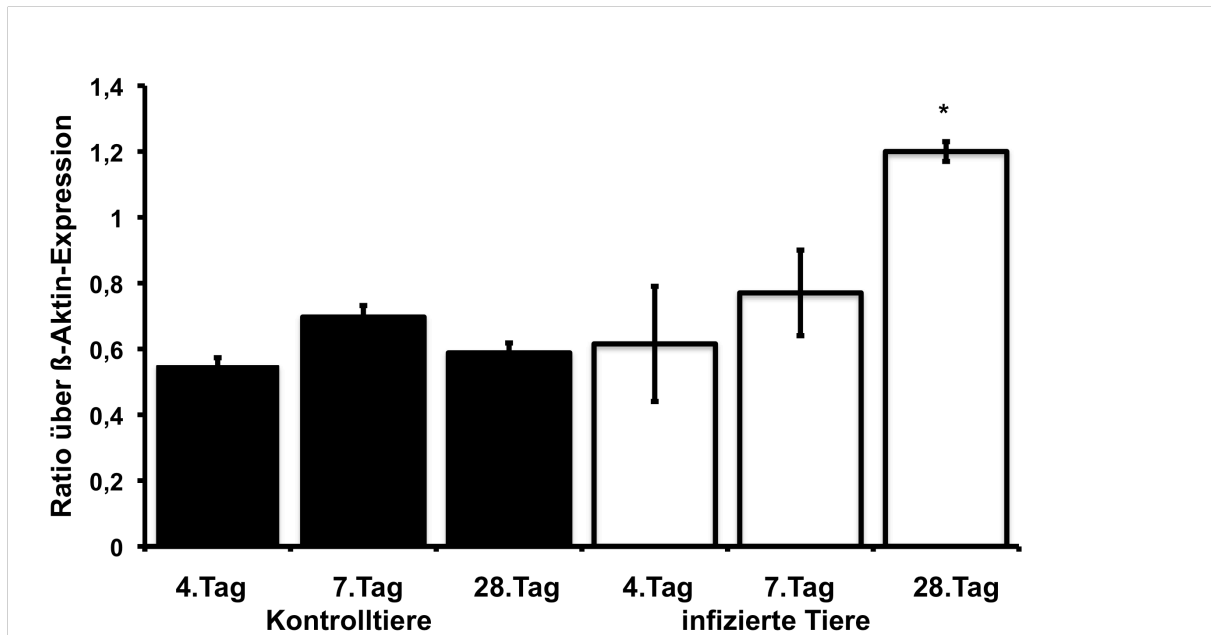


Abb. 4.5.5: Darstellung der mRNA-Expression von MMP-3/TIMP-1 als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.2 Analyse der mRNA-Expression der Kollagene

4.5.2.1 Kollagen I

Die mRNA-Expression von Kollagen I zeigte zwischen den Versuchsgruppen am 4. Tag keine signifikante Veränderungen (K4 $1,47 \pm 0,1$, I4 $1,46 \pm 0,05$). Am 7. Tag p.i. konnte eine leichte, signifikante Reduktion ($p < 0,041$) der mRNA-Expression von Kollagen I dokumentiert werden (K7 $1,67 \pm 0,06$, I7 $1,38 \pm 0,09$). Zwischen K28 und I28 ($1,42 \pm 0,09$ und $1,88 \pm 0,06$) wurde ein deutlicher und signifikanter Anstieg von Kollagen I dargestellt ($p < 0,03$) (s. Abb. 4.5.6).

Ergebnisse

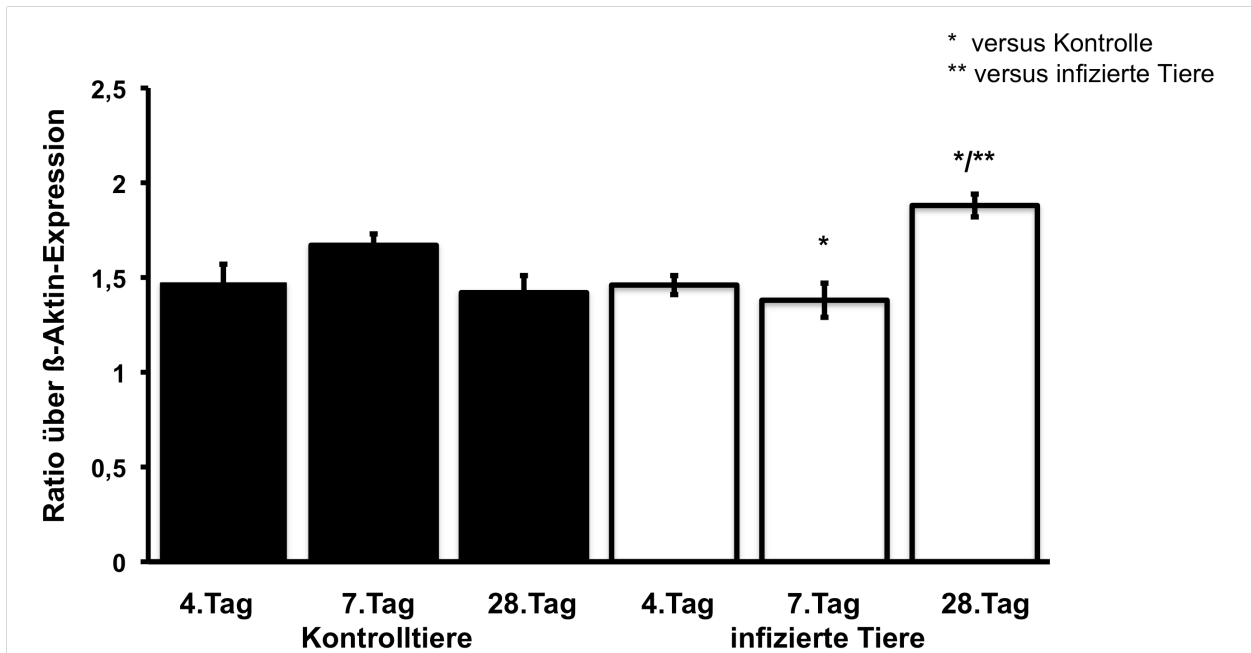


Abb. 4.5.6: Darstellung der mRNA-Expression von Kollagen I als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.2.2 Kollagen III

Mittels RT-PCR ließ sich bei Kollagen III auf der Ebene der Genexpression (s. Abb. 4.5.7) eine signifikante Reduktion ($p < 0,03$, $p < 0,02$, $p < 0,01$) der mRNA-Expression aller infizierten Tiere I4, I7 und I28 ($1,46 \pm 0,04$; $0,57 \pm 0,09$; $0,48 \pm 0,02$) im Vergleich zu den Kontrolltieren (K4 $0,74 \pm 0,03$, K7 $0,71 \pm 0,05$, K28 $0,57 \pm 0,06$) nachweisen. Zwischen den infizierten Versuchsgruppen wurde keine signifikante Veränderung dokumentiert.

Ergebnisse

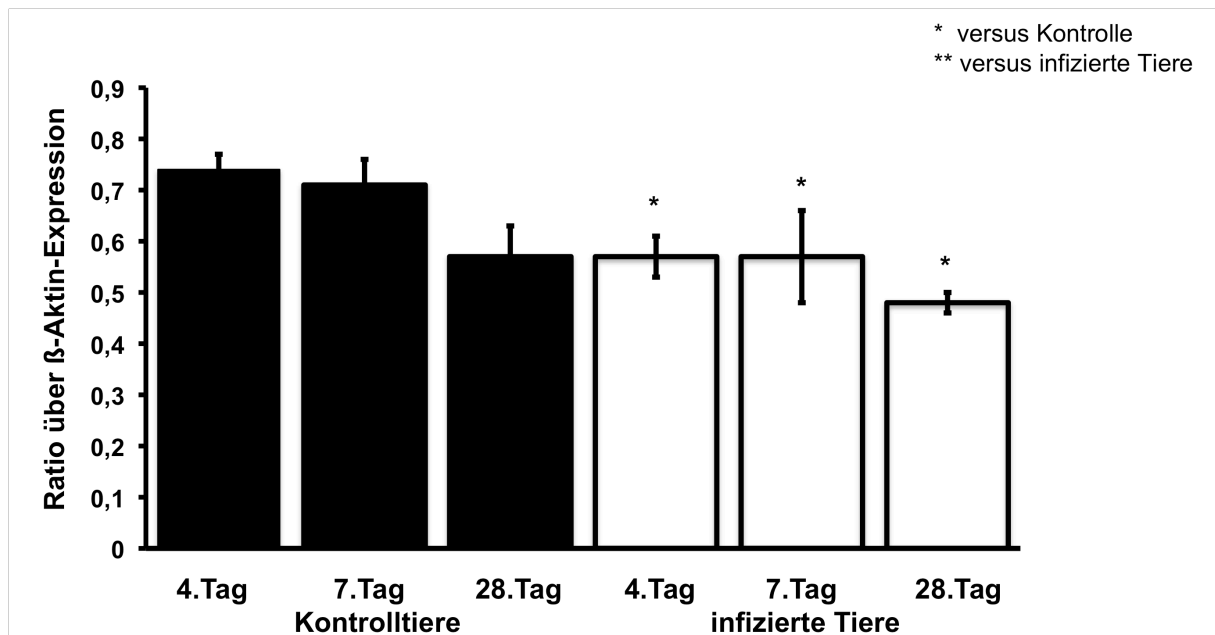


Abb. 4.5.7: Darstellung der mRNA-Expression von Kollagen III als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.2.3 Kollagen IV

Die mRNA-Expression von Kollagen IV zeigte zwar einen Anstieg von den Kontrollgruppen K4 und K7 ($0,68 \pm 0,06$ und $0,57 \pm 0,03$) zu den Gruppen I4 und I7 ($0,78 \pm 0,04$ und $0,73 \pm 0,07$), man konnte jedoch keine statistische Signifikanz erzielen, wohingegen K28 ($0,6 \pm 0,05$) zu I28 ($0,77 \pm 0,05$) signifikant anstieg ($p < 0,05$).

Zwischen den infizierten Versuchsgruppen wurden keine signifikanten Veränderungen dokumentiert (s. Abb. 4.5.8).

Ergebnisse

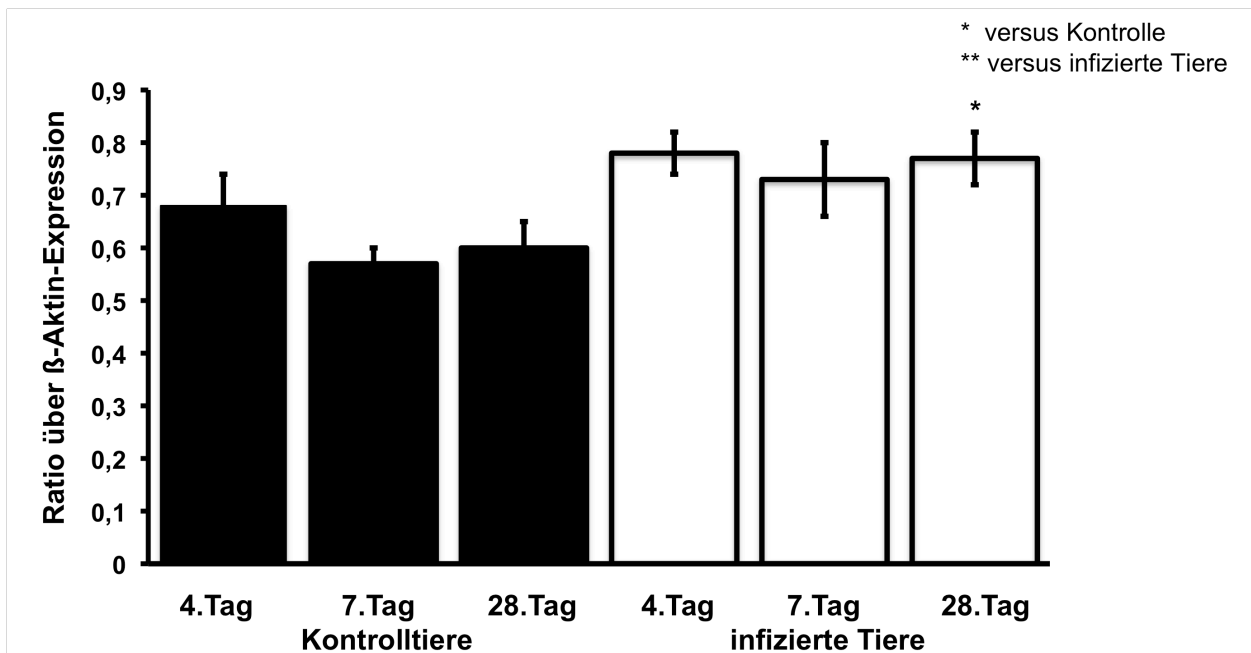


Abb. 4.5.8: Darstellung der mRNA-Expression von Kollagen IV als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.2.4 Kollagen I/Kollagen III-Ratio

Durch semiquantitative RT-PCR konnte in infizierten Myokardproben am 4. und 28. Tag p.i. eine signifikant ($p < 0,04$; $p < 0,05$) erhöhte mRNA-Expression der Kollagen-I/Kollagen-III-Ratio gegenüber den Kontrollen nachgewiesen werden (K4 $1,96 \pm 0,18$; I4 $2,66 \pm 0,17$; K28 $2,79 \pm 0,13$; I28 $3,97 \pm 0,17$).

Am 7. Tag p.i. konnte keine Veränderung dokumentiert werden (K7 $2,41 \pm 0,15$; I7 $2,52 \pm 0,21$; s. Abb. 4.5.9).

Ergebnisse

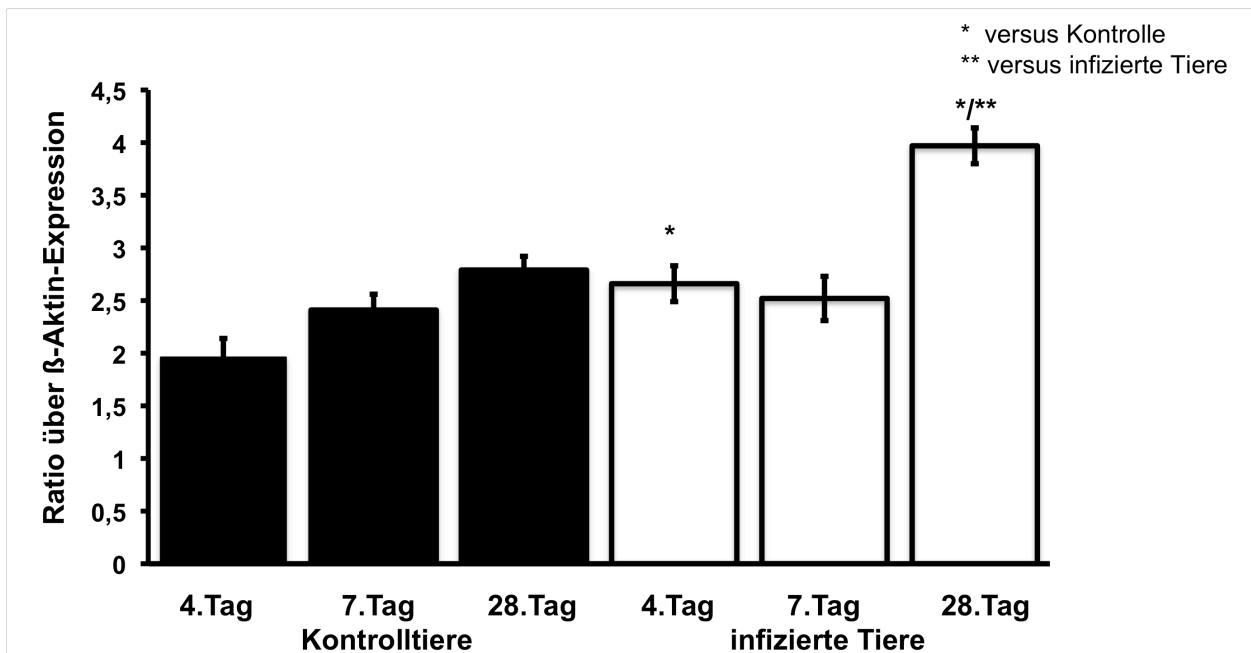


Abb. 4.5.9: Darstellung der mRNA-Expression von KollagenI/KollagenIV als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.3 mRNA-Expressionsanalyse der pro- u. antiinflammatorischen Zytokine

4.5.3.1 Interleukin-1 β

Beim Vergleich der mRNA-Expression von IL-1 β der Versuchsgruppen K4 und K7 (K4 $0,47 \pm 0,06$, K7 $0,52 \pm 0,04$) zu den Versuchsgruppen I4 und I7 (I4 $1,35 \pm 0,1$, I7 $0,79 \pm 0,08$) kam es zu einem signifikanten Anstieg bei den infizierten Tieren ($p < 0,0001$, $p < 0,05$). Die Kontrollgruppen K28 zu I28 zeigten keine signifikanten Veränderungen, außer einem leichten Anstieg der Expression von IL-1 β in der Gruppe I28 (s. Abb. 4.5.10). Die mRNA-Expression der infizierten Tiere am 7.Tag p.i. stellte eine signifikante Reduktion zur Gruppe I4 dar ($p < 0,001$).

Ergebnisse

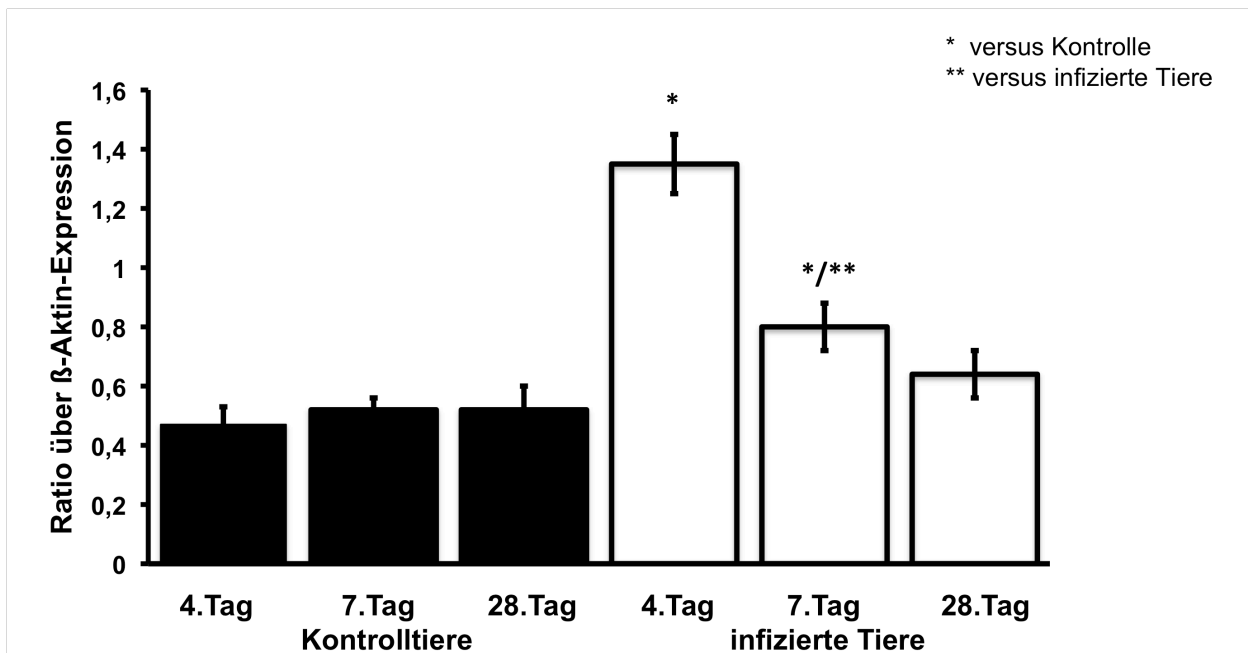


Abb. 4.5.10: Darstellung der mRNA-Expression von IL-1 β als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.3.2 Interleukin-6

Die mRNA-Expression von IL-6 zeigte in allen infizierten Gruppen (I4 $1,56 \pm 0,08$, I7 $1,91 \pm 0,06$, I28 $1,02 \pm 0,05$) einen signifikanten und deutlichen Anstieg (s. Abb. 4.5.11; $p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,001$) zu den jeweiligen Kontrollgruppen (K4 $0,78 \pm 0,1$, K7 $0,69 \pm 0,05$ und K28 $0,69 \pm 0,05$). Sowohl im Vergleich I4 zu I28, als auch im Vergleich I7 zu I28 konnte eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von IL-6 ($p < 0,0001$, $p < 0,001$) dargestellt werden. In der Gruppe I7 der infizierten Tiere wurde ein signifikanter Anstieg ($p < 0,004$) der mRNA-Expression im Vergleich zur Gruppe I4 dokumentiert.

Ergebnisse

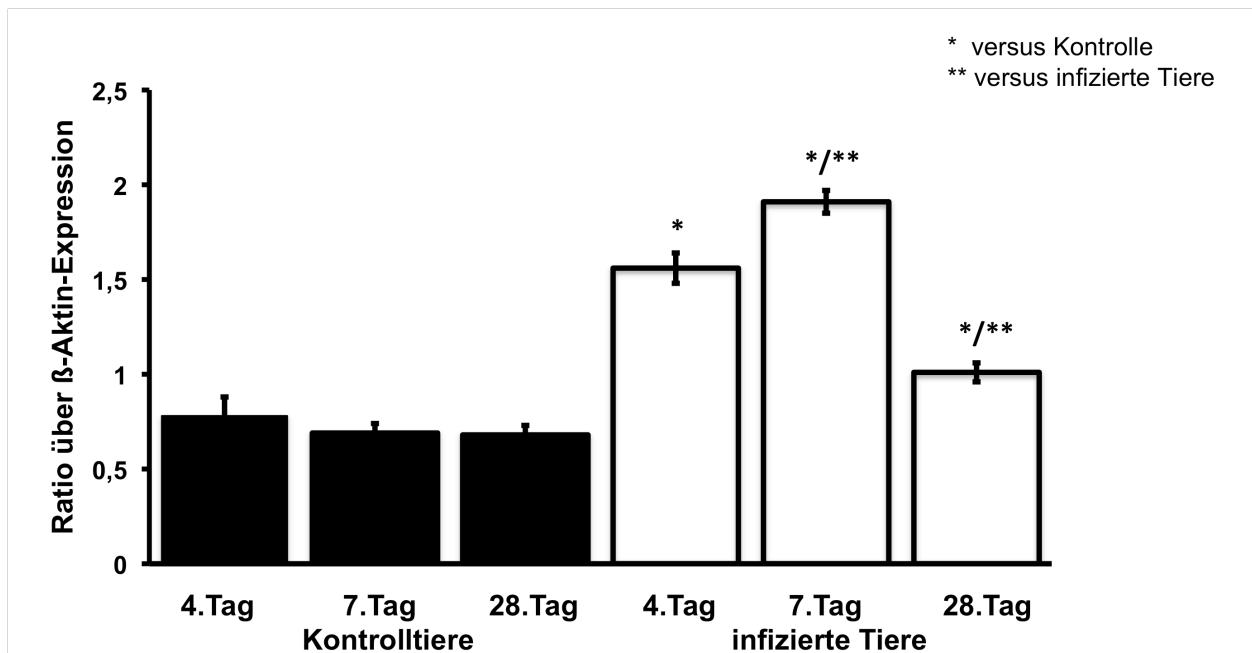


Abb. 4.5.11: Darstellung der mRNA-Expression von IL-6 als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.3.3 Interleukin-10

Mit Hilfe der RT-PCR ließ sich bei IL-10 ein signifikanter Anstieg ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,001$) der mRNA-Expression von allen Kontrollgruppen (K4 $0,72 \pm 0,07$; K7 $0,67 \pm 0,06$; K28 $0,67 \pm 0,06$) zu den dazugehörigen infizierten Gruppen (I4 $1,5 \pm 0,07$; I7 $1,79 \pm 0,04$; I28 $1,01 \pm 0,05$) darstellen. Die Gruppe I28 zeigte eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression zu den Gruppen I4 sowie I7 ($p < 0,005$) (s. Abb. 4.5.12). In der Gruppe I7 der infizierten Tiere konnte ein signifikanter Anstieg zur mRNA-Expression der Gruppe I4 ($p < 0,004$) dokumentiert werden.

Ergebnisse

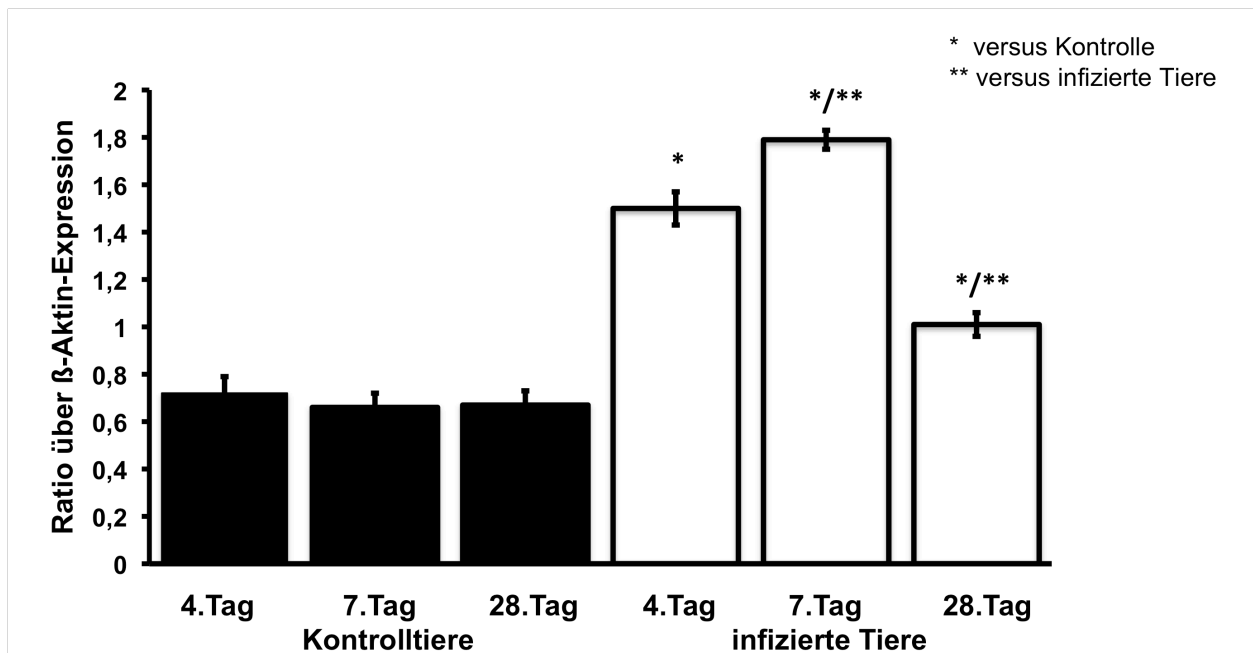


Abb. 4.5.12: Darstellung der mRNA-Expression von IL-10 als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.3.4 Tumornekrosefaktor- α

Die mRNA-Expression von TNF- α stieg in der Gruppe der infizierten Tiere am 7.Tag p.i. (I7 $0,83 \pm 0,08$; K7 $0,43 \pm 0,05$) signifikant an ($p < 0,0001$). Innerhalb der Gruppen K4 und I4 ($0,44 \pm 0,05$; $0,49 \pm 0,06$) sowie K28 zu I 28 ($0,56 \pm 0,03$; $0,66 \pm 0,06$) stellte sich ausschließlich eine minimale Zunahme der mRNA-Expression bei den infizierten Mäusen ein (ohne statistische Signifikanz). Die mRNA-Expression von TNF- α der Versuchsgruppe I4 zu I7 verhielt sich signifikant steigend ($p < 0,008$) (s. Abb. 4.5.13).

Ergebnisse

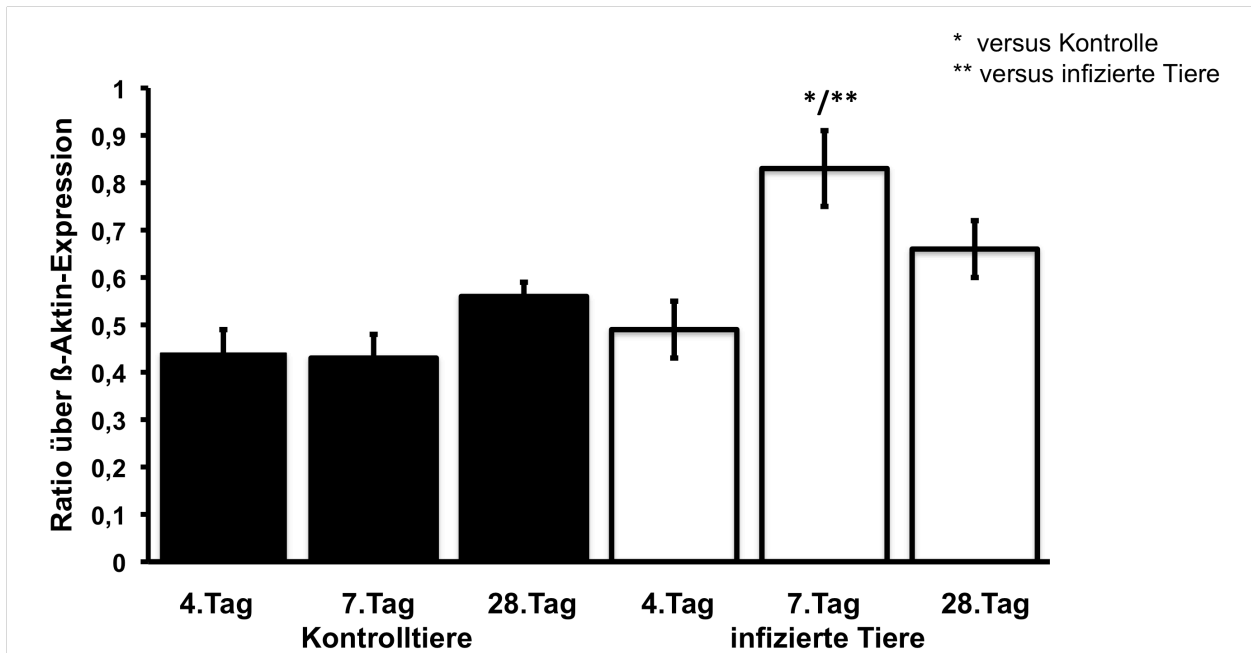


Abb. 4.5.13: Darstellung der mRNA-Expression von TNF- α als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.5.3.5 Interferon- γ

Die mRNA-Expression von INF- γ zeigte bei allen infizierten Mäusen (I4 $1,35 \pm 0,05$, I7 $0,8 \pm 0,05$, I28 $0,64 \pm 0,05$) einen signifikanten Anstieg ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$) zur jeweiligen Kontrollgruppe (K4 $0,81 \pm 0,05$, K7 $0,83 \pm 0,05$ und K28 $0,79 \pm 0,05$). Im Vergleich I4 zu I7 konnte keine signifikante Veränderung belegt werden (s. Abb. 4.5.14). Innerhalb der infizierten Gruppen wurde bei I28 eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression sowohl zu I4, als auch zu I7 dokumentiert ($p < 0,05$).

Ergebnisse

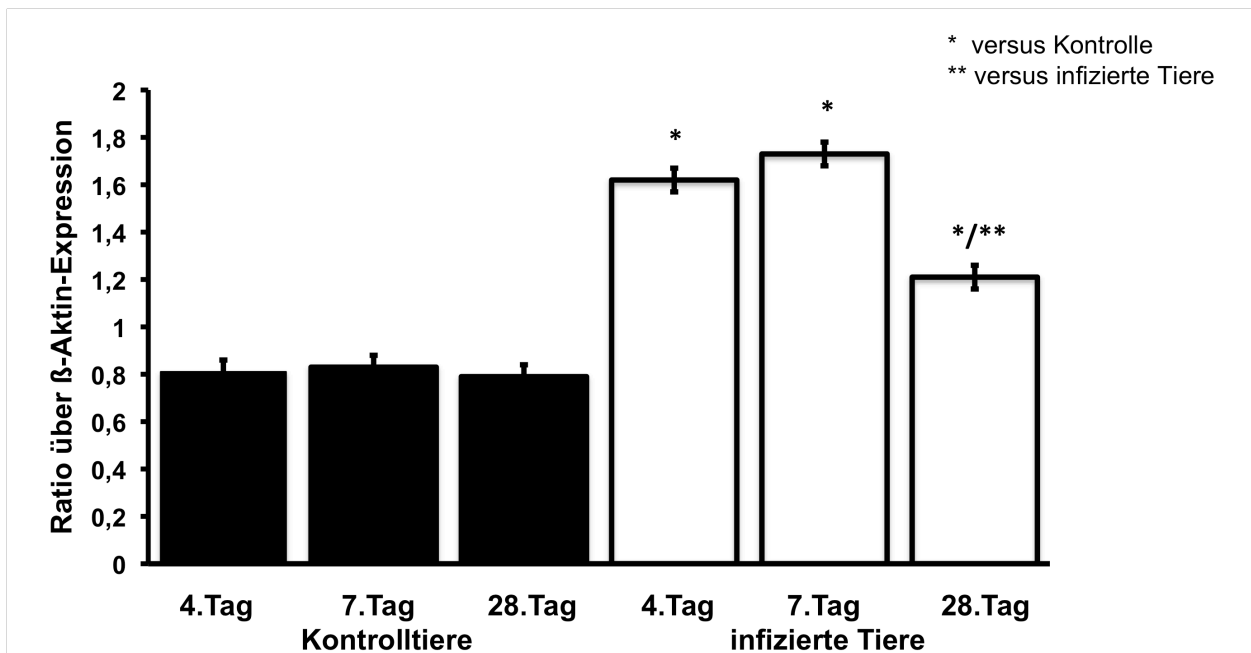


Abb. 4.5.14: Darstellung der mRNA-Expression von Interferon- γ als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

4.6 Korrelationen

Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels Pearsons- Korrelation zwischen Inflammation und MMP/TIMP-System zu jedem Zeitpunkt der Infektion (s. Tbl. 4.6.1).

	MMP-8	MMP-3	TIMP-1
INF- γ	0,687a	0,823b	0,701a
IL-6	0,732b	0,694a	0,705a
IL-10	0,708b	0,718b	0,717b

Tbl. 4.6.1: Werte der Pearsons-Korrelation, dargestellt durch r = Korrelationskoeffizient und a: $P < 0,05$ und b: $P < 0,001$.

Ergebnisse

Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertung mittels Pearsons- Korrelation zwischen dem Matrixdegradationssystem und der linksventrikulären Funktion zu jedem Zeitpunkt der Infektion (s.Tbl. 4.6.2).

	EF	LVESV	SV
MMP-3	0,396a	0,312	0,353a
MMP-8	0,396a	0,407a	0,388a

Tbl. 4.6.2: Ergebnisse der Auswertung mittels Pearsons-Korrelation, dargestellt durch r = Korrelationskoeffizient und a: $P < 0,05$ und b: $P < 0,001$.

4.7 Kollagennachweis mittels Sirius red-Färbung

Alle Ergebnisse der Sirius red-Färbung wurden wie bereits in Kapitel 3.5 erläutert, dank des Analysesystems Lucia G erhoben. Mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis konnte auch im Falle der Sirius red-Färbung gezeigt werden, dass Einzelvergleiche zwischen den Versuchsgruppen durchgeführt werden konnten ($p < 0,05$).

Der gemessene Kollagengehalt wurde als prozentualer Anteil am gesamten untersuchten Herzgewebe dargestellt.

In der Sirius red-Färbung konnte ein signifikanter Anstieg der Kollagengesamtmenge der Versuchsgruppen K7 zu I7 ($0,37 \pm 0,05$ zu $0,76 \pm 0,12$), wie von den Gruppen K28 zu I28 ($0,47 \pm 0,04$ zu $0,98 \pm 0,11$) dargestellt werden ($p < 0,006$ und $p < 0,001$). Die Kollagengesamtmenge zwischen der Kontrollgruppe K4 und der infizierten Gruppe I4 wies keine signifikante Veränderung auf (s. Abb. 4.7.1). Eine signifikante Erhöhung des Gesamtkollagengehaltes erfolgte in der infizierten Gruppe I4 ($0,5 \pm 0,07$) zu I7 ($p < 0,001$).

Ergebnisse

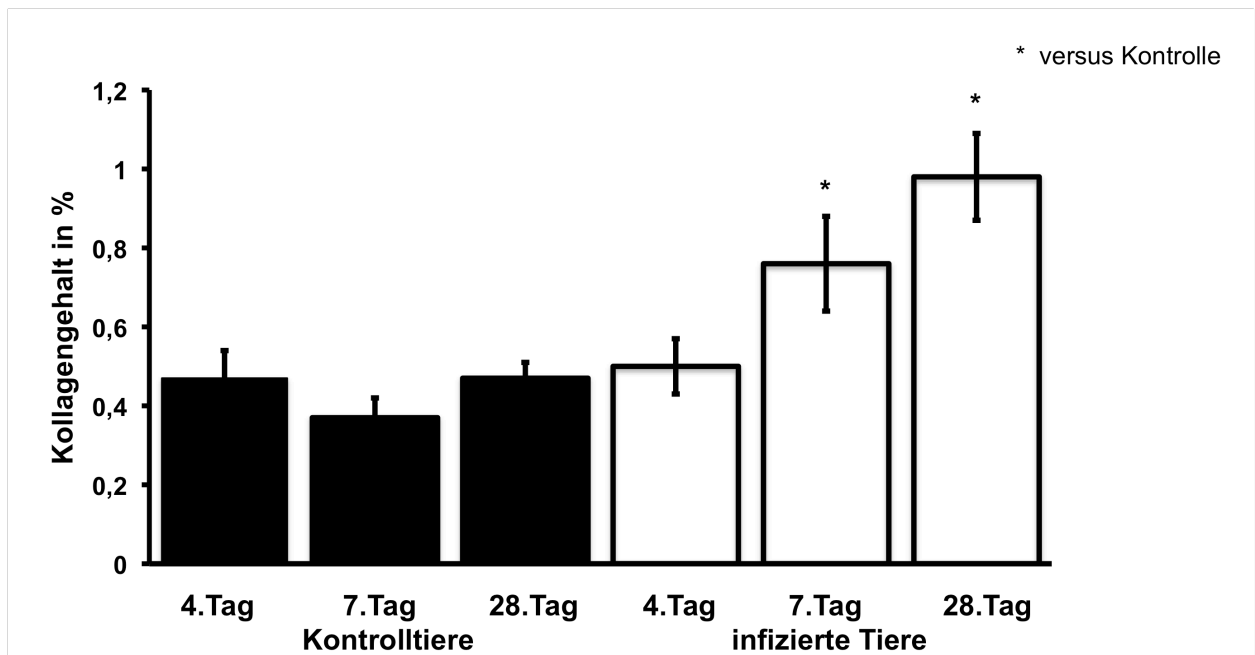


Abb. 4.7.1: Darstellung des Kollagengehaltes in % anhand der Sirius red-Färbetechnik aller Versuchsgruppen.

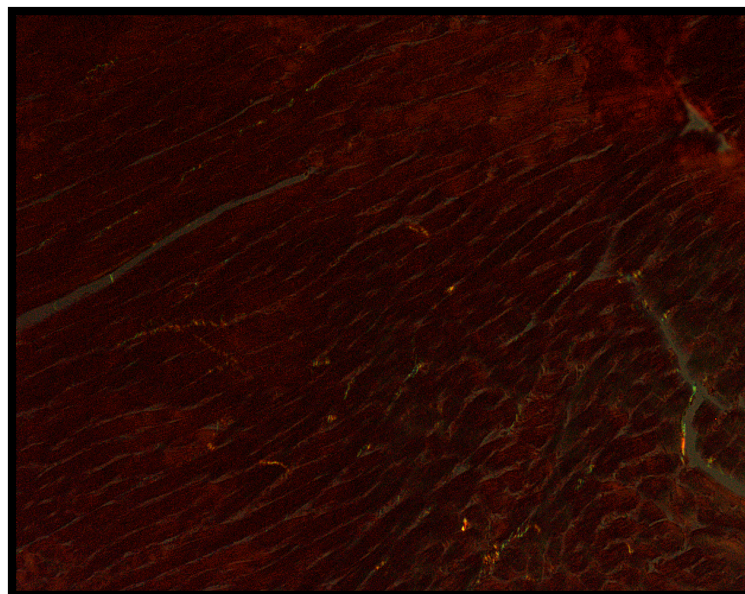


Abb. 4.7.2: Darstellung des Kollagengehaltes mit Hilfe der Sirius red-Färbung des Herzmuskelschnittes einer Kontrollmaus am 28.Tag p.i..

Ergebnisse

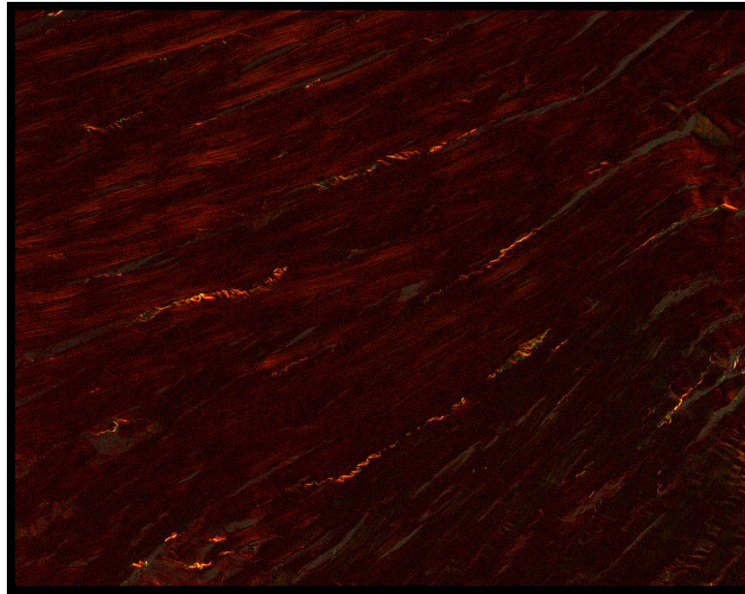


Abb. 4.7.3: Darstellung des Kollagengehaltes mit Hilfe der Sirius red-Färbung des Herzmuskelschnittes einer infizierten Maus am 28.Tag p.i..

Diskussion

5. Diskussion

5.1 Allgemein

Die EZM des Myokards spielt eine wichtige Rolle für den Erhalt der Integrität und der Leistungsfähigkeit des Herzens. Die exakten molekularen Mechanismen, die für das kardiale Remodeling im Rahmen einer viralen Myokarditis von Bedeutung sind konnten weder beim Menschen noch in verschiedenen Tiermodellen eindeutig geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher bei CVB3-infizierten SWR/J-Mäusen der Einfluss der Expression von Zytokinen und MMPs/TIMPs auf die Modulation der EZM und deren Auswirkung auf die linksventrikuläre Funktion untersucht, um die komplexen Umbauprozesse der EZM zu erfassen. In Abhängigkeit dieser Ergebnisse wäre es möglich, ein wirkungsvolles kausales Behandlungskonzept entwickeln zu können. Ziel ist es, in diesem Kapitel die vorliegenden Ergebnisse mit der aktuellen Literatur zu diskutieren.

5.2 Morbidität und Mortalität der SWR/J-Mäuse

Im Rahmen dieses Mausmodells stellte sich anhand der aufgezeigten Krankheitssymptomatik und des spezifischen CVB3-Nachweises im Myokard ein Bild über die Ausprägung der Morbidität dar. Diese ist von den unterschiedlichsten Parametern abhängig. Nicht nur der Mausstamm, sondern auch das Alter und das Geschlecht der Mäuse sind für die Ausprägung der Myokarditis relevant (Kishimoto et al., 1991, Reyes M u. Lerner M, 1985). In dieser Studie wurde deutlich, dass sich mit Dauer, die Tiere durch die Infektion in ihrer Physiognomie (z.B. struppiges Fell), ihrem reduzierten Fressverhalten und zunehmender Einschränkung ihrer Bewegung immer deutlicher zu ihrem Nachteil veränderten. Auffällig ist, dass der allgemeine Krankheitszustand der infizierten Tiere jedoch im Vergleich zu vorangehenden Studien mit BALB/c-Mäusen in einem ähnlichen Modell als eher milde bezeichnet werden konnte. Im Rahmen des Versuchsablaufes verstarb kein Tier. Zhang et al. (1994) konnte die von uns gemachte Beobachtung bereits 1994 nachweisen, indem er zeigte, dass SWR/J-Mäuse, trotz der gleichen Dosis von CVB3, zum gleichen Zeitpunkt aktiver

Diskussion

als die infizierten BALB/c-Mäuse waren und nicht wie sie, zum Teil bereits am 4. Tag p.i. verstarben. Aufgrund der Unterschiede im genetischen „Background“, konnte sich vermutlich eine stärker ausgeprägte Myokarditis als bei dem infizierten BALB/c-Stamm entfalten, was sich interessanterweise nur minimal auf das klinische Erscheinungsbild auswirkte. Dies ermöglichte eine vollständige Entwicklung einer Myokarditis und deren Progress zur chronischen Erkrankung. Die Studie postulierte zudem noch die These, dass durch die hohe Sensitivität der SWR/J-Mäuse zu CVB3, eine Korrelation zwischen der Ausprägung der Myokarditis und der Dosis des Virus in SWR/J-Mäusen besteht (Zhang et al., 1994). In der vorliegenden Studie wurde bewusst der SWR/J-Mausstamm gewählt, da eine vorangegangene Studie belegen konnte, dass SWR/J-Mäuse im Gegensatz zu einem BALB/c-Mausstamm, der eher eine moderate Myokarditis im Versuchsmodell mit CVB3 entwickelte, eine persistierende Myokarditis sogar bis zu Monaten ausbilden konnten (Feinstone et al., 1973). Diese Vorteile ermöglichten eine besonders gute Beurteilung aller zu analysierenden Parameter in diesem Projekt im zeitlichen Verlauf der Myokarditis. Somit konnte durch unsere Studie erneut gezeigt werden, dass man mit Hilfe eines Mausmodells, basierend auf SWR/J-Mäusen, z.B. aufgrund der längeren Überlebenszeit der Tiere, aussagekräftigere Ergebnisse in einer längerfristigen Studie erzielen kann, als mit einem Modell mit BALB/c-Mäusen.

5.3 Körper- u. Herzgewichte der SWR/J-Mäuse

In dieser Studie konnten wir im Verlauf der CVB3-induzierten Myokarditis eine signifikante Reduktion der Herzgewichte der infizierten Tiere am 7. Tag p.i. nachweisen. In Übereinstimmung präsentierte Kanda et al. z.B. eine Abnahme des Herzgewichtes in einem Mausmodell am 8. Tag nach Infektion durch das EMC-Virus (Enzephalomyokarditisvirus) (Kanda et al., 1999). Diese und auch unsere Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich zu der Arbeit von Wee et al. (1992). Sie zeigten bei DBA/2-Mäusen mit EMC-Virus am 7.Tag eine Zunahme der Herzgewichte. Am 28. Tag p.i. dieser Arbeit stellte sich dann auch bei unseren Mäusen eine signifikante Zunahme der Gewichte ein. Dies ist im Einklang einiger Studien, welche eine deutliche Erhöhung des Herzgewichtes bereits drei Wochen nach der Infektion präsentieren konnten (Watanabe et al., 2001; Baba et al., 2000). Zum frühen Zeitpunkt der Infektion konnten noch keine Unterschiede festgestellt werden.

Diskussion

Bezüglich des Körpergewichtes wurde in der vorliegenden Studie am 28. Tag p.i. eine Zunahme trotz der beobachteten verminderten Nahrungsaufnahme aller infizierten Mäuse aufgezeigt. Desgleichen konnte Zhang et al. belegen, indem er bereits eine Zunahme des Körpergewichtes von SWR/J-Mäusen mit CVB3-induzierter Myokarditis seit dem 6. Tag p.i. dokumentierte. Die Gruppe wies des Weiteren darauf hin, dass die Veränderungen des Gewichtes unter identischen Voraussetzungen vom Mausstamm abhängig seien. Dies belegte er damit, indem er BALB/c-Mäuse präsentierte, die im Gegensatz dazu am 6. Tag p.i. dramatisch an Körpergewicht verloren hatten. Diese Ergebnisse stimmen genau mit unserer Arbeit überein. Wir konnten ebenso eine signifikante Reduktion des Mausgewichtes am Tag 7 p.i. demonstrieren. Nicht nur im Mausmodell werden unterschiedliche Angaben des Körpergewichtes im Zusammenhang einer viralen Myokarditis registriert sondern auch beim Menschen. So kann es einerseits durch vielseitige Kompensationsmechanismen zur Wasser- u. Elektrolytretention mit Zunahme des Körpergewichtes kommen. Andererseits kommt es aber auch zum Gewichtsverlust bei kardialer Kachexie. In diesem Fall wird eine signifikante Erhöhung von TNF- α und dessen kataboler Wirkung als Erklärung herangezogen (McMurray et al., 1991). Die errechnete Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio bleibt an allen Tagen der Infektion in der vorliegenden Studie nahezu stabil. Aus welchem Grund in unserer Studie sowohl das Herzgewicht als auch das Körpergewicht der infizierten Mäuse am 7. Tag erst signifikant abfällt und dann am 28. Tag wieder deutlich ansteigt, bleibt ungeklärt.

5.4 Myokardiale Immunreaktion

In vielen vorangegangenen Studien wird die Immunreaktion als ausschlaggebende Größe für die Entwicklung einer kardialen Dysfunktion, Myokardschädigung und als Promoter für das pathologische Remodeling gesehen (Gifford R, 1951; Wilson et al., 1969). Kawai et al. (1991) beschreiben zur Erläuterung der Pathogenese der Myokarditis ein Mausmodell, bei dem man den Vorgang der Entzündung im Myokard nach Injektion des Virus in drei zeitliche Abschnitte aufteilt: akute, subakute und chronische Phase der Entzündung.

Diskussion

Während der akuten Phase konnte, wie auch in unserer Studie, eine vermehrte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden. Diesbezüglich wird in der Literatur vor allem von einer erhöhten Expression von IL-1 β sowie von Interferon- γ (Shioi et al., 1996; Matsumori A, 1997) berichtet. Zudem konnten erste histologische Veränderungen in Form von Nekrosen der Myozyten sowie Zeichen der Apoptose dokumentiert werden (Rose and Hill, 1996; Wilson et al., 1969). Zelluläre Infiltrationen wurden in der frühen Phase der Myokarditis nur gering dargestellt und setzten sich vor allem aus naturalen Killerzellen und Makrophagen zusammen (Seko et al., 1991; Feldman and McNamara, 2000). Dies erklärt in unserer Arbeit die gesteigerte Expression der proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-10 sowie Interferon- γ . Die Funktion von IL-1 β ist auf der einen Seite eine Stimulation der Expression von z.B. MMP-3 und MMP-8 auf mRNA-Ebene (Shioi et al., 1996; Matsumori A, 1997) und andererseits eine Inhibierung der TIMP-Expression in den Endothelzellen (Chow et al., 1992). Die Arbeitsgruppe von Shioi (Shioi et al., 1996) erbrachte nicht nur den Nachweis, dass eine erhöhte Expression von IL-1 β in einer myokardialen Fibrose im Mausmodell resultiert, sondern stellten wie auch in dieser vorliegenden Studie eine Expressionserhöhung von IL-1 β bei akuter EMCV-Myokarditis in DBA/2-Mäusen sogar bis zum 80. Tag p.i. dar. Auch eine weitere Arbeitsgruppe (Glück et al., 2001) zeigte bei NMRI-Mäusen mit CVB3-Infektion am 7. Tag p.i. eine erhöhte Expression von IL-1 β und IL-6. Die Synthese dieser proinflammatorischen Zytokine können durch uPA gefördert werden (Plesner et al., 1997) und somit zur ausgeprägten Herzschädigung beitragen.

Eine vermehrte Expression von IL-6, die in dieser Arbeit dargestellt werden konnte, führt zu einer erhöhten Produktion von TIMP-3 u. TIMP-1 und bleibt ohne Einfluß auf die Expression der MMPs, was zu einem Ungleichgewicht des MMP/TIMP-Systems führen kann (Huber et al., 1994; Nakano et al., 2001). Es scheint eine alleinige relative Ischämie oder hypoxischer Streß auszureichen, damit die kardialen Myozyten IL-6 produzieren (Yamauchi-Takahara et al., 1995). Eine vermehrte Expression von IL-6 sowie des entsprechenden Rezeptors werden zusammen für eine kardiale Hypertrophie bei Mäusen verantwortlich gemacht (Hirota et al., 1995). Eine andere Arbeitsgruppe bestätigte sogar eine erhöhte Expression von IL-6 bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz bei DCM sowie eine entsprechende Korrelation mit einer nachgewiesenen reduzierten systolischen Funktion (Plenz et al., 2001).

Diskussion

Unsere Untersuchungen verdeutlichen während der subakuten Phase (Tag 7) einen maximalen Anstieg der Expression von TNF- α , Interferon- γ , IL-2 und IL-10. Pauschinger et al. konnten bereits in einer Studie die verstärkte Expression von IL-10 bei BALB/c-Mäusen mit Myokarditis am 10. Tag p.i. nachweisen und somit die Ergebnisse dieser Studie bestätigen (Pauschinger et al., 2005).

Feldmann et al. wies in einem transgenen Tiermodell mit myokardialer Überexpression von TNF- α nach, dass diese Tiere einer Herzfunktionsstörung entsprechend das Bild der dilatativen Kardiomyopathie entwickeln (Feldman AM, 2000). TNF- α kann außerdem eine myokardiale Hypertrophie (Kubota et al., 1997) sowie eine Apoptose der Kardiomyozyten bewirken (Arstall et al., 1999). Durch eine Inhibition der TNF- α -Effekte mittels Antikörpern konnte dokumentiert werden, dass sich die Myokardfunktion verbesserte und die Aktivität der MMPs vermindert wurde (Kadokami et al., 2001). In hohen Konzentrationen verursacht TNF- α durch eine Synthesesteigerung von Stickstoffmonoxid kardiodepressive Effekte (Stein et al., 1996). Eine Studie mit TNF- α transgenen Mäusen wiederum belegte, dass der Quotient der totalen myokardialen MMP/TIMP- Expression signifikant erhöht ist (Sivasubramanian et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde die maximale Expression von INF- γ am Tag 7 p.i. dokumentiert. Klingel et al. beschreibt ein Maximum an Tag 12 p.i. bei resistenten C57BL/6-Mäusen, was seiner Meinung nach für eine effektive und früh beginnende antivirale Antwort sprechen könnte (Klingel et al., 2003). Bezüglich INF- γ konnte herausgefunden werden, dass dieses Zytokin nicht nur die virale Replikation reduziert, sondern auch zu einer verminderten Inflammation und folglich zu einer weniger ausgeprägten Fibrose nach Viruselimination führt (Afanasyeva et al., 2005). Andere Ergebnisse zeigten nach Behandlung von Mäusen mit anti-INF- γ -Antikörpern nach 3 Wochen eine deutlich ausgeprägtere Form der Myokarditis (Afanasyeva et al., 2001). Diese Ergebnisse verdeutlichen den protektiven Charakter von INF- γ im Mausmodell bezüglich einer Myokarditis.

Betrachtet man die chronische Phase, zeigt sich eine persistierende inflammatorische Antwort, die sich jedoch im Vergleich zu Beginn der Infektion eher von geringerer Intensität darstellt. Die Schädigung des kardialen Gewebes in dieser Phase lässt sich eindeutig auf die erhöhten inflammatorischen Zytokine sowie einer persistierenden myokardialen T-Zell-Infiltration zurückführen. Dies verursacht auf Dauer eine Degeneration der Myofibrillen, welche wiederum den Übergang von einer Myokarditis in eine dilatative Kardiomyopathie hervorrufen kann. So lässt sich während der

Diskussion

chronischen Phase in dieser Studie eine signifikante Erhöhung von IL-10 und INF- γ nachweisen. IL-10, ein Zytokin mit anti-inflammatorischer Eigenschaft, konnte eine protektive Rolle in einer Autoimmunmyokarditis zugesprochen werden (Li et al., 2005). Li et al. konnten demonstrieren, dass durch eine IL-10-Behandlung eine reduzierte Inflammation und dadurch eine verbesserte Hämodynamik und eine geringere Expression von IL-2 u. TNF- α nachgewiesen werden konnte. Nishii et al. postulierten, dass IL-10 wiederum die aktive virale Persistenz fördert. IL-10 soll dabei die Produktion von INF- γ durch naturale Killerzellen hemmen und somit zu einer verzögerten Virusbeseitigung beitragen (Nishii et al., 2004). Der mehrfach dokumentierte hemmende Einfluss von IL-10 auf die MMP-Synthese (Aretz et al., 1987), konnte durch diese Studie bei auffällig hoher Expression aller MMPs in den infizierten Tiergruppen nicht unterstützt werden. Hierbei sollte man jedoch die Vielfalt aller möglichen stimulierenden Effekte auf die Synthese im Ganzen bedenken.

Der Einfluß der inflammatorischen Antwort auf die myokardiale Nekrose konnte in dieser Arbeit signifikant in einer statistisch erstellten Korrelation zwischen den Parametern der Myozytolyse (INF- γ , IL6, IL-10 gegen MMP-8, MMP-3, TIMP-1) und der zellulären myokardialen Infiltration nachgewiesen werden.

5.5 Die extrazelluläre Matrix und deren Veränderung im Rahmen der Myokarditis

Die Störung des Gleichgewichtes der EZM ist ein entscheidender Faktor, der den Übergang der Myokarditis zur dilatativen Kardiomyopathie bewirkt. So wie inflammatorische Zytokine in die Regulation der Expression und Degradierung von Kollagen involviert sind, trägt die vermehrte inflammatorische Antwort zum pathologischen Kollagenverbrauch bei. Komponenten der EZM wie z.B. Kollagen Typ I und Typ III werden unter anderem von proinflammatorischen Zytokinen reguliert (Bouluyt et al., 1994). Diese indizieren auch die Expression von Metalloproteinasen (Deswal et al., 2001; Mauviel A, 1993; Siwik et al., 2000), welche für die Degradierung der EZM verantwortlich sind. Studien berichten von einer erhöhten Expression von TNF- α und IL-1 β , welche mit einer ebenso erhöhten Expression von Metallproteinasen und einer reduzierten Expression von TIMPs einhergehen. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibierung von TNF- α zu einer reduzierten Expression sowie zu einer verminderten Aktivität von MMPs führt, wodurch die linksventrikuläre Funktion

Diskussion

profitiert (Bradham et al., 2002). Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten unserer Studie überein, die eine Korrelation zwischen der Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , INF- γ und TNF- α) und der daraus resultierenden erhöhten Produktion von MMPs (MMP-3, -2 u. -8) und einer verringerten Synthese von TIMPs (TIMP-1, -3) zeigen. Auch die Arbeitsgruppe von Li et al. (2007) berichtet wie wir über eine gesteigerte Expression von MMPs u. über eine Reduktion von TIMPs. Über diese Unausgeglichenheit des MMP/TIMP-Systems während der Infektion wurde von Li et al. (2000) bereits berichtet. Der Schwerpunkt wurde hier, wie zuvor auch in unserer Studie, auf die induzierte Expression von MMPs und auf die reduzierte Produktion von TIMPs gelegt. Hieraus resultierte der Nachweis eines erhöhten Anteils an löslichem Kollagen ohne Zunahme des Gesamtkollagengehaltes (Li et al., 2002). Es wird postuliert, dass die Veränderungen des Kollagenmetabolismus durch eine Zerstörung des dreidimensionalen Kollagennetzwerkes sowie durch den Verlust der strukturellen Integrität des Myokards entstehen. Woodiwiss et al. veranschaulichten den Zusammenhang zwischen der Reduktion der „cross-links“ des Kollagens durch erhöhte MMP-Aktivität und den als Folge daraus gestiegenen Anteil des löslichen Kollagens. Diese Tatsache führte nachweislich zu einer LV-Dysfunktion, zum Remodeling und zu einer Kammerdilatation (Woodiwiss et al., 2001). Unsere Theorie des Ungleichgewichtes wird zusätzlich durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Cheung et al. bei CVB-3 infizierten A/J-Mäusen unterstützt (Cheung et al., 2005). Der Anstieg der MMP-Expression sowie deren Aktivität korrelierten auch hier signifikant mit der Entwicklung einer linksventrikulären Dilatation mit reduziertem Schlagvolumen und eingeschränkter Ejektionsfraktion. Dies bestätigt erneut den engen Zusammenhang zwischen Integrität der EZM und der linksventrikulären Funktion. In unserer Studie beschäftigten wir uns aus diesem Grund mit den relevanten MMPs wie z.B.: Kollagenasen u. Gelatinasen, um einen näheren Einblick in die Zusammenhänge der EZM-Komponenten zu erlangen.

Gelatinasen, in dieser Studie wurde MMP-2 untersucht, ermöglichen die weitere Teilung der zuvor gebildeten löslichen Fragmente. In der vorliegenden Arbeit war MMP-2 vor allem am 7. und 28. Tag p.i. signifikant erhöht. Sowohl die Studie von Tschöpe et al. (2004) als auch die Studie von Li et al. untermauert die von uns dargestellten Ergebnisse der erhöhten MMP-2-Expression (Pauschinger et al., 2005; Li et al., 2007). Diese Gelatinase A besitzt eine Substratspezifität für Laminin, Kollagen I, Kollagen IV sowie Fibronectin. Experimentelle Studien wiesen darauf hin, dass MMP-2 spezifisch im

Diskussion

linksventrikulären Myokard vermehrt nachgewiesen werden kann (Coker et al., 1998). Die gleiche Arbeitsgruppe (Coker et al., 1999) zeigte auch später eine isolierte Expression der Gelatinasen in linksventrikulären Myozyten, was folglich die These unterstützt, dass dadurch die Möglichkeit eines direkten Einflusses der Gelatinasen auf den Prozeß des kardialen Remodelings besteht (Woodruff JF, 1974). MMP-2 wird von Angiotensin II induziert, dies zeigte eine Arbeit mit neonatalen Fibroblasten der Ratte (Kühl et al., 1997). Dieses Ergebnis besitzt eine wichtige Relevanz für die Therapie mit ACE-Hemmern, durch deren Hilfe MMP-2 weniger induziert wurde u. somit die linksventrikuläre Funktion aufrechterhalten werden konnte.

Eine weitere Komponente stellt das MMP-3 dar, welches als Stromelysin Kollagen Typ I und Typ IV spaltet und die Aktivierung der inaktiv vorliegenden proMMPs initiiert (Rutschow et al., 2006). MMP-3 gilt somit als Schlüsselenzym des Matrixabbaus. Dieses Schlüsselenzym ist in unserer Arbeit in allen Phasen der Entzündung vermehrt exprimiert und führt durch eine gesteigerte Spaltung von Kollagen I u. IV zu dem in dieser Studie beschriebenen Verlust der strukturellen Integrität des Herzens. Betrachtet man nun die mRNA-Expression der restlichen MMPs im Vergleich zu MMP-3 in der akuten und subakuten Phase der Infektion sieht man, dass Stromelysin von allen drei MMP-Typen insgesamt am wenigsten stark exprimiert wurde. Dies könnte durch die starke Präsenz sowohl von INF- γ als auch von TNF- α bedingt sein, die wiederum beide die Expression von TIMP-1 zu diesem Zeitpunkt der Myokarditis fördern. Es ist bekannt, dass TIMP-1 z.B. MMP-3 inhibieren kann (Damian RT, 1964; Lane et al., 1992). TIMPs blockieren den Zugang der MMPs zu Matrixproteinen, indem sie an deren aktive Zentren binden.

Eine deutliche Reduktion von TIMP-1 stellte sich in dieser Arbeit bei den infizierten Mäusen der chronischen Phase ein. Die MMP-3/TIMP-1-Ratio war am 28. Tag signifikant erhöht. Bereits bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie konnte neben einer gesteigerten myokardialen MMP-3-Expression eine verminderte TIMP-1-Expression und damit das Missverhältnis des Quotienten MMP/TIMP dokumentiert werden (Li et al., 2000). Bei Patienten mit kardialer Dysfunktion konnte ebenso die verminderte Expression von TIMP nachgewiesen werden (Kandolf et al., 1999). In einem Mausmodell von Roten et al. (Chow et al., 1991) wird sogar gezeigt, dass eine TIMP-1-Depletion zur Verbesserung der kardialen Funktion führt.

Kollagenasen, z.B. in unserer Arbeit MMP-8, spalten nichtlösliche Kollagenfibrillen in lösliche Gelatinfragmente. MMP-8 besitzt eine Substratspezifität für Kollagen I u.

Diskussion

Kollagen III. Bezüglich MMP-8 stellte unsere Arbeit am 7. Tag p.i. einen prägnanten Anstieg der mRNA-Expression dar. Genau dieses Ergebnis erzielten wir bereits in einer vorherigen Arbeit (Pauschinger et al., 2005), allerdings wurde damals am 10. Tag der Infektion gemessen. In diesem Rahmen war es uns gelungen, den protektiven Effekt von Carvedilol im frühen Stadium der Myokarditis durch eine MMP-8-Reduktion nachzuweisen. Wir gehen davon aus, dass MMP-8 den Kollagenabbau in dieser Entzündungsphase initiieren kann, um mit Hilfe von anderen MMPs, den Kollagenturnover voranzutreiben und den Remodelingprozeß zu verstärken. Wird im Rahmen einer Therapie mit Carvedilol die MMP-8-Expression gehemmt, entsteht hieraus ein positiver Effekt für die linksventrikuläre Funktionsleistung des Herzens. Dieser Effekt kam nicht nach einer β_1 -selektiven Blockade mit Metoprolol zustande. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der myokardialen MMP-Expression und dem linksventrikulären Remodeling ließ sich in weiteren tierexperimentellen Studien (Coker et al., 1998; Spinale et al., 1998), in Knock-Out Versuchen (Roten et al., 2000) und durch Studien zu MMP-Inhibitoren (Peterson et al., 2001) aufzeigen.

Zu berücksichtigen ist jedoch, dass auch andere MMPs wie z.B. MMP-9 und andere Proteasen, welche in dieser Studie nicht untersucht wurden, an der Matrixdegradation beteiligt sind. So ist anzunehmen, dass unidentifizierte virale Proteasen am Abbau der Matrix teilhaben könnten, da in der vorliegenden Studie in allen infizierten Mäusen eine Persistenz enteroviralen Genoms mittels seminested-PCR dargestellt werden konnte.

Insgesamt lässt sich durch unsere Arbeit sowohl bei akuter als auch bei chronischer viraler Myokarditis ein Übergewicht der MMP-Expression und vor allem während der chronischen Phase der Myokarditis ein signifikanter Anstieg der MMP/TIMP-Ratio dokumentieren. Demzufolge stellt sich eine Degradation der extrazellulären Matrix dar, die sich vor allem in einer Verarmung der Kollagenquervernetzung ausdrückt, was wiederum als Konsequenz daraus zur Funktionseinschränkung des Herzens führt.

5.6 Die Kollagendegradation

Kollagen Typ I und III besitzen verschiedene physikalische Eigenschaften und stellen die Hauptbestandteile der myokardialen extrazellulären Matrix dar. Eine veränderte Kollagen I/Kollagen III-Ratio scheint eine große Wirkung auf die diastolische als auch

Diskussion

auf die systolische Funktion des Herzens. Dies erklärt sich durch die unterschiedlichen Funktionen des Kollagens. Kollagen III bildet ein elastisches Netzwerk, welches die kinetische Energie für eine elastische Rückstellung gewährleistet, wohingegen Kollagen I dem Myokard eine Zugfestigkeit ermöglicht. Bei einer isolierten Zunahme von Kollagen I kommt es daher zu einer myokardialen Steife. Somit ist zu vermuten, dass dies auch die Ursache für die in dieser Studie präsentierte diastolische Dysfunktion sein könnte (Oxlund et al., 1986), da wir zum Zeitpunkt der chronischen Myokarditis eine deutliche und signifikant erhöhte mRNA-Expression von Kollagen I nachweisen konnten. Desweiteren dokumentierten wir in dieser Arbeit am 28. Tag p.i. eine signifikant erhöhte Ratio von Kollagen I/Kollagen III. In einer vorangehenden Studie betrachteten wir diese Ratio bereits bei Patienten mit DCM und konnten eine Korrelation zwischen linksventrikulärer Funktion und einer gesteigerten Kollagen I/Kollagen III-Ratio darstellen (Pauschinger et al., 1999). Ein erhöhter Quotient lässt sich durch unterschiedliche Expressionslevel der MMPs sowie z. B. durch die gesteigerte Affinität von MMP-8 zu Kollagen III als zu Kollagen I erklären (Woessner et al., 1991). Sowohl in der akuten, als auch in der subakuten Phase der Myokarditis bestand keine signifikante Änderung der Expression von Kollagen Typ I auf mRNA-Ebene. Dies wurde durch die Ergebnisse von Pauschinger et al. bereits beschrieben (Pauschinger et al., 1999) und darauf zurückgeführt, dass lösliche Kollagenfragmente signifikant vermehrt in Western blot-Analysen nachgewiesen werden konnten und eine myokardiale Kollagen Degradierung hauptsächlich auf posttranslationaler Ebene stattfindet. Dieser posttranslationale Prozess des myokardialen Kollagennetzwerkes wurde mehrfach in Studien mit Ratten (Woodiwiss et al., 2001), mit Patienten mit DCM (Klingel et al., 1992) sowie in Untersuchungen bei Schweinen mit Tachykardie-induzierter Kardiomyopathie (Spinale et al., 1996) verdeutlicht. Alle diese Studien zeigten ein vermindertes „cross-linking“ des Kollagens, welches zu einem reduzierten Nachweis auf mRNA-Ebene von nativem, unlöslichen Kollagen führt.

Diese Arbeit stellt eine Zunahme des Gesamtkollagengehaltes im Myokard mittels Sirius red-Färbung dar. Diese Ergebnisse stehen damit im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen. Eine Erklärung für diese Zunahme des Kollagengehaltes könnte eine Synthesesteigerung durch Aktivierung verschiedener Zytokine sein. Alternativ hierzu käme ein verminderter Abbau der Kollagene in Frage, woraus eine Zunahme der Translation resultieren würde. Ein Forschungsergebnis von Heymans et al. (2006) bezog sich auf eine uPA-Deletion, die durch vermindertes

Diskussion

kardiales Remodeling und reduzierter Inflammation einer Fibrosierung entgegenwirken konnte. Auch in dieser Arbeit von Heymans et al. wurde ein erhöhter Gesamtkollagengehalt histologisch nachgewiesen.

Kollagen IV wird von Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Kardiomyozyten gebildet (Eghbali et al., 1989). Die Funktion des Kollagen IV in der Basalmembran liegt in der Stabilisierung der Zelle, die durch die zug- und reißfesten Eigenschaften der Kollagene erreicht wird. Dabei wird sichergestellt, dass die Architektur der Basalmembran und deren Funktion während physiologischer Formveränderungen nicht beeinträchtigt wird, wie z.B. bei den Kontraktions- u. Relaxationszyklen des Herzens. In dieser Lokalisation ist Kollagen IV ein wichtiger Baustein in der Basalmembran und ergänzt sich in der Funktion mit anderen Zellwandproteinen wie Laminin, Proteoglykanen und Integrinen. Es wird darüber berichtet, dass Kollagen VI und Kollagen IV interagieren und somit die Basalmembran mit der interstitiellen Matrix verankern (Kuo et al., 2010). Eine Degradation von Kollagen IV durch MMP-2 wird physiologisch sowie pathologisch im Rahmen der Wundheilung und bei Metastasen beobachtet (LeBleu et al., 2007; Khoshnoodi et al., 2008). Falk et al. (2002) demonstrierten eine Korrelation zwischen einer gesteigerten Expression von MMP-2 sowie der Degradation der Basalmembran. Dies belegt erneut, dass MMP-2 einen direkten Einfluss auf Kollagen IV besitzt und somit eine Hauptrolle im Rahmen des Remodelings der Basalmembran spielt. In unserer Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg von Kollagen IV der infizierten Tiere am 28. Tag p.i. dokumentiert werden. Es existieren in der Literatur bisher keine spezifischen Erfahrungsberichte bezüglich der Expression von Kollagen IV in Mausmodellen mit Myokarditis. In einer Arbeit konnte die gesteigerte Expression von Kollagen IV kurz nach einem Myokardinfarkt, d.h. zu dem Zeitpunkt einer inflammatorischen Antwort im Myokard in der peripheren Zone des Infarktes dargestellt werden (Yamanishi et al., 2010). Außerdem wurde das Vorkommen von Kollagen IV auf die Basalmembran der Myozyten sowie auf die Regionen der Fibrosebildung bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie begrenzt (Watanabe et al., 2001).

5.7 Bedeutung der Persistenz des Coxsackie-B3-Virus im Rahmen der Myokarditis

Mit dem Erreichen der maximal ausgeprägten Entzündungsinfiltration wird das CVB3 in der Regel vollständig aus dem Herzmuskel eliminiert. In Abhängigkeit von bisher unbekanntem genetischen Faktoren gelingt es jedoch dem CVB3, sich einer fortgeschrittenen Entzündungsreaktion im Wirt zu entziehen, um somit über die akute Virusreplikation hinaus zu persistieren. In diesem Zusammenhang sollte ebenfalls erwähnt werden, dass es sich bei einer chronischen Herzmuskelentzündung nicht zwingend um eine persistierende Virusinfektion handeln muss, da bereits durch McManus et al. eine postvirale Immunpathogenese der Myokardschädigung ohne die Persistenz eines Virus belegt wurde. Ferner wird die These postuliert, dass die virale RNA-Synthese bei persistierendem CVB3 auffällig langsamer stattfindet, als in der akuten Phase der Infektion des Herzens (Reetoo et al., 2000). In der vorliegenden Studie wurde durch die „nested“-PCR während der chronischen Phase (28. Tag p.i.) eine Viruspersistenz von 30% verdeutlicht, was als ausschlaggebender Faktor für die ausgeprägte Myokarditis zum späten Zeitpunkt der Infektion diskutiert werden kann. Diese Daten stimmen mit der Studie von Klingel et al. (2003) überein, in der man ebenso eine Viruspersistenz bei immunkompetenden SWR/J-Mäusen dokumentierte, die zu einer chronischen Myokarditis führte. DBA/1-Mäuse hingegen, die die virale RNA früh eliminieren und somit den inflammatorischen Prozess beenden können, scheinen nicht zu einer Chronifizierung zu neigen (Klingel et al. 1992). Kyu et al. konnten sogar mittels PCR in ihrer Studie eine persistierende virale RNA bis zum 90. Tag p.i. nachweisen (Kyu et al., 1992). Wee et al. dokumentierten bei EMC-Virus-induzierten DBA/2-Mäusen mit Myokarditis den deutlichen Nachweis des Virus von Tag 21 bis 42 der Infektion und schlussfolgerten hieraus, dass das EMC-Virus über die Phase der virusinduzierten Myozytolyse hinaus im Myokard persistieren kann (Wee et al., 1992). Wie erwartet, zeigte sich in der Versuchsgruppe der akuten und subakuten Infektionsphase bei allen Tieren enterovirale RNA, da in diesem Stadium der Infektion das Virus noch nicht vollständig eliminiert werden kann.

Die Ergebnisse von Kühl et al. (2003) weisen darauf hin, dass kardiale, persistierende sowie virale Infektionen als die Hauptursache für eine fortschreitende LV-Dysfunktion gelten und aus diesem Grund verstärkt an effektiven, antiviralen Therapieansätzen geforscht werden sollte. Dieser Ansatz wurde bereits in einer Studie begonnen, in der

Diskussion

man mit INF- β eine Viruselimination erwirken konnte, die zu einer Verbesserung der LV-Funktion führte (Kühl et al., 2003).

5.8 Analyse der Hämodynamik

Diese Studie zeigt eine detaillierte Charakterisierung der Veränderungen der Hämodynamik bei CVB3-infizierten SWR/J-Mäusen im Verlauf der verschiedenen Entzündungsphasen im Rahmen einer Myokarditis. Eine detaillierte Beurteilung der hämodynamischen Parameter ist aus den verschiedensten Gründen sinnvoll. In einem Mausmodell können lediglich die Aussagen zur Mortalität u. Morbidität sowie der subjektiv beurteilte klinische Status der Mäuse einen Hinweis auf mögliche pathologische Veränderungen der Mäuse mit einer Myokarditis geben. Durch diese Parameter ergeben sich jedoch nur äußerst vage Anhaltspunkte, sodass die Auswertung der kardialen Funktionsparameter für eine objektive Beurteilung der Auswirkungen der Virusmyokarditis essentiell ist. Mit dem Wissen, dass es sich bei einer CVB3-induzierten Myokarditis vor allem um eine linksventrikuläre Myokardschädigung handelt (Hashimoto I, 1986), die im schlimmsten Fall zu einer Linksherzinsuffizienz führt (Maisch B, 1996), konzentriert sich diese Arbeit auf die Erhebung der hämodynamischen Parameter bezüglich des linken Herzens. Insgesamt ermöglicht die Darstellung der einzelnen Funktionsparameter der Hämodynamik einen Überblick über den Zusammenhang des Remodelings und dessen Auswirkungen auf die linksventrikuläre Funktion zu den spezifischen Zeitpunkten der Infektion. Folglich wurde die Leistungsfähigkeit des Herzens durch die Ermittlung der Wandspannung des linken Ventrikels, der Herzfrequenz, des Schlagvolumens sowie der Relaxationsfähigkeit und der Kontraktilität dargestellt. Die hämodynamischen Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Herrn Prof. Dr. med. C. Tschöpe durchgeführt. Da die intrakardiale Druckmessung zu methodischen Fehlern neigt (Kennedy JW, 1975), wurde darauf geachtet, dass diese Versuchsreihe von einer einzelnen u. sehr erfahrenen Person durchgeführt wurde, um individuelle Schwankungen beim Messen zu verhindern.

Am 4. Tag der Entzündung zeigt sich ausschließlich eine diastolische Dysfunktion mit einem erhöhten LVEDP und einem reduzierten LVEDV ohne Beeinträchtigung der systolischen Parameter wie z.B. der systolischen Funktion (EF). Die vorliegenden

Diskussion

hämodynamischen Ergebnisse stehen im Einklang der von Nishio et al. veröffentlichten Daten. Die Arbeitsgruppe konnte ebenso eine diastolische Dysfunktion und ein reduziertes LVEDV nachweisen (Nishio et al., 2002). Diese beschriebene Dysfunktion erklärt man sich durch die Entwicklung eines interstitiellen Ödems des linken Ventrikels und durch eine temporäre Reduktion des LVEDV. In diesem frühen Stadium der Infektion liegt weder eine ausgeprägte inflammatorische Veränderung noch ein Remodeling des Myokards vor. Man postuliert, dass die diastolische Dysfunktion in der akuten Phase der Infektion am ehesten durch die Konsequenzen direkter viraler Effekte wie z.B. einer fokalen Nekrose von Myofibrillen entsteht (Shioi et al., 1996). Des Weiteren zeigen die proinflammatorischen Zytokine wie z.B. IL-1 β und TNF- α einen Einfluss auf die diastolische Dysfunktion, indem sie die Ca²⁺-ATPase des endoplasmatischen Retikulums schädigen, da dies vor allem die diastolische Relaxation reguliert (Yokoyama et al., 1993). Ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen der Gruppe Schwimmbeck et al. (1995) konnte in dieser Arbeit keine hyperdynamische Phase mit einer deutlichen Erhöhung von dP/dt-max und von LVESP bei den infizierten Tieren nachgewiesen werden. Für die akute Myokarditis entstanden bereits experimentelle Ansätze zu einer möglichen medikamentösen Therapie. Eine Behandlung mit IL-4 während der frühen Phase der Myokarditis zeigte deutliche Einflüsse auf die Expression von Zytokinen, sodass sich die systolischen Parameter u. somit die Herzfunktion dramatisch besserte. Diese Ergebnisse ließen sich am ehesten durch die Reduktion des MMP/TIMP-Verhältnisses unter IL-4-Therapie im Vergleich zur unbehandelten Gruppe erklären (Li et al., 2007).

Die in dieser Arbeit erhobenen Werte am 7. Tag der Infektion zeigen eine weitgehende Konkordanz mit den bislang veröffentlichten Veränderungen der hämodynamischen Parameter. Durch die Infektion mit Coxsackieviren kam es zu einer weiteren Einschränkung der kardialen Leistungsfähigkeit. In der subakuten Phase wurde eine Schädigung der systolischen sowie der diastolischen Funktion deutlich. Im Einzelnen betrachtet sanken der linksventrikuläre systolische Druck, dP/dt-max, das Schlagvolumen und die EF während der subakuten Phase ab, wohingegen LVEDV sowie LVESV anstiegen.

Betrachtet man die signifikante Reduktion des linksventrikulären systolischen Drucks, ist somit auch die Nachlast in allen virusinfizierten Tieren gesunken. Dies kann als linksventrikuläres Pumpversagen mit einem deutlichen Verlust des zirkulierenden peripheren Volumens gedeutet werden. Da auch die Kontraktilität mit dP/dt-max in der

Diskussion

Gruppe der infizierten Mäuse abgenommen hatte, spricht man in diesem Zusammenhang von einer Einschränkung der Kontraktilität des Ventrikels, die durch eine Destruktion des Myokards und durch das Ungleichgewicht im MMP/TIMP-System entsteht. Im Rahmen der Myokarditis kommt es zu einem Verlust von kontraktilen Elementen durch lokalisierte oder diffuse Zerstörung von Myokardzellen. Bezüglich der Parameter der Kontraktilität konnten Herzum et al. (1995) eine signifikante Korrelation zwischen der Reduktion des dP/dt -max und dem Höhepunkt der kardialen Entzündung am 10. Tag p.i. zeigen. Die eingeschränkte Kontraktilität (dP/dt -max) könnte sich in unserer Studie auf den signifikanten Anstieg der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β zu diesem Zeitpunkt der Infektion zurückführen lassen. Es ist bekannt, dass diese proinflammatorischen Zytokine sowohl eine direkte als auch eine indirekte negativ inotrope Wirkung besitzen, die den Verlust der myokardialen Kontraktilität auch in dieser Studie hervorgerufen haben könnten (Finkel et al., 1992). Des Weiteren ist durch direkte virale oder T-Zellvermittelte Zytolyse das myokardiale Gefüge gestört (Basti Weber et al., 1990; Marijjanowski et al. 1995; Pauschinger et al., 1999). Bezüglich der Auswertung und Beurteilung des Parameters der Kontraktilität ist zu bedenken, dass definitionsgemäß die Herzfrequenz einen entscheidenden Einfluß auf den Kontraktilitätswert besitzt. In dieser Studie blieb die Herzfrequenz jedoch nahezu konstant, sodass in diesem Fall die Reduktion der Kontraktilität nicht durch eine erhebliche Verlangsamung der Herzfrequenz begründet sein kann und somit keine Einschränkung der Aussagekraft besteht. Erstaunlicherweise wurde eine nahezu stabile Herzfrequenz der infizierten Tiere dokumentiert, obwohl man im Rahmen der entstandenen Herzinsuffizienz eher mit einem Anstieg der Frequenz durch β -Rezeptorstimulation als Kompensationsreaktion gerechnet hätte. Diese untypische Reaktion könnte durch eine beschriebene Schädigung des Reizleitungssystems durch Coxsackieviren zu erklären sein (Terasaki et al., 1992).

Die chronische Phase der viralen Entzündung zeigt eine signifikante Reduktion von dP/dt -min sowie der bereits während der subakuten Phase gefallen Parameter (LVESP, SV, dP/dt -max und EF) und einen signifikanten Anstieg von LVEDV und LVESV. Hierfür könnten die Viruspersistenz (Kühl et al., 2003) sowie der fortgeschrittene EZM-Turnover verantwortlich sein.

Die diastolische Relaxation der Herzmuskulatur wird mit dem Index dP/dt -min beschrieben und ist gleichfalls abhängig wie dP/dt -max von Nachlast u. HF. Wie erwartet verhalten sich demnach beide Parameter in der chronischen Phase gleich.

Diskussion

Erklärbar ist die Reduktion beider Werte durch die tendenzielle Abnahme der Herzfrequenz zum Zeitpunkt der chronischen Infektion. Die Nachlast (LVEDP) hingegen blieb am 28. Tag der Infektion eher stabil und veränderte sich nicht auffällig. Diese Ergebnisse erzielte auch die Arbeitsgruppe von Tschöpe et al. (2004), allerdings wurden diese Werte schon am 10. Tag der Infektion erhoben.

Der linksventrikuläre endsystolische Druck (LVESP) wird indirekt durch den Sympathikus reguliert, da er von der Nachlast des Herzens abhängig ist. Durch den erhöhten Sympathikotonus nimmt der Aortendruck zu, bedingt durch die Erhöhung des peripheren Widerstandes, als Ergebnis der Wirkung der Katecholamine an α_1 -Rezeptoren. Bei gleichzeitig ansteigender Vorlast soll dem Herzen die Möglichkeit gegeben werden, durch nun vermehrte und schnellere Füllung das zirkulierende Blutvolumen bei beginnender Herzinsuffizienz aufrecht zu erhalten. Versagen aber diese Mechanismen, z.B. im Verlauf einer Myokarditis, kommt es zum Abfall der maximalen Wandspannung und folglich zum Abfall des endsystolischen Drucks. Auch in dieser Studie konnte dieser Abfall vor allem am 28. Tag registriert werden. Dies deutet darauf hin, daß das Herz durch die Infektion nicht mehr in der Lage ist, sich den Belastungen anzupassen und gegen die erhöhte Vorlast entsprechende Drücke zu entwickeln. Dieses linksventrikuläre Pumpversagen geht mit einem reduzierten Blutvolumen einher, welches auch nicht durch den fehlenden kompensatorischen Anstieg der Herzfrequenz erhöht werden kann.

Die Beeinträchtigung der kardialen, ventrikulären Funktion wird durch verschiedene Faktoren während der unterschiedlichen Entzündungsphasen des Myokards verursacht. Die subakute Phase zeichnet sich durch den Beginn der Entstehung von inflammatorisch bedingten myokardialen Infiltrationen und durch die zytotoxische Wirkung der Viren aus, die insgesamt in einer Myozytolyse und frühen Veränderungen der extrazellulären Matrixkomponenten resultieren. Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bereits nach einer Woche beginnende Veränderungen der EZM durch Zytokine eine linksventrikuläre Depression hervorrufen konnten (Huber and Pfaeffle, 1994), während bei der chronischen Myokarditis ein fortschreitender Entzündungsprozess durch die Persistenz der Viren gefördert wurde. Dies wiederum verstärkt das Ungleichgewicht zwischen MMPs u. TIMPs, welches zu einer progressiven Beschädigung der extrazellulären Matrixkomponenten führt, das wiederum die Verschlechterung der linksventrikulären Funktion zur Folge hat. Erklärend dafür erscheint die Induktion der matrixabbauenden MMPs durch TNF- α und INF- γ und die

Diskussion

damit verbundene posttranslationale Degradation von Kollagen I und Kollagen III. Die fibrilläre Kollagenmatrix ist eine wichtige Komponente des linksventrikulären Myokards, welche die linksventrikuläre Geometrie beeinflusst. Wir konnten in dieser Arbeit die signifikante Korrelation zwischen ansteigender MMP-Expression und zunehmender linksventrikulärer Dilatation und reduziertem Schlagvolumen sowie eingeschränkter systolischer Funktion darlegen.

Ein Zusammenhang zwischen viraler Myokarditis und kardialer Dysfunktion konnte in zahlreichen Studien bereits belegt werden. So fanden Herzum et al. bei einer durch CVB3-ausgelösten Myokarditis in DBA/2-Mäusen eine deutliche Suppression von LVESP, dP/dt max und dP/dt min 10 Tage nach Infektion (Herzum et al. 1995). Eine andere Arbeitsgruppe transfundierte immundefizienten SCID-Mäusen Blut von Patienten mit gesicherter viraler Myokarditis und fand eine deutliche Minderung der systolischen Herzfunktion (Schwimmbeck et al., 1995).

Bezüglich eines Ansatzes zur gezielten u. effektiven Therapie bei viraler Myokarditis zur Verbesserung der linksventrikulären Funktion und vorzeitigen Vermeidung der Remodelingprozesse des Myokards erbrachte unsere Arbeit mit Carvedilol u. Metoprolol interessante Ergebnisse. Bei beiden β -Blockern konnten Verbesserungen in der Kontraktilität, der Relaxation und der ventrikulären Wandspannung gemessen werden. Die hämodynamischen Effekte der β -Blocker werden hauptsächlich auf die Reduktion der sympathischen Aktivität zurückgeführt, im Besonderen auf die Senkung des zyklischen AMP, Ca^{2+} -Gehalt und die Ca^{2+} abhängige ATPase-Aktivierung, um die Myozytenfunktion und Struktur zu erhalten. Ein weiterer Ansatzpunkt einer fortschrittlichen Therapie wäre die Erforschung einer medikamentösen MMP-Inhibition. In dieser Arbeit wurde ein direkter Zusammenhang zwischen dem MMP-TIMP-System und der Herzfunktion bei viraler Myokarditis präsentiert, wie bereits in bekannten früheren Studien bei verschiedenen anderen Herzerkrankungen zuvor (Zhang et al., 1993; Aplin et al., 1999).

6. Zusammenfassung

Im Rahmen einer CVB3-induzierten murinen chronischen Myokarditis kommt es durch die virale Persistenz zu einer chronischen myokardialen Inflammation und somit zu einem Ungleichgewicht des matrixregulierenden Systems. Das Missverhältnis zwischen erhöhter Expression von MMPs und reduzierter Expression von TIMPs fördert den pathologischen Umsatz von Kollagen. Dieser Prozess führt zu einem Verlust der strukturellen Integrität des Herzens. Es entsteht eine linksventrikuläre Dysfunktion und eine Dilatation der Ventrikel mit einer reduzierten Ejektionsfraktion. Diese Befunde stehen im Einklang mit der humanen dilatativen Kardiomyopathie. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des matrixregulierenden Systems bestehend aus MMPs, TIMPs, Kollagenen und Zytokinen sowie dessen Einfluss auf die hämodynamische Funktion im zeitlichen Verlauf der murinen Myokarditis.

Es wurde in 30, sechs Wochen alten männlichen SWR/J-Mäusen, mittels intraperitonealer Injektion von $1,5 \times 10^5$ PFU Coxsackievirus-B3 (Nancy Strain) eine virale Myokarditis erzeugt. 10 unbehandelte Kontrollen und 10 infizierte Mäuse dienten jeweils am 4., 7. und 28. Tag p.i. als Vergleichsgruppe bezüglich des zeitlichen Verlaufes der Myokarditis. Der Erfolg der Virusinfektion wurde durch den Nachweis des enteroviralen Genoms im Myokard mittels seminested-PCR vorgenommen. Im Rahmen der entstandenen Myokarditis wurden die resultierenden Einschränkungen der Herzfunktion durch hämodynamische Messungen beurteilt. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression von IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ , MMP-2, MMP-3, MMP-8, TIMP-1, Kollagen I, Kollagen III, und Kollagen IV in den einzelnen Versuchsgruppen verglichen und an der endogenen Expression von β -Aktin relativiert. Ferner wurde der Gesamtkollagenanteil mittels Sirius red-Färbung nachgewiesen.

Es konnte mittels hämodynamischer Messungen gezeigt werden, dass in der akuten Phase der Virusmyokarditis eine diastolische Dysfunktion besteht. Folglich konnte eine Schädigung sowie eine Dilatation des linken Ventrikels durch die CVB3-Infektion dokumentiert werden. Diese hämodynamischen Messungen korrelierten mit der gesteigerten Expression der pro-inflammatorischen Zytokine in der akuten Phase der Entzündung, was bisher noch in keiner Studie nachgewiesen werden konnte.

Die virusinduzierte kardiale Inflammation war mit einer signifikanten Induktion des MMP/TIMP-Systems verbunden, was in einem Ungleichgewicht der MMP/TIMP-Ratio

Zusammenfassung

während der chronischen Phase resultierte. Dieses Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs führte nachweislich zu einer linksventrikulären Dilatation.

Diese Ergebnisse im Mausmodell verdeutlichen die Relevanz der viralen Persistenz für eine chronische Myokarditis mit subsequenter chronischer Inflammation. Es folgt ein Ungleichgewicht des Matrixdegradationssystems mit pathologischem kardialen Remodeling als Konsequenz.

Hier liegt ein relevanter Therapieansatz der humanen progressiven linksventrikulären Dysfunktion bei chronischer Myokarditis mit CVB3-Persistenz. Durch eine pharmakologische MMP-Inhibition könnte nach diesen Ergebnissen ein günstiger Einfluss auf die matrixdegradierende Wirkung von MMPs genommen werden. Dies würde den erhöhten pathologischen Kollagenverbrauch im Rahmen des pathologischen Remodelings und somit eine kardiale Depression verhindern.

7. Literaturverzeichnis

Afanasyeva M, Wang Y, Kaya Z, Park S, Zilliox MJ, Schofield BH, Hill SL, Rose NR. Experimental autoimmune myocarditis in A/J mice is an interleukin-4-dependent disease with a Th2 phenotype. *Am J Pathol.* 2001;159:193-203

Afanasyeva M, Georgakopoulos D, Belardi DF, Bedja D, Fairweather D, Wang Y, Kaya Z, Gabrielson KL, Rodriguez ER, Caturegli P, Kass DA, Rose NR. Impaired up-regulation of CD25 on CD4⁺ T cells in IFN-gamma knockout mice is associated with progression of myocarditis to heart failure.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jan 4;102(1):180-5. Epub 2004 Dec 20

Antonio H: Mechanik der Herzaktion, in R Schmidt und G Thews (Hrsg.): *Physiologie des Menschen.* Springer, Berlin 1995, S. 464-465

Aplin AE, Howe AK, Juliano R. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:737-744

Archard L.C., Bowles N.E, Cunningham L et al. Molecular probes for detection of persisting enterovirus infection of human heart and their prognostic value.

Eur Heart J 1991;56-9

Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ Jr, Olsen EG, Schoen FJ. Myocarditis. A histopathologic definition and classification.

Am J Cardiovasc Pathol. 1987;1(1):3-14

Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ Res.* 1999 Oct 29;85(9):829-40

Baba T, Kanda T, Kobayashi I. Reduction of cardiac endothelin-1 by angiotensin II type 1 receptor antagonist in viral myocarditis of mice. *Life Sci.* 2000;67(5):587-597

Literaturverzeichnis

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

Bachmaier K, Pummerer C, Liu P et al. Low-molecular weight tumor necrosis factor receptor p55 controls induction of autoimmune heart disease. *Circulation* 1997;95:655-661

Badorff C, Knowlton K. Role of CVB protease 2A in dystrophin destruction. *Nat Med.* 1999;5:320-326

Baughman KL. Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria. *Circulation* 2006;113(4):593-5. Review.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW: Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science.* 1997;275(5304):1320-1323

Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Boden MK, Windsor LJ. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250

Bishop JE, Greenbaum R, Gibson DG, Yacoub M, Laurent GJ. Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol.* 1990;22(10):1157-1165

Bischof JE, Laurent GJ. Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart. *Eur Heart J* 1995;16 (SupplC):38-44

Bouluyt, M.C., O'Neil, L., Mededith, A.L., 1994. Alteration in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure: Marked upregulation of genes encoding extracellular components. *Circ. Res.* 75, 25–32

Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ Jr, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor

necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation*. 1998;97(14):1382-1391

Bradham WS, Moe G, Wendt KA, et al. TNF-a and myocardial metalloproteinases in heart failure: relationship to LV remodeling.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002; 282:H1288-H1295

Brooks BP, Stromblad S, Sanders LC et al. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha V\beta 3$.
Cell 1996;85:683-693

Borg TK, Ranson WF, Moslehy FA, Caulfield JB: Structural basis of ventricular stiffness. *Lab Invest* 1981,44:49-54

Bowles N.E, Richardson PJ, Olsen E. et al. Detection of Coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* 1986;1120-3

Burns WH, Billups LC, Notkins AL. Thymus dependence of viral antigens.
Nature 1975;256:654-56

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

Chao CC, Hu S, Sheng WS, Tsang M, Peterson PK. Tumor necrosis factor-alpha mediates the release of bioactive transforming growth factor-beta in murine microglial cell cultures. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995;77(3):358-65

Chello M, Mastroroberto P, Romano R, Perticone F, Marchese AR. Collagen network remodeling and left ventricular function in constrictive pericarditis.
J Mol Cell Cardiol. Heart 1996; 75(2):184-189

Cheung C, Luo H, Yanagawa B, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis.

J Carpath 2005; 15:63-74

Chow LH, Radio SJ, Sears TD, et al: Insensitivity of right ventricular endomyocardial biopsy in the diagnosis of myocarditis. J Am Coll Cardiol 1989;14:915-920.

Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM. Differential effects of myocarditic variants of coxsackievirus B3 in inbred mice. Lab Invest. 1991;64:55-64

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;66:24-31

Clements GB. Characteristics of viruses inducing cardiac disease. In: Banatvala JE ed: Viral infections in the heart.1993; pp.1-22

Coats WD, Whittacker P, Cheung DT, Currier JW, Han B, Faxon DP. Collagen content is significantly lower in restenotic versus nonrestenotic vessels after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit model. Circulation.1997;95:1293-1300

Coker ML, Thomas CV, Clari MJ, Hendrick JW, Krombach RS, Galis ZS, et al. Myocardial matrix metalloproteinase activity and abundance with congestive heart failure. Am J Physiol 1998;274:H1516-23

Coker ML, Doscher MA, Thomas CV, Galis ZS, Spinale FG. Matrix metalloproteinase activity and expression in isolated LV myocyte preparations.

Am J Physiol 1999;277:H777-87

Conca W, Kaplan PB, Krane SM. Increases in levels of procollagenase mRNA in human fibroblasts induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, or serum follow c-jun expression and are dependent on new protein synthesis.

Trans Assoc Am Physicians. 1989;102:195-203

Craighead JE, Huber SA, Sriham S: Biology of disease: Animal models of piconavirus-induced autoimmune disease: Their possible relevance to human disease. *Lab Invest.* 1990;63:432-446

Dalton D, Pitts-Meek S, et al. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- α genes. *Science*1993;259:1739-42

Damian RT. Molecular Mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am Nat.* 1964;98:129-149

Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and Cytokine Receptors in Advanced Heart Failure : An Analysis of the Cytokine Database from the Vesnarinone Trial (VEST). *Circulation* 2001; 103:2055-2059

Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res.* 1995;77(5):863-8. Review

Eghbali M, Blumenfeld O, Seifter S. Localization of the fibers I, III, and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:103–13

Emonard H, Grimaud JA. Matrix metalloproteinases. A review. *Cell Mol Biol* 1990;36:131-153

Factor Sm. Robinson TF, Dornitz R. Alterations of the myocardial skeletal framework in acute myocardial infarction with and without ventricular rupture. *American J Cardiovasc Path* 1986;1:96-97

Falk V, Soccia PM, Grunenfelder J, et al. Regulation of matrix metalloproteinases and effect of MMP-inhibition in heart transplant related reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:53–58

Feinstone SM, Hensley GT, Rytel MW. Post-coxsackie virus B3 myocardial pathology in mice. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1973;1;144(1):345-50

Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med.* 2000 Nov 9;343(19):1388-98

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):387-389

Fiorentino D, Zlotnick T, Mosmann N et al. Il-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991;147:3815-22

Friedrich MG, Sechtem U, Schulz-Menger J, Holmvang G, Alakija P, Cooper LT, White JA, Abdel-Aty H, Gutberlet M, Prasad S, Aletras A, Laissy JP, Paterson I, Filipchuk NG, Kumar A, Pauschinger M, Liu P; Cardiovascular magnetic resonance in myocarditis: A JACC White Paper. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(17):1475-87

Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, et al.. Processing of tumor necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature.* 1994;370(6490):555-557

McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC Jr, Boyer CM, Champion B, Connolly KM, Conway JG, Furdon P, Karp S, Kidao S, et al.. Regulation of tumor necrosis factor-alpha processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature.* 1994;370(6490):558-561

Gifford R, Dalldorf G. The morbid anatomy of experimental coxsackie virus infection. *Am J Pathol.* 1951;27:1047-1064

Glück B, Schmidtke M, Merkle I, Stelzner A, Gemsa D. Persistent expression of cytokines in the chronic stage of CVB3-induced myocarditis in NMRI mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(9):1615-26

Godeny EK, Gauntt CJ. Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3 induced murine myocarditis. *J Immunol.* 1986;137(5):1695-1702

Literaturverzeichnis

Godeny EK, Gauntt CJ. Interferon and natural killer cell activity in coxsackievirus B3 induced murine myocarditis. *Eur Heart J.* 1987;8(suppl.):433-435

Godeny EK, Gauntt CJ. Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replikation. *J Immunol.* 1987;139:913-8

Godman GC, Bunting H, Melnick JL. The histopathology of coxsackievirus infection in mice. I. Morphologic observations with four different viral types. *Am J Pathol.* 1952;28:223-258

Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE: Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 1996: 271 (48): 30375-30380

Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: A tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962;48:1014-1022

Hashimoto I. Myocarditis in mice infected with coxsackievirus B3. *Br J Exp Path.* 1986;67:737-745

Hasty KA, Jeffrey JJ. The collagen substrate specificity of human neutrophil collagenase. *The Journal of Biochem Chem* 1987;262(21):10048-10052

He CS, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(8):2632-6

Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL: The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol.* 1995;69(11):6720-6728

Herskowitz A, Ahmed-Ansari A, Neumann DA, et al: Induction of major histocompatibility complex antigens within the myocardium of patients with active myocarditis: a nonhistologic marker of myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:624-632

Herzum M, Mahr P, Wietzychowski F, Jomaa H, Weller R, Spengler D, Ruppert V, Maisch B. Left ventricular hemodynamics in murine viral myocarditis. *Eur Heart J.* 1995;16 Suppl O:28-30

Heymans S, Pauschinger M, De Palma A, Kallwellis-Opara A, Rutschow S, Swinnen M, Vanhoutte D, Gao F, Torpai R, Baker AH, Padalko E, Neyts J, Schultheiss HP, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator or matrix metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis. *Circulation.* 2006;114:565-73

Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T- Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May 23;92(11):4862-6

Huber SA, Job LP, Woodruff JF. Lysis of infected myofibres by coxsackievirus B3 immune T lymphocytes. *Am J Pathol.* 1980;98:682-694

Huber SA, Lodge PA. Coxsackievirus B-3 myocarditis in BALB/c mice. Evidence for autoimmunity to myocyte antigens. *Am J Pathol.* 1984;116(1):21-29

Huber SA. The role of immune mechanisms in pathogenesis, in Bendinelli M, Friedman H (eds): *Infectious agents and pathogenesis: Coxsackieviruses: a general update.* New York, Plenum Press, 1988,pp 103-116

Huber SA, Polgar J, Schultheiss P, Schwimmbeck 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

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;68:5126-5132

Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schönian U, Maisch B. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID). First epidemiological results. *Herz*. 2000;25(3):279-85

Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation in the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1986;261(9):4337-4345

Ignatz RA, Endo T, Massague J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 1987;262(14):6443-6446

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarisation microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11:447-455

Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. *Arch histol jap*. 1978;41(3):267-274

Kadokami T, Frye C, Lemster B, Wagner CL, Feldman AM, Mc-Tiernan CF. Anti-tumor necrosis factor-alpha antibody limits heart failure in a transgenic model. *Circulation* 2001;104:1094-7

Kanda T, Koike H, Arai M, Wilson JE, Carthy CM, Yang D, McManus BM, Nagai R, Kobayashi I. Increased severity of viral myocarditis in mice lacking lymphocyte maturation. *Int J Cardiol*. 1999 Jan;68(1):13-22

Kandolf R., Klingel K; Molecular mechanisms in the pathogenesis of enteroviral heart disease: acute and persistent infections; *Clinical immunology and immunopathology*;1993,153-158

Kandolf R. The molecular pathogenesis of enterovirus myocarditis. Virus persistence and chronic inflammation. *Internist (Berl)*. 1995;36(5):430-8

Kandolf R. Myocarditis and cardiomyopathy. *Verh. Dtsch. Ges. Path*. 1996;127-38

Kandolf R. Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy.
Med Klin 1998;215-22

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):149-158

Kapadia S, Torre-Amione G, Yokoyama T, Mann DL. Soluble TNF binding proteins modulate the negative inotropic properties of TNF-alpha in vitro.
Am J Physiol. 1995;268(2 Pt 2):H517-525

Katz SD, Rao R, Berman JW, Schwarz M, Demopoulos L, Bijou R, LeJemtel TH: Pathophysiological correlates of increased serum tumor necrosis factor in patients with congestive heart failure. Relation to nitric oxide-dependant vasodilation in the forearm circulation. *Circulation* 1994;90(1):12-16

Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past to the future. *Circulation.* 1999;99(8):1091-1100

Kennedy JW. Cardiac hemodynamics. In: Strandness DE, Summer DS eds. *Hemodynamics for surgeons.* Grune & Stratton Inc., New York. 1975:47-72

Kereiakes D.J, Parmley W.W. Myocarditis and cardiomyopathy.
Am Heart J 1984;1318-26

Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV.
Microsc Res Tech 2008 May;71(5):357-70

Kim HE, Dalal SS, Young E, Legato MJ, Weisfeldt ML, D'Armiento J: Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction.
J Clin Invest 2000;106(7):857-866

Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, Klingel K, Bültmann B, Müller T, Lindinger A, Böhm M. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis.

Circulation 2008;118:639-648

Kinoshita T, Sato H, Takino T et al. Processing a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase. A by a recombinant-membrane-type I matrix metalloproteinase. *Cancer Research* 1996;56:2535-2538

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):1247-1254

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.

Circulation. 1987;61(5):715-725

Kishimoto C, Ochiai H, Sasayama S. Immunological mechanisms in experimental coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Jpn Circ J*. 1991 Nov;55(11):1144-8

Klingel K, Hohenadl C, Canu A et al. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation.

Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:314-318

Klingel K, Schnorr JJ, Sauter M, Szalay G, Kandolf R. beta2-microglobulin-associated regulation of interferon-gamma and virus-specific immunoglobulin G confer resistance against the development of chronic coxsackievirus myocarditis.

Am J Pathol. 2003 May;162(5):1709-20

Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem*. 1996;271(3):1544-50

Kodama M et al. Rat dilated cardiomyopathy after autoimmune giant cell myocarditis. *Circ Res* 1994;75(2):278-284

Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res*. 1997 Oct;81(4):627-35

Kühl U, Noutsias M, Seeberg B et al. Immunohistological evaluation of myocardial biopsies from patients with dilated cardiomyopathy. *J Heart Failure* 1994;231-45

Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP. Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart* 1996;75(3):295-300

Kühl U, Schultheiss HP. Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf Myokarditis. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 1996;153-61

Kühl U, Pauschinger M, Schultheiss HP. New concepts in the diagnosis of inflammatory myocardial disease. *Deutsch Med Wochenschrift* 1997;690-8

Kühl U, Pauschinger M, Schultheiss HP. Ätiopathogenetische Differenzierung der entzündlichen Kardiomyopathie: Immunsuppression und Immunmodulation. *Internist*. 1997;38:590-601

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

Kuo HJ, Maslen CL, Keene DR, Glanville RW. Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. *J Biol Chem* 1997;17;272(42):26522-9

Kyu B, Matsumori A, Sato Y, Okada I, Chapman NM, Tracy S. Cardiac persistence of cardioviral RNA detected by polymerase chain reaction in a murine model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1992;86(2):522–530

LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007 Oct;232(9):1121–9

Lee AA, Delhaas T, McCulloch AD, Villerreal FJ. Different responses of adult cardiac fibroblasts to in vitro biaxial strain patterns. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1833-43

Leipner C, Grün K, Borchers M. The outcome of CVB3-induced myocarditis is influenced by the cellular immune status. *Herz* 2000;25:245-248

Li J, Schwimmbeck PL, Tschöpe C, Leschka S, Husmann L, Rutschow S, et al. Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. *Cardiovasc Res* 2002;56:235-47

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):1123-1129

Li YY, McTiernan CF, Feldman AM: Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* 2000: 46 (2): 214-224

Li Y, Heuser JS, Kosanke SD, Hemric M, Cunningham MW. Protection against experimental autoimmune myocarditis is mediated by interleukin-10-producing T cells that are controlled by dendritic cells. *Am J Pathol.* 2005 Jul;167(1):5-15

Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation* 2000;102:1874-1876

Lijne Pj, Petrov VV, Fagard RH. Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. *J Renin Angiotensin Aldosteron syst* 2001;2:117-22

Liu P, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 2001, 104:1076-1082

MacArthur C.G, Tarin D, Goodwin J.F et al. The relationship of myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1984;1023-35

Maisch B. Immunological regulator and effector functions in perimyokarditis postmyocarditic heart muscle disease and dilated cardiomyopathy. *Basic Res 1986 Cardiol* 81(1);217-242

Maisch B, Kochsiek K, Gold R. International symposium inflammatory heart disease. *Eur Heart J* 1987;8(J)

Maisch B. Autoreactive mechanisms infective endocarditis. *Springer Sem 1989 Immunopathol* 11:439-456

Maisch B. Kollagenkrankheiten und weitere rheumatische Erkrankungen. *Springer* 1989;296-325

Maisch B. Autoreactivity to the cardiac myocyte, connective tissue and the extracellular matrix in heart disease and postcardiac injury. *Springer Sem Immunopathol* 1989;11:369-396

Maisch B, Bauer E, Cirsi M, Kochsiek K. Cytolytic cross-reactive antibodies directed against the cardiac membrane and viral proteins in Cocksackievirus B3 and B4 myocarditis. *Circ* 1993;87(IV):49-65

Maisch B: Entzündliche Herzerkrankungen (Endokarditis, Myokarditis und Kardiomyopathien). In: Classen M, Diehl V, Kochsieck K eds.: *Lehrbuch der Inneren*

Medizin, Verlag Urban & Schwarzenberg. 1991: 1040-1068

Mak TW. Insights into the ontogeny and activation of T-cells.
Clin Chem. 1994;40:2128-2131

Mall G. The morphology of myocarditis. Internist (Berl). 1995;36(5):426-9. Review

Malkusch W, Rehn B, Bruch J. Advantages of sirius red staining for quantitative morphometric collagen measurements in lungs. Exp Lung Res. 1995;21:67-77

Martino TA, Liu P, Petric M et al. Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy: a review of clinical and experimental studies. In: Rotbart HA. Ed. Human Enterovirus Infections . Washington DC: ASM Press; 1995:291-351

Martino T, Petric M, Weingartl H et al. The Coxsackie-adenovirus-receptor (CAR) is used by reference strains and clinical isolates representing all 6 serotypes of coxsackievirus group B, and by swine vesicular disease virus.
J Virol 2000;271:99-108

Marijjanowski MM, Teeling P, Mann J, Becker AE. Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment. J Am Coll Cardiol. 1995;25(6):1263-72

Matsumori A, Yamada T, et al. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. Br Heart J. 1994;72:561-566

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. Review

Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression.
J Cell Biochem. 1993;53(4):288-95. Review

McMurray J, Abdullah I, Dargie HJ, Shapiro D. Increased concentrations of tumor necrosis factor in "cachectic" patients with severe chronic heart failure.

Brit Heart J 1991;66(5):356-358

Melnick JL. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Fields BN ed:Virology.

Raven Press, New York, USA, 1990. pp 549-605

Mertens T. possibilities and limits of virologic diagnosis in suspected virusinduced cardiomyopathy. Internist (Berl) 1995;439-47

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin A, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clones. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol. 1986;136(7):2348-2357

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

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today. 1996;17(3):138-46. Review

Mosmann TR, Li L, Hengartner H, Kagi D, Fu W, Sad S: Differentiation and functions of T cell subsets . Ciba Found Symp. 1997;204:148-154; discussion 154-158

Murphy G, Allan JA, Willenbrock F, Cockett MI, O'Connell JP, Docherty AJ. The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity.

J Biol Chem. 1992;267(14):9612-8

Murphy G, Knauper V: Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain? Matrix Biol 1997: 15 (8-9): 511-518

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

Naparstek Y, Plotz PH. The role of autoantibodies in autoimmune disease.

Annu Rev Immunol 1993;11:79-104

Neu N, Rose NR, Beisel et al. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. J Immunol 1987;139(11):3630-3636

Neumann S, Huse K, Semrau R. Aldosterone and d-glucose stimulate the proliferation of human cardiac myofibroblasts in vitro. Hypertension 2002;39:756-60

Nishii M, Inomata T, Takehana H, Takeuchi I, Nakano H, Koitabashi T, Nakahata J, Aoyama N, Izumi T. Serum levels of interleukin-10 on admission as a prognostic predictor of human fulminant myocarditis.

J Am Coll Cardiol. 2004 Sep 15;44(6):1292-7

Nishio R, Matsumori A, Shioi T, Ishida H, Sasayama S. Treatment of experimental viral myocarditis with interleukin-10. Circulation. 1999;100(10):1102-8

Nishio R, Sasayama S, Matsumori A Left ventricular pressure-volume relationship in a murine model of congestive heart failure due to acute viral myocarditis.

J Am Coll Cardiol. 2002 Oct 16;40(8):1506-14

Obermeyer U, Scheidler J, Maisch B. Antibodies against micro-and-intermediate filaments in carditis and DCM- are they a diagnostic marker? Eur Heart J 1987;8(J):181-186

Olbrich H.-G. Epidemiologie- Ätiologie der DCM, 2000 Z Kardiol 90:Suppl 1,I/2-I/9

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. N Engl J Med. 1997;336(16):1131-41

Opavsky M, Penninger J, Aitken K et al. Susceptibility to myocarditis is dependent on the response of $\alpha\beta$ T lymphocytes to coxsackieviral infection.

Circ Res 1999;85:551-558

Oxlund H. Relationships between the biomechanical properties, composition and molecular structure of connective tissues. *Connect Tissue Res.* 1986;15(1-2):65-72

Pauschinger M, Kühl U, Dörner A et al. Detection of enteroviral RNA in endomyocardial biopsies in inflammatory cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Z Kardiol.* 1998;123(48):443-52

Pauschinger M, Doerner A, Remppis A, Tannhauser R, Kuhl U, Schultheiss HP. Differential myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation. *Cardiovasc Res.* 1998;37(1):123-9

Pauschinger M., Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck P, Kühl U, Schultheiss H.-P. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* 1999; 99:2750-2756

Pauschinger M, Leschka S, Spillmann F, Li J, Poller W, Noutsias M, Husmann L, Schwimmbeck PL, Tschoepe C. IL-4 induziert bei Coxsackie B3 infizierten BALB/c Mäusen die infekbedingten Auswirkungen auf Herzfunktion, MMP-3 und TIMP-1 Expression durch Induktion von TGF- β 1. *Z. Kardiol* 2002;91 (Supplement 1):I/101

Pauschinger M, Rutschow S, Chandrasekharan K, Westermann D, Weitz A, Peter Schwimmbeck L, Zeichhardt H, Poller W, Noutsias M, Li J, Schultheiss HP, Tschoepe C. Carvedilol improves left ventricular function in murine coxsackievirus-induced acute myocarditis association with reduced myocardial interleukin-1beta and MMP-8 expression and a modulated immune response.

Eur J Heart Fail. 2005 Jun;7(4):444-52

Penninger JM, Pummerer C, Liu P et al. Cellular and molecular mechanisms of murine autoimmune myocarditis. *APMIS.* 1997;105:1-13

Peterson JT, Hallak H, Johnson L, Li H, O'Brien PM, Sliskovic DR, Bocan TM, Coker ML, Etoh T, Spinale FG. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure.

Circulation. 2001;103(18):2303-9

Pickering JG, Boughner DR. Fibrosis in the transplanted heart and its relation to donor ischemic time. Assessment with polarized light microscopy and digital image analysis. Circulation 1990;81(3):949-958

Plesner T, Behrendt N, Ploug M. Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR.

Stem Cells. 1997;15:398-408

Plenz G, Song ZF, Tjan TD, Koenig C, Baba HA, Erren M, Flesch M, Wichter T, Scheld HH, Deng MC. Activation of the cardiac interleukin-6 system in advanced heart failure. Eur J Heart Fail. 2001 Aug;3(4):415-21

Putschler H, Meloan SN, Waldrop FS. Are picro- dye reactions for collagens quantitative? Chemical and histochemical considerations.

Histochemistry. 1988;88:243-256

Rabin ER, Hassan SA et al. Coxsackie virus B3 myocarditis in mice.

Am J Pathol 1964;44:775-797

Rager-Zisman, Allison AC. The role of antibody and host cells in the resistance of mice against infection by Coxsackie B3 virus. J Gen Virol 1973;19:329-338

Reetoo KN, Osman SA, Ilavia SJ, Camerron-Wilson CI, Banatvala JE, Muir P. Quantitative analysis of viral RNA kinetics in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis : biphasic pattern of clearance following acute infection, with persistence of residual viral RNA throughout and beyond the inflammatory phase of disease.

J Gen Virol. 2000;81(Pt 11):2755-62

Reyes M and Lerner M. Coxsackievirus myocarditis- with special reference to acute and chronic effects. *Progress in Cardiovascular Diseases*, Vol XXVII, No 6, 1985:pp373-394

Rezzonico R, Burger D, Dayer JM. Direct contact between T lymphocytes and human dermal fibroblasts or synoviocytes down-regulates types I and III collagen production via cell-associated cytokines. *J Biol Chem*. 1998;273(30):18720-8

Richardson P.J. Clinical aspects of myocarditis. In: *Myocarditis and related disorders*, eds. M. Sekiguchi, E.G.J Olsen and J.F. Goodwin. Springer Verlag 1985;97-100

Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995;376(6):345-355

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(12):4167-4171

Romagnani S. Human TH1 und TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;98(4),279-285

Rose NR, Hill SL. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996;80(3.2):92-99

Roten L, Nemoto S, Simsic J, Coker ML, Rao V, Baicu S, Defreyte G, Soloway PJ, Zile MR, Spinale FG. Effects of gene deletion of the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-type 1 (TIMP-1) on left ventricular geometry and function in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(1):109-120

Rutschow S, Li J, Schultheiss HP, Pauschinger M. Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Res*. 2006;69:646-56

Literaturverzeichnis

Sakakibara S, Konno S. Endomyocardial biopsy (Editorial).

Jpn Heart J. 1962;537-543

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-491

Samsonov M et al. Serum neopterin- possible immunological marker of myocardial inflammation in patients with dilated heart muscle disease.

Eur Heart j 1991;12(D):151-153

Sato H, Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMP) in tumor metastasis. *J Biochem* 1996 119:209-215

Schmidtke M, Gluck B, Merkle I, Hofmann P, Stelzner A, Gemsa D. Cytokine profiles in heart, spleen, and thymus during the acute stage of experimental coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis. *J Med Virol*. 2000;61(4):518-26

Schultheiss HP. New concepts in viral heart disease.

Springer-Verlag, c1988. xi, 504 p.: ill.

Schultheiss HP, Kühl U, Janda I et al. Immunosuppressive therapy of myocarditis? *Herz* 1992;112-21

Schultheiss HP, Pauschinger M, Kühl U. Pathogenesis of inflammatory cardiomyopathies. *Med Klin* 1998;229-35

Schwartzkopff B, Klein R.M. Diagnosis and therapy of myocarditis.

Internist (Berl) 1995;469-83

Schwimmbeck PL, Badorff C, Rohn G, Schulze K, Schultheiss HP. Impairment of left ventricular function in combined immune deficiency mice after transfer of peripheral blood leukocytes from patients with myocarditis. *Eur Heart J*. 1995,16 Suppl O:59-63

Seder RA, Gazinelli AP, Sher A, Paul W. Interleukin-12 acts directly on CD4+ T cell to enhance priming for IFN- γ production and diminishing interleukin-4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10188-92

Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635-73

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;69(2):360-367

Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, Takaku F, Yazaki Y. Expression of perforin in infiltrating cells in murine heart and acute myocarditis caused by Coxsackievirus B3. *Circulation.* 1991;84(2):788-795

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 May;170(1):53-8

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):1327-1336

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):105-108

Seko Y, Takahashi N, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Effects of in vivo administration of anti-B7-1/B7-2 monoclonal antibodies on murine acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Circ Res.* 1998;82(5):613-618

Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation* 1996; 94(11):2930-2937

Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, MacLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, Mann DL. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* 2001;104(7):826-31

Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* 2000; 86 :1259-65

Smith S, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell mediated disease. *J Immunol* 1991;147:2141-7

Sobernheim J. *Praktische Diagnostik der inneren Krankheiten mit vorzüglicher Rücksicht auf pathologische Anatomie.* Hirschwald, Berlin. 1837; 118

Spinale FG, Zellner JL, Johnson WS et al. Cellular and extracellular remodeling with the development and recovery from tachycardia induced cardiomyopathy: changes in fibrillar collagen, myocyte adhesion capacity and proteoglycans.

J Mol Cell Cardiol 1996;28:1591–1608

Spinale FG, Lannini JP, Mukherjee R, Melton DM, de Gasparo M. Angiotensin AT1 receptor inhibition, angiotensin-converting enzyme inhibition, and combination therapy with developing heart failure: cellular mechanisms of action.

J Card Fail. 1998;4(4):325-32

Spinale FG, Coker ML, Krombach SR, Mukherjee R, Hallak H, Houck WV, Clair MJ, Kribbs SB, Johnson LL, Peterson JT, Zile MR. Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure: effects on left ventricular dimensions and function. *Circ Res.* 1999;85(4):364-76

Springman E.B., Angleton E.L., Birkedal-Hansen H., Van Waart H.E. (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine-switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 364-368

Stein B, Frank P, Schmitz W, Scholz H, Thoenes M. Endotoxin and cytokines induce

direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol.* 1996 Aug;28(8):1631-9

Stetler-Stevenson W. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *A J P* 1996;148(5):1345-1350

Strauer B.E. Consensus conference. Myocarditis-dilated cardiomyopathy. Inaugurated by German Society of Internal Medicine. *Internist (Berl)* 1995;484-502

Suda T, Zlotnik A. A origin, differentiation and repertoire selection of CD3+, CD4+, CD8+ thymocytes bearing either $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cell receptors. *J Immunol* 1993;150:447-455

Takino T, Sato H. Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs from a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem* 1995;270:23013-23020

Tan LB, Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res.* 1991;69(5):1185-95

Terasaki F, James TN, Nakayama Y, Daguchi H, Kitaura Y, Kawamura K: Ultrastructural alterations of the conducting system in mice exhibiting sinus arrest or heart block during coxsackievirus B3 acute myocarditis. *Am Heart J.* 1992;123:439-451

Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A, Kawai C. Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *J Am Coll Cardiol.* 1986;7(4):868-872

Tracy S, Chapman NM and Beck MA 1991. Molecular biology and pathogenesis of coxsackie B viruses. *Rev. Med. Virol.* 1:145-154

Tschöpe C, Westermann D, Steendijk P, Noutsias M, Rutschow S, Weitz A, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Pauschinger M. Hemodynamic characterization

of left ventricular function in experimental coxsackieviral myocarditis: effects of carvedilol and metoprolol. *Eur J Pharmacol.* 2004 May 3;491(2-3):173-9

Van Grevelde S, S. and De Jager H. Myocarditis in new borns caused by Coxsackie virus. Clinical and prognostic data. *Ann Pediatr.* 1956;100-12

Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinckerhoff CE. Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1996;6(4):391-411. Review

Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, Wong HL, Klotman PE. Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(10):4577-81

Watanabe T, Kusachi S, Yamanishi A, Kumashiro H, Nunoyama H, Sano I, et al. Localization of type IV collagen alpha chain in the myocardium of dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Jpn Heart J* 1998 Nov;39(6):753-62

Watanabe K, Nakazawa M, Fuse K, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y, Ohnuki T, Gejyo F, Maruyama H, Miyazaki J. Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin-10 by electroporation. *Circulation.* 2001;104(10):1098-100

Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res.* 1988;62(4):757-65

Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH, Armstrong PW. Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation.* 1990;82(4):1387-1401

Wee Lily, Liu P, Penn L et al. Persistence of viral genome into late stages of murine myocarditis detected by PCR. *Circulation* 1992;86:1605-1614

Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Research in Cardiology* 1994;89:397-410

Why HJF, Meany BT, Richardson PJ, Olsen EGJ, 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;89:2582-2589

Why H. Enteroviruses and myocarditis. *Br J Hosp Med* 1995;430-4

Wilson F, Miranda Q, Chason J, Lerner A. Residual pathologic changes following murine Coxsackie A and B myocarditis. *Am J Pathol*. 1969;55:253-265

Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, et al. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation*. 2001 103:155-60

Woodruff JF, Kilbourne ED. The influence of quantitated post-weaning undernutrition on Coxsackievirus B-3 infection of adult mice: I-Viral persistence and increased severity of lesions. *J Infect Dis* 1970;121:137-163

Woodruff JF, Woodruff JJ. Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of Coxsackie virus B3 heart disease. *J Immunol*.1974;113:1726-34

Woodruff JF. Lack of correlation between neutralizing antibody production and suppression of Coxsackie virus B3 replication in target organs: Evidence for involvement of mononuclear inflammatory cells in host defense. *J Immunol* 1979;123:31-36

Woodruff JF. Viral myocarditis: a review. *Am J Pathol*. 1980;101:425-483

Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 1991;5(8):2145-54. Review

Yamada T, Matsumori A, Sasayama S. Therapeutic effect of anti-tumor necrosis factor-alpha on the murine model of viral myocarditis induced by ECM.

Circulation. 1994;89:846-851

Yamanishi A, Kusachi S, Nakahama M, Ninomiya Y, Watanabe T, Kumashiro H, et al. Sequential changes in the localization of the type IV collagen alpha chain in the infarct zone: immunohistochemical study of experimental myocardial infarction in the rat. *Pathol Res Pract* 1998;194(6):413-22

Yamauchi-Takahara K, Ihara Y, Ogata A, Yoshizaki K, Azuma J, Kishimoto T. Hypoxic stress induces cardiac myocyte-derived interleukin-6.

Circulation. 1995 Mar 1;91(5):1520-4

Yanagawa B, Spiller O, Choy J, Luo H. CVB3-associated myocardial pathology and viral load reduced by recombinant soluble human decay-accelerating factor in mice.

Lab Invest 2003;83:75-85

Zhang HY, Yousef GE, Ouyang X, Archard LC: Characterisation of a murine model of myocarditis induced by a reactivated Coxsackievirus B3.

Int J Exp Pathol 1994, 75:99-110

Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, Rom WN. Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure.

J Immunol. 1993;150:4188-4196

Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian heart. *J Clin Invest*. 1993;92(5):2303-1

8. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
ATPase	Adenosintriphosphatasen
bidest	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel (1 Bq = 1 Zerfall / s)
Ca ²⁺	Calcium
CAR	<i>coxsackieadenoviral receptor</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleinic acid</i>
CM	Kardiomyopathie
CVB3	Coxsackievirus Typ B 3
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleinic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
EMCV	Enzephalomyokarditisvirus
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
EZM	extrazelluläre Matrix
g	Gramm
g	Gravitationsbeschleunigung (g = 9,81 m/s ²)
h	Stunde
Hf	Herzfrequenz (min ⁻¹)
HZV	Herzzeitvolumen
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös

IFN	Interferon
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
M	molar
MC	Myokarditis
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (1 mmHg = Pa)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT-MMP	<i>membrane-type matrix metalloproteinase</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PFU	<i>plaqueforming units</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
p.i.	post infectionem
proMMP	Proenzymform der MMP
RNA	<i>ribonucleinic acid</i>
rpm	„rounds per minute“
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SV	Schlagvolumen
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borate-EDTA
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
t-PA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
u	<i>unit</i>

u-PA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
WHO	<i>World Health Organisation</i>

9. Danksagung

Ich danke dem Direktor der Medizinischen Klinik II des Campus Benjamin Franklin, Herrn Prof. Dr. H.-P. Schultheiss für die Möglichkeit, in seiner Einrichtung wissenschaftlich zu arbeiten.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Matthias Pauschinger für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, aber auch für seine Betreuung und Geduld danken. Er begleitete meine Arbeit mit Interesse und wertvollen Anregungen.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Carsten Tschöpe für die Durchführung der hämodynamischen Untersuchung in seiner Arbeitsgruppe danken.

Für das freundliche Arbeitsklima, die anregenden Diskussionen und ihre Hilfsbereitschaft bedanke ich mich recht herzlich bei meinen Doktorandenkollegen Susanne Rutschow, Sebastian Leschka, Lars Husmann, Katharina Hoppe und Florian Reichenbach. Besonders bei Susanne Rutschow möchte ich mich persönlich für die sehr gute Betreuung und Einarbeitung bedanken.

Bei Herrn Dr. Jun-Li, Herrn Zingler, Frau Nöhring, Ulla Kobalz und Kerstin Puhl bedanke ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre im Labor sowie für die immer freundliche und geduldige Unterstützung bei praktischen und theoretischen Schwierigkeiten.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Ehemann für die moralische Unterstützung. Er stand mir stets mit wissenschaftlichen Ratschlägen zur Seite und sorgte immer wieder für die nötige Motivation.

10. Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

11. Publikationsliste

Originalarbeiten:

Rutschow S, Leschka S, Westermann D, Puhl K, **Weitz A**, Ladyszenskij L, Jaeger S, Zeichhardt H, Noutsias M, Schultheiss HP, Tschöpe C, Pauschinger M. Left ventricular enlargement in coxsackievirus-B3 induced chronic myocarditis -- ongoing inflammation and an imbalance of the matrix degrading system. Eur J Pharmacol. 2010 Mar 25;630(1-3):145-51.

Pauschinger M, Rutschow S, Chandrasekharan K, Westermann D, **Weitz A**, Peter Schwimmbeck L, Zeichhardt H, Poller W, Noutsias M, Li J, Schultheiss HP, Tschöpe C. Carvedilol improves left ventricular function in murine coxsackievirus-induced acute myocarditis association with reduced myocardial interleukin-1beta and MMP-8 expression and a modulated immune response. Eur J Heart Fail. 2005 Jun;7(4):444-52.

Tschöpe C, Westermann D, Steendijk P, Noutsias M, Rutschow S, **Weitz A**, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Pauschinger M. Hemodynamic characterization of left ventricular function in experimental coxsackieviral myocarditis: effects of carvedilol and metoprolol. Eur J Pharmacol. 2004 May 3;491(2-3):173-9.

Kongressbeiträge:

Pauschinger M, Rutschow S, Leschka S, **Weitz A**, Puhl K, Ladyschewskij L, Noutsias M, Klingel K, Kandolf R, Tschöpe C. Mißverhältnis im MMP/TIMP-System führt zur myokardialen Fibrose mit linksventrikulärer Dysfunktion im chronischen Myokarditis Modell an CVB-3 infizierten SWR/J-Mäusen. Z Kardiologie 93: Suppl 3 (2004). V1536

Rutschow S, Leschka S, Westermann D, **Weitz A**, Poller W, Noutsias N, Pauschinger M. Die Bedeutung des oxidativen Stresses, unter Einflußnahme von proinflammatorischen Zytokinen, auf den Verlauf der chronischen Myokarditis im

Übergang zur dilatativen Kardiomyopathie. Z Kardiol 2004 Z Kardiol 93: Suppl 3 (2004). P1392

Pauschinger M, Kumaran C, Rutschow S, **Weitz A**, Leschka S, Noutsias M, Westermann D, Schwimmbeck P. Hemmung der TGF- β 1-Expression und Verbesserung der linksventrikulären Funktion durch β -Adrenorezeptor-Blockade mit Carvedilol in CVB-3-induzierter akuter Myokarditis. Z Kardiol 2003;92(Suppl I):I-10

Rutschow S, Tschoepe C, **Weitz A**, Schwimmbeck PL, Westermann D, Chandrasekharan K, Schultheiss HP, Pauschinger M. Attenuation of Interleukin-1b by carvedilol in coxsackievirus-induced acute myocarditis. Eur. Heart J. Aug/Sept 2003, (24) Abstract Suppl.: 677.

Rutschow S, Leschka S, Westermann D, **Weitz A**, Puhl K, Pauschinger M. Prävention der linksventrikulären Dysfunktion durch den nicht selektiven beta-Blocker Carvedilol in CVB-3-induzierter akuter Myokarditis. Dtsch Med Wochenschr 2003;128(Suppl.3):P69 (Young Investigator Award)

Rutschow S, Tschöpe C, **Weitz A**, Noutsias M, Poller W, Rauch U, Leschka, Westermann D, Schwimmbeck P, Pauschinger M. Carvedilol führt zur Modulation der MMP- und IL—1 β -Expression sowie zu einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion bei muriner Myokarditis. Z Kardiol 2003;92(Suppl. I):I-331

Tschöpe C, Westermann D, Rutschow S, **Weitz A**, Pauschinger M. Hemodynamic characterization of left ventricular function in experimental coxsackieviral myocarditis: effects of carvedilol and metoprolol. Z Kardiol 2003;92(Suppl. I):I-394

12. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Anneke Verlohren, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Analyse der Zusammenhänge und Verläufe der Zytokine, Interleukine und der extrazellulären Matrix bei akuter und chronischer viraler Myokarditis bei SWR/J-Mäusen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 03.03.2011

Anneke Verlohren