

Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
Aus der Klinik für Kardiologie und Pulmologie,  
Medizinische Klinik II  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiss

**Der Einfluss einer prolongierten Interleukin-4-Behandlung auf Inflammation,  
Matrixdegradationssystem und linksventrikuläre Funktion im  
Myokarditis-Mausmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde  
Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Christina Kampf  
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. M. Pauschinger

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. R. Dechend

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 03.02.2009

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> <span style="float: right;"><b>7</b></span>
1.1	Virale Myokarditis beim Menschen <span style="float: right;">7</span>
1.2	Enterovirale Myokarditis bei SWR/J-Mäusen <span style="float: right;">9</span>
1.3	Coxsackieviren <span style="float: right;">10</span>
1.4	Pathogenese der experimentellen viralen Myokarditis <span style="float: right;">11</span>
1.4.1	Akute Phase <span style="float: right;">11</span>
1.4.1.1	Virale Zytolyse <span style="float: right;">12</span>
1.4.1.2	Zytokine und Zellinfiltrat <span style="float: right;">12</span>
1.4.2	Subakute Phase <span style="float: right;">12</span>
1.4.2.1	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) <span style="float: right;">13</span>
1.4.2.2	Stickstoffmonoxid (NO) <span style="float: right;">14</span>
1.4.2.3	Zytokine <span style="float: right;">15</span>
1.4.2.4	Differenzierung von CD4 <sup>+</sup> -T-Helferzellen zu Th <sub>1</sub> - bzw. Th <sub>2</sub> -Zellen <span style="float: right;">16</span>
1.4.2.5	B- und T-Lymphozyten <span style="float: right;">19</span>
1.4.3	Chronische Phase <span style="float: right;">20</span>
1.4.3.1	Kardiale Virusgenompersistenz <span style="float: right;">21</span>
1.4.3.2	Extrakardiale Virusinfektion <span style="float: right;">22</span>
1.4.3.3	Autoimmunreaktion <span style="float: right;">22</span>
1.4.4	Die kardiale extrazelluläre Matrix <span style="float: right;">23</span>
1.4.4.1	Remodeling der extrazellulären Matrix <span style="float: right;">24</span>
1.4.4.2	Matrixmetalloproteinasen <span style="float: right;">25</span>
1.4.4.3	Inhibitoren der Metalloproteinasen <span style="float: right;">28</span>
1.5	Problemstellung <span style="float: right;">29</span>
<b>2</b>	<b>Versuchstiere, Material und Methodik</b> <span style="float: right;"><b>31</b></span>
2.1	Tiere <span style="float: right;">31</span>
2.2	Virus <span style="float: right;">31</span>
2.3	Material <span style="float: right;">31</span>

2.3.1	Antikörper, Enzyme, Primer und Chemikalien	31
2.3.2	Lösungen	34
2.3.3	Arbeitsgeräte und Programme	35
2.3.4	Verbrauchsartikel	37
2.4	Tierversuche	38
2.5	Versuchsanordnung	38
2.6	Gewebepräparation	39
2.7	Molekularbiologische Methoden (Polymerase-Kettenreaktion)	39
2.7.1	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.7.2	RNA-Extraktion mittels TRIZOL <sup>®</sup>	40
2.7.3	DNase Verdau	41
2.7.4	Reverse Transkription	42
2.7.5	Optimierung der PCR-Bedingungen	42
2.7.5.1	Primeranlagerungstemperatur	43
2.7.5.2	Zyklenzahl	43
2.7.6	RT-PCR und Nested-RT-PCR	44
2.7.7	Semiquantitative RT-PCR	46
2.7.8	Agarosegelelektrophorese	48
2.8	Proteinchemische Methoden	49
2.8.1	Proteinextraktion mittels RIPA-Puffer	49
2.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	50
2.8.3	Gelatin-Zymographie der MMP-2-Aktivität	50
2.8.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
2.8.3.2	Gelatin-Zymographie	51
2.8.3.3	Gel-Färbung und -Entfärbung	52
2.9	Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten	52
2.9.1	Anfertigung von Paraffinschnitten	52
2.9.2	Grundlagen der indirekten immunhistochemischen Färbung	53
2.9.3	Immunhistochemische Färbung von CD3 <sup>+</sup> -Zellen	54
2.9.3.1	Entparaffinierung der Schnitte und Antigendemaskierung	54
2.9.3.2	Antikörperbindung und Farbreaktion	55

2.9.4	Immunhistochemische Färbung von CD11b <sup>+</sup> -Zellen	56
2.9.5	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	56
2.10	Messung der Hämodynamik	57
2.10.1	Theorie der Konduktanzmethode	57
2.10.2	Operativer Eingriff und Messvorgang	58
2.11	Statistische Analyse	59
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
3.1	Verhalten der Versuchstiere, Krankheitsverlauf und Mortalität	61
3.2	Körper- und Herzgewicht der Versuchstiere	61
3.3	Ergebnisse der RT-PCR	62
3.3.1	Nachweis enteroviraler RNA	62
3.3.2	Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR	63
3.3.2.1	mRNA-Expression von Zytokinen	64
3.3.2.2	mRNA-Expression von MMP-2, MMP-3 und MMP-9	66
3.3.2.3	mRNA-Expression von TIMP-4	68
3.3.2.4	MMP/TIMP-4 Quotienten	69
3.3.2.5	mRNA-Expression von uPA und tPA	69
3.3.2.6	mRNA-Expression von Kollagen Typ I und Typ III	70
3.4	Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung von MMP-2	71
3.5	CD3 <sup>+</sup> -Lymphozyten und CD11b <sup>+</sup> -Makrophagen	72
3.6	Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchungen	74
3.6.1	Korrelationen nach Pearson	76
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1	SWR-Mäuse und Krankheitsverlauf	79
4.2	Inflammatorische Parameter	80
4.3	Extrazelluläre Matrix	83
4.4	Hämodynamik	89
4.5	Studienlimitierung und Ausblick	95

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>132</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis	132
7.2	Abbildungsverzeichnis	135
7.3	Tabellenverzeichnis	137
7.4	Publikationsverzeichnis	138
7.5	Selbstständigkeitserklärung	139
7.6	Lebenslauf	140
7.7	Danksagung	142

# 1 Einleitung

## 1.1 Virale Myokarditis beim Menschen

Die Myokarditis ist definiert als eine fokale oder diffuse entzündliche Erkrankung des Myokards, die akut, subakut oder chronisch verläuft. Der Entzündungsprozess kann von wenigen subepikardialen Entzündungsherden der linken Ventrikelwand bis hin zu einem diffusen Befall beider Ventrikel reichen (1, 2, 3). In ätiologischer Hinsicht können eine Vielzahl von infektiösen (Viren, Bakterien, Pilze, Spirochäten, Protozoen, Würmer) und nichtinfektiösen Faktoren (Kardiotoxine, Systemerkrankungen, allergische Reaktionen) eine Myokarditis auslösen. In den westlichen Industrienationen sind Viruserkrankungen die häufigste Ursache einer akuten Myokarditis (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Während in früheren Untersuchungen vor allem Enteroviren, insbesondere Coxsackievirus B3, ätiologisch verantwortlich gemacht wurden (10, 11), zeigen neuere Studien, dass auch Adenoviren, Parvovirus B19 und humanes Herpesvirus-6 eine große Rolle spielen (4, 7, 9, 12).

Die Patienten sind häufig symptomarm oder sogar asymptomatisch und nur selten treten eine akute Herzinsuffizienz oder vital bedrohliche Herzrhythmusstörungen auf (1, 13). Der klinische Verlauf ist überwiegend günstig und die Myokarditis heilt spontan innerhalb von Wochen aus (1, 14). Bei einem Teil der Patienten geht jedoch die akute in eine chronische Myokarditis über, die nach derzeitigem Kenntnisstand in eine inflammatorische dilatative Kardiomyopathie einmünden kann (15, 16, 17).

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM), die durch eine Erweiterung und verminderte Pumpleistung eines oder beider Ventrikel charakterisiert ist (18, 19), ist die häufigste Herzmuskelerkrankung. Seit vielen Jahren wird die akute bzw. chronische virale Myokarditis als eine wichtige Ursache neben den ischämischen und valvulären Erkrankungen diskutiert (11, 18, 20, 21). Bowles et al. (22) wiesen bereits 1986 bei Patienten mit Myokarditis sowie bei denen mit dilatativer Kardiomyopathie enterovirale RNA in nahezu 50% der Endomyokardbiopsien nach. Kühl et al. (9) fanden bei zwei Drittel von 245 erwachsenen Patienten mit DCM im Myokard virales Genom von einem weiten Spektrum kardiotroper Viren. Die pathogenetische Bedeutung dieser Befunde wird durch eine Studie gestützt, die zeigte, dass die virale Persistenz

bei DCM mit einer progredienten Funktionsstörung und die spontane Elimination mit einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion verbunden sind (23). Auch eine Behandlung der DCM mit Interferon- $\beta$  führte zum Verschwinden des bis dahin persistierenden viralen Genoms und zu einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Dysfunktion (24).

Der klinischen Bedeutung der Myokarditis bzw. der DCM steht eine nur lückenhafte Kenntnis der Pathogenese gegenüber. Dieses Erkenntnisdefizit erklärt sich durch die besondere Situation beim Menschen, die die Aufklärung der Myokarditispathogenese erschwert. Aufgrund des häufig symptomarmen Verlaufs setzt die Diagnostik bei vielen Patienten erst zu einem Zeitpunkt ein, zu dem der Krankheitsverlauf schon mehr oder weniger weit fortgeschritten ist. Darüber hinaus erlauben die zur Verfügung stehenden nichtinvasiven diagnostischen Mittel nur unspezifische Aussagen. Informationen über die Pathogenese liefern sie nicht.

Zweifellos haben die klinische Einführung der Endomyokardbiopsie und die histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Materialaufarbeitung einen deutlichen Fortschritt gebracht. Jedoch handelt es sich bei der Endomyokardbiopsie um ein invasives Verfahren, das mit einer Mortalität von etwa 0,03% verbunden ist (25, 26). Vielfach wird deshalb erst dann eine Biopsie diskutiert, wenn eine therapierefraktäre akute oder chronische Herzinsuffizienz unklarer Ätiologie vorliegt (26, 27). Zudem verläuft ein Teil der Myokarditiden fokal, so dass eine repräsentative Materialgewinnung erschwert oder gar unmöglich sein kann (2, 26). Dementsprechend wird die Sensitivität der endomyokardialen Biopsie in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Biopsie, dem Ort der Materialgewinnung, dem Untersucher und der Bezugsgröße zwischen 35 - 60% angegeben (28, 29). Selbst bei adäquater Materialgewinnung wird nur eine punktuelle Aussage ohne eine klare zeitliche Zuordnung zu dem dynamischen pathogenetischen Ablauf möglich sein.

Aufgrund dieser Probleme beim Menschen wurden experimentelle Myokarditismodelle entwickelt, die eine raschere und exaktere Aufklärung der Pathogenese erlauben. So wurde bei verschiedenen Mausstämmen mit unterschiedlichen Agenzien eine Myokarditis induziert und anschließend untersucht. In Analogie zur klinischen Situation wurde häufig das Modell einer viralen Myokarditis durch Infektion mit Coxsackievirus B3 gewählt. In diesen Rahmen ordnet sich auch die vorliegende Arbeit ein, die es sich zur Aufgabe gemacht hat, die Bedeutung einer



Interleukin-4-Gabe bei der murinen Coxsackievirus B3 induzierten Myokarditis bei SWR/J-Mäusen zu klären.

## **1.2 Enterovirale Myokarditis bei SWR/J-Mäusen**

Von Grodums und Dempster (30) wurde über ein murines, picornavirusinduziertes Myokarditismodell berichtet, das in Variationen in unzähligen nachfolgenden Untersuchungen zur Anwendung kam. Hierzu wurden eine ganze Reihe verschiedener Mausstämmen verwandt wie Balb/c- (31), C3H/He- (32), A/J- (33), NMRI- (34), SWR-Mäuse (35) und andere. SWR/J-Mäuse sind Labortiere mit dem H-2 Haplotyp q2, die genetisch gut definiert sind und in der Forschung für verschiedenste Zwecke genutzt werden. Es handelt sich um immunkompetente, permissive Mäuse, bei denen es im Verlauf der Infektion zu einer Persistenz viraler RNA in Milz und Lymphknoten kommt (36). Klingel et al. (37) untersuchten die Rolle der Enterovirus-Replikation in der Entwicklung der akuten und chronischen Herzmuskelerkrankung bei unterschiedlichen immunkompetenten Mausstämmen. Hierbei kamen sie unter anderem zu dem Ergebnis, dass die Läsionen während der akuten myokardialen Infektion bei SWR/J-Mäusen im Vergleich zu anderen Mausstämmen relativ stark ausgeprägt sind. Enterovirale RNA konnte im akuten Stadium in Herz, Milz, Lymphknoten, Pankreas, Lunge, Thymus, Leber und Gehirn nachgewiesen werden. Eine persistierende Infektion entwickelte sich jedoch nur im Herzmuskel, in der Milz und in den Lymphknoten. Ferner stellten die Autoren fest, dass die persistierende Infektion in SWR/J-Mäusen unabhängig von dem H-2 Haplotyp zu sein scheint. Vielmehr vermuteten sie als Ursache für die Chronifizierung eine Restriktion der Virusreplikation und der Kapsid-Proteinsynthese im Zusammenhang mit der Unfähigkeit immunkompetenter Zellen, virusinfizierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Trotz des ubiquitären viralen Organbefalls und der ausgeprägten Myokarditis wiesen die SWR/J-Mäuse nur eine geringe Mortalität auf. Diese Eigenschaften lassen SWR/J-Mäuse für die experimentelle Untersuchung der Pathogenese der akuten sowie der chronisch persistierenden Myokarditis gut geeignet erscheinen.

### 1.3 Coxsackieviren

Zur Induktion einer experimentellen viralen Myokarditis werden häufig Coxsackieviren verwandt. Dies liegt insofern nahe, als beim Menschen Coxsackieviren zu den häufigsten Erregern der viralen Myokarditis gehören (4, 10, 11). Zwar ist der Mensch der einzige natürliche Wirt, jedoch lassen sich verschiedene Tiere wie Mäuse, Ratten und Hamster mit Coxsackieviren experimentell infizieren (38, 39). Coxsackieviren sind Enteroviren und gehören der Familie der Picornaviren an. Es handelt sich um kleine (~ 27 nm), unbehüllte ikosaederförmige RNA-Viren, bestehend aus einem linearen RNA-Plusstrang und einem Kapsid. Das Kapsid setzt sich aus zwölf Pentameren mit jeweils fünf Protomeren zusammen. Ein Protomer besteht aus vier verschiedenen Strukturproteinen (VP1 - VP4), wobei VP1 - VP3 die Oberfläche des Virions bilden und VP4 auf der Innenseite des Kapsids lokalisiert ist. Die Proteine VP1 - VP3 sind unter anderem für die Virusgestalt verantwortlich, das Protein VP4 dient der Stabilisierung des Kapsids sowie der Interaktion mit dem Genom. Virologisch werden bei den Coxsackieviren im Wesentlichen die zwei Gruppen A mit A1 - A22, A24 und B mit B1 - B6 Serotypen unterschieden. Die einzelnen Gruppen bzw. Serotypen besitzen eine unterschiedliche Organaffinität und führen demgemäß im Krankheitsfall zu unterschiedlicher Symptomatik. Coxsackieviren vom Typ B, insbesondere B3 (CVB3), sind durch kardiotope Eigenschaften gekennzeichnet, die sie zur Myokarditisinduktion prädestinieren (40, 41).

Voraussetzung für die Entwicklung einer Myokarditis ist die Bindung des Virus an Membranproteine der Zelle. Für diese Ankopplung ist auf Seiten der Coxsackieviren Typ B das VP1-Protein verantwortlich. Sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen konnte ein gemeinsamer Rezeptor für die Bindung der strukturell unterschiedlichen Coxsackieviren Typ B und Adenoviren der Gruppe A, C, D, E und F, der so genannte Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) identifiziert werden (42). Hierbei handelt es sich um einen 365 Aminosäuren umfassenden, transmembranösen Rezeptor der Immunglobulin-Superfamilie, der in Verbindung mit anderen Rezeptoren für die Virusbindung (z.B. decay-accelerating factor, DAF [CD55]; aktiviert unter anderem das Komplementsystem) und die Virusinternalisierung verantwortlich ist (43, 44). Während die CAR-Expression im gesunden Myokard gering ist, erfolgt anscheinend im Rahmen einer Myokarditis bzw. DCM eine starke Hochregulation (45, 46). Die Expression von CAR auf der Zielzelle beeinflusst einerseits die primäre zelluläre Infektion, andererseits aber

auch die Virusausbreitung, die Virusreplikation und die Viruspersistenz, z.B. in Form eines extrakardialen Reservoirs. Nach der Penetration des Virus kommt es innerhalb von Minuten zur Freisetzung der RNA in das Zellzytoplasma mit anschließender komplementärer RNA-Strangbildung.

Lyden et al. (47) konnten im Tiermodell zeigen, dass der Verlauf der CVB3-Myokarditis hormonabhängig ist. So wiesen mit Testosteron behandelte Mäuse eine etwa dreifach stärkere Expression des myokardialen CVB3-Rezeptors und/oder akzessorischer Bindungsmoleküle auf als mit Östrogen behandelte Tiere. Dies könnte eine Erklärung für die beim Menschen beobachtete Dominanz der akuten Myokarditis bei Männern sein.

#### **1.4 Pathogenese der experimentellen viralen Myokarditis**

Bezüglich des chronologischen Ablaufs der experimentellen viralen Myokarditis der Maus lassen sich nach Kawai (48) und McManus et al. (49) drei Phasen unterscheiden: eine akute, eine subakute und eine chronische Phase. Dem weitgehend entsprechend postulieren auch Liu und Mason (50) einen dreiphasigen Krankheitsprozess mit einer viralen, einer inflammatorischen und einer dilatativen Phase.

##### **1.4.1 Akute Phase (Tag 0 - 3 p.i.)**

Die akute Phase (Tag 0 - 3 p.i.) ist zunächst gekennzeichnet durch die CVB3-Internalisierung über den CAR, die Virusreplikation und eine direkte virale Zytotoxizität (49) mit fokalen myokardialen Zytolysen, Nekrosen und Apoptosen (41, 51). Erst ab dem dritten Tag wird zunehmend mRNA proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  sowie IFN- $\gamma$  von myokardialen Zellen (Myozyten, Endothelzellen, Fibroblasten) exprimiert (32, 52). Zu diesem Zeitpunkt besteht nur ein spärliches Zellinfiltrat aus Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen (52).

### **1.4.1.1 Virale Zytolyse**

In pathogenetischer Hinsicht ist die initiale myokardiale Schädigung in der akuten Phase der experimentellen Virusmyokarditis auf eine direkte virale Zytotoxizität mit Zytolyse und Apoptosen zurückzuführen (49, 53). Insbesondere in den ersten beiden Tagen p.i. fehlen noch eine Zytokinexpression oder eine zelluläre Infiltration, die die Zellschädigung verursachen könnten. Zudem haben sowohl in situ Hybridisierungsstudien bei CVB3-infizierten Mäusen als auch in vitro Studien gezeigt, dass Coxsackie- und Zytomegalieviren direkt Myokardiolyse induzieren können (49, 53, 54, 55). Hierbei scheint unter anderem die Spaltung von Dystrophin durch die virale Protease 2A eine Rolle zu spielen (56).

### **1.4.1.2 Zytokine und Zellinfiltrat**

Ab dem dritten Tag p.i. werden eine Zytokinexpression und ein zelluläres Infiltrat nachweisbar. Die pathogenetische Bedeutung dieser Veränderungen betrifft aber vor allem das subakute Stadium und soll deshalb im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

## **1.4.2 Subakute Phase (Tag 4 - 14 p.i.)**

Ab Tag vier p.i. folgt die subakute Phase der experimentellen Virusmyokarditis, die initial durch eine zelluläre Infiltration von NK-Zellen und Makrophagen, danach zunehmend von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, Neutrophilen, Monozyten, B-Lymphozyten und Fibroblasten gekennzeichnet ist (49, 57). In späteren Stadien der subakuten Phase dominieren die aktivierten zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und Makrophagen (48, 58, 59).

Neben dem zellulären Infiltrat weist die subakute Phase eine starke Expression zahlreicher Zytokine auf. Hierbei besteht eine zeitabhängige unterschiedliche Freisetzung verschiedener Zytokine. Bis zum siebten Tag p.i. steigen proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  sowie IFN- $\gamma$  an. Nach dem 5. - 7. Tag werden vor allem regulatorische Zytokine wie IL-2, IL-4 und IL-10 exprimiert (32). Allerdings wird IL-10, das auf T-

Lymphozyten und Makrophagen eine deaktivierende Funktion ausübt (60), bereits frühzeitig parallel zur Virusreplikation exprimiert und bleibt ebenso wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bis in die späte Phase der Myokarditis nachweisbar (34). Die gesteigerte Zytokinexpression wird zumindest initial durch die virale Infektion induziert und erfolgt durch ortsansässige myokardiale Zellen (32, 52), ab 5. – 7. Tag jedoch vor allem durch aktivierte Makrophagen und Lymphozyten des Zellinfiltrates (32, 52, 58). Ab 8. - 10. Tag treten neutralisierende Antikörper-Titer mit einem Maximum um den 14. Tag auf (61), die mit einer vollständigen Viruselimination einhergehen. Zeitlich parallel dazu entwickeln sich während des 7. - 14. Tages p.i. die schwersten myokardialen Zellschädigungen.

Während in pathogenetischer Hinsicht die akute Phase noch ganz überwiegend von der direkten Virustoxizität bestimmt ist, spielt in der subakuten Phase die Immunabwehr die entscheidende Rolle. Hierbei muss zwischen der angeborenen (unspezifischen) und der adaptiven (spezifischen) Immunabwehr mit zellulären und humoralen Komponenten unterschieden werden. Zu den Zellen der angeborenen Immunabwehr zählen NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen und dendritische Zellen. Teile der humoralen angeborenen Immunität sind Oponine, Akute-Phase-Proteine, Lysozym, Perforin und das Komplementsystem. Zu den Zellen der adaptiven Immunabwehr gehören die B- und T-Lymphozyten. Entsprechend dem oben geschilderten Wechsel des Zellinfiltrates stehen am Anfang der subakuten Phase die angeborene Immunabwehr (s. 1.4.2.1) und das NO-System (s. 1.4.2.2, S. 14), später die erworbene Immunabwehr (s. 1.4.2.4, S. 16 + 1.4.2.5, S. 19) im Vordergrund.

#### **1.4.2.1 Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)**

Die dominante Infiltration von NK-Zellen am Übergang von der akuten zur subakuten Phase stellt die erste entscheidende Antwort des angeborenen Immunsystems auf die erfolgte Virusinfektion dar. Für die Attraktion von NK-Zellen scheint zum einen CVB3 selbst verantwortlich zu sein, das die Myozyten frühzeitig zur Bildung von Chemokinen z.B. von MCP-1 (monozyten chemoattractant protein 1) stimuliert (62). Zum anderen setzen antigenpräsentierende Zellen (APC) nach Erkennung der viralen Infektion Zytokine und

Chemokine frei, die die NK-Zellen zum Ort der Infektion führen und über Interleukin-2 und IFN- $\gamma$  aktivieren (63).

Als Teil des angeborenen Immunsystems entfalten NK-Zellen frühzeitig antigenunabhängig wichtige Wirkungen. Während zeitweise ein aggravierender inflammatorischer Effekt der NK-Zellen diskutiert wurde, zeigen neuere Studien, dass sie hauptsächlich über zwei Mechanismen eine kardioprotektive Funktion besitzen. Zum einen tragen sie durch Freisetzung von Perforin, das zirkuläre porenähnliche Läsionen ( $\sim 16$  nm) an der Zellmembranoberfläche und eine Lyse virusinfizierter Myokardzellen verursacht, zur Hemmung der Virusreplikation bzw. zur Viruselimination bei (64, 65, 66). Da die Lyse nur virusinfizierte Zellen betrifft, erfolgt hierdurch keine zusätzliche Myokardschädigung (65). Zum anderen besitzen NK-Zellen die Fähigkeit zur frühen und raschen Induktion von IFN- $\gamma$ , welches das adaptive Immunsystem stimuliert (67, 68, 69). Eine Sonderform stellen die NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen dar, die Charakteristika von CD4<sup>+</sup>- und NK-Zellen besitzen (70) und neben anderen Zytokinen große Mengen IL-4-synthetisieren. Diesen Funktionen entsprechend war bei Mäusen eine verminderte NK-Zellaktivität oder NK-Zelldepletion mit einem Anstieg der myokardialen Virustiter, einer verzögerten Viruselimination und einer schwereren Kardiomyopathie verbunden (71, 72, 73). Somit kommt den NK-Zellen eine entscheidende protektive Rolle bei der Entwicklung der CVB3-induzierten Myokarditis durch Begrenzung der Virusreplikation und Stimulation sowie Differenzierung des adaptiven Immunsystems zu (s. 1.4.2.4, S. 16).

#### **1.4.2.2 Stickstoffmonoxid (NO)**

Die gegen Ende der akuten Phase zunehmend exprimierte Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  stimulieren die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) in Kardiomyozyten und führen zu einem Anstieg von Stickstoffmonoxid (NO). Insbesondere bei der frühen Kontrolle der Virusinfektion im Rahmen des angeborenen Immunsystems wird NO eine bedeutende Rolle zugeschrieben (74). NO hemmt bei verschiedenen viralen Infektionen, so auch bei CVB3, die Virusreplikation, die Zellproliferation und die Zell-zu-Zell-Ausbreitung der Infektion (74, 75, 76). Darüber hinaus kann NO die virale Protease 2A durch Nitrolisierung des Cysteins inaktivieren und somit die Spaltung von Dystrophin vermindern (77). Die initial protektive

Wirkung von IFN beruht auf der Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen sowie der Induktion der NO-Synthese (78, 79). Das Zusammenwirken beider Mechanismen ist für eine effiziente initiale Infektabwehr von großer Bedeutung.

### 1.4.2.3 Zytokine

Die in der subakuten Phase anfangs von den myokardialen Zellen, später dem Zellinfiltrat reichlich exprimierte Zytokine spielen in der Pathogenese der viralen Myokarditis eine entscheidende Rolle. Sie nehmen Einfluss auf die angeborene bzw. erworbene Immunabwehr, die Differenzierung der T-Helferzell-Population (s. 1.4.2.4, S. 16), die extrazelluläre Matrix (s. 1.4.4.2, S. 25) und die Fibrosebildung. Die Wirkung einzelner Zytokine auf die virale Myokarditis der Maus wurde in zahlreichen experimentellen Modellen untersucht. Welche Bedeutung der jeweils festgestellten Einzelwirkung im Kontext des außerordentlich komplexen natürlichen Ablaufs zukommt, ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Durch die exogene Zufuhr von Il-1 oder Il-2 kann eine CVB3-induzierte Myokarditis verstärkt (80), die Entwicklung einer Myokarditis durch Blockierung von Il-1- bzw. Il-2-Rezeptoren gehemmt (81) und bei myokarditisresistenten B10.A Mäusen eine CVB3- Myokarditis durch Il-1 bzw. TNF- $\alpha$  induziert werden (82). Il-6 und TNF- $\alpha$  können zu einer Aggravierung der viralen Myokarditis der Maus und zu einer Verschlechterung der Herzfunktion führen (52, 82, 83). Il-4, als frühes Produkt von NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen und als Th<sub>2</sub>-Zytokin (s. 1.4.2.4, S. 16) mit autoregulatorischer Aktivität (84, 85), hemmt die Makrophagen (86), stimuliert die Expression des IL-4-Rezeptors auf Lymphozyten, fördert die Bildung antiinflammatorischer Zytokine wie TGF- $\beta$ 1 (87) und vermindert die Produktion der Th<sub>1</sub>-typischen Zytokine IL-2 sowie IFN- $\gamma$  (88). Il-6 beeinflusst die Makrophagenaktivierung (89), die B-Zelldifferenzierung (90) und hat bei frühzeitiger Applikation einen günstigen (91), bei langfristiger Verabreichung einen ungünstigen Effekt auf den Myokarditisverlauf (92). Il-10 hemmt Makrophagen, Th<sub>1</sub>-Zellen und die IL-2- bzw. TNF- $\alpha$ -Expression (60). Die Behandlung von Mäusen mit EMCV-Myokarditis mit rekombinantem humanem Il-10 reduziert die myokardialen Läsionen und erhöht das 14-Tage-Überleben (93). Il-12 wie auch IFN- $\gamma$  vermindern im EMCV-Myokarditismodell den Parenchymschaden und führen zu einer Verlängerung der Überlebenszeit (94, 95, 96). IL-15

verstärkt die Zytotoxizität von NK-Zellen, stimuliert die B-Zell-Proliferation, die Ig-Sekretion und die T-Zell-Proliferation (97, 98). Il-18 verstärkt die NK-Zell- und Makrophagenaktivität und fördert die IFN- $\gamma$ -Expression. Zum Zeitpunkt der Infektion appliziertes Il-18 vermindert die myokardialen Nekrosen und verbessert die Überlebensrate bei C3H/HeJ-Mäusen mit EMCV-Myokarditis (99). Sowohl IFN- $\alpha$  (100) und IFN- $\beta$  (101, 102) als auch IFN- $\gamma$  (103) wirken bei einer CVB3-Infektion protektiv und IFN knock out Mäuse erliegen rasch einer CVB3-Myokarditis (48).

Nach diesen Untersuchungen scheinen bei der Pathogenese der subakuten viralen Myokarditis der Maus die Zytokine Il-1 $\beta$ , Il-2, Il-15, TNF- $\alpha$  eher proinflammatorische und die Zytokine Il-4, Il-10, Il-12, Il-18, IFN eher protektive Wirkungen zu entfalten.

#### **1.4.2.4 Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen zu Th<sub>1</sub>- bzw. Th<sub>2</sub>-Zellen**

Während zu Anfang der subakuten Phase vor allem NK-, NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen (APC) auftreten, wird später das zelluläre Infiltrat zunehmend von B- und T-Lymphozyten dominiert. Das angeborene Immunsystem kontrolliert zwar die frühe Virusinfektion, ohne das nachfolgende adaptive Immunsystem gelingt jedoch keine endgültige Infektbeseitigung (66, 67). Dementsprechend spielen pathogenetisch in der subakuten Phase sowohl B- als auch T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle, die durch die frühe Zytokinexpression (vor allem von IFN- $\gamma$ , Il-12 und Il-4) des angeborenen Immunsystems aktiviert werden (104, 105). Ihre diagnostische Differenzierung erfolgt über das spezifische Profil von Oberflächenmolekülen („cluster of differentiation“, CD), wobei CD2, -3, -4, -7, -8 für T-Lymphozyten sowie deren Subpopulationen und CD1, -19, -20, -21, -22, -23, -24 für B-Lymphozyten charakteristisch sind. CD4 wird typischerweise auf T-Helferzellen und CD8 auf zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert. NK-Zellen und Makrophagen sind durch CD11b gekennzeichnet.

Mosmann et al. (106) beschrieben eine Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen (Th<sub>0</sub>) zu Th<sub>1</sub>- bzw. Th<sub>2</sub>-Zellen. Hierbei handelt es sich um ausgereifte T-Helferzellen, die sich durch ihr bevorzugt gebildetes Zytokinmuster und ihre Funktion unterscheiden. So exprimieren Th<sub>1</sub>-

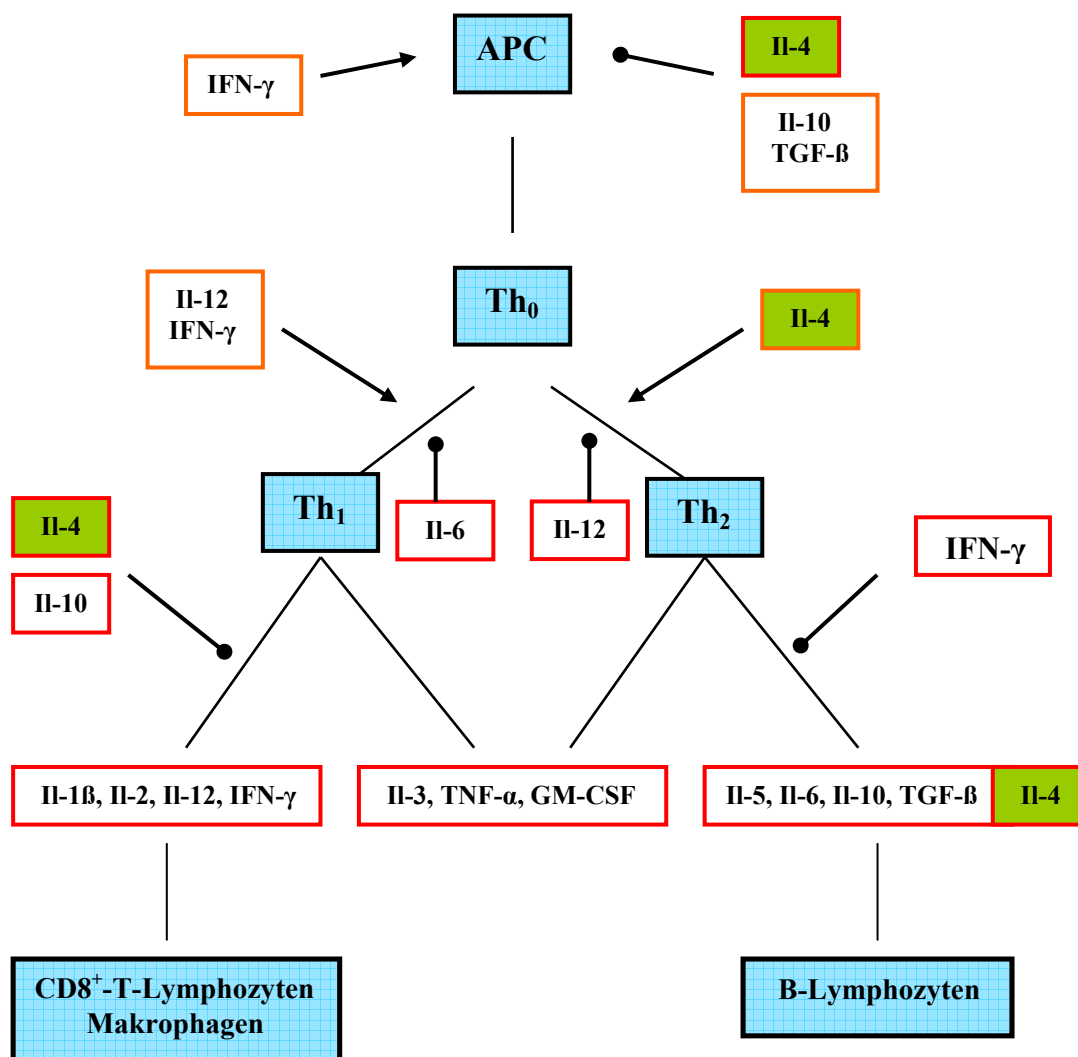


Zellen überwiegend Il-1 $\beta$ , Il-2, Il-12 und IFN- $\gamma$  („Th<sub>1</sub>-Zytokine“) sowie Th<sub>2</sub>-Zellen Il-4, Il-5, Il-6, Il-10 und TGF- $\beta$  („Th<sub>2</sub>-Zytokine“; s. Abb. 1.1, S. 18) (106, 107). Über die jeweilige Zytokinexpression aktivieren Th<sub>1</sub>-Zellen die zelluläre (Makrophagen und zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten) und die Th<sub>2</sub>-Zellen die humorale Immunabwehr (B-Lymphozyten, IgG1- und IgE-Bildung) (108, 109).

Für Art und Umfang der Th<sub>0</sub>-Differenzierung sind neben der genetischen Disposition (110), Antigeneigenschaften (111), der Typ der antigenpräsentierenden Zelle (APC) (112, 113), Geschlechtshormone (31, 114, 115) und die Zytokinexpression entscheidend. Während die ersten vier Faktoren in einer gegebenen Situation feststehen, erfolgt die eigentliche Modulation der Th<sub>1</sub>- bzw. Th<sub>2</sub>-Bildung vor allem durch die jeweilige Zytokinexpression. So fördern initial die von NK-Zellen und Makrophagen gebildeten Zytokine IFN- $\gamma$  und Il-12 die Differenzierung zu Th<sub>1</sub>- (116) und das von NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen stammende Il-4 die Differenzierung zu Th<sub>2</sub>-Zellen (117). In der Folge üben die von diesen Zellen in höherer Konzentration gebildeten Zytokine selbst einen stimulierenden oder hemmenden Einfluss auf die Zelldifferenzierung aus. Die Th<sub>2</sub>-Zytokine Il-4 und Il-10 inhibieren die Th<sub>1</sub>-Funktion (60, 118) und Il-6 hemmt die Differenzierung der Th<sub>0</sub>- zur Th<sub>1</sub>-Zelle (119). Umgekehrt inhibieren die Th<sub>1</sub>-Zytokine Il-12 die Ausdifferenzierung zur Th<sub>2</sub>-Zelle (116) und IFN- $\gamma$  die Th<sub>2</sub>-Funktion (120). Neben der Beeinflussung der jeweils anderen Zellpopulation haben Il-4 bzw. Il-12 und IFN- $\gamma$  auch stimulierende Wirkungen im Sinne einer positiven Rückkopplung auf die eigene Zellreihe. Im Hinblick auf die Beeinflussung der experimentellen Virusmyokarditis durch eine exogene Zytokinapplikation ist von Bedeutung, dass IFN- $\gamma$  bereits auf der Stufe der antigenpräsentierenden Zellen einen stimulierenden (31) und Il-4, Il-10 und TGF- $\beta$  einen hemmenden Einfluss auf Makrophagen besitzen (60, 87, 121). In Abb. 1.1 sind die einzelnen Zytokine mit ihren jeweiligen Funktionen aufgeführt. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Daten von verschiedenen Studien mit unterschiedlichen experimentellen Bedingungen stammen. Insofern ist das Schema nicht ohne weiteres vollständig auf eine bestimmte experimentelle Situation zu übertragen, zumal einzelne Zytokine (z.B. Il-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt ihrer Einwirkung durchaus gegensätzliche Effekte haben können (122).

Entsprechend der unterschiedlichen stimulierenden Wirkungen ausgereifter Th-Zellen auf T- und B-Lymphozyten werden der Th<sub>1</sub>-Antwort im CVB3-Myokarditis-Mausmodell überwiegend

proinflammatorische und der Th<sub>2</sub>-Antwort protektive Wirkungen zugeschrieben. So überwog bei männlichen BALB/c-Mäusen mit ausgeprägter entzündlicher Reaktion die Th<sub>1</sub>-



**Abb. 1.1:** Polarisation von CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen nach Antigenkontakt und Einfluss verschiedener Zytokine → Stimulation, —● Hemmung  
APC = antigenpräsentierende Zelle; Zytokine rot eingrahmt

Antwort und bei weiblichen Tieren mit milder entzündlicher Reaktion die Th<sub>2</sub>-Antwort (31). Seko et al. (32) fanden bei C3H/He-Mäusen in der Frühphase der CVB3-Myokarditis ein

deutliches Überwiegen der Th<sub>1</sub>- gegenüber der Th<sub>2</sub>-Antwort. Bei BALB/c-Mäusen bewirkt eine Aktivierung von V $\gamma$ 4<sup>+</sup>-T-Zellen - über Stimulation einer dominanten Th<sub>1</sub>-Antwort - eine Verstärkung und eine Aktivierung von V $\gamma$ 1<sup>+</sup>-T-Zellen - über eine dominante Th<sub>2</sub>-Antwort - eine Hemmung der CVB3-Myokarditisentwicklung (123, 124). Leipner et al. (125) fanden sowohl bei immunkompetenten als auch bei IL-4-defizienten knock out Mäusen in der akuten Phase einer CVB3-induzierten Myokarditis eine dominante Th<sub>1</sub>-Antwort. Darüber hinaus wiesen die IL-4-defizienten Mäuse eine verlängerte myokardiale Viruspersistenz und eine Neigung zur persistierenden chronischen Herzmuskelerkrankung auf. Im Unterschied zu den genannten Untersuchungen führte eine anti-IL-4-Behandlung bei A/J-Mäusen mit experimenteller Autoimmunmyokarditis nicht zu einer Verschlechterung, sondern zu einer Abschwächung der Myokarditis (126). Es ist unklar, inwieweit für diese Unterschiede das differente Myokarditis-Mausmodell verantwortlich ist.

#### **1.4.2.5 B- und T-Lymphozyten**

##### **B-Lymphozyten**

Die über Zytokine der Th<sub>2</sub>-Zellen aktivierten B-Lymphozyten sind durch die Bildung von neutralisierenden Antikörpern (AK) gegen noch nicht intrazellulär lokalisierte Viren maßgeblich an der Überwindung der Infektion beteiligt. Beginnend ab 4. und vor allem ab 8. - 10. Tag p.i. treten rasch zunehmend antivirale AK mit einem Maximum um den 14. Tag auf. Eng mit dem Anstieg der neutralisierenden AK ist ein Abfall der Virustiter verknüpft (61). Die Bedeutung der B-Zellen für die Viruselimination wird durch Untersuchungen an B-Zell knock out Mäusen untermauert, die nach Infizierung mit CVB3 eine chronische, lebenslange Infektion entwickeln (127). Zudem geht verschiedenen Untersuchungen zufolge eine frühe Antikörperantwort mit einer weniger schweren Myokarditis einher (128, 129). Die Viruselimination über NK-Zellen, Makrophagen, neutralisierende Antikörper und zytotoxische T-Zellen erreicht zum Ende der subakuten Phase ihren Höhepunkt, so dass nach dem 14. Tag p.i. zumeist nur noch virale RNA nachweisbar ist (35). Inwieweit B-Zellen bei dem Myokarditis-Mausmodell nicht nur eine protektive, sondern durch Bildung CVB3-Myosin kreuzreagierender AK auch eine schädigende Funktion haben, wird derzeit noch kontrovers diskutiert (s. 1.4.3.3, S. 22).

### **T-Lymphozyten**

Im Verlauf der subakuten Phase nimmt der Anteil der über Zytokine der Th<sub>1</sub>-Zellen aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten am zellulären Infiltrat stetig zu und erreicht am 7. - 14. Tag p.i. sein Maximum. Parallel zu diesem Anstieg erreicht die myokardiale Schädigung ihr stärkstes Ausmaß (48, 59). Für einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen dem CD8<sup>+</sup>-Zellinfiltrat und dem Auftreten der Myokardschäden sprechen nicht nur das zeitliche und örtliche Zusammentreffen, sondern auch zahlreiche weitere Beobachtungen. So konnte gezeigt werden, dass zytotoxische T-Lymphozyten virusinfizierte Myozyten *in vitro* lysieren können (130, 131). Nackt-Mäuse ohne Thymus (132, 133) weisen, ebenso wie T-Zell depletierte Mäuse, nur eine abgeschwächte virusinduzierte Myokarditis auf (58, 134, 135). CD4<sup>+</sup>-/CD8<sup>+</sup>-Rezeptor knock out Mäuse waren wie T-Zellrezeptor knock out Mäuse vor einer kardialen Coxsackieinfektion besser als CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-Rezeptor knock out Mäuse geschützt (136). Schließlich kann die Myokarditis durch Transfer von T-Zellen erkrankter in nicht erkrankte Mäuse übertragen werden (137). Die durch T-Lymphozyten verursachten Zellschäden sind zum einen durch eine Perforin induzierte Zytolyse CVB3-infizierter Zellen bedingt und wichtiger Teil der Infektabwehr bzw. -überwindung. Zum anderen können während der Erkrankung autoreaktive zytotoxische T-Lymphozyten aktiviert werden, die auch nicht infizierte Myokardzellen angreifen, zusätzliche Schäden setzen und zur Chronifizierung der Myokarditis beitragen (s. 1.4.3.3, S. 22).

In der Pathogenese der viralen Myokarditis der Maus hat somit die adaptive Immunabwehr in der subakuten Phase eine zweifache, z.T. gegensätzliche Bedeutung. Während die B-Lymphozyten durch Bildung neutralisierender Antikörper überwiegend protektiv wirken, werden die schweren myokardialen Zellschäden vor allem durch zytotoxische T-Lymphozyten verursacht.

#### **1.4.3 Chronische Phase (ab Tag 15 p.i.)**

Als chronische Phase der experimentellen Virusmyokarditis bezeichnet man die Phase ab Tag 15 p.i. Die Viruselimination ist zu diesem Zeitpunkt in der Regel abgeschlossen. Dessen ungeachtet besteht die entzündliche Reaktion fort und geht zunehmend mit einer Matrixdegradation, einem Kollagenumbau und einer diffusen Fibrose einher. Bei Überleben der Mäuse und längerfristigem

Verlauf folgen eine Zunahme des Verhältnisses Herz- zu Körpergewicht, eine Ventrikeldilatation und eine Herzinsuffizienz (48). Der Zusammenhang zwischen einer chronischen Myokarditis und der Entwicklung einer inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie wurde von verschiedenen Seiten diskutiert und experimentell untermauert (48, 138, 139, 140).

Nach dem 14. Tag p.i. ist in der Regel kein replizierendes Virus mehr nachweisbar (s. 1.4.2.5, S. 19). In pathogenetischer Hinsicht kommt somit eine floride kardiale Virusinfektion als Ursache für die Entwicklung und die Progression der chronischen Myokarditis nicht mehr in Betracht. Als alternative Erklärungen für die Chronifizierung werden deshalb eine Virusgenom- bzw. eine extrakardiale Viruspersistenz und/oder eine Autoimmunreaktion diskutiert.

#### **1.4.3.1 Kardiale Virusgenompersistenz**

Als eine mögliche Ursache für die Chronifizierung der viralen Myokarditis wird die Persistenz viraler RNA mit konsekutiver, anhaltender Stimulation von T-Lymphozyten diskutiert (48). So war bei DBA/2-Mäusen mit EMCV- und bei NMRI-Mäusen mit CVB3-induzierter Myokarditis bei Abwesenheit von infektiösem Virus virale RNA bis zu über 90 Tage p.i. nachweisbar (141, 142, 143). Verschiedene immunkompetente Mäuse mit viraler RNA-Persistenz entwickeln eine chronische Myokarditis, DBA/J-Mäuse mit frühzeitiger RNA-Elimination jedoch nicht (37). Klingel et al. (37) vermuteten, dass persistierende virale RNA zur Replikation fähig ist und neues antigenes Material freisetzt. Kim et al. (144) wiesen im Myokard CVB3-infizierter Mäuse virales Genom nach, das 5' terminal 7 bis 49 Nukleotiddeletionen (TD) aufwies und langsam replizierte. Gesunde Mäuse entwickelten nach Inokulation von CVB3-TD-Genom keine Entzündungsreaktion oder Nekrosen. Das Auftreten von CVB3-TD könnte die Genompersistenz bei intaktem Immunsystem und die Persistenz der Myokarditis nach Elimination des infektiösen Virus erklären (144, 145). Wessely et al. (140) konnten zeigen, dass transgene Mäuse mit kardialer Expression einer CVB3-RNA-Mutanten ohne infektiöse Eigenschaften echokardiographisch und morphologisch eine DCM mit systolischer Funktionsstörung entwickeln. Andere Autoren weisen jedoch darauf hin, dass CVB3- und MCMV-resistente Mäuse (z.B. C57BL/6) – trotz Persistenz viraler RNA über 90 Tage – zwar eine akute, aber keine

chronische Myokarditis entwickeln und halten zumindest bei diesen Tieren die Art der Immunantwort für entscheidender (146).

Entsprechend der Situation beim Tier konnte auch bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie in Endomyokardbiopsien in bis zu zwei Drittel aller Fälle virales Genom nachgewiesen werden (6, 9, 147). Darüber hinaus bestand bei solchen Patienten ein Zusammenhang zwischen der Prognose und der Viruspersistenz bzw. Virusclearance (148).

#### **1.4.3.2 Extrakardiale Virusinfektion**

Muir et al. (149) wiesen darauf hin, dass die Viruspersistenz in extrakardialen Geweben an der Unterhaltung einer chronischen Myokardierkrankung beteiligt sein könnte. Untersuchungen bei Mäusen ergaben, dass in der chronischen Phase der CVB3-induzierten Myokarditis das Virus in Milz und Lymphknoten (37) sowie Leber und Pankreas (40) über die subakute Phase hinaus persistierte. Die Autoren vermuteten, dass die anhaltende Infektion dieser Organe mit einer Aktivierung des Immunsystems für den Fortgang der Myokarditis auch nach kardialer Viruselimination verantwortlich ist (36, 37). Hierfür könnten auch Befunde von Reetoo et al. (35) sprechen, die serielle Untersuchungen von CVB3-RNA in verschiedenen Organen und der myokardialen Inflammation durchführten. Hierbei beobachteten sie eine Koinkidenz von RNA-Elimination in der Milz und dem Verschwinden der Myokarditis bei unverändert persistierender CVB3-RNA im Herzen.

#### **1.4.3.3 Autoimmunreaktion**

Für eine Beteiligung autoimmuner Mechanismen an dem Verlauf der chronischen viralen Myokarditis sprechen das Auftreten von Autoantikörpern (150, 151), die Myozytenzytolyse durch zytotoxische T-Lymphozyten in vitro (130, 131) und die Übertragbarkeit der Myokarditis durch Antikörper (152, 153) oder T-Lymphozyten (137). Bei Mäusen gilt Myosin als wichtigstes kardiales Autoantigen. So kann durch Injektion von kardialem Myosin eine Myokarditis induziert werden, die histologisch der viralen Myokarditis gleicht. Charakteristisch ist das

Auftreten autoreaktiver T-Lymphozyten und autoreaktiver zytotoxischer Antikörper mit einer Kreuzreaktion gegen CVB3-Kapsidprotein (154, 155). Isolierte zytotoxische Antikörper beim Menschen zeigten eine Kreuzreaktion mit CVB3-Kapsidprotein und kardialem Myosin, wobei beide in etwa 40% der Aminosäuresequenz übereinstimmten (156). Hieraus wurde gefolgert, dass aufgrund eines homologen Epitops von CVB3 und Myosin kreuzreagierende Autoantikörper und/oder zytotoxische T-Lymphozyten auftreten, die für den weiteren Verlauf der myokardialen Entzündung verantwortlich sind („molekulares Mimikry“). In mehreren Studien konnten kreuzreagierende AK nachgewiesen werden (152, 156, 157). In anderen Studien besaßen die aufgetretenen Autoantikörper jedoch keine kreuzreagierenden Eigenschaften (158, 159). Alternativ könnte in diesen Fällen die Antikörperbildung durch massive Freisetzung oder strukturelle Änderung intrazellulärer Antigene induziert werden. Andererseits entwickeln auch B-Zell knock out Mäuse (C57BL/6) oder SCID-Mäuse (SCID = severe combined immunodeficiency syndrome) eine schwere Myokarditis (127, 160).

In pathogenetischer Hinsicht bleibt die Bedeutung von Autoantikörpern sowohl für die Entwicklung der myosininduzierten Autoimmunmyokarditis als auch der chronischen viralen Myokarditis der Maus unklar (48, 145, 155). Zumindest scheint eine Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen und dem verwandten Mausstamm zu bestehen (48, 161). Hingegen ist die pathogenetische Bedeutung autoreaktiver  $CD8^+$ -T-Lymphozyten weitgehend akzeptiert (48, 58, 145, 146, 162), wobei Myosin als eines von vermutlich mehreren Autoantigenen bei der Autoimmunmyokarditis und der CVB3-Myokarditis identifiziert werden konnte (155, 163).

#### **1.4.4 Die kardiale extrazelluläre Matrix (EZM)**

Das Myokard besteht neben Myozyten, Fibroblasten und Gefäßen aus einer extrazellulären Matrix (EZM), die von Kollagenen, Proteoglykanen, Glukosaminoglykanen, Fibronectin, Laminin, Osteopontin und anderen Molekülen gebildet wird (164). Von allen Bestandteilen kommen dem Kollagen Typ I (Kol I) mit 85% und dem Kollagen Typ III (Kol III) mit 11% der EZM die größte Bedeutung zu, während die anderen Kollagene (IV, V, VI) zu vernachlässigen sind (165). Kol I und Kol III unterscheiden sich nicht nur bezüglich ihres quantitativen

Vorkommens, sondern auch ihrer Eigenschaften. Während Kol I parallel angeordnete dicke, reißfeste Fibrillen mit großer mechanischer Belastbarkeit bildet, formt Kol III feine, elastische Fibrillen, die die Speicherung kinetischer Energie ermöglichen. Zusammen bilden Kol I und Kol III ein komplexes dreidimensionales Netzwerk, das als Gerüst für die Anordnung von Myozyten und Gefäßen, die Koordination der Myozytenkontraktion und der Aufrechterhaltung der Herzgeometrie dient. Über die mechanische Funktion hinaus moduliert die EZM zahlreiche interzelluläre -, Zell-Matrix- und Zell-Gefäß-Interaktionen, die für Wachstum und Funktion verschiedener kardialer Zellen wichtig sind (166). Die Kollagensynthese erfolgt über kardiale Fibroblasten und wird durch eine Reihe von Faktoren wie mechanische Beanspruchung, Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- $\beta$ ) und neurohormonale Einflüsse (Angiotensin II, Aldosteron) stimuliert bzw. durch verschiedene Zytokine inhibiert (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) (167, 168).

#### **1.4.4.1 Remodeling der extrazellulären Matrix (EZM)**

Beim gesunden Herzen unterliegt das Kollagennetz einem täglichen Umbau von etwa 5 - 9% und steigt bei verschiedenen Herzerkrankungen bis zu 50% an (169, 170, 171). Hierbei handelt es sich zumeist nicht nur um eine Beschleunigung von Abbau und Synthese, sondern auch um eine Aufspaltung der Quervernetzungen, Veränderung des Gesamtkollagengehaltes und/oder der relativen Anteile von Kol I bzw. Kol III (172, 173, 174, 175). Der qualitative und quantitative Umbau der EZM, der mit wechselnd ausgeprägter Fibroblastenproliferation, Myozytenhypertrophie, Nekrose und Fibrose verbunden ist, wird unter dem Begriff des Remodeling zusammengefasst (176). In funktioneller Hinsicht führt der Umbau über eine zunehmende Steifheit des Myokards, eine Veränderung der Herzgeometrie und eine Herzdilatation zur diastolischen bzw. systolischen Funktionsstörung (177). Abgesehen von pathogenetischen Unterschieden findet sich ein pathologisches Remodeling bei arterieller Hypertonie, Myokardhypertrophie, Myokardischämie, ventrikulärer Tachykardie und inflammatorischer Kardiomyopathie (178). Der Matrixumbau erfolgt über eine Dysbalance der Faktoren, die bei Kollagensynthese und -abbau beteiligt sind wie Wachstumsfaktoren, Zytokine sowie verschiedene Proteasen und deren Inhibitoren.

Im Falle der viralen Myokarditis wird das empfindliche Gleichgewicht der EZM-Regulation



durch die entzündliche Reaktion selbst gestört. Bezogen auf das Kollagengerüst betrifft dies sowohl die Kollagensynthese als auch den Kollagenabbau. Als Mediatoren wirken hierbei die initial von myokardialen Zellen später vom zellulären Infiltrat überschießend exprimierten Wachstumsfaktoren und Zytokine wie TGF- $\beta$ , Il-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Während TGF- $\beta$  die Kollagensynthese stimuliert (167), wird diese von Il-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  gehemmt (168). Zur gleichen Zeit beeinflussen dieselben Zytokine den Kollagenabbau durch Modulation der beteiligten Proteasen (Matrixmetalloproteinasen) und Proteaseinhibitoren („tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“).

#### **1.4.4.2 Matrixmetalloproteinasen (MMPs)**

Bei den proteolytischen Enzymen werden Exo- und Endopeptidasen unterschieden, je nachdem ob sie terminale oder interne Peptidverbindungen spalten. Die Endopeptidasen können in Abhängigkeit von dem jeweiligen katalytischen Mechanismus und der Inhibitorsensitivität weiter in Serin-, Zystein-, Aspartat- und Metalloproteinasen unterteilt werden. Der Kollagenabbau ist im Wesentlichen auf die Funktion der Matrixmetalloproteinasen (Matrixine, MMPs) und nur z.T. der Serinproteinasen (z.B. Plasmin) zurückzuführen.

Bei den Matrixmetalloproteinasen handelt es sich um eine Gruppe von 22 Enzymen, deren Namen vom gemeinsamen Substrat (EZM) und der funktionellen Zinkabhängigkeit abgeleitet wurde. Alle MMPs enthalten eine Pre-, Pro- und eine zinkbindende katalytische Domäne (179, 180). Entsprechend ihrem Wirkort werden sie in extrazellulär wirkende, sezernierte MMPs und in sechs lokal wirksame, membrangebundene MT-MMPs unterteilt. Ausgehend von ihrer Substratspezifität und Funktion können Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) und Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11) unterschieden werden (180). Der Abbau von Kollagen wird durch die Kollagenase MMP-1 eingeleitet und die entstehenden Fragmente durch MMP-2, MMP-9 und MMP-3 vollständig degradiert. Die Wirkung der MMPs bezieht sich jedoch nicht nur auf den Abbau des Kollagengerüsts, sondern betrifft alle Matrixbestandteile einschließlich der Zelloberflächenmoleküle und Nichtmatrixproteine (180). Infolgedessen sind sie bei zahlreichen Prozessen involviert wie der Embryonalentwicklung, Gewebebildung, Wundheilung, bei entzündlichen Erkrankungen,

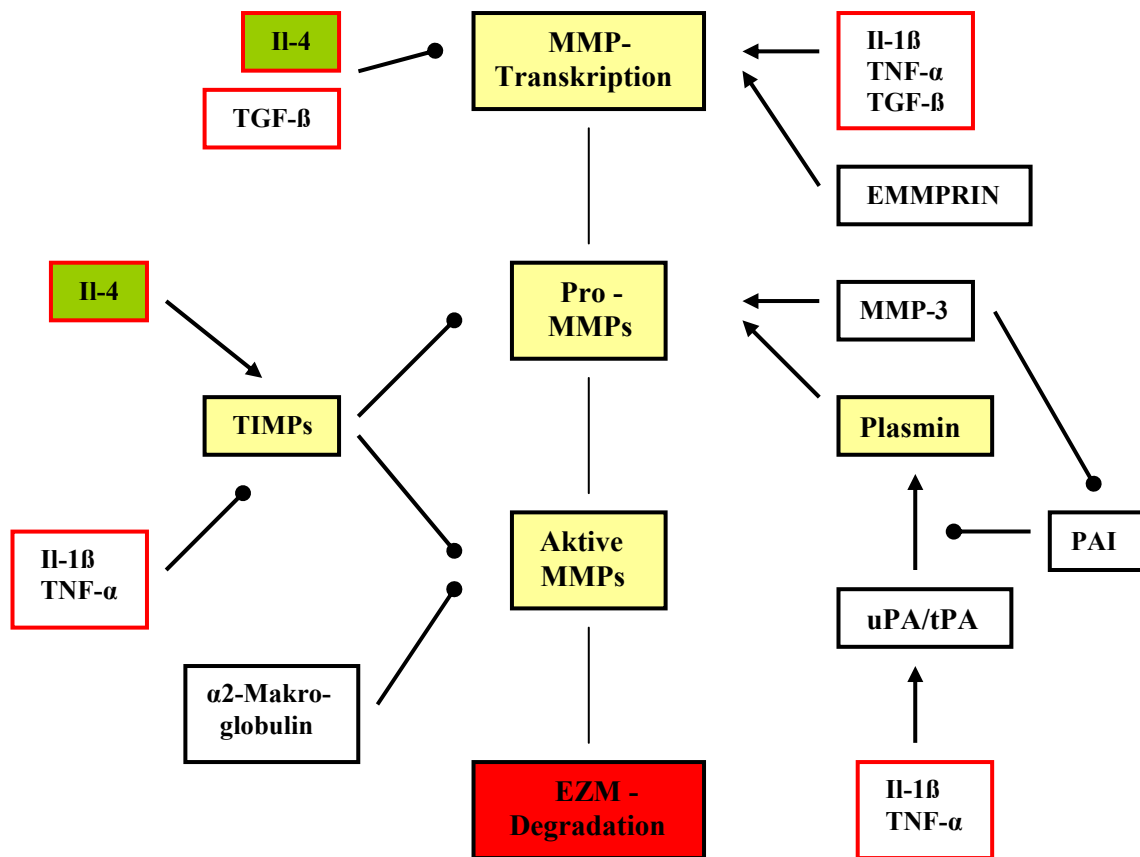
Tumoren und auch dem kardialen Remodeling. Dementsprechend können die MMPs von zahlreichen, sehr unterschiedlichen Zellen gebildet werden (z.B. Fibroblasten, Myofibroblasten, Kardiomyozyten, Endothelzellen, Makrophagen, Neutrophile, Lymphozyten, Tumorzellen u.a.) (180, 181).

In Bezug auf die Funktion der einzelnen MMPs ergeben sich vielfältige Überlappungen. Dies betrifft insbesondere den Kollagenabbau, an dem nahezu alle MMPs beteiligt sind. Demgegenüber sind für die Degradation der anderen Matrix- und Nichtmatrixproteine (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle,  $\alpha$ 2-Makroglobulin, Plasminogen u.a.) vor allem MMP-2, MMP-3 und MMP-9 verantwortlich (180). Unter allen MMPs nimmt MMP-3 eine Sonderstellung ein, da es neben seiner Beteiligung beim EZM-Umbau auch eine wichtige Rolle in der initialen Aktivierung der anderen MMPs spielt (182, 183). Bezüglich der Funktion einzelner MMPs in anderen Zusammenhängen (z.B. Knochenentwicklung, vaskuläres Remodeling, Tumorwachstum u.a.) siehe Sternlicht und Werb (180).

Die vielfältigen und bedeutenden Funktionen der MMPs in physiologischen wie auch pathologischen Prozessen erklärt, warum die MMPs in einem nur zum Teil aufgeklärten komplexen System engmaschig reguliert werden. Diese Regulation findet auf drei Ebenen statt: auf der Ebene der Transkription, der Aktivierung und der Degradation. Hieran sind Zytokine, Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ , VEGF, PDGF u.a.), Neurohormone (Angiotensin II, Endothelin-1), das spezifische Substrat, Inhibitoren sowie die MMPs selbst beteiligt (180, 184).

Die Synthese von MMP-2, MMP-3 und MMP-9 wird von den Zytokinen Il-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  und die von MMP-1, MMP-2 und MMP-3 von einem membrangebundenen Aktivator („extracellular matrix metalloproteinase inducer“, EMMPRIN) stimuliert (168, 185) (Abb. 1.2). TGF- $\beta$  hat bezogen auf einzelne MMPs gegensätzliche Effekte im Sinne einer Induktion der Expression von MMP-2 und MMP-9 und einer Suppression von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 (186, 187, 188). Neben TGF- $\beta$  übt auch Il-4 einen hemmenden Einfluss auf die MMP-Synthese aus (84). Nach Transkription, Translation und Entfernung der Pre-Domäne werden alle extrazellulären MMPs als inaktive Pro-Enzyme sezerniert und an EZM-Proteine gebunden (189, 190). Die Aktivierung erfolgt über die proteolytische Abspaltung der Pro-Peptiddomäne durch bereits aktiviertes MMP-3, MT1-MMP und/oder unspezifische Proteinase vor allem von Plasmin (183, 191). Plasmin

selbst wird durch Konversion von Plasminogen mittels der Plasminogenaktivatoren uPA („urokinase-type plasminogen activator“) bzw. tPA („tissue-type plasminogen activator“) gebildet, die ihrerseits durch einen Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI) gehemmt werden (191) (Abb. 1.2). Über die Konversion von Plasminogen hinaus scheint uPA zusätzlich T-Zellen, Makrophagen und proinflammatorische Zytokine wie  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  und  $\text{TGF-}\beta$  zu stimulieren und damit selbst zu Inflammation und Matrixdegradation beizutragen (192).



**Abb. 1.2:** Stimulierende und hemmende Einflüsse auf das Matrixdegradationssystem

→ Stimulation      —● Hemmung / Inaktivierung

(Aus Gründen der Übersichtlichkeit konnten die Effekte auf einzelne MMPs oder TIMPs nicht dargestellt werden, Einzelheiten siehe Text. Zytokine rot eingerahmt)

### 1.4.4.3 Inhibitoren der Metalloproteinasen

Die Hemmung der MMPs erfolgt durch spezifische und unspezifische Inhibitoren (Abb. 1.2). Als spezifische Inhibitoren wurden bislang vier größtenteils sezernierte Proteine („tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“, TIMPs) identifiziert (189, 190, 193). Die TIMPs werden von den gleichen Zellen gebildet, die auch die EZM und die MMPs synthetisieren. Sie besitzen eine größere N-terminale Domäne und eine interagierende dreifach gewundene kleinere C-Subdomäne (194). Die N-terminale Domäne bindet an die katalytische Domäne der proMMPs und MMPs in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Hierdurch wird die Aktivierung der proMMPs verhindert (195) bzw. die Aktivität der MMPs durch Blockierung der Substratbindungsseite reversibel gehemmt (189, 193). Zusammen inhibieren die TIMPs alle MMPs, wobei sie einzeln in Bezug auf die Expression und die Affinität zu MMPs Unterschiede zeigen (196). Während TIMP-1 und TIMP-2 ubiquitär exprimiert werden, wurde TIMP-4 überwiegend im Herzen nachgewiesen und daher auch als „cardiac inhibitor of metalloproteinase“ bezeichnet (197). TIMP-1 ist ein Inhibitor von MMP-3 und MMP-9, TIMP-4 von MMP-1 bis -3, -7, -9 und MT1-MMP (196, 198, 199, 200). TIMP-2 hat eine duale Funktion. In niedriger Konzentration fördert es durch membranständige Komplexbildung mit MT1-MMP und proMMP-2 die MMP-2-Aktivierung durch benachbarte ungebundene MT1-MMP-Moleküle. In hoher Konzentration hingegen hemmt es nach Sättigung der MT1-MMP-Moleküle ungebundenes aktiviertes MMP-2 (201, 202). Vor allem die Expression von TIMP-3 wird durch  $\text{IL-1}\beta$  sowie  $\text{TNF-}\alpha$  gehemmt (196, 198) und die von TIMP-1 durch  $\text{IL-4}$  stimuliert (203).

Neben den spezifischen TIMPs bestehen auch unspezifische Inhibitoren, unter denen  $\alpha 2$ -Makroglobulin die größte Rolle spielt (Abb. 1.2). Im Gegensatz zu den TIMPs, die mehr lokal wirksam sind, hemmt  $\alpha 2$ -Makroglobulin ubiquitär und irreversibel (180, 204). Schließlich spielen die MMPs selbst in Bezug auf ihre Regulation insofern eine wesentliche Rolle, als dass sie ihre eigene proteolytische Inaktivierung und Degradation vornehmen (180).

Die Bedeutung der Inhibitoren, speziell der lokal wirksamen TIMPs, besteht in der Ausbalancierung der durch Zytokine und Serinproteinasen bedingten Aktivierung des MMP-Systems. Bei einer Auslenkung des Gleichgewichts z.B. durch proinflammatorische Zytokine mit überschießender MMP-Aktivierung oder durch eine TIMP-Suppression tritt ein verstärkter

Umbau der EZM auf. Mehrere Studien beim Menschen sowie beim Tier zeigten, dass auch das kardiale Remodeling auf ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs (MMP/TIMP-Verhältnis) zurückgeführt werden kann (175, 205, 206, 207, 208, 209).

## 1.5 Problemstellung

Bei Betrachtung der in Abb. 1.1 (S. 18) und Abb. 1.2 (S. 27) dargestellten Schemata wird deutlich, dass Zytokine auf jeder Ebene sowohl der Inflammation als auch des Matrixdegradationssystems eine besondere Rolle spielen. Insofern liegt es nahe, durch eine exogene Einflussnahme auf die Zytokinkonstellation den natürlichen Verlauf der Myokarditis zu verändern. Dies kann sowohl durch Gabe eines zytokin- oder rezeptorspezifischen Antikörpers als auch durch Verabreichung eines bestimmten Zytokins erfolgen.

Frühere Untersuchungen ergaben, dass durch die Gabe von Il-1 bzw. Il-2 die Entstehung und Unterhaltung der CVB3-Myokarditis gefördert wird (80, 81, 82). Spätere Studien zeigten hingegen, dass durch eine frühzeitige Applikation von Il-10 (93), Il-12 bzw. IFN- $\gamma$  (94, 95, 96) oder Il-18 (99) die myokardialen Läsionen vermindert und das Überleben verlängert werden kann. Allerdings wurden diese Untersuchungen mit einem anderen Myokarditismodell (Encephalomyocarditis virus (EMCV)-Myokarditis) durchgeführt. Inwieweit diese Daten auf die CVB3-Myokarditis übertragbar sind, ist unklar.

Unter den in Abb. 1.1 und 1.2 dargestellten Zytokinen spielt Il-4 eine besondere Rolle. Zum einen hemmt es die Makrophagen, die Expression von proinflammatorischen Th<sub>1</sub>-Zytokinen und stimuliert die eher antiinflammatorische Th<sub>2</sub>-Antwort. Zum anderen inhibiert es die MMP-Transkription und stimuliert die TIMP-1-Expression, was zu einer protektiv wirkenden Verschiebung des MMP/TIMP-Verhältnisses führen könnte.

Diese günstig erscheinenden Eigenschaften von Il-4 waren der Anlass, die Auswirkungen einer exogenen Il-4-Applikation auf den Verlauf der experimentellen CVB3-Myokarditis bei SWR/J-Mäusen in vivo zu überprüfen. Hierzu wurden gesunde und CVB3-infizierte Mäuse ohne bzw. CVB3-infizierte Mäuse mit kontinuierlicher Il-4-Gabe vom Zeitpunkt der Infizierung bis zum

Beginn der chronischen Phase untersucht. Untersuchungsgegenstand waren Parameter der akuten Entzündung, des MMP/TIMP-Systems und die linksventrikuläre Funktion.

Im Einzelnen sollten durch die vorliegende Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

1. Zu welchen Veränderungen der inflammatorischen Parameter (Zytokinexpression, Zellinfiltration) führt eine CVB3-induzierte Myokarditis bei SWR/J-Mäusen am Ende der subakuten Phase?
2. Bestehen zu diesem Zeitpunkt bereits Verschiebungen im Matrixdegradationssystem gemessen am MMP/TIMP-Verhältnis und der uPA- bzw. tPA-Expression?
3. Gehen diese Veränderungen mit einer Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion einher?
4. Welchen Einfluss hat die kontinuierliche Il-4-Gabe auf die Expression proinflammatorischer Zytokine, die Zellinfiltration und das Matrixdegradationssystem?
5. Kann durch eine kontinuierliche Il-4-Gabe eine etwaige linksventrikuläre Funktionsstörung als Folge der subakuten Myokarditis gebessert werden?

## 2 Versuchstiere, Material und Methodik

### 2.1 Tiere

Sämtliche SWR/J-Mäuse wurden aus Zuchten des Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA bezogen. Die Versuchstiere wurden in Gruppen von 6 - 8 Tieren in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen des Typs Makrolon III (42 x 26 x 15 cm) auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Die Umweltbedingungen der Tiere wurden in engem Rahmen konstant gehalten. Die Raumtemperatur lag bei  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , die relative Luftfeuchtigkeit bei  $55 \pm 5\%$  und die Belichtung erfolgte in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus (07<sup>00</sup> bis 19<sup>00</sup> Uhr MEZ). Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse zwei Wochen lang an diese Versuchsbedingungen gewöhnt. Die Ernährung der Tiere erfolgte ad libitum mit pelletiertem Alleinfuttermittel (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage) und sterilem Leitungswasser, das über Tränkeflaschen angeboten wurde. Die Tiere wurden von dem Pflegepersonal täglich sorgfältig kontrolliert und ihre Verhaltensweisen protokolliert.

### 2.2 Virus

Die Infizierung der Mäuse erfolgte mit dem Coxsackievirus B3 (CVB3, Nancy strain), das von Prof. Dr. med. Zeichardt, Institut für Virologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, zur Verfügung gestellt wurde. Das Virus wurde in einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  plaque forming units (PFU) in HeLa-Medium bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Unmittelbar vor der Anwendung wurden Einzeldosen von  $5 \times 10^5$  PFU in 0,5 ml PBS-Puffer (150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) gelöst und im Wasserbad auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt.

### 2.3 Material

#### 2.3.1 Antikörper, Enzyme, Primer und Chemikalien

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller / Lieferant
ABC-Reagenz	VECTASTAIN <sup>®</sup> Standard	Vector, Laboratories, Burlingame, U.S.A.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezifizierung</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
Aceton		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	SeaKem LE Agarose	Cambrax, Rockland, U.S.A.
Anti-Maus-CD3-AK	1:50, Ratte	Serotec, Eching, Deutschland
Anti-Maus-CD11b-AK	1:50, Ratte	BD Biosciences (Pharmingen), Heidelberg, Deutschland
Anti-Ratte-IgG-AK	1:100, Kaninchen, EO 468	Dako, Hamburg, Deutschland
Aqua bidest.	Aqua Spüllösung, steril	Delta Select, Pfullingen, Deutschland
Avidin / Biotin	Avidin / Biotin Blocking Kit	Vector, Laboratories, Burlingame, U.S.A.
Biotherm Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase	Rapidozym, Berlin, Deutschland
Borsäure		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
BSA	Bovines Serum Albumin	Vector Laboratories, Burlingame, U.S.A.
Carbazol	3-Amino-9-Ethylcarbazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Blue	Coomassie Blue G-250	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DEPC-behandeltes Aqua bidest.	RNase freies Wasser	Promega, Mannheim, Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
DNA-Längenstandard	Marker VIII	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
DNase I	RNase freie DNase	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
DNTP Set	dATP, dGTP, dCTP, dTTP	AB-Gene, Hamburg, Deutschland
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	100% (Eisessig) p.a.	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	Ethanol absolut p.a.	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	1% Lösung in Wasser	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Farblack zur Kernfärbung	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
HCL	1 N (1mol/l)	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	2-Propanol	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaiser's Glycerin-gelatine	Gelatine 7040	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid	gekörnt	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland



<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezifizierung</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
Magnesiumchlorid	als Hexahydrat	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol		J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumacetat		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat-Trihydrat		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdesoxycholsäure		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N-Dimethylformamid		VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P-40		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Normalserum	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Primer		TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
Protein Assay Kit BCA		Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
Proteinmarker	für Zymographie	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Reverse Transkription	cDNA Synthese Kit	Promega, Mannheim, Deutschland
rmIL-4	rekombinantes murines IL-4	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
RNase Zap	aktiver RNase-Inhibitor	Ambion, Austin, U.S.A.
RNasin		Promega, Mannheim, Deutschland
SDS	Sodiumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris-Base	Trishydroxymethylaminomethan	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethanhydrochlorid	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton	X-100 p.a.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trizol LS Reagent	zur RNA-Extraktion	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween <sup>®</sup> 20	Polyäthylenglykol-Sorbitan-Fettsäureester	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v) p.a.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Xylol	Xylol Isomere f. die Histologie	VWR Merck, Darmstadt, Deutschland
Zymographie-Gel	Ready Precast Gel 10%	Bio-Rad, München, Deutschland

### 2.3.2 Lösungen

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
AEC-Färbelösung	Immunhistochemie	0,025% AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) (w/v) 5% N,N-Dimethylsulfonamid (v/v) 3 mM Essigsäure 7 mM Natriumacetat 0,01% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v) ad Aqua dest.
Agarosegel	PCR	Agarose 1% Ethidiumbromid 0,5 x TBE
Elektrophoresepuffer	Zymographie	250 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1% SDS (w/v) ad Aqua dest. pH 8,3
Entfärbelösung	Zymographie	70 ml Eisessig 350 ml Methanol 600 ml Aqua dest.
Enzympuffer	Zymographie	12,1 g Tris-Base 63,0 g Tris HCL 117 g NaCl 7,4 g CaCl <sub>2</sub> 500 µl MgCl <sub>2</sub> 20 ml Brij 35 ad 1000 ml Aqua dest.
Ladepuffer	PCR-Elektrophorese	40% Sucrose (w/v) 0,25% Bromphenolblau (w/v)
Pepsin	Immunhistochemie	Pepsin, Dako 1 N HCl ad Aqua dest.
Renaturierungspuffer	Zymographie	Triton X-100 ad Aqua dest.

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
RIPA-Puffer  Proteasehemmer	Proteinextraktion	PBS 1% Nonidet P-40 0,5% Natriumdesoxycholsäure 0,1% 20%iges Natriumdodecylsulfat  mit 0,2 M PMSF in Ethanol Aprotinin 1 µg/µl in Aqua dem. Leupeptin 5 mg/ml in Aqua dem. Pepstatin 5 mg/ml in Methanol
TBE-Puffer	Agarosegelelektrophorese	45 mM Tris-borat 1 mM EDTA, pH 8,0
TBS pH 7,6-7,8	Immunhistochemie	60,60 g Trizma HCl 13,90 g Trizma Base 87,66 g NaCl ad 1 l Aqua dest.
TE-Puffer	Nested PCR Virusnachweis	10mM Tris-HCl 1mM EDTA, pH 7,4
Tween <sup>®</sup> 0,025%	Immunhistochemie	250 µl Tween <sup>®</sup> 20 ad 1 l TBS

### 2.3.3 Arbeitsgeräte und Programme

Gerät / Programm	Bezeichnung / Hersteller
Absorbance Reader für ELISA	Magellan Standard, Sunrise, Tecan, Austria GmbH, Grödig/Salzburg, Österreich
Aufzeichnung der Hämodynamik	WR3101 Mark VII Linearrecorder; Graphtec Corporation, Tokyo, Japan
Autoklav	Hartmann, Schleswig, Deutschland
Brutschrank	Function Line; Heraeus, Osterode, Deutschland
Drucker, farbig	Stylus Photo 870, Epson
Drucker, schwarz-weiss	HP Laser Jet 1300, Hewlett-Packard
Eismaschine	AF-10; Scotsman, Vernon Hills, U.S.A.

<b>Gerät / Programm</b>	<b>Bezeichnung / Hersteller</b>
Eisschrank -20°C:	Economic super; Bosch AG, Stuttgart, Deutschland
-20°C/4°C:	Electronic; Bosch AG, Stuttgart, Deutschland
-80°C:	Ultralow Freezer; Zapf Instrumente, Sarstedt, Deutschland
Elektrophoresekammer (Agarosegele)	Standard Power Pack P25; Biometra, Göttingen, Deutschl.
Elektrophoresekammer (Zymographie)	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelschlitten	Eigenproduktion Charité
Gewebeeinbettungsautomat	Shandon, Frankfurt/Main, Deutschland
Grafikprogramm	Corel Draw 6.0; Corel, Unterschleissheim, Deutschland
Konduktanzkatheter	1,4-F Millar Mikrokonzuktanz-Katheter, (ARIA SPR-719); Millar Instruments, Houston, U.S.A.
Homogenisator	Pellet Pestle Motor; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschl.
Magnetrühr- / Erwärmungsplatte	Ikamag RCT; IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop	Leica DMRD; Leica, Bensheim, Deutschland
Mikroskopkamera	DC Viewer; Leica, Bensheim, Deutschland
Mikrotom	Jung CM 3000; Leica, Bensheim, Deutschland
Mikrowelle	Privileg Microwave 800; Welabo, Düsseldorf, Deutschland
Ofen 250°C	Heraeus, Osterode, Deutschland
PCR- Thermozykler	Mastercycler gradient; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter 646, Knick; Beyer, Düsseldorf, Deutschl.
Photometer	DU 640i; Beckman-Coulter, Krefeld, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Schüttler	KS 500; IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland SM 25; Bühler, Tübingen, Deutschland
Software zur digitalen Messung der optischen Dichte	Scion Corporation, Maryland, USA
Software zur Digitalisierung der Gele	BioDoc V2.0; Biometra, Göttingen, Deutschland
Software zur Auswertung immunhistologischer Schnitte	Lucia G V3.51; Imaging Laboratories, Prag, Tschechische Republik
Statistikprogramm	SPSS 10.0.1; SPSS Incorporation, Chicago, U.S.A.
Tabellenerstellungsprogramm	Excel 2000, Microsoft, Unterschleissheim, Deutschland
Textverarbeitungsprogramm	Word 2000, Microsoft, Unterschleissheim, Deutschland

<b>Gerät / Programm</b>	<b>Bezeichnung / Hersteller</b>
Thermomixer	Comfort; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Ultrazentrifuge	Sorval Superspeed RC-2B; Kendro, Langenselbold, Deutschland
UV-Transilluminator	BioDoc Analyze System; Biometra, Göttingen, Deutschland
Vortexgeräte	MS2 Minishaker; IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland Vibro-Fix; IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Waage, elektronisch	DMS 580; Kern Elektronik, Albstadt, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.0R; Heraeus, Osterode, Deutschland

#### 2.3.4 Verbrauchsartikel

<b>Artikel</b>	<b>Spezifizierung</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
Deckgläser	24 x 50 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einmalhandschuhe	Derma-Free	Ansell-Medical, Bangkok, Thailand
Feintücher	Kim Wipe lite	Hakle-Kimberley, Mainz, Deutschland
Homogenisierstäbe	Pellet Pestles	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Objektträger	Unbeschichtet für Immunhistochemie	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Photopapier	K 65 HM-CE	Sony, Köln, Deutschland
Pipettenspitzen	10, 100, 1000 µl unsteril 10, 100, 1000 µl mit Filtertip, RNase frei	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Polyacrylamidgel	7,5% Tris-HCl-Gel	Bio-Rad, München Deutschland
Reaktionsgefäße	0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml Safe-Lock bzw. RNase frei	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifugengefäße	Sorval Polypropylen Oak Ridge Bottle	Kendro, Langenselbold, Deutschland

## 2.4 Tierversuche

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes von 1993. Für die Versuche erteilte das Landesamt für Landesschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin die Genehmigung. Der tierexperimentelle Teil dieser Arbeit wurde gemäß den Richtlinien des Deutschen Ethikrates und der Gesundheitsbehörde NIH sowie mit Billigung der Ethikkommission des CBF durchgeführt.

## 2.5 Versuchsanordnung

Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. P. L. Schwimmbeck (Institut für Kardiologie und Pulmologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin) durchgeführt. Das Maus-Myokarditismodell ist in unserer Arbeitsgruppe seit längerem etabliert und bereits in mehreren Studien zur Anwendung gekommen (160, 170, 210, 211). Für die Untersuchung wurden acht Wochen alte männliche SWR/J-Mäuse verwandt, die vom Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA bezogen wurden. Insgesamt wurden 24 SWR/J-Mäuse ausgewählt und randomisiert auf vier Gruppen verteilt (Tab. 2.1).

**Tab. 2.1:** Versuchsgruppen

Versuchsgruppen	Kürzel	Behandlung
Gruppe 1 (n = 6)	K	Nicht infizierte Kontrolltiere
Gruppe 2 (n = 6)	K+Il-4	Nicht infizierte Tiere mit mrIL-4 vom 1. - 14. Tag
Gruppe 3 (n = 6)	I	CVB3-infizierte Tiere
Gruppe 4 (n = 6)	I+Il-4	CVB3-infizierte Tiere mit mrIL-4 vom 1. - 14. Tag

Am Tag 0 erhielten die Tiere der Gruppe 1 (Kontrollen, K) einmalig eine Injektion mit 0,5 ml PBS i.p. im Sinne einer Scheininjektion. Die Tiere der Gruppe 2 (K+Il-4) erhielten eine einmalige Injektion mit 0,5 ml PBS i.p. im Sinne einer Scheininjektion und wurden mit 200 ng rekombinantem murinem Interleukin-4 (rmIL-4; R&D System) gelöst in 100 µl PBS + 0,1% BSA

täglich i.p. für 14 Tage behandelt. Die Tiere der Gruppe 3 (I) wurden mit  $5 \times 10^5$  plaque forming units (PFU) CVB3 (Nancy strain) in 0,5 ml phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS) i.p. infiziert. Die Tiere der Gruppe 4 (I+II-4) wurden mit  $5 \times 10^5$  plaque forming units (PFU) CVB3 (Nancy strain) in 0,5 ml phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS) i.p. infiziert und analog zur Gruppe 2 mit 200 ng rekombinantes murines Interleukin-4 täglich i.p. für 14 Tage behandelt.

Am 14. Tag post infectionem wurde die Studie nach Erhebung der hämodynamischen Parameter (s. 2.10, S. 57) beendet.

## **2.6 Gewebepräparation**

Nach den hämodynamischen Messungen wurden die Tiere getötet und die Herzen unter sterilen Bedingungen am Gefäßstiel entnommen. Die blutleeren Herzen wurden gewogen und zu dem vor dem Eingriff erhobenen Gewicht der Tiere in Beziehung gesetzt. Anschließend wurden die Vorhöfe entfernt und die Ventrikel durch Schnittführung senkrecht zur Herzlängsachse geteilt. Der proximale Teil, der für die spätere RNA- bzw. Protein-Extraktion vorgesehen war, wurde sofort in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Der untere Teil im Bereich der Herzspitze wurde für die nachfolgende Paraffineinbettung und immunhistologische Aufarbeitung in 4%iger neutraler Formalinlösung fixiert.

## **2.7 Molekularbiologische Methoden (Polymerase-Kettenreaktion)**

### **2.7.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Bei der PCR handelt es sich um ein Verfahren, mit dem geringste Mengen von DNA vervielfältigt und danach mit üblichen Labormethoden nachgewiesen werden können. Das Prinzip beruht auf einer vielfachen Wiederholung eines Reaktionsablaufes (Zyklus), der aus drei Schritten besteht. Im ersten Schritt werden die beiden komplementären DNA-Stränge durch Erhitzen auf  $94 - 96^\circ\text{C}$  getrennt (Denaturierung). Durch Abkühlen auf  $50 - 65^\circ\text{C}$  binden im

zweiten Schritt synthetische Primer (kurze DNA-Stücke mit definierter Sequenz) an den komplementären Teil der DNA-Einzelstränge (Hybridisierung). Im dritten Schritt wird die Temperatur auf die optimale Arbeitstemperatur von zugegebenen DNA-Polymerasen (68 - 72°C) angehoben, die dann die DNA vom Primerende aus entsprechend dem DNA-Einzelstrang verlängern (Elongation, DNA-Polymerisation). Durch ständige Wiederholung eines solchen Zyklus verdoppelt sich jeweils die Anzahl der kopierten DNA-Moleküle. Im Anschluss an die PCR können die PCR-Produkte durch eine Agarosegelelektrophorese (s. 2.7.8, S. 48) sichtbar gemacht und ggf. quantifiziert werden.

### **2.7.2 RNA-Extraktion mittels TRIZOL<sup>®</sup>**

Die RNA-Extraktion aus den Herzproben wurde mittels der Trizol-Methode gemäß den Protokollen der Firma Gibco BRL nach der modifizierten Single-Step-Methode von Chomczynski (212) durchgeführt. Für die Aufarbeitung der RNA wurden ausschließlich sterile RNase-freie Substanzen und Materialien verwendet. Alle Glasgefäße wurden zuvor fünf Stunden bei 250°C ausgebacken. Sämtliche selbst hergestellten Reagenzien wurden mit frischem Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Aqua bidest. angesetzt. Zur Eliminierung von RNasen wurden Arbeitsflächen, Materialien sowie Einmalhandschuhe großzügig mit RNase-Zap behandelt.

Die in Stickstoff gelagerten Myokardproben wurden jeweils zu 400 µl Trizol<sup>®</sup> (Lagerung bei 4°C) gegeben und anschließend gewogen. Zunächst erfolgte die manuelle Zerkleinerung der Gewebestücke mittels Pellet Pestles und anschließend die vollständige Homogenisierung. Daraufhin wurden weitere 400 µl Trizol hinzugefügt, der Ansatz von 800 µl gründlich durchmischt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 160 µl Chloroform und starkem Schütteln über 15 sec wurde der Ansatz ca. 3 min stehen gelassen. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Gewebeproben bei 4°C mit 12.000 g über 15 min bis zur Separation von drei Phasen: der Oberphase, der Zwischenphase und der Unterphase. Die wässrige RNA-haltige Oberphase wurde abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA- und proteinhaltige weiße Zwischenphase und die rötliche Unterphase wurden für die spätere Proteinextraktion bei -20°C gelagert.



Zur Ausfällung der RNA wurden der RNA-haltigen Oberphase 400 µl Isopropanol zugegeben, die Lösung mehrmals vorsichtig geschwenkt und anschließend ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei 12.000 g und 4°C wurde die RNA über 20 min zentrifugiert und pelletiert. Nach Entfernung der überstehenden Flüssigkeit wurden unter sorgsamer Schonung des Pellets 800 µl 75%iges Ethanol (v/v, -20°C) zum Waschen und Lösen des Pellets dazugegeben. Anschließend wurde das Gemisch bei 7.500 g und 4°C erneut über 15 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Ethanols und Trocknen des Pellets an der Luft über etwa 10 min erfolgte die gewichtsadaptierte, gewebeabhängige Zugabe von nukleasefreiem Wasser (DEPC-behandeltes Aqua bidest.) zu den glasigen Pellets gemäß der Formel:

$$\text{Lösemenge (}\mu\text{l)} = \text{Gewebemasse (mg)} \times 1,6 \text{ (= spez. Gewebefaktor für das Herz)}$$

Zur vollständigen Lösung wurden die Pellets im Thermomixer bei 300 rpm und 58°C über 10 min inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Ausgehend von einem Verhältnis von 80% RNA und 20% DNA wurde die exakte Nukleinsäurekonzentration der Probe mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Die Qualität der RNA wurde dabei photometrisch als Ratio  $A_{260} / A_{280}$  überprüft und in einem Bereich von 1,6 - 1,8 als qualitativ gut beurteilt.

### 2.7.3 DNase Verdau

Im Rahmen der RT-PCR wird die Genexpression bzw. die Expression von RNA untersucht, indem letztere in eine cDNA überführt wird. Um Interferenzen mit der DNA der Gewebeproben zu vermeiden, muss diese jedoch zuvor durch eine DNA-Verdauung eliminiert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Behandlung mit DNase I<sup>®</sup> nach Protokollen der Firma Roche durchgeführt.

10 µg der isolierten RNA wurden in einem 50 µl Reaktionsgemisch (25 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,2) mit 25 U RNase-freier DNase I<sup>®</sup> für 2 h bei 37°C im Thermozykler inkubiert. Zur anschließenden Inaktivierung der DNase wurde die Lösung über 5

min bei 90°C inkubiert und dann 5 min auf Eis gestellt. Die restlose Elimination der DNA wurde mittels einer Kontroll-PCR mit  $\beta$ -Aktin-Primern überprüft und bei Unvollständigkeit noch einmal eine Behandlung mit 25 U 10% DNase I<sup>®</sup> durchgeführt. Die vollständig verdauten Proben wurden mittels Photometrie (260 nm und 280 nm) untersucht und die Konzentration der RNA bestimmt.

#### **2.7.4 Reverse Transkription**

Die Überführung der RNA in cDNA (complementary DNA) erfolgte durch Reverse Transkription. Dies ermöglichte die anschließende Untersuchung der Proben mittels semiquantitativer RT-PCR. Die cDNA-Synthese wurde mit dem Reverse Transkriptions System der Firma Promega (Promega, Mannheim, BRD) mit einem „first strand“ cDNA Synthese Kit nach den dazugehörigen Protokollen durchgeführt. 2  $\mu$ g RNA wurden ad 10  $\mu$ l mit nukleasefreiem DEPC-behandeltem Aqua bidest. aufgefüllt und 10 min bei 70°C denaturiert. Im Folgenden wurde die RNA in einem 40  $\mu$ l Reaktionsgemisch (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM dNTP`s, 40 U RNAsin, 1  $\mu$ g Oligo-(dT)15-Primer) mit 25 U AMV-Reverse Transkriptase bei 42°C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der AMV Reverse Transkriptase durch Inkubation des Ansatzes über jeweils 5 min bei 95°C und Abkühlen auf Eis. Die so gewonnene hochkonzentrierte cDNA wurde zunächst bei -80°C zwischengelagert. Für die Durchführung der PCR-Reaktion wurde die cDNA bei Raumtemperatur aufgetaut und gleichmäßig mit DEPC-behandeltem Aqua bidest. verdünnt, so dass sie anschließend in die PCR-Reaktion eingesetzt werden konnte.

#### **2.7.5 Optimierung der PCR-Bedingungen**

Für einen optimalen Ablauf der PCR und als Voraussetzung für eine semiquantitative Auswertbarkeit sowie Reproduzierbarkeit der Ergebnisse müssen die Primeranlagerungstemperatur und die Zyklenzahl für jeden Primer individuell ermittelt werden.

### 2.7.5.1 Primeranlagerungstemperatur

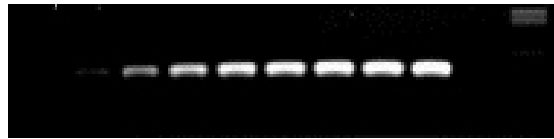
Zunächst wurde die Primeranlagerungstemperatur für alle Primerpaare mittels des Gradient-Thermostats der Firma Eppendorf ermittelt. Hierzu wurden mehrere Probeläufe zwischen 50°C und 70°C durchgeführt (PCR 1: T = 55,0°C, G = 5,0°C; PCR 2: T = 60°C, G = 5°C; PCR 3: T = 65,0°C, G = 5,0°C). Eine optimale Anlagerungstemperatur liegt dann vor, wenn das Signal maximal, ohne oder mit nur schwachen Nebenbanden (unspezifischen Signalen) versehen, zur Darstellung kommt. Bei den verwendeten Primern, die im Einzelnen in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgeführt sind, ergaben sich optimale Anlagerungstemperaturen zwischen 51°C - 64°C. Zusammen mit der optimalen Primeranlagerungstemperatur wurde die günstigste MgCl<sub>2</sub>-Konzentration durch Variation zwischen 1,5 bis 4,0 mM in Form der stärksten spezifischen Bande ermittelt.

### 2.7.5.2 Zyklenzahl

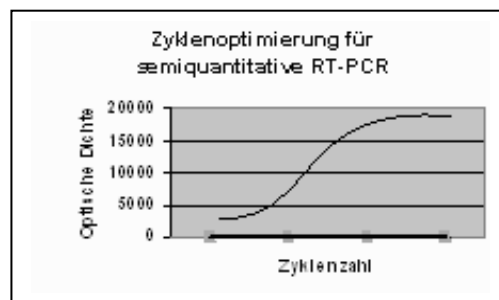
Im Hinblick auf die semiquantitative Auswertung und für den Vergleich von PCRs ist entscheidend, dass sie sich im exponentiell linear ansteigenden Abschnitt der Amplifikationskurve befinden. Es wurden deshalb PCRs unter gleichen Versuchsbedingungen mit identischen Reaktionsansätzen jedoch unterschiedlichen Zyklenzahlen durchgeführt. Die Proben wurden nebeneinander in einem 2%igen Agarosegel mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen und die spezifischen Banden der PCR-Produkte als optische Dichtewerte (OD) mit Hilfe der Scion-Image-Software (Scion Corporation, Maryland, USA) gemessen (s. Abb. 2.1).

Die optischen Dichtewerte wurden als Maß für die Stärke der Signale gegenüber den Zyklenzahlen aufgetragen. Für die semiquantitative RT-PCR wurde eine Zykluszahl im unteren linear ansteigenden Teil der Amplifikationskurve gewählt (s. Abb. 2.2). Die ermittelten optimalen Zyklenzahlen sind für die einzelnen Primer in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgeführt.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 N M



**Abb. 2.1:** Amplifikation von  $\beta$ -Aktin bei verschiedenen Zyklenzahlen  
 Spur 1-9: Ansteigende Zyklenzahlen (Zyklus 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31)  
 N: Negativkontrolle, M: Marker



**Abb. 2.2:** Zyklusoptimierung für semiquantitative RT-PCR

### 2.7.6 RT-PCR und Nested-RT-PCR

Zum Nachweis enteroviraler RNA wurde eine RT-PCR („reverse transcription-polymerase chain reaction“) modifiziert nach Saiki et al. (213) durchgeführt. Die hierfür benötigten Primer wurden von der Firma TIB Molbiol bezogen. Die Primersequenzen und die ermittelten Anlagerungstemperaturen sowie Zyklenzahlen sind in der Tabelle 2.2 aufgelistet.

**Tab. 2.2:** Charakteristika der Primer für den Nachweis von enteroviralem Genom.

Amplifikat	Sequenzen AS 5'→3'	Sequenzen SE 5'→3'	Anlagerungs- temperatur (°C)	Zyklen
CVB3 <sub>(Basis)</sub>	cggtacctttgtgcgcctgt	caggccgccaacgcagcc	61,0	30
CVB3 <sub>(Nested)</sub>	ccccggactgagtatcaata	ggccgccaacgcagccaccg	57,0	35
β-Aktin	agggaaatcgtgcgtgacat	catctgctggaaggtggaca	64,0	26

Nach reverser Transkription mit MMLV-Reverse Transkriptase jeder einzelnen RNA-Probe unter Einsatz von Random-Primern wurden 100 ng cDNA für die PCR eingesetzt. Zunächst wurde als Kontrolle eine RT-PCR mit dem „housekeeping enzyme“ β-Aktin durchgeführt. Hierfür wurde die gewonnene Stocklösung der cDNA für die β-Aktin-PCR und die CVB<sub>3</sub>-Basis-PCR mit autoklaviertem Aqua dest. 1:5 verdünnt. Es wurde ein 20 µl Reaktionsansatz aus Puffer, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM β-Aktin Primer AS, 0,5 µM β-Aktin Primer SE, 0,25 mM dNTPs, 0,025 U/µl Gold Taq und Aqua dem. erstellt und 5 µl der verdünnten cDNA hinzugegeben. Dem Ansatz wurde ein Tropfen Mineralöl zugefügt. Die Amplifikation der cDNA wurde mit einem 26 Zyklen umfassenden Programm im Thermozykler der Firma Eppendorf durchgeführt, der bei Verwendung der Gold Taq nicht vorgeheizt werden sollte. Zunächst durchliefen die Proben 7 min bei 95°C. Die darauf folgenden Zyklen bestanden jeweils aus einer 45 sec dauernden Denaturierung bei 95°C, Primeranlagerung bei 64°C und DNA-Synthese bei 72°C. Abschließend durchliefen die Proben einen DNA-Syntheseschritt über 10 min bei 72°C. Als interne Negativkontrolle wurden für jede amplifizierte cDNA-Probe zweimal Aqua dest. und als interne Positivkontrollen eine Koamplifikation von endogenem β-Aktin sowie von klonierter cDNA von Coxsackievirus B3 (PCV B3-Typ, 73,5 ng/µl) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit 2%igem Agarosegel mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid. Die Signale wurden anschließend mittels BioDoc Analyse System unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm aufgenommen.

Anschließend wurde die Basis RT-PCR zum Nachweis von CVB<sub>3</sub> durchgeführt. Hierfür wurden einem Reaktionsansatz von 20 µl bestehend aus Puffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM CVB<sub>3(Basis)</sub> AS und 0,4 µM CVB<sub>3(Basis)</sub> SE, 0,2 mM dNTPs, 0,025 U/µl Gold Taq sowie Aqua dem. je 5 µl cDNA und ein Tropfen Mineralöl zugefügt. Zur Kontrolle wurden vier Negativ- und vier

Positivkontrollen koamplifiziert. Die Proben durchliefen im Thermozykler 7 Minuten bei 95°C, anschließend 30 Zyklen mit je 45 sec Denaturierung bei 95°C, Primeranlagerung bei 61°C, Elongation bei 72°C sowie abschließend eine 10-minütige DNA-Synthese bei 72°C. Danach folgte die Auswertung der PCR im 2%igen Agarosegel mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid.

Zur Steigerung der Sensitivität wurde im Anschluss eine nested-PCR durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die PCR-Produkte der Basis-PCR jeweils 1:100 mit 1 x TE-Puffer (pH 7,6) verdünnt. Davon wurden 4 µl in einer 35 Zyklen umfassenden sekundären PCR erneut amplifiziert. Die Proben durchliefen 7 min bei 95°C und anschließend 35 Zyklen bestehend aus 45 sec Denaturierung bei 95°C, 45 sec Primeranlagerung bei 57°C sowie 45 sec Elongation bei 72°C. Abschließend wurde eine 10-minütige DNA-Synthese bei 72°C durchgeführt. Die Auswertung der PCR erfolgte in einem 2%igem Agarosegel mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid.

### **2.7.7 Semiquantitative RT-PCR**

Die gewonnene cDNA wurde auf die Transkripte der in Tabelle 2.3 aufgeführten Parameter untersucht. Die hierfür benötigten Primer wurden von der Firma TIB Molbiol bezogen. Die Primersequenzen und die ermittelten Anlagerungstemperaturen sowie Zyklenzahlen sind in der Tabelle 2.3 aufgelistet.

Für die RT-PCR von MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-4, TNF- $\alpha$ , tPA, Kol I, Kol III und  $\beta$ -Aktin wurden jeweils 3 µl cDNA eingesetzt, die in 29,9 µl Wasser gelöst wurden. Zu jeder Probe wurden 12,1 µl Reaktionsansatz gegeben (4,5 µl 10 x PCR-Puffer, 2 µl 50 mM dNTPs, 2,0 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 µl 3'Primer, 1,8 µl 5'Primer [Primerkonzentration: 50 ng/µl gelöst in Aqua bidest.]), 0,5 µl 1,25 U Taq-DNA-Polymerase (Rapidozym). Für die PCR von MT1-MMP, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  und uPA wurden je 6 µl cDNA eingesetzt und in 26,9 µl Wasser gelöst. Die Reaktionsansätze von uPA und IFN- $\gamma$  wurden mit 1,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> variiert, IFN- $\gamma$  zeigte die besten Ergebnisse bei Zusatz von 6% DMSO (Dimethylsulfoxid).

**Tab. 2.3:** Charakteristika der Primer für die semiquantitative RT-PCR.

Amplifikat	Sequenzen AS 5'→3'	Sequenzen SE 5'→3'	Anlagerungs- temperatur (°C)	Zyklen
Il-1β	ccactttgctcttgacttct	gggatgatgatgataacctg	51	40
TNF-α	gtggggagcagagggttcagtg	caaaggagagtgggtcaggtt	60	36
INF-γ	agcaacagcaaggcgaaaaag	gttgatctgggggtggggga	56	40
IL-6	cactaggttgccgagtagatctc	atgaagttcctctctgcaagagact	58	40
IL-10	actcttcacctgctccactgc	acatactgtaaccgactcct	62	40
MMP-2	cgggtccattttcttctca	ggagaaggctgtgttcttcg	58	33
MMP-3	atggaaacgggacaagtctg	tggagatgctcactttgacg	51	40
MMP-9	cccacctatccagactcct	cgacagcacctcccactatg	62	38
MT1-MMP	gccatcctttcatag	tgtccccctttaccagtg	55	40
TIMP-4	gtggttctctggtcctacta	ctcttccctctgtggtgtga	60	33
uPA	cagtctgaaccaaaggagcatcagta aac	ccatctaccagaagaacaaggag gaagtc	57	40
tPA	tttctttgtcattgcttcat	catcgtctccatttctct	55	40
Kol I	tggggtggaggaggagttta	ctggaagagcggagagta	55	33
Kol III	caccattgagacattttgaag	cccagaacattacataccact	59	31
β-Aktin	agggaaatcgtgcgtgacat	catctgctggaagggtggaca	60	25

Mittels des Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde ein Zyklus-für-Zyklus-Monitoring der PCR-Produkte durchgeführt, um die Amplifikationseffizienz und die exponentiell-lineare Phase sicherzustellen. Für alle Primerpaare wurde das gleiche PCR-Programm verwendet:

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

Die Schritte 2, 3 und 4 wurden mit der für den jeweiligen Primer ermittelten optimalen Zyklenzahl und der Schritt 3 mit der jeweils ermittelten optimalen Primeranlagerungstemperatur (Tab. 2.3) wiederholt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen und anschließend analysiert. Die einzelnen Banden wurden im UV-Transluminator digitalisiert und die Stärke der Signale mit der Scion-Image-Software (Scion Corporation, Maryland, USA) in Optische Dichtewerte (OD) transformiert.

Jede PCR wurde durch eine oder mehrere weitere PCRs kontrolliert, bestätigt und die Ergebnisse gemittelt. Als Negativkontrolle lief bei allen PCRs ein Reaktionsansatz mit Wasser mit. Als interne Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin mitgeführt. Hierbei ist von Bedeutung, dass  $\beta$ -Aktin in allen Eukaryotenzellen stark exprimiert, jedoch durch eine Virusinfektion nicht beeinflusst wird.  $\beta$ -Aktin wird daher auch als „housekeeping gene“ bezeichnet, weil es von den Zellen unabhängig vom Stimulationsstatus in hohem Maße exprimiert wird.

### **2.7.8 Agarosegelelektrophorese**

Mittels Agarosegelelektrophorese können die DNA-Proben aufgetrennt werden. In diesem mit TBE-Puffer (s.u.) versetzten Medium liegen die Nukleinsäuren aufgrund des pH-Wertes des verwendeten Laufpuffers als Polyanione mit negativ geladenen Phosphatgruppen vor und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Im ausgehärteten Zustand bildet die Agarose eine dreidimensionale Gelmatrix, durch die die Wanderung größerer DNA-Fragmente stärker behindert wird als die kleinerer, so dass die Beweglichkeit der Nukleinsäuren sowohl durch die Nettoladung als auch durch die Molekülgröße beeinflusst wird. DNA-Fragmente gleicher Größe wandern bei konstanter Porengröße und elektrischer Feldstärke übereinstimmend weit in der Gelmatrix. Damit die Nukleinsäuren nur innerhalb der Matrix wandern können, wurden jeweils 45 µl PCR-Produkt mit 9 µl eines 6 x Ladepuffers (40% Sucrose (w/v), 0,25% Bromphenolblau (w/v)) beschwert. Pro Spur wurden jeweils 10 µl der DNA-Probe in Ladepuffer aufgetragen.

Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel (w/v) in TBE-Puffer mittels Horizontalgelelektrophorese für 20 min bei 120 V aufgetrennt. Als Richtwert für die Länge des untersuchten DNA-Fragmentes wurde stets ein DNA-Längenstandard mitgeführt. Der DNA-



Längenstandard enthielt DNA-Fragmente bekannter Größe. Zur optischen Darstellung der DNA unter UV-Licht wurde den Agarosegelen 0,4 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt. Direkt nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel im UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm digital aufgezeichnet (Belichtung 1000 ms, Blende 4,0, Vergrößerungsfaktor 20) und zur Dokumentation elektronisch gespeichert (BioDoc Analyze System; Biometra). Die PCR-Ergebnisse wurden auf β-Aktin bezogen und als relative mRNA-Werte angegeben (OD Zytokin Amplifikat / OD β-Aktin Amplifikat).

## **2.8 Proteinchemische Methoden**

### **2.8.1 Proteinextraktion mittels RIPA-Puffer**

Für die Proteinextraktion mittels RIPA-Puffer wurden die bei der RNA-Präparation zurückgelegten Myokardproben verwendet. Zunächst wurde das Gewebegewicht ermittelt. Anschließend wurde die entsprechende Menge RIPA-Puffer (s. 2.3.2, S. 34), dem unmittelbar vor dem Gebrauch Proteasehemmer zugefügt wurde, gemäß folgender Formel zu den Proben hinzugegeben:

$$\text{RIPA-Puffer-Menge } (\mu\text{l}) = \text{Gewebegewicht (mg)} \times 10$$

Danach wurde auf Eis gearbeitet, um starke Blasenbildung zu vermeiden. Das Gewebe wurde zunächst manuell mittels Pellet Pestles zerkleinert und dann mit einem Stabhomogenisator vollständig homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 600 rpm und 4°C im Thermomixer behandelt sowie anschließend für 15 min bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert und Zellreste pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und in kleineren Mengen aliquotiert, um ein wiederholtes Auftauen der Proteine bei verschiedenen Proteinbestimmungen zu vermeiden. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

### **2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde mittels des BCA-Protein Assay Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) durchgeführt. Der Nachweis basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der zweiwertiges  $\text{Cu}^{2+}$  in alkalischem Milieu zu einwertigem  $\text{Cu}^+$  reduziert wird. Die  $\text{Cu}^+$ -Ionen bilden mit der Bicinchonininsäure (BCA) einen Chelatkomplex, der die kolorimetrische Quantifizierung der Gesamtproteinmenge ermöglicht. Für die Konzentrationsbestimmung wurde eine Eichkurve unter Verwendung einer Verdünnungsreihe (Doppelbestimmung) mit bovinem Serumalbumin (BSA) und Aqua dest. erstellt. Die Proteinkonzentration der Untersuchungsproben wurde dann durch Vergleich der gemessenen Absorption mit der Eichkurve im ELISA-Reader bestimmt.

Nach Erwärmung der Messproben auf Raumtemperatur wurden diese mittels Vortexer gründlich durchmischt. Jeweils 50  $\mu\text{l}$  der mit Aqua dest. im Verhältnis 1:100 verdünnten Proteinlösungen wurden in Form einer Dreifachbestimmung auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 1 ml BCA-Arbeitslösung je Probe versehen. Der Ansatz wurde auf dem Vortexer kurz durchmischt und anschließend für 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Die proportional zur Proteinkonzentration einsetzende Farbentwicklung (lila) wurde innerhalb von max. 30 min mittels ELISA-Reader (SUNRISE) bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen.

### **2.8.3 Gelatin-Zymographie der MMP-2-Aktivität**

Die Gelatin-Zymographie wird zur Aktivitätsbestimmung von Enzymen mit gelatinolytischen Eigenschaften verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde sie zur Bestimmung der Aktivität von MMP-2 eingesetzt. Bei dieser Methode werden die Proteine zunächst elektrophoretisch auf gelatinehaltigen Polyacrylamidgelen getrennt. Danach werden die Gele mit einem enzymhaltigen Puffer inkubiert und anschließend gefärbt. Bei Anwesenheit einer gelatinolytisch aktiven Peptidase stellt sich der betreffende Gelbereich ungefärbt und die unveränderte Gelatine gefärbt dar.

### **2.8.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein Detergenz mit vielen negativen Ladungen. Nach Anlagerung an ein Protein wird dieses denaturiert und die spezifische Ladung des Proteins maskiert. Der entstandene negativ geladene SDS-Proteinkomplex wandert dann in der Gelelektrophorese mit einer Geschwindigkeit, die nur noch von Molekül- und Gelporengröße abhängt, zur Anode. Dies führt im elektrischen Feld bei konstanter Gelporengröße zur Auftrennung der Proteine auf dem Weg zur Anode.

Zunächst wurden die Myokard-Proteinproben mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt und mit der gleichen Menge Ladepuffer (Gesamtvolumen 20 µl; s. 2.3.2, S. 34) vermischt. Anschließend wurde der Ansatz über 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Für die Untersuchung wurden jeweils die 20 µl der Proteinproben auf ein 10%iges Polyacrylamid-Gel mit 0,1% Gelatine (w/v) (Biorad 161-1185) aufgetragen und die Proben bei konstanter Spannung (125 V) über 60 min laufen gelassen. Auf jedem Gel wurde ein Längenstandard mitgeführt, der die Zuordnung der Gelatinase A-Aktivität zu einer spezifischen Bande ermöglichte. Die Elektrophorese erfolgte auf Eis, so dass eine Hitzeentwicklung mit konsekutiver irreversibler Inaktivierung der Proteasen oder eine vorzeitige Gelatinolyse vermieden werden konnten. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das SDS mit Renaturierungs-Puffer (2,5% Triton X-100 (v/v)) unter leichtem Schütteln der Gele über dreimal 20 min entfernt. Als interne Kontrollen wurden pro Gel jeweils eine Negativkontrolle mit Aqua dest. und Ladepuffer, eine Positivkontrolle sowie ein Größenstandard mitgeführt.

### **2.8.3.2 Gelatin-Zymographie**

Nach Entfernung des SDS wurden die Gele mit den Proteinproben bei Raumtemperatur zweimal über 20 min unter leichtem Schütteln in frischem Enzympuffer (s. 2.3.2, S. 34) reaktiviert und im Anschluss für 18 h bei 37°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Abschließend wurden die Gele über 30 min bei Raumtemperatur in Enzympuffer geschüttelt.

### **2.8.3.3 Gel-Färbung und -Entfärbung**

Zur Sichtbarmachung der durch die Aktivität von MMP-2 (= Gelatinase A, Maus 85 kDa) gespaltenen Gelatine in Form von Aussparungen gegenüber dem Rest des Gels wurden die Gele mit 0,5%iger Coomassie-Lösung G250 über 3 h unter leichtem Schütteln gefärbt. Anschließend wurden die Gele mehrfach mit Entfärbelösung aus 7% Essigsäure (v/v) und 35% Methanol (v/v) entfärbt, bis sich deutliche klare Banden gegenüber dem blau gefärbten Hintergrund hervorhoben. Hierbei entsprachen die klaren ungefärbten Banden der MMP-2-Aktivität, durch die die Gelatine gespalten und die Spaltprodukte aus dem Gel diffundierten.

Die gefärbten Gele wurden im UV-Transilluminator mittels der Software BioDoc V2.0 (Biometra) bei einer Wellenlänge von 254 nm digital aufgezeichnet (Belichtung 1000 ms, Blende 4,0, Vergrößerungsfaktor 20) und zur Dokumentation elektronisch gespeichert. Die Stärke der Signale wurde mit Hilfe der Scion-Image-Software (Scion Corporation) ausgewertet und die relativen optischen Dichtewerte (OD) ermittelt. Jede Enzymaktivitätsbestimmung wurde durch eine oder mehrere weitere Bestimmungen bestätigt und die Ergebnisse gemittelt.

## **2.9 Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten**

### **2.9.1 Anfertigung von Paraffinschnitten**

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Gewebeproben zunächst in 4%iger neutraler Formalinlösung fixiert (s. 2.6, S. 39). Im Anschluss an die Fixation wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet. Die hierfür notwendige histologische Gewebeaufarbeitung erfolgte in einem Gewebereinbettungsautomaten in folgenden Teilschritten:

2 x 1 h in 70% Ethanol (v/v)

3 x 2 h in 96% Ethanol (v/v)

2 x 1 h in 100% Ethanol

1 x 1 h in 66% Ethanol in Xylol (v/v)

1 x 1 h in 33% Ethanol in Xylol (v/v)

1 x 1 h in Xylol

2 x 2 h in Paraplast (56°C)

Im Anschluss an die Behandlung im Gewebeeinbettungsautomaten und nach Abkühlung der Masse wurden die fertigen Paraffinblöcke bei 4°C dunkel gelagert. Mit einem Rotationsmikrotom wurden von den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben 5 µm dicke serielle Schnitte hergestellt. Danach wurden die Schnitte auf unbeschichtete Objektträger überführt und bei 37°C über Nacht getrocknet. Die fertigen Paraffinschnitte wurden auf die Marker CD3<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> untersucht.

## 2.9.2 Grundlagen der indirekten immunhistochemischen Färbung

Die Immunhistochemie dient zum Nachweis antigener Strukturen wie Proteine und Polysaccharide auf der Grundlage einer Antigen-Antikörper-Reaktion. In der vorliegenden Arbeit wurde ein indirektes immunhistochemisches Verfahren unter Verwendung von zwei Antikörpern (AK) eingesetzt, das über einen kaskadenförmigen Ablauf den Nachweis von CD3<sup>+</sup>- bzw. CD11b<sup>+</sup>-Zellen erlaubt.

Bei dieser indirekten Methode bindet zuerst ein unkonjugierter Primär-AK an das zu untersuchende Antigen. Anschließend wird ein gegen das Fc-Fragment des Primär-AKs gerichteter Sekundär-AK zugegeben. Danach kann der Sekundär-AK bereits im nächsten Schritt über einen gebundenen Marker nachgewiesen werden. Häufig wird jedoch ein Zwischenschritt zur Erhöhung der Sensitivität eingeschaltet. Hierzu dient die Verwendung eines Sekundär-AKs, an den Biotin gebunden ist (biotinylierter AK). Die hohe Affinität von Avidin für Biotin wird für die nachfolgende Bindung eines Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (ABC-Komplex) an den Sekundär-AK ausgenutzt. Da dieser Komplex eine höhere Anzahl von Markermolekülen (Peroxidase) trägt als bei dem Sekundär-AK möglich wäre, wird das Signal verstärkt (Amplifikation) und der Nachweis sensitiver. Nach Bindung des ABC-Komplexes erfolgt der AK-Nachweis über Umsetzung eines zugegebenen Peroxidase-Substrates (214).

### **2.9.3 Immunhistochemische Färbung von CD3<sup>+</sup>-Zellen**

Als Primär-AK wurde ein monoklonaler Anti-Maus-CD3-AK der Ratte (Firma Serotec, MCA 1477) in einer Verdünnung von 1:50 verwendet, der sich gegen das CD3-Antigen muriner Lymphozyten richtet. Als Sekundär-AK diente ein monoklonaler Anti-Ratte-IgG-AK vom Kaninchen in einer Verdünnung von 1:100 (Firma Dako, EO 468), der sich gegen den Primär-AK der Ratte richtet. Der Sekundär-AK ist für die nachfolgende Bindung des ABC-Komplexes mit Biotin markiert (biotinyliert).

#### **2.9.3.1 Entparaffinierung der Schnitte und Antigendemaskierung**

Zunächst erfolgte die Paraffinentfernung durch zweimaliges Waschen der Schnitte in Xylol über jeweils 10 min. Anschließend wurden das Xylol mittels Abs. Ethanol herausgewaschen und die Schnitte in mehreren Schritten in absteigender Alkoholreihe (90% → 70% → 30% Ethanol) über jeweils 2 min rehydriert. Zur weiteren Bewässerung der Schnitte sowie zum Entfernen des Ethanols wurden die Schnitte im Folgenden in Aqua dest. gespült und über zweimal 3 min bei Raumtemperatur in frischem Aqua dest. stehen gelassen.

Anschließend wurde eine Demaskierung von Antigenen vorgenommen. Formalin kann über eine kovalente Vernetzung von Aminosäuren unter Bildung von Methylenbrücken zu einer Maskierung von Antigenen führen, wodurch die Permeabilität und Bindung von Antikörpern an Antigenstrukturen behindert wird. Um diese „Maskierung“ von Antigenstrukturen und dadurch verfälschte Ergebnisse zu verhindern, wurden die formalinfixierten Präparate mit Pepsin demaskiert. Die entparaffinierten Schnitte wurden mit frisch angesetztem Pepsin (Dako) (4 mg/ml Pepsin in 0,2 M HCl) für 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Demaskierung wurde durch zweimaliges gründliches Spülen mit Aqua dest. beendet.

### 2.9.3.2 Antikörperbindung und Farbreaktion

Da Peroxidase als Enzymmarker diente, wurden zur Blockade endogener Peroxidasen die Schnitte in einer wässrigen Lösung von 0,9% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) über 15 min unter Schütteln inkubiert und die Peroxidasen irreversibel inaktiviert. Nach Entfernung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels Spülung in TBS-Puffer wurden die Objektträger zur Freilegung der AK-Bindungsstellen zweimal über 5 min in 0,025% Tween<sup>®</sup> (in TBS) gewaschen. Avidin bindet nicht nur an Biotin, sondern auch an negativ geladene Gewebestandteile. Zur Absättigung negativer Ladungen an Kollagen- und Bindegewebsproteinen, Vermeidung unspezifischer Hintergrundfärbungen und Blockade des endogenen Biotins wurde eine Lösung aus 10% Normalserum in TBS hergestellt und mit 1% BSA sowie 4 Tropfen Avidin/ml Lösung versetzt. Hierbei müssen zum Ausschluss unspezifischer Bindungen die Herkunft von Normalserum und Sekundär-AK übereinstimmen (im Falle von CD3 das Kaninchen). Mit dieser Lösung wurden die Schnitte gleichmäßig bedeckt und in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur über 30 min inkubiert.

Der nächste Schritt diente der Bindung des Primär-AKs und der Blockade des endogenen Avidins. Hierfür wurde eine Lösung aus Primär-AK in TBS und 1% BSA mit 4 Tropfen Biotin/ml hergestellt, auf die Schnitte gleichmäßig aufgetragen und über 60 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Evtl. danach noch vorhandener ungebundener AK wurde durch Waschen der Schnitte mit 0,025% Tween<sup>®</sup> (in TBS) über zweimal 5 min entfernt. Anschließend wurden der in TBS und 1% BSA gelöste biotinylierte Sekundär-AK aufgetragen und die Schnitte ebenfalls bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer über 30 min inkubiert sowie zweimal mit TBS über jeweils 5 min gewaschen.

Zur Bindung des Enzym-Markers an den Sekundär-AK wurde ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, VECTASTAIN<sup>®</sup>, Vector), der zuvor frisch angesetzt und 30 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert wurde, auf die Schnitte aufgetragen. Nach 30 min bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer wurde noch einmal mit TBS über zweimal 5 min gewaschen. Für die Sichtbarmachung der nun an den Sekundär-AK gebundenen Peroxidase wurde das Chromogen Carbazol (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Merck, Deutschland) verwandt. Die Peroxidase färbt das Carbazol in Anwesenheit des Elektronendonors Wasserstoffperoxid zu einem rotbraunen Farbniederschlag aus, worüber die Identifizierung der CD3<sup>+</sup>-Zellen ermöglicht wird. Hierzu wurden die Schnitte mit einer frisch angesetzten Carbazol-Lösung unter sanftem

Schütteln über 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wegen der Lichtempfindlichkeit des Carbazols wurden die Küvetten abgedunkelt. Die Färbung bzw. die Peroxidase-Reaktion wurden in allen Schnitten parallel und identisch durchgeführt.

Im Anschluss an die Farbreaktion wurden die Schnitte zweimal 5 min mit TBS gewaschen und danach eine Kern- bzw. Zytoplasmafärbung mittels Hämalaun durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte 5 sec in Hämalaun geschwenkt und anschließend in warmem Leitungswasser gespült, bis keine Blaufärbung des Leitungswassers mehr sichtbar war. Abschließend wurden die Schnitte mit Kaiser's Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) überschichtet, mit 21 x 26 mm großen Deckgläsern versehen und haltbar gemacht.

Zur Testung des Primärantikörpers wurden bei jedem Färbedurchgang Schnitte der Milz als Positivkontrolle und Myokardgewebe der Kontrolltiere als Negativkontrolle verwendet. Zur Testung der Spezifität des Sekundärantikörpers wurden Schnitte von Milz und Myokardgewebe der Kontrolltiere anstelle des Primärantikörpers mit Verdünnungspuffer inkubiert, um evtl. unspezifische Färbungen auszuschließen.

#### **2.9.4 Immunhistochemische Färbung von CD11b<sup>+</sup>-Zellen**

Die immunhistochemische Färbung von CD11b<sup>+</sup>-Zellen erfolgte nach oben stehendem Protokoll (s. 2.9.3, S. 54). Als Primär-AK wurden der monoklonale Anti-Maus-CD11b-AK von der Ratte (Firma BD Biosciences), als Sekundär-AK der monoklonale Anti-Ratte-IgG-AK vom Kaninchen (Firma Dako, EO 468; s. 2.3.1, S. 31) verwendet.

#### **2.9.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen**

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte jeweils mittels Computer-assistierter Morphometrie (Software LUCIA G<sup>TM</sup>, Version 3.5.1, Imaging Laboratories, Prag, Tschechien) in einem geblindeten Verfahren. Für jede Gewebeprobe wurden mittels eines



Lichtmikroskops (Leica DMRD™, Leica, Bensheim, Deutschland) zwei Gewebeschnitte mäanderförmig mit einer 200-fachen Vergrößerung untersucht, auf eine Videokamera (Sony 3CCD™ color) übertragen und digitalisiert. Das PC-Programm optimierte Schärfe und Kontrast des Schnittes und zählte die angefärbten Zellen (CD3<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) pro Schnitt. Angegeben wurden die auf einen mm<sup>2</sup> umgerechneten Mittelwerte.

## **2.10 Messung der Hämodynamik**

### **2.10.1 Theorie der Konduktanzmethode**

Die Auswirkungen der CVB3-induzierten Myokarditis auf die Herzleistung und deren Beeinflussung durch eine Interleukin-4 Behandlung sollten durch Bestimmung der Hämodynamik untersucht werden. Die Aufzeichnung von Druck-Volumen-Kurven gilt sowohl beim Menschen als auch bei Tieren als Goldstandard der Hämodynamik-Messung (215). Zur Aufzeichnung des Herzzyklus als Druck-Volumen-Kurve wurde die Konduktanzmethode verwandt, die als genaue Methode zur Beschreibung der linksventrikulären systolischen und diastolischen Funktion des Herzens angesehen wird.

Die Untersuchung wird mit einem Konduktanz-Katheter durchgeführt, der aus vier Elektroden und einem Drucksensor besteht. Die Elektroden sind paarweise über und unter dem Drucksensor angebracht. Die Messung des linksventrikulären Blutvolumens erfolgt über ein elektrisches Feld, das durch die äußeren Elektroden aufgebaut wird. Die Potentialunterschiede an den inneren Elektroden werden kontinuierlich aufgezeichnet und so die Leitfähigkeit zwischen den Elektroden bestimmt. Das aufgezeichnete Volumensignal ist ein Gesamtvolumen aus der Konduktanz des Blutes und der parallelen Konduktanz. Durch Infusion von hypertoner Kochsalzlösung kann die parallele Konduktanz ermittelt und das reale Blutvolumen errechnet werden.

Das intraventrikuläre Volumen  $V_i$  kann mit der Formel

$$V_i(t) = (1/\alpha) (pL^2) (G_i(t) - G_{pi})$$

- $V_i$  = intraventrikuläres Volumen  
 $\alpha$  = Volumen-Kalibrationsfaktor  
 $p$  = elektrischer Widerstand des Bluts  
 $L$  = Abstand zwischen den Elektroden  
 $G_i$  = Gesamtkonduktanz  
 $G_{pi}$  = Konduktanz des umgebenden Gewebes (Parallele Konduktanz)

errechnet werden. Mittels des Drucksensors können der linksventrikuläre endsystolische Druck (LVESP), der maximale Druckanstieg über die Zeit ( $dP/dt_{max}$ ) und der minimale Druckabfall über die Zeit ( $dP/dt_{min}$ ) gemessen werden.  $dP/dt_{max}$  wird als Parameter für die linksventrikuläre Kontraktilität (systolische Funktion) und  $dP/dt_{min}$  als Parameter für die linksventrikuläre Relaxation (diastolische Funktion) verwandt. Mit Hilfe dieser in Echtzeit und in vivo bestimmten Parameter können dann Druck-Volumen-Kurven erstellt werden.

### 2.10.2 Operativer Eingriff und Messvorgang

Die Durchführung der hämodynamischen Messungen erfolgte durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Carsten Tschöpe (Klinik für Kardiologie und Pulmologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin). Am 14. Versuchstag wurden alle 24 Tiere mittels 125  $\mu\text{g/g}$  Kg Thiopental (Glaxo-Smith) i.p. anästhesiert, anschließend intubiert und maschinell mit einem Hubvolumen von 8  $\mu\text{l/g}$  Kg und Raumluft beatmet (Mouse Minivent, Hugo Sachs, Deutschland).

Zur linksventrikulären Katheterisierung wurden am Hals ein Hautschnitt in Längsrichtung von kaudal nach kranial durchgeführt und Halsmuskulatur sowie Speicheldrüsen durchtrennt. Nach Darstellung der rechten A. carotis communis wurde ein 1,4-F Millar Mikrokonduktanz-Druck-Katheter (ARIA SPR-719, Millar Instruments, Houston, USA) mit Mikroinstrumentarium in das Gefäß eingebracht und retrograd über die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt (210, 216). Die Messungen erfolgten jeweils in Apnoe durch Sistieren der Ventilation für etwa fünf Sekunden.

Im Rahmen der Messung wurden folgende Parameter erhoben:

- die Herzfrequenz (S/min)
- der linksventrikuläre endsystolische Druck (LVESP, mmHg),  
als Maß für die maximale Wandspannung
- die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{\max}$ , mmHg/s),  
als Maß für die linksventrikuläre Kontraktilität und
- die minimale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{\min}$ , mmHg/s),  
als Maß für die linksventrikuläre diastolische Relaxation.

Als Maß für die Herzauswurfleistung wurden die

- Ejektionsfraktion (EF, %) und das
- Herz-Minuten-Volumen (CO,  $\mu\text{l}/\text{min}$ )  
mittels der Software IOX V 1.5 (Emka, Frankreich) berechnet.

## 2.11 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden einer deskriptiven und explorativen statistischen Analyse unterzogen. Die Auswertung wurde mit Hilfe der SPSS Software für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden jeweils Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und Median bestimmt. Im Text des Ergebnisteils werden stets die Mittelwerte mit den Standardabweichungen angegeben. Daneben werden alle Parameterergebnisse graphisch in Form von Boxplots dargestellt und wiedergegeben. Hierbei repräsentieren die Box den Interquartilsbereich zwischen 25% und 75%, die innere Linie den Median und die Längslinien (Whiskers) die Werte, die anderthalb Kastenlängen über oder unter denen der Box liegen, begrenzt durch den größten bzw. kleinsten Bereichswert. Werte, die mehr als anderthalb und weniger als drei Kastenlängen außerhalb der Box liegen, werden durch einen Kreis, und Werte, die mehr als drei Kastenlängen außerhalb der Box liegen, durch einen Stern gekennzeichnet.

Da die Stichprobenumfänge z.T. unterschiedlich waren und eine Normalverteilung nicht anzunehmen war, wurde die explorative statistische Analyse ausschließlich mit nichtparametrischen Tests durchgeführt. Zuerst wurde mit Hilfe des H-Tests von Kruskal-Wallis

für jede einzelne Variable geprüft, ob die Stichproben (Untersuchungsgruppen) aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammten. Ergab sich ein signifikanter Unterschied bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  konnte die Nullhypothese (Gleichheit der Gruppen für eine bestimmte Variable) verworfen werden. Nur in diesem Fall wurde anschließend für die entsprechende Variable ein Einzelvergleich zwischen zwei Untersuchungsgruppen mit Hilfe des U-Tests nach Mann-Whitney durchgeführt (217, 218).

Als Maß für die lineare Abhängigkeit zwischen zwei Variablen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Daneben wurden die Einzelwerte der beiden Variablen als x/y-Punkte in ein x/y-Diagramm eingetragen und eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt (217, 218). Im Text werden der Korrelationskoeffizient  $r$ , das Quadrat des Korrelationskoeffizienten  $r^2$  als Bestimmtheitsmaß und die grafischen Darstellungen mit x/y-Punkten und Regressionsgeraden wiedergegeben.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Verhalten der Versuchstiere, Krankheitsverlauf und Mortalität**

Bei den Tieren der Kontrollgruppen (K und K+IL-4) traten keinerlei Verhaltensveränderungen oder körperliche Beeinträchtigungen auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Tiere der virusinfizierten Gruppe (I) im Verlauf der Studie eine zunehmende Krankheitssymptomatik. Nach vier bis fünf Tagen p.i. fielen die Tiere zunächst nur durch ein ruhigeres Verhalten auf. In den darauf folgenden Tagen traten eine Abnahme des Bewegungsdrangs und ein verminderter Fresstrieb in den Vordergrund. Gegen Ende der Studie wirkten die Tiere apathisch und fielen gegenüber den nicht infizierten Kontrollen durch ein geringeres Gewicht und eine geringere Körpergröße auf. Das Fell der infizierten Tiere wurde struppig und stumpf. Die mit IL-4 behandelten infizierten Tiere (I+IL-4) zeigten im Prinzip ähnliche Symptome, jedoch zu einem späteren Zeitpunkt und in einer deutlich abgeschwächten Form.

Während der Untersuchungsdauer bis zum Studienende am 14. Tag verstarb keines der Tiere.

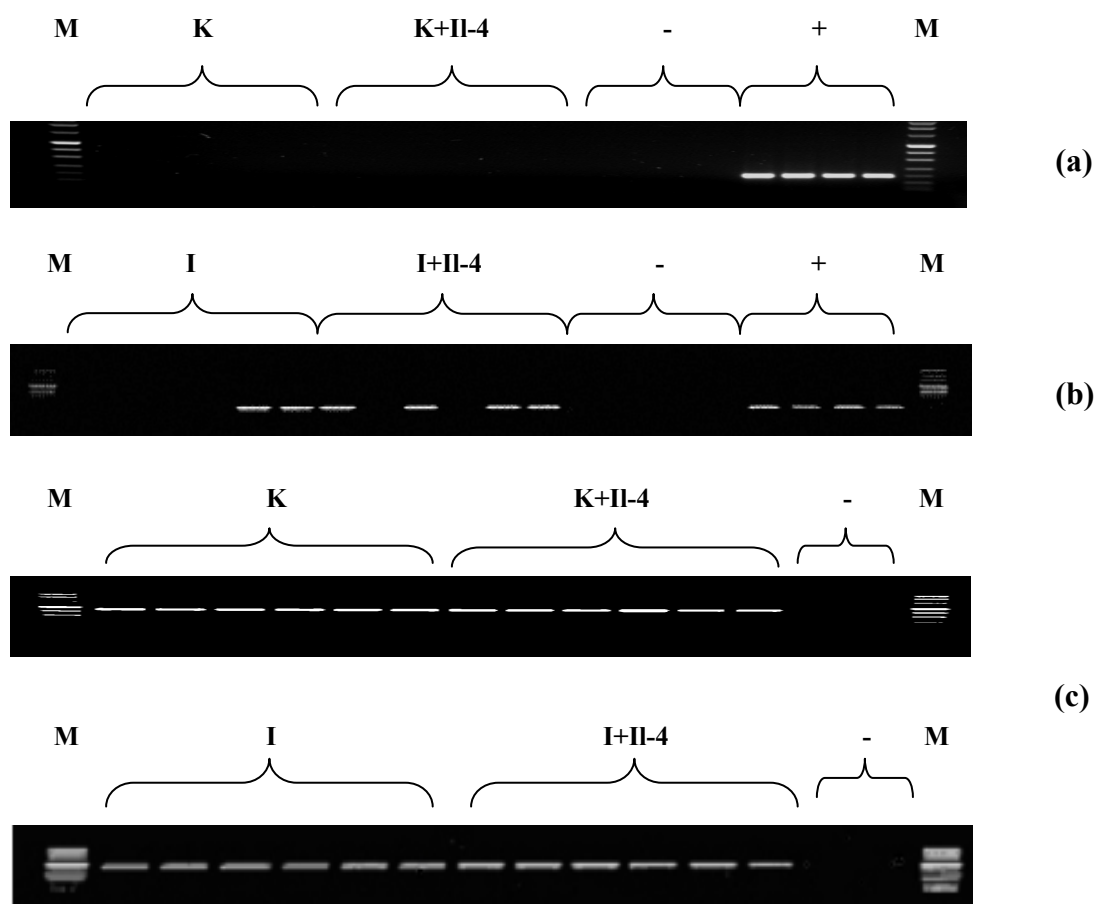
### **3.2 Körper- und Herzgewicht der Versuchstiere**

Zum Körper- und Herzgewicht liegen leider keine Einzeldaten, sondern nur die Schwankungsbreite innerhalb der einzelnen Gruppen vor. Insofern konnte kein statistischer Vergleich durchgeführt werden. Das Körpergewicht der Kontrolltiere (K) reichte von 23,3 bis 23,8 g, das der infizierten Tiere (I) von 20,9 bis 21,4 g und das der infizierten Tiere mit IL-4-Behandlung (I+IL-4) von 23,9 bis 24,3 g. Das Herzgewicht der Kontrolltiere (K) lag zwischen 120 bis 130 mg, das der infizierten Tiere (I) von 100 bis 109 mg und das der infizierten Tiere mit IL-4-Behandlung (I+IL-4) von 120 bis 130 mg.

### 3.3 Ergebnisse der RT-PCR

#### 3.3.1 Nachweis enteroviraler RNA

Mittels RT-PCR in Kombination mit nested-PCR konnte bei keinem der Kontrolltiere (Gruppe K und K+Il-4; s. Abb. 3.1a), jedoch bei 2 der infizierten (I) und 4 der infizierten mit Il-4 behandelten Tiere (I+Il-4); s. Abb. 3.1b) enterovirale RNA nachgewiesen werden.



**Abb. 3.1:** Nachweis enteroviraler RNA mittels seminested RT-PCR

**(a+b)** Nested-PCR von CVB3 **(c)** Interne Kontrolle mit RT-PCR von  $\beta$ -Aktin

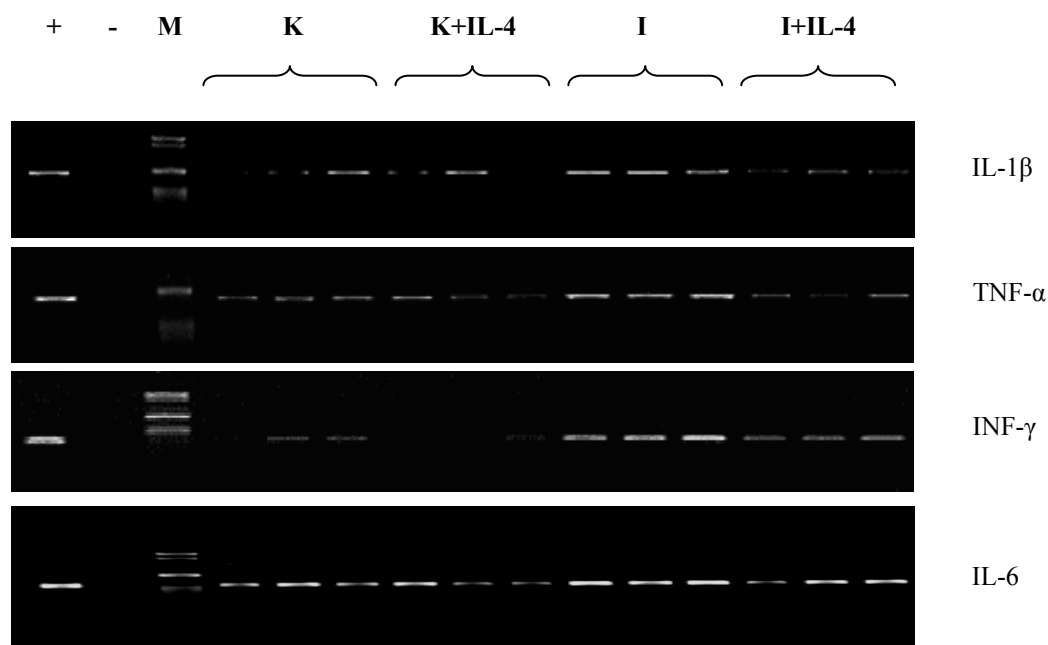
Darstellung im Ethidiumbromid gefärbten 2%igen Agarosegel

(M = DNA-Längenstandard [Marker VIII], - = Negativkontrolle, + = Positivkontrolle)

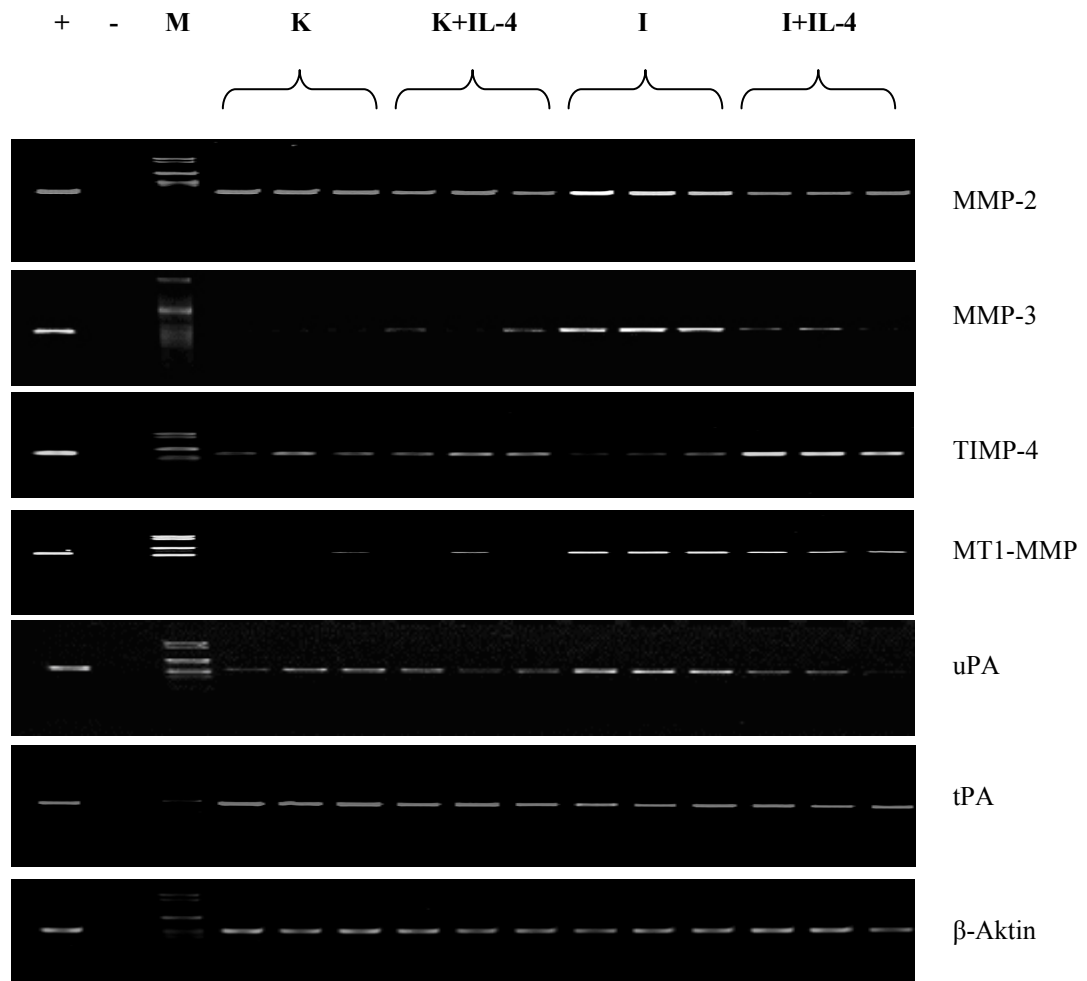
### 3.3.2 Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR

Die Genexpression der einzelnen Variablen ist für die verschiedenen Gruppen anhand repräsentativer PCR-Analysen in Abb. 3.2a und Abb. 3.2b dargestellt. Bei dem Vergleich der vier Gruppen mittels des H-Tests nach Kruskal-Wallis ergab sich für die Variablen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, TIMP-4 und uPA ein statistisch signifikanter Unterschied, so dass für diese die Nullhypothese verworfen und Einzelvergleiche mit dem U-Test nach Mann-Whitney angeschlossen wurden. Für IL-6, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MT1-MMP, tPA, Kol I und Kol III ergab der H-Test keine Signifikanz, so dass für diese Variablen die Nullhypothese nicht verworfen und keine Einzelvergleiche durchgeführt werden konnten.

Bei den Einzelvergleichen der beiden Kontrollgruppen (K gegen K+IL-4) ergab sich für keine der mit dem U-Test geprüften Variablen mit Ausnahme von TIMP-4 ein statistisch signifikanter Unterschied. Bezogen auf TIMP-4 wiesen die mit IL-4 behandelten gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression auf ( $0,72 \pm 0,24$  vs.  $0,40 \pm 0,23$ ;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.2a:** Vergleich der Genexpression von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  und IL-6 in den einzelnen Gruppen



**Abb. 3.2b:** Vergleich der Genexpression von MMP-2, MMP-3, TIMP-4, MT1-MMP, uPA, tPA und  $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen

(Aus jeder Gruppe wurden drei repräsentative Proben ausgewählt und auf einem Ethidiumbromid gefärbten 2%igen Agarosegel aufgetragen. M = Marker)

### 3.3.2.1 mRNA-Expression von Zytokinen

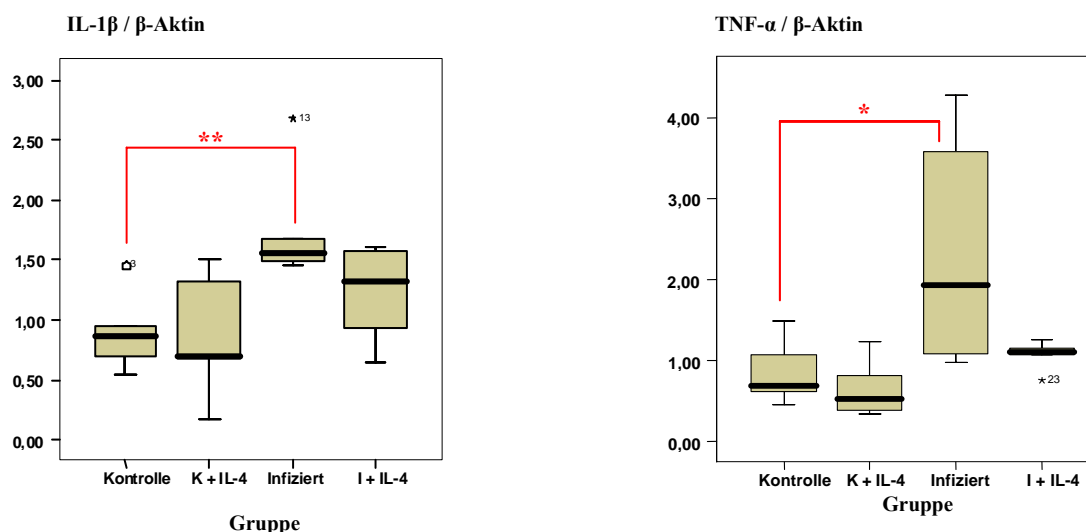
Bei den Einzelvergleichen mit dem U-Test zwischen unbehandelten und mit IL-4 behandelten Kontrolltieren ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  ( $0,84 \pm 0,38$  vs.  $0,64 \pm 0,34$ ), TNF- $\alpha$  ( $0,89 \pm 0,31$  vs.  $0,84 \pm 0,49$ ), INF- $\gamma$  ( $0,39 \pm 0,22$  vs.  $0,30 \pm 0,27$ ) sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10



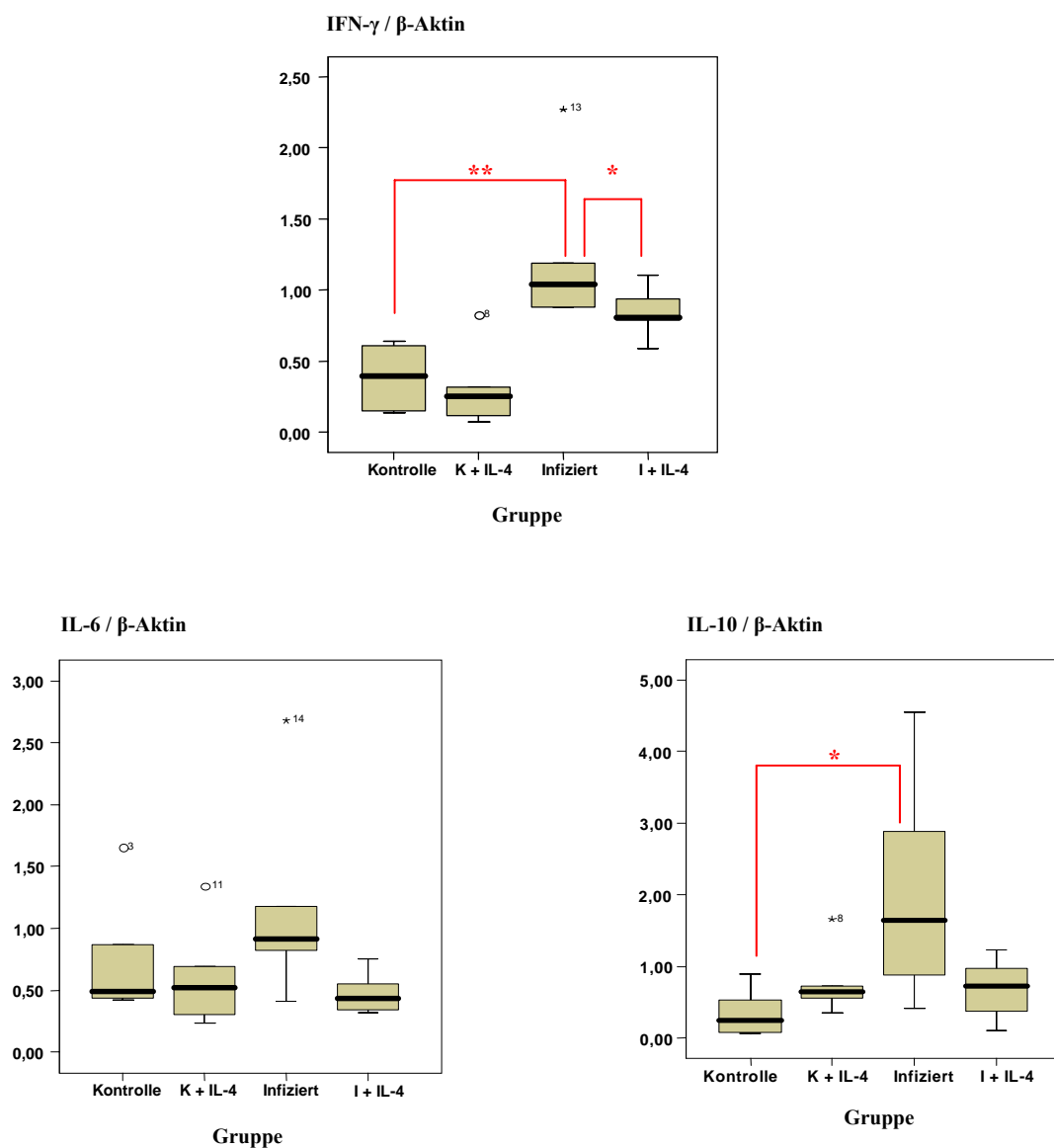
( $0,35 \pm 0,33$  vs.  $0,77 \pm 0,46$ ) nachweisen. Demgegenüber war die mRNA-Expression in der infizierten im Vergleich zu der nicht infizierten Gruppe von IL-1 $\beta$  ( $1,77 \pm 0,51$  vs.  $0,89 \pm 0,31$ ;  $p < 0,01$ ), TNF- $\alpha$  ( $2,30 \pm 1,35$  vs.  $0,84 \pm 0,38$ ;  $p < 0,05$ ), INF- $\gamma$  ( $1,22 \pm 0,53$  vs.  $0,39 \pm 0,22$ ;  $p < 0,01$ ) und IL-10 ( $2,00 \pm 1,52$  vs.  $0,35 \pm 0,33$ ;  $p < 0,05$ ) signifikant erhöht (s. Abb. 3.3a und 3.3b).

Die IL-4-Behandlung der infizierten Tiere hingegen führte zu signifikant reduzierter mRNA-Expression von INF- $\gamma$  ( $0,84 \pm 0,17$  vs.  $1,22 \pm 0,53$ ;  $p < 0,05$ ) und deutlicher, aber nicht signifikant reduzierter mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  ( $1,23 \pm 0,38$  vs.  $1,77 \pm 0,51$ ), TNF- $\alpha$  ( $1,08 \pm 0,17$  vs.  $2,30 \pm 1,35$ ) und IL-10 ( $0,69 \pm 0,40$  vs.  $2,00 \pm 1,52$ ) gegenüber den unbehandelten infizierten Tieren (s. Abb. 3.3a und 3.3b).

Die mRNA-Expression von IL-6 war in der infizierten Gruppe gegenüber der nicht infizierten Gruppe tendenziell erhöht ( $1,15 \pm 0,79$  vs.  $0,73 \pm 0,48$ ) und wurde durch IL-4-Behandlung der infizierten Tiere im Vergleich zu den nicht behandelten infizierten Tieren deutlich gesenkt ( $0,47 \pm 0,16$  vs.  $1,15 \pm 0,79$ ). Allerdings entstammten die Versuchsgruppen für IL-6 gemäß dem H-Test nach Kruskal-Wallis nicht aus verschiedenen Grundgesamtheiten. Daher waren Einzelvergleiche für diesen Parameter unzulässig.



**Abb. 3.3a:** mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in Relation zur mRNA-Expression von  $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen. (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ )

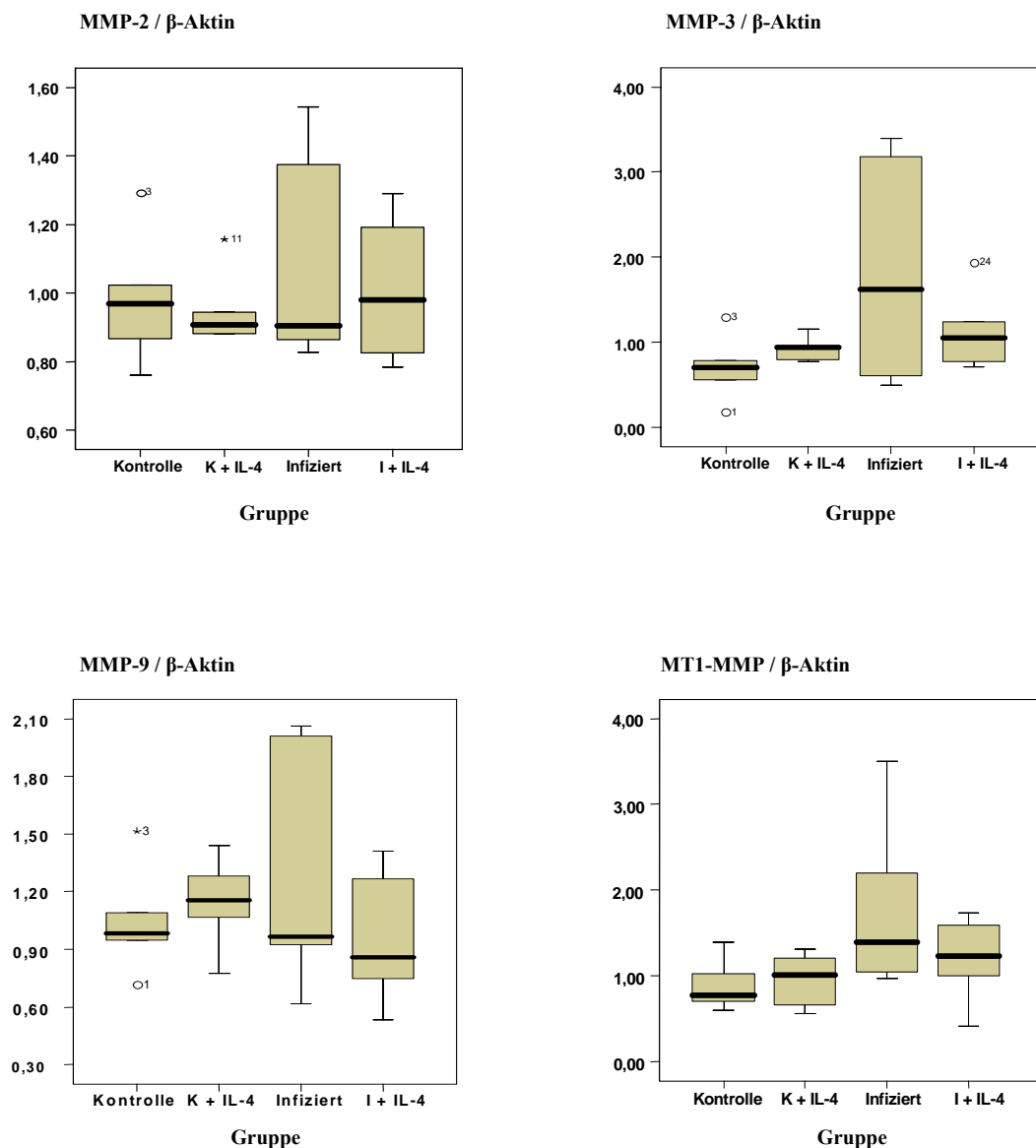


**Abb. 3.3b:** mRNA-Expression von INF- $\gamma$ , IL-6 und IL-10 in Relation zur mRNA-Expression von  $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ )

### 3.3.2.2 mRNA-Expression von MMP-2, MMP-3 und MMP-9

Die mRNA-Expression von MMP-2 und MMP-9 verhielten sich in den verschiedenen Versuchsgruppen relativ ausgeglichen. Die mRNA-Expression von MMP-3 hingegen war in der infizierten Gruppe gegenüber der nicht infizierten Kontrollgruppe um das 2,6-fache erhöht

( $1,82 \pm 1,29$  vs.  $0,71 \pm 0,36$ ) und wurde durch die IL-4-Behandlung der infizierten Tiere im Vergleich zu den nicht behandelten infizierten Tieren um das 1,6-fache gesenkt ( $1,13 \pm 0,45$  vs.  $1,82 \pm 1,29$ ) (s. Abb. 3.4). Allerdings entstammten die Versuchsgruppen für MMP-2, MMP-3 und MMP-9 gemäß dem H-Test nach Kruskal-Wallis statistisch nicht aus verschiedenen Grundgesamtheiten, daher waren Einzelvergleiche für diese Parameter unzulässig.



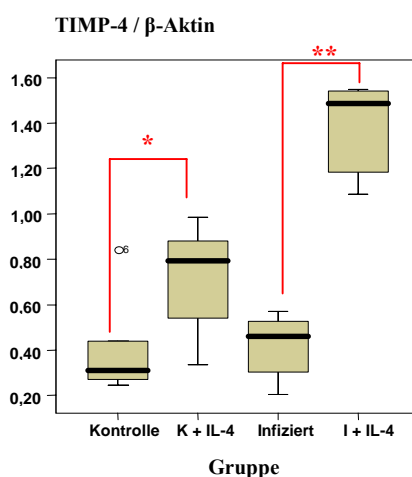
**Abb. 3.4:** mRNA-Expression von MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MT1-MMP in Relation zur mRNA-Expression von  $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen

Für MT1-MMP ergab sich ein Anstieg der mRNA-Expression bei den infizierten Tieren gegenüber den Kontrolltieren auf das 2,0-fache (s. Abb. 3.4). Allerdings entstammten die Versuchsgruppen für MT1-MMP gemäß dem H-Test nach Kruskal-Wallis statistisch nicht aus verschiedenen Grundgesamtheiten, daher waren Einzelvergleiche für diesen Parameter unzulässig.

### 3.3.2.3 mRNA-Expression von TIMP-4

Im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltieren ließ sich in den mit IL-4 behandelten Kontrolltieren eine signifikante Zunahme der mRNA-Expression von TIMP-4 nachweisen ( $0,72 \pm 0,24$  vs.  $0,40 \pm 0,23$ ;  $p < 0,05$ ). Die mRNA-Expression von TIMP-4 verhielt sich in Kontrolltieren und infizierten Tieren hingegen weitgehend ausgeglichen ( $0,40 \pm 0,23$  vs.  $0,42 \pm 0,14$ ) (s. Abb. 3.5).

Unter der IL-4-Behandlung kam es bei den infizierten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Tieren zu einem signifikanten Anstieg der TIMP-4 mRNA-Expression auf das 3,3-fache ( $1,39 \pm 0,20$  vs.  $0,42 \pm 0,14$ ;  $p < 0,01$ ) (s. Abb. 3.5).



**Abb. 3.5:** mRNA-Expression von TIMP-4 in Relation zur mRNA-Expression von  $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ )

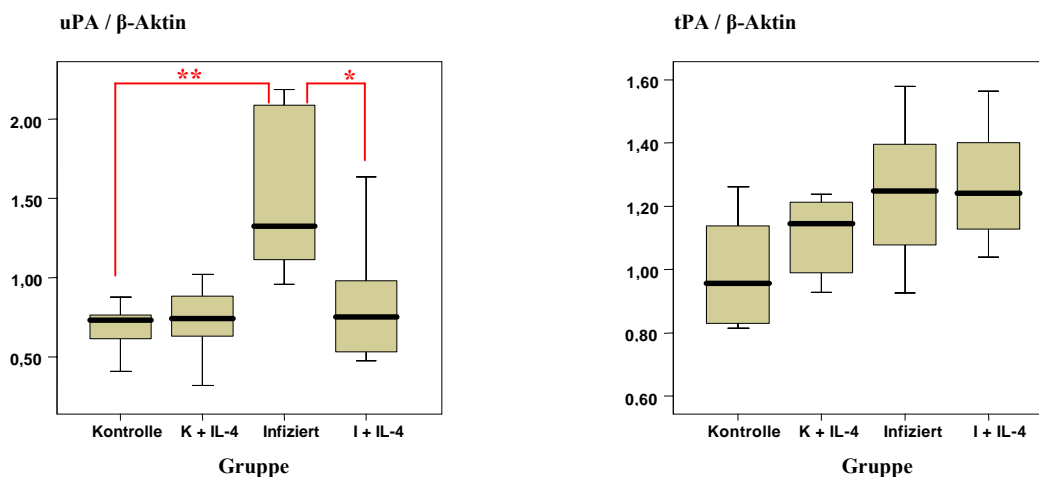
### 3.3.2.4 MMP/TIMP-4 Quotienten

Da die Beziehung mRNA MMP zu mRNA Inhibitor (MMP/TIMP) die pathophysiologische Bedeutung einer MMP-Veränderung besser widerspiegelt als die alleinige Angabe des absoluten MMP-Wertes, wurden für die einzelnen Gruppen die jeweiligen Quotienten berechnet. Hierbei ergab sich für den Quotienten MMP-2/TIMP-4 der Kontrolltiere ( $Q_K$ ) ein Wert von 2,44 und für den der infizierten Tiere ( $Q_I$ ) von 2,54. Im Gegensatz dazu zeigte der Quotient der mit IL-4 behandelten infizierten Tiere ( $Q_{IL-4}$ ) gegenüber dem der unbehandelten infizierten Tiere eine signifikante Abnahme um das 3,5-fache auf 0,73 ( $p < 0,05$ ). Für MMP-3/TIMP-4 ergab der  $Q_I$  gegenüber dem  $Q_K$  einen deutlichen Anstieg auf das 2,5-fache (4,33 vs. 1,76) wohingegen der  $Q_{IL-4}$  gegenüber  $Q_I$  signifikant um das 5,3-fache abnahm (0,81 vs. 4,33;  $p < 0,01$ ). Der  $Q_I$  von MMP-9/TIMP-4 der Gruppe der infizierten Tiere zeigte im Vergleich zum  $Q_K$  der Kontrolltiere einen tendenziellen Anstieg (2,99 vs. 2,59) und  $Q_{IL-4}$  der Gruppe der infizierten mit IL-4 behandelten Tiere gegenüber dem  $Q_I$  eine signifikante Abnahme um das 4,4-fache auf einen Wert von 0,68 ( $p < 0,01$ ).

### 3.3.2.5 mRNA-Expression von uPA und tPA

In den Einzelvergleichen ließ sich kein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression des Plasminogenaktivators uPA der nicht behandelten und mit IL-4 behandelten Kontrolltieren nachweisen ( $0,69 \pm 0,16$  vs.  $0,72 \pm 0,25$ ). Die mRNA-Expression von uPA war in der infizierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe um das 2,2-fache erhöht ( $1,50 \pm 0,52$  vs.  $0,69 \pm 0,16$ ;  $p < 0,01$ ). Die IL-4-Behandlung der infizierten Tiere führte im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression von uPA um das 1,8-fache ( $0,85 \pm 0,44$  vs.  $1,50 \pm 0,52$ ;  $p < 0,05$ ) (s. Abb. 3.6).

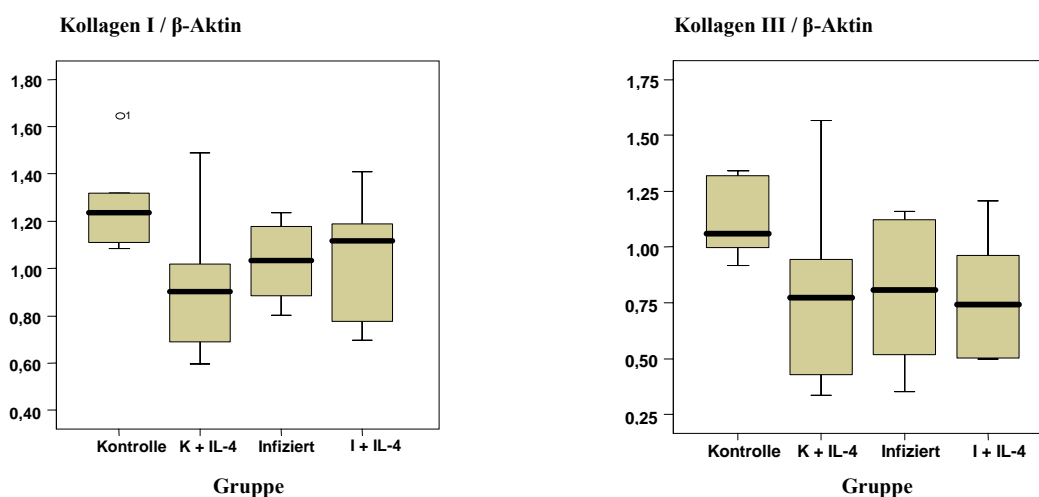
Die mRNA-Expression von tPA verhielt sich in den verschiedenen Versuchsgruppen relativ ausgeglichen. Bei den infizierten Tieren ließ sich ein tendenzieller Anstieg im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen (s. Abb. 3.6). Allerdings stammten die Versuchsgruppen für tPA gemäß dem H-Test nach Kruskal-Wallis statistisch nicht aus verschiedenen Grundgesamtheiten, daher waren Einzelvergleiche für diesen Parameter unzulässig.



**Abb. 3.6:** mRNA-Expression von uPA und tPA in Relation zur mRNA-Expression von  $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ )

### 3.3.2.6 mRNA-Expression von Kollagen Typ I und Typ III

Die mRNA-Expression von Kol I und Kol III waren in den einzelnen Gruppen weitgehend gleich, wenn auch der jeweilige Median der Kontrollen mehr oder weniger deutlich über dem der anderen Gruppen lag (s. Abb. 3.7). Jedoch entstammten die Versuchsgruppen für Kol I und



**Abb. 3.7:** mRNA-Expression von Kollagen Typ I und Typ III in Relation zur mRNA-Expression von  $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen

Kol III nach dem H-Test von Kruskal-Wallis statistisch nicht aus verschiedenen Grundgesamtheiten, daher waren Einzelvergleiche für diese Parameter unzulässig.

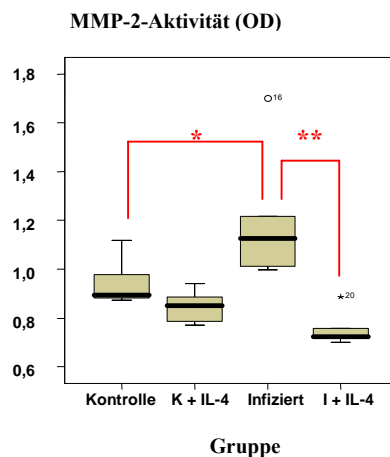
### 3.4 Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung von MMP-2

Die gelatinolytische Aktivität von MMP-2 wurde mittels Gelatin-Zymographie bestimmt und die ungefärbte Bande bei 62 kDa als MMP-2 identifiziert (s. Abb. 3.8 und 3.9). Der H-Test ergab eine signifikante Varianz zwischen den Versuchsgruppen, so dass die Nullhypothese verworfen und



**Abb. 3.8:** Vergleich der Enzymaktivität von MMP-2 in den einzelnen Gruppen

(Aus jeder Gruppe wurden zwei repräsentative Proben ausgewählt und auf Coomassie-Gel dargestellt. M=Marker)

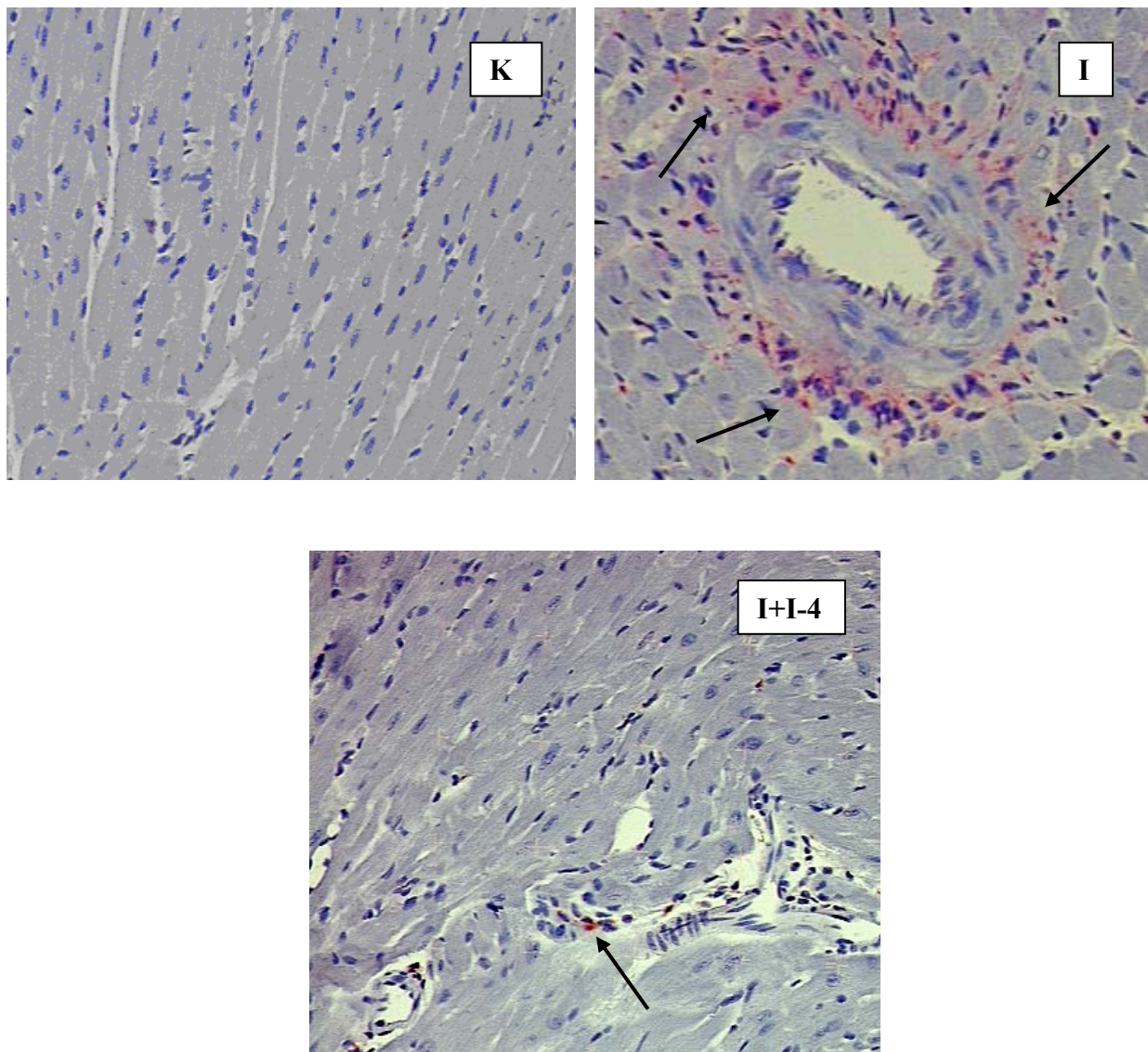


**Abb. 3.9:** Enzymaktivität von MMP-2 in den einzelnen Gruppen (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ )

(OD = optische Dichte)

Einzelvergleiche durchgeführt werden konnten. In den Einzelvergleichen mit dem U-Test zeigten die infizierten Tiere gegenüber den Kontrolltieren eine signifikante Zunahme der Enzymaktivität von MMP-2 ( $1,09 \pm 0,10$  vs.  $0,95 \pm 0,10$ ;  $p < 0,05$ ). Demgegenüber kam es bei den infizierten Tieren unter IL-4-Behandlung im Vergleich mit den unbehandelten infizierten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der MMP-2-Enzymaktivität ( $0,76 \pm 0,08$  vs.  $1,09 \pm 0,10$ ;  $p < 0,01$ ).

### 3.5 CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten und CD11b<sup>+</sup>-Makrophagen

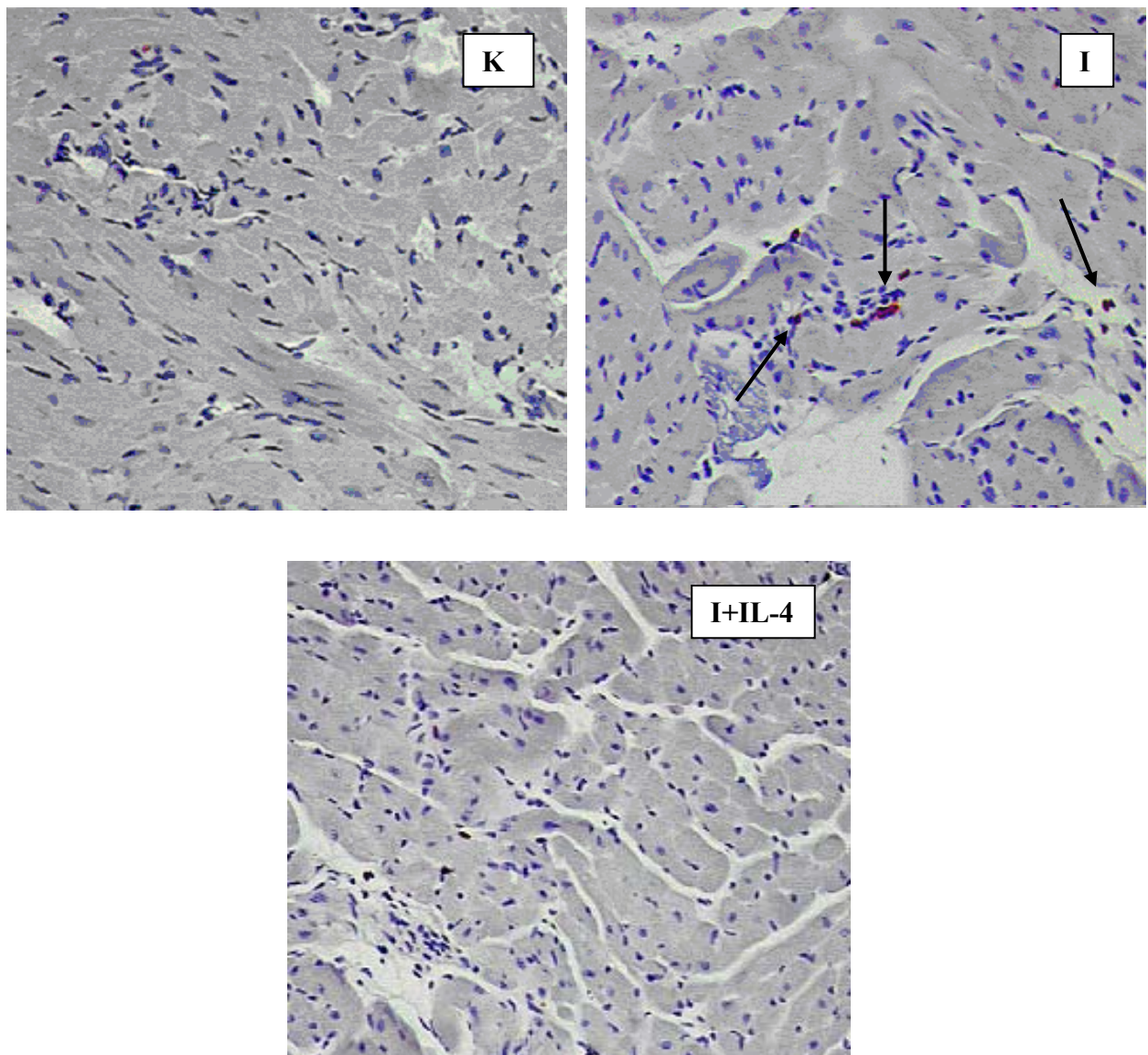


**Abb. 3.10:** Immunhistochemische Färbung der CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten. Paraffinschnitte Kontrollen (K), infizierte Gruppe (I), IL-4-behandelte infizierte Gruppe (I+IL-4)



Bezüglich der Infiltration von  $CD3^+$ -Lymphozyten (s. Abb. 3.10) ergab der H-Test eine signifikante Varianz zwischen den Versuchsgruppen, so dass die Nullhypothese verworfen und Einzelvergleiche durchgeführt werden konnten.

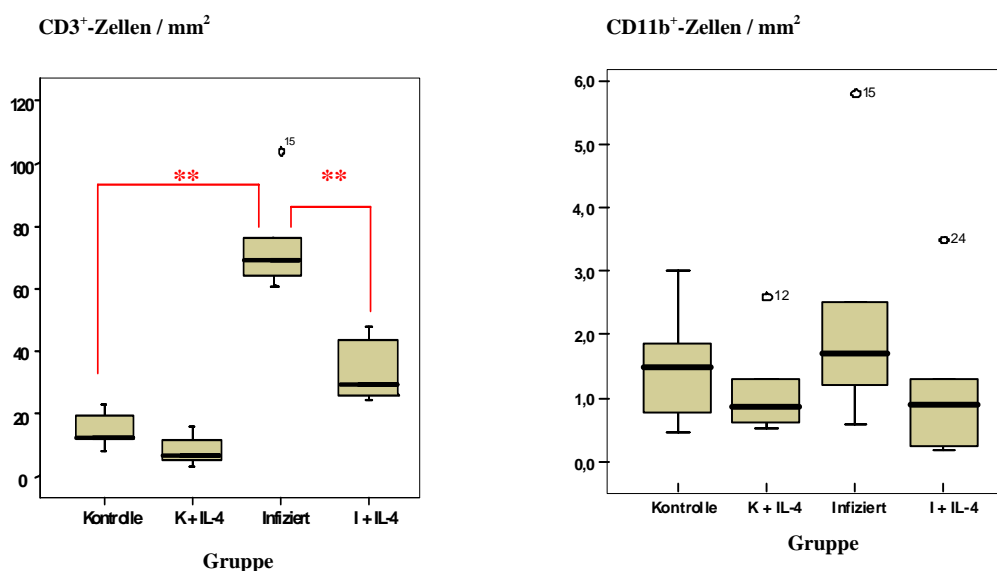
Im Einzelvergleich mit dem U-Test zeigten die infizierten Tiere gegenüber den Kontrollen einen signifikanten Anstieg der  $CD3^+$ -Zellzahl ( $73,8 \pm 15,8$  vs.  $14,8 \pm 5,5$ ;  $p < 0,01$ ) (Abb. 3.12). Die IL-4-



**Abb. 3.11:** Immunhistochemische Färbung der  $CD11b^+$ -Makrophagen. Paraffinschnitte Kontrollen (K), infizierte Gruppe (I), IL-4-behandelte infizierte Gruppe (I+IL-4)

Behandlung der infizierten Tiere führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion der CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten im Vergleich zu den unbehandelten infizierten Tieren ( $33,6 \pm 9,8$  vs.  $73,8 \pm 15,8$ ;  $p < 0,01$ ) (s. Abb. 3.12).

Auch bei den CD11b<sup>+</sup>-Makrophagen (s. Abb. 3.11) wiesen die infizierten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen eine Zunahme ( $2,3 \pm 1,9$  vs.  $1,5 \pm 0,9$ ) und die mit IL-4 behandelten Tiere gegenüber den unbehandelten infizierten Tieren eine Reduktion der Zellzahl auf ( $1,2 \pm 1,2$  vs.  $2,3 \pm 1,9$ ) (s. Abb. 3.12). Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab jedoch keine Signifikanz für die CD11b<sup>+</sup>-Makrophagenzahl. Insofern konnten die Nullhypothese nicht verworfen und keine Einzelvergleiche in den verschiedenen Versuchsgruppen durchgeführt werden.



**Abb. 3.12:** CD3<sup>+</sup>- sowie CD11b<sup>+</sup>-Zellen in den einzelnen Gruppen (\*\* =  $p < 0,01$ )  
Kontrollen (K), infizierte Gruppe (I), IL-4-behandelte infizierte Gruppe (I+IL-4)

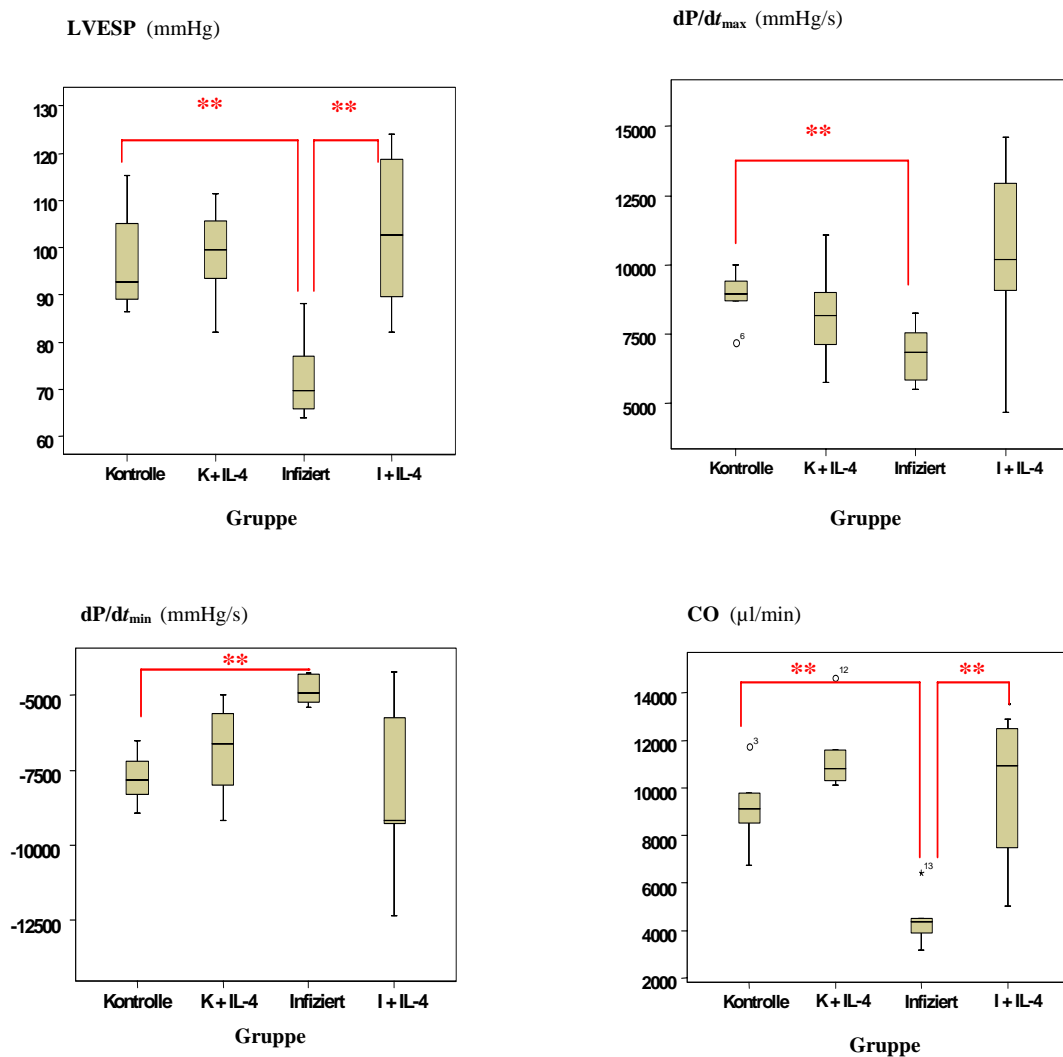
### 3.6 Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchung

Bei allen 24 Tieren wurde am 14. Tag p.i. eine hämodynamische Messung durchgeführt.

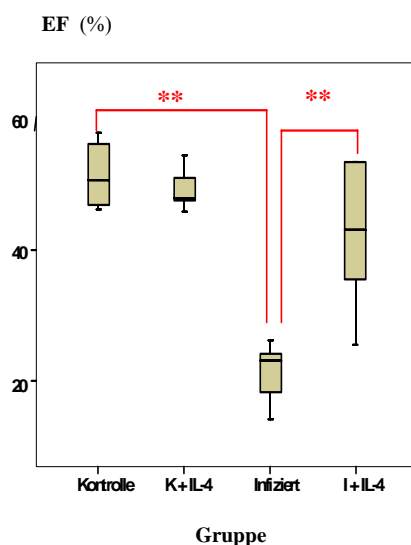
Für die erhobenen hämodynamischen Parameter Herzfrequenz (S/min), LVESP (mmHg),  $dP/dt_{\max}$  (mmHg/s),  $dP/dt_{\min}$  (mmHg/s), CO ( $\mu\text{l}/\text{min}$ ) und EF (%) ergab der H-Test, dass die

Wertegruppen aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen. Somit konnten eine signifikante Varianz zwischen den Versuchsgruppen angenommen und Einzelvergleiche durchgeführt werden.

In der unbehandelten infizierten Gruppe ergab sich gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme von Herzfrequenz ( $490 \pm 28$  vs.  $551 \pm 42$ ;  $p < 0,05$ ; ohne Abb.), LVESP ( $72,4 \pm 8,9$  vs.  $97,0 \pm 11,1$ ;  $p < 0,01$ ),  $dP/dt_{\max}$  ( $6793 \pm 1025$  vs.  $8872 \pm 935$ ;  $p < 0,01$ ),  $dP/dt_{\min}$  ( $-4836 \pm 504$  vs.  $-7769 \pm 847$ ;  $p < 0,01$ ) (s. Abb. 3.13), CO ( $4457 \pm 1080$  vs.  $9183 \pm 1643$ ;  $p < 0,01$ ) und EF ( $21,3 \pm 4,9$  vs.  $51,1 \pm 5,1$ ;  $p < 0,01$ ) (s. Abb. 3.14).



**Abb. 3.13:** Linksventrikuläre Funktionsparameter (LVESP,  $dP/dt_{\max}$ ,  $dP/dt_{\min}$  und CO) in den einzelnen Gruppen (\*\* =  $p < 0,01$ )

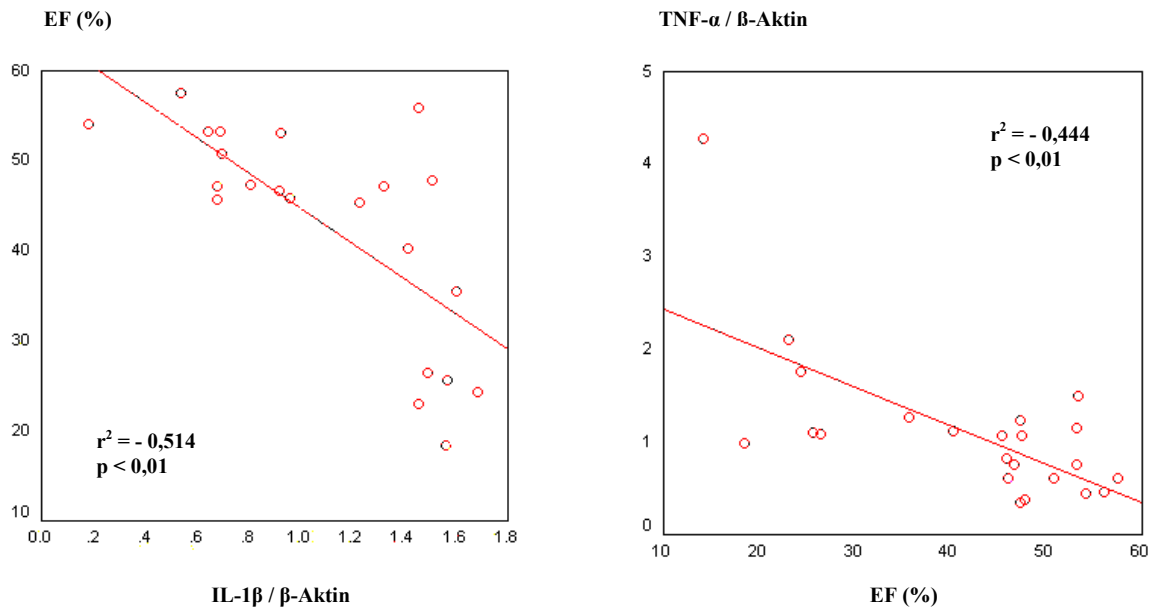


**Abb. 3.14:** Linksventrikulärer Funktionsparameter EF in den einzelnen Gruppen (\*\* =  $p < 0,01$ )

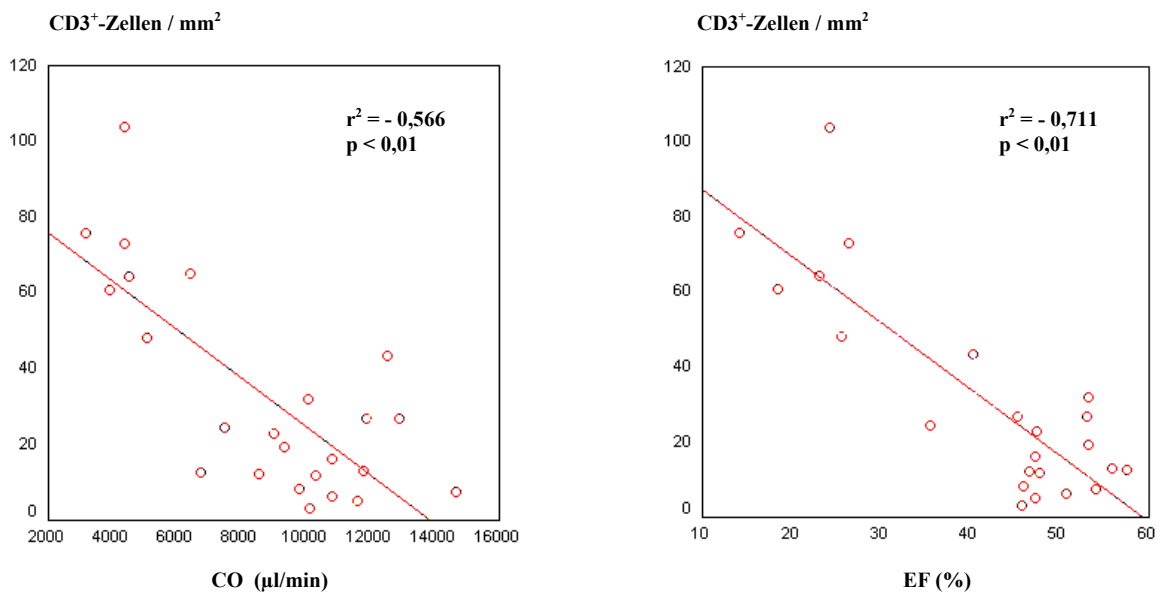
Bei den mit IL-4 behandelten infizierten Mäusen stiegen LVESP ( $103,3 \pm 16,2$  vs.  $72,4 \pm 8,9$ ;  $p < 0,01$ ) (s. Abb. 3.13), CO ( $9975 \pm 3137$  vs.  $4457 \pm 1080$ ;  $p < 0,01$ ) und EF ( $42,2 \pm 10,7$  vs.  $21,3 \pm 4,9$ ;  $p < 0,01$ ) (Abb. 3.14) signifikant gegenüber den unbehandelten infizierten Tieren an. Die Parameter  $dP/dt_{\max}$  ( $10276 \pm 3448$  vs.  $6793 \pm 1025$ ) und  $dP/dt_{\min}$  ( $-8330 \pm 2899$  vs.  $-4836 \pm 504$ ) wiesen unter der IL-4 Behandlung einen 1,5-fachen bzw. 1,7-fachen Anstieg auf (s. Abb. 3.13), der jedoch das Signifikanzniveau nicht erreichte. Die Herzfrequenz blieb nahezu unverändert ( $518 \pm 40$  vs.  $490 \pm 28$ ; n.s.).

### 3.6.1 Korrelationen nach Pearson

Im Hinblick auf etwaige Zusammenhänge zwischen Parametern der Inflammation oder des Matrixdegradationssystems mit der EF bzw. dem CO wurden Korrelationen nach Pearson berechnet. Hierbei zeigte sich, dass die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  ( $r = -0,717$ ,  $r^2 = -0,514$ ;  $p < 0,01$ ) und TNF- $\alpha$  ( $r = -0,666$ ;  $r^2 = -0,444$ ;  $p < 0,01$ ) mit der EF negativ korreliert waren (s. Abb. 3.15). Eine negative Korrelation bestand auch zwischen der CD3<sup>+</sup>-Zellzahl und dem CO ( $r = -0,752$ ;  $r^2 = -0,566$ ;  $p < 0,01$ ) sowie der EF ( $r = -0,843$ ;  $r^2 = -0,711$ ;  $p < 0,01$ ) (s. Abb. 3.16). Von den Parametern des Matrixdegradationssystems zeigte die mRNA-Expression von uPA eine negative Korrelation mit der EF ( $r = -0,733$ ;  $r^2 = -0,537$ ;  $p < 0,01$ ) (s. Abb. 3.17).

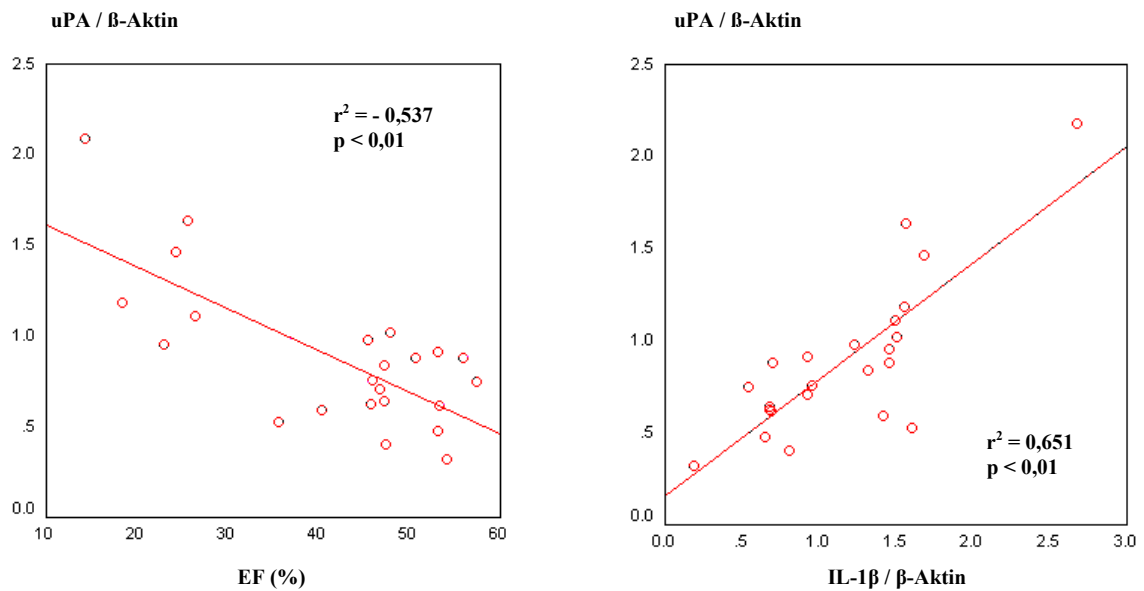


**Abb. 3.15:** Korrelation nach Pearson zwischen mRNA-Expression von IL-1β/β-Aktin bzw. TNF-α/β-Aktin und EF



**Abb. 3.16:** Korrelation nach Pearson zwischen CD3<sup>+</sup>-Zellzahl und CO bzw. EF

Daneben war uPA auch mit Il-1 $\beta$  ( $r = 0,807$ ,  $r^2 = 0,651$ ;  $p < 0,01$ ) positiv korreliert (s. Abb. 3.17).



**Abb. 3.17:** Korrelation nach Pearson zwischen mRNA-Expression von uPA/ $\beta$ -Aktin und EF bzw. mRNA-Expression von Il-1 $\beta$ / $\beta$ -Aktin

## 4 Diskussion

Die virale Myokarditis und die inflammatorische dilatative Kardiomyopathie haben eine große klinische Bedeutung (11, 15, 20, 21). Die Aufklärung der genauen Pathogenese beider Erkrankungen steht jedoch noch aus. In zahlreichen Untersuchungen konnte virale RNA im Myokard sowohl der murinen Myokarditis als auch in einem hohen Prozentsatz der chronischen Myokarditis bzw. idiopathischen DCM des Menschen nachgewiesen werden (6, 9, 22, 23, 141, 142, 143, 147). Aufgrund dieser und anderer Befunde wurde von verschiedenen Autoren eine viral induzierte und unterhaltene Autoimmunreaktion mit progredienter Entzündung und chronischem Myokardumbau diskutiert (48, 130, 145, 146, 162). Insofern ist es von Interesse, inwieweit durch eine Immunmodulation der Ablauf einer viralen Myokarditis beeinflusst werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss einer exogenen Il-4-Behandlung von SWR/J-Mäusen mit CVB3-Myokarditis auf Inflammation, Matrixdegradationssystem und Herzfunktion untersucht.

### 4.1 SWR/J-Mäuse und Krankheitsverlauf

Für die Untersuchung der CVB3-Myokarditis wird häufig das von Woodruff und Kilbourne (219) entwickelte Myokarditismodell bei BALB/c-Mäusen verwandt. Nach Untersuchungen von Zhang et al. (220) haben BALB/c-Mäuse jedoch insbesondere bei einer längerfristigen Studiendauer gewisse Nachteile. Die Autoren untersuchten den Verlauf einer CVB3-Infektion bei BALB/c- und SWR-Mäusen im Hinblick auf Morbidität, Mortalität sowie Art und Schweregrad der Myokarditis über insgesamt 60 Tage. Hierbei stellten sie fest, dass BALB/c-Mäuse schwer erkrankten, drastisch an Gewicht verloren, eine fulminante Pankreatitis, jedoch nur eine leichte Myokarditis entwickelten und häufiger verstarben. Demgegenüber erschienen die SWR-Mäuse wenig beeinträchtigt, verloren kein Gewicht, zeigten eine geringere Pankreatitis aber eine wesentlich schwerere Myokarditis. Keines der Tiere verstarb im gesamten Untersuchungszeitraum. Die Unterschiede in dem Krankheitsverlauf beider Mausstämme führten die Autoren auf die schwere Pankreatitis bei den BALB/c-Mäusen zurück.

Auch Klingel et al. (37) untersuchten die akute und chronische CVB3-Myokarditis in

unterschiedlichen immunkompetenten Mausstämmen. Hierbei stellten sie fest, dass bei SWR/J-Mäusen die kardialen Läsionen stärker ausgeprägt waren als bei den anderen Mausstämmen. Enterovirale RNA konnte in vielen Organen nachgewiesen werden (Herz, Milz, Lymphknoten, Pankreas, Lunge, Thymus, Leber, Gehirn), eine chronische Infektion mit RNA-Persistenz entwickelte sich jedoch nur im Herzmuskel, in der Milz und in den Lymphknoten (37, 53).

Somit scheinen SWR-Mäuse für längerfristige interventionelle Studien aufgrund der bevorzugten kardialen Manifestation der CVB3-Infektion, der starken Ausprägung der Myokarditis und der hohen Überlebensrate besonders geeignet zu sein. Der Krankheitsverlauf der Tiere in der vorliegenden Studie war jedoch stärker ausgeprägt als bei den von Zhang et al. (220) beschriebenen SWR-Mäusen. Im Gegensatz zu diesen wurden unsere Tiere symptomatisch und entwickelten einen Gewichtsverlust, der jedoch mit etwa 10% des KG im Vergleich zu den BALB/c-Mäusen von Zhang et al. (220) gering ausfiel. In Übereinstimmung mit der genannten Studie verstarb keines der Tiere vorzeitig.

## 4.2 Inflammatorische Parameter

Zur Beschreibung der myokardialen Inflammation wurden in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression verschiedener Zytokine und die Infiltration von CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten bzw. CD11b<sup>+</sup>-Makrophagen untersucht. In Bezug auf die Zytokine wurden sowohl Th<sub>1</sub>- (IL-1β, IFN-γ) als auch Th<sub>2</sub>-Zytokine (IL-6, IL-10) und das von beiden Zelltypen gebildete TNF-α bestimmt. Das ermittelte Zytokinmuster bei den infizierten männlichen SWR/J-Mäusen entsprach dem eines Th<sub>1</sub>-Phänotyps mit einem signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-1β, IFN-γ und TNF-α. Demgegenüber verhielten sich die Th<sub>2</sub>-Zytokine mit einem unveränderten IL-6 und einem Anstieg von IL-10 uneinheitlich. Auch bei anderen Mausstämmen wie BALB/c- (31) oder C3H/He-Mäusen (32) wurde in der subakuten Phase der CVB3-Myokarditis eine dominante Th<sub>1</sub>-Immunantwort beschrieben. Li et al. (221) beobachteten vor allem einen Anstieg des Th<sub>1</sub>-Zytokins IL-2. Die aggravierende inflammatorische Wirkung von IL-1, IL-2 und TNF-α auf den Myokarditisverlauf ist durch zahlreiche Untersuchungen belegt (80, 81, 82, 83, 222; s. 1.4.2.3, S. 15).



Die Th<sub>1</sub>-Antwort mit Aktivierung autoreaktiver zytotoxischer CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ist nach Ansicht verschiedener Autoren für die Myokardschäden in der subakuten Phase der CVB3-Myokarditis verantwortlich (48, 58, 145, 146, 162). Demgegenüber werden der Th<sub>2</sub>-Antwort mit Aktivierung der humoralen Immunabwehr und Hemmung der Th<sub>1</sub>-Antwort protektive Eigenschaften zugeschrieben. Dem entspricht die Beobachtung von Huber et al. (31), dass weibliche BALB/c-Mäuse, die im Gegensatz zu den männlichen Tieren eine dominante Th<sub>2</sub>-Antwort ausbilden, einen wesentlich milderen Verlauf der CVB3-Myokarditis aufweisen. Ebenso bewirkt bei BALB/c-Mäusen die Induktion einer dominanten Th<sub>1</sub>-Antwort durch V $\gamma$ 4<sup>+</sup>-T-Zellen eine Verstärkung und die Induktion einer dominanten Th<sub>2</sub>-Antwort durch V $\gamma$ 1<sup>+</sup>-T-Zellen eine Hemmung der CVB3-Myokarditisentwicklung (123, 124). Diese Rollenverteilung ist jedoch nicht ohne weiteres auf alle Myokarditismodelle übertragbar. So stand bei A/J Mäusen mit myosininduzierter Autoimmunmyokarditis die Th<sub>2</sub>-Immunantwort im Vordergrund, jedoch hatte sie hier keine protektive, sondern eine die Krankheitsentwicklung und -progression fördernde Wirkung. Dementsprechend konnte durch Gabe eines monoklonalen anti-IL-4 Antikörpers der Th<sub>2</sub>- in einen Th<sub>1</sub>-Phänotyp umgewandelt und der Myokarditisverlauf abgemildert werden (126).

Die Polarisierung der CD4<sup>+</sup>-Helferzellen zu Th<sub>1</sub>- oder Th<sub>2</sub>-Zellen wird neben IFN- $\gamma$  im Wesentlichen von IL-4 kontrolliert (88, 117, 118, 223). Es stimuliert die Th<sub>2</sub>-Bildung und die Expression antiinflammatorischer Zytokine (87), hemmt die Th<sub>1</sub>-Funktion mit IL-2 und IFN- $\gamma$ -Bildung (60, 88, 118) und führt zu einem deutlichen Abfall von IFN- $\gamma$  produzierenden Th<sub>1</sub>-Zellen (224). Damit übereinstimmend führte die in der vorliegenden Studie durchgeführte IL-4-Behandlung bei den infizierten Mäusen zu einem signifikanten Abfall von IFN- $\gamma$  und einer tendenziellen Abnahme von IL-1 $\beta$ . Der etwas geringer ausgeprägte Effekt auf IL-1 $\beta$  am 14. Tag p.i. könnte darauf zurückzuführen sein, dass IL-1 $\beta$  vor allem in der akuten Phase bis zum siebten Tag ansteigt (32), IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  jedoch bis in die späte Phase hinein exprimiert werden (34). TNF- $\alpha$  wurde durch die IL-4 Behandlung nicht supprimiert, was mit seiner dualen Expression sowohl von Th<sub>1</sub>- als auch Th<sub>2</sub>-Zellen erklärbar ist. Ein Anstieg der Th<sub>2</sub>-Zytokine (IL-6, IL-10), über das bereits im Rahmen der Infektion erreichte Niveau hinaus, war nicht festzustellen.

Das myokardiale Infiltrat der infizierten Mäuse war von einem deutlichen Überwiegen der CD3<sup>+</sup>-Zellen geprägt. Gegenüber den Kontrolltieren wiesen die infizierten Tiere einen signifikanten 5,0-fachen Anstieg der CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten auf. Da eine Differenzierung in

CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-Zellen nicht vorgesehen war, bleibt offen, auf welchen Zelltyp diese Veränderung zurückzuführen ist. Von anderen Autoren wurde aber übereinstimmend sowohl bei der CVB3- (48, 58) als auch der murinen CMV-Myokarditis (59) nach dem siebten Tag p.i. eine Dominanz von CD8<sup>+</sup>- gegenüber CD4<sup>+</sup>-Zellen beschrieben. Die Untersuchung der CD11b<sup>+</sup>-Makrophagen ergab im Vergleich zu den CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten eine deutlich geringere Präsenz und nur einen 1,5-fachen, nicht signifikanten Anstieg bei den infizierten Tieren gegenüber den Kontrolltieren. Die Dominanz von CD3<sup>+</sup>-Zellen im entzündlichen Infiltrat der späten subakuten Phase der CVB3-Myokarditis stimmt mit den Befunden anderer Autoren überein (48, 58, 221). Lediglich Huber (225) fand bei BALB/c-Mäusen mit CVB3-Myokarditis ein Überwiegen von Makrophagen gegenüber CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten. Allerdings beziehen sich diese Daten auf den siebten und nicht den 14. Tag p.i. wie bei der vorliegenden Untersuchung. Vom pathogenetischen Ablauf her ist plausibel, dass zu Anfang die antigenpräsentierenden Makrophagen und später die induzierten T-Lymphozyten im Vordergrund stehen. Damit übereinstimmend beschrieb Kawai (48) eine maximale Zunahme der T-Lymphozyten im Zeitraum zwischen dem siebten und 14. Tag p.i. Der Anstieg der CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten im Rahmen der Infektion ist vermutlich unter anderem auf die gesteigerte Expression der Th<sub>1</sub>-Zytokine Il-2, Il-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  zurückzuführen, die eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten spielen (118, 122, 226, 227, 228).

Unter der Il-4-Behandlung wurde eine Abnahme des entzündlichen Infiltrates beobachtet. Dies betraf vor allem die CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten, die einen signifikanten 2,2-fachen Abfall aufwiesen und weniger die Makrophagen mit einer 1,9-fachen Reduktion. Auch bei BALB/c-Mäusen mit CVB3-Myokarditis wurde unter einer auf nur fünf Tage begrenzten Il-4-Gabe ein signifikanter Abfall der CD3<sup>+</sup>-Zellen beobachtet (221). Ursächlich dürfte hierfür die Il-4-bedingte Hemmung der Th<sub>1</sub>-Zytokinexpression insbesondere von Il-2, Il-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  sein (60, 88), die, wie oben beschrieben, für die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten von Bedeutung sind.

Bei keinem der Kontrolltiere konnte mittels der RT-PCR in Kombination mit der nested-PCR CVB3-RNA im Myokard nachgewiesen werden. Auch bei vier der unbehandelten und bei zwei der mit Il-4 behandelten infizierten Tiere ließ sich am Ende der subakuten Phase keine CVB3-RNA mehr detektieren. Die bereits erfolgte CVB3-RNA-Elimination bei der Hälfte der Tiere war ebenso unerwartet, wie auch die höhere Eliminationsrate bei den unbehandelten Mäusen.

Zudem scheinen beide Befunde im Widerspruch zu den ausgeprägten Entzündungsparametern und der schweren kardialen Dysfunktion bei den unbehandelten Tieren zu stehen. Nach Beobachtungen von Herzum et al. (260) ist jedoch die kardiale Dysfunktion bei der CVB3-Myokarditis nicht mit der Viruskonzentration, sondern mit den histologischen Veränderungen korreliert. Darüber hinaus wird von verschiedenen Autoren diskutiert, inwieweit nicht die kardiale, sondern die extrakardiale CVB3-Persistenz z.B. in Milz und Lymphknoten für die Chronifizierung der CVB3-Myokarditis verantwortlich ist (35, 36, 37, 149). Hiernach käme der rascheren kardialen CVB3-RNA-Elimination bei den unbehandelten Mäusen weder in Bezug auf die kardiale Funktion noch auf den weiteren Myokarditisverlauf eine prognostische Bedeutung zu. Ursächlich könnte sie durch das im Vergleich zu den behandelten Tieren wesentlich stärkere T-Zellinfiltrat bedingt sein, da insbesondere CD8<sup>+</sup>-T-Zellen letztlich für die Elimination virusinfizierter Myozyten verantwortlich sind.

### **4.3 Extrazelluläre Matrix**

Zahlreiche Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass die inflammatorische Reaktion Umbauvorgänge der EZM induziert, die mit pathologischen Veränderungen des funktionell und morphologisch wichtigen Kollagengerüsts einhergehen. Diese unter dem Begriff des Remodeling zusammengefassten Veränderungen (s. 1.4.4.1, S. 24) werden durch Zytokine und vor allem durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) verursacht und führen ungebremst zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz und einer DCM (173, 178, 192, 209, 221, 229). Für einen kausalen Zusammenhang zwischen MMP-Aktivierung und EZM-Umbau sprechen experimentelle Daten. So führte eine chronische konstitutive Expression von MMP-1 im Herzen von transgenen Mäusen zur Desorganisation der EZM mit Reduktion des interstitiellen Kollagens und zur systolisch/diastolischen Funktionsstörung (177).

Das Bindeglied zwischen der Entzündung und der Aktivierung des Matrixdegradationssystems stellt die Immunantwort des Organismus mit Zytokinexpression und zellulärem Infiltrat dar. Insbesondere die Zytokine fungieren als wichtige Regulatoren des MMP-Systems (189, 196, 230). Beispielhaft konnte gezeigt werden, dass die kardiale Überexpression von TNF- $\alpha$  bei transgenen Mäusen mit einer gesteigerten MMP-Aktivität, einem progredienten Remodeling und einer linksventrikulären Dilatation einhergeht (207, 231). Umgekehrt führte die kardiale

Expression eines Il-1-Rezeptorantagonisten bei BALB/c-Mäusen zur drastischen Reduktion der Fibrosebildung und Mortalität (222). Insbesondere proinflammatorische Zytokine wie Il-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  können die Synthese verschiedener MMPs (MMP-1, -2, -3, -9) induzieren (168, 232, 233). TGF- $\beta$  stimuliert die MMP-2- und MMP-9-Expression und supprimiert MMP-1 und MMP-3 (186, 187, 188).

Über die direkte Einflussnahme auf die MMP-Synthese hinaus aktivieren Il-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  noch indirekt auf zweierlei Weise das MMP-System. Zum einen stimulieren sie über die Expressionssteigerung von uPA die Bildung der Serinprotease Plasmin, die neben MMP-3 und MT1-MMP latente proMMPs aktiviert (234, 235). Zum anderen inhibieren sie spezifische TIMPs und reduzieren damit deren Hemmung der proMMP-Aktivierung bzw. Inaktivierung der aktiven MMPs (183, 196, 236). Die genannten Zytokine führen jedoch nicht nur über die Aktivierung des MMP-Systems, sondern auch über eine Modulation der Kollagensynthese zum EZM-Umbau (s.u.).

Neben den proinflammatorischen Zytokinen ist auch das zelluläre Infiltrat der Entzündungsreaktion an dem Remodeling beteiligt. Die bei der viralen Myokarditis in großer Zahl auftretenden Makrophagen, Fibroblasten, Neutrophilen und T-Lymphozyten sind alle zur Expression von MMPs befähigt (180, 181, 232). Dementsprechend konnten bei Mäusen mit CVB3-Myokarditis mittels In-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie infiltrierende CD11b<sup>+</sup>-Makrophagen bzw. infiltrierende Immunzellen als Hauptquelle von MMP-3 und MMP-9 identifiziert werden (175, 178, 221).

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Beschreibung des Zustands des Matrixdegradationssystems die mRNA-Expression von vier MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MT1-MMP), von einem spezifischen MMP-Inhibitor (TIMP-4), von zwei Vertretern der Plasminogenaktivierung (uPA, tPA) und die MMP-2-Aktivität untersucht. Bezogen auf die MMPs wiesen die infizierten Tiere einen 2,6-fachen Anstieg von MMP-3 und einen 2-fachen Anstieg von MT1-MMP auf. MMP-2 und MMP-9 waren jedoch ebenso wie TIMP-4 gegenüber den Kontrollen unverändert. Der MMP-3-Anstieg steht im Einklang mit der bei den infizierten Tieren signifikant erhöhten Zytokinexpression (Il-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). Demgegenüber verwundert die unveränderte mRNA-Expression von MMP-2 und MMP-9. Am ehesten scheint

dies noch für MMP-2 verständlich, das im Myokard konstitutiv exprimiert werden soll, jedoch nicht für die induzierbare Form von MMP-9 (237, 238, 239). Auch die Einbeziehung des Inhibitors durch Bildung der MMP/TIMP-4 Quotienten führte zu keiner Veränderung des Befundes. MMP-2/TIMP-4 und MMP-9/TIMP-4 waren bei den infizierten Mäusen gegenüber den Kontrollen unverändert. Lediglich das Verhältnis MMP-3/TIMP-4 stieg auf das 2,5-fache an. Bei CVB3-infizierten BALB/c-Mäusen wurde am zehnten Tag p.i. ebenfalls ein Anstieg der mRNA von MMP-3 (2-fach) beobachtet. Im Unterschied zu den vorliegenden Ergebnissen waren jedoch auch die mRNA-Expression von MMP-9 erhöht und von TIMP-4 erniedrigt (175). Auch Cheung et al. (178), die CVB3-infizierte A/J-Mäuse am dritten, neunten und 30. Tag p.i. untersuchten, beschrieben einen Anstieg der MMP-9-mRNA und einen Abfall der Proteinexpression von TIMP-4 am neunten Tag. Danach bildeten sich die Veränderungen jedoch zurück, so dass sich am 30. Tag p.i. die Werte beider Parameter nicht mehr von den Basalwerten unterschieden. Dennoch erscheint es nicht sehr wahrscheinlich, dass der spätere Untersuchungszeitpunkt der vorliegenden Untersuchung (14. Tag gegenüber neuntem bzw. zehntem Tag p.i.) für die Unterschiede bezogen auf MMP-9 bzw. TIMP-4 verantwortlich ist. Daten anderer Untersucher zum Matrixdegradationssystem bei SWR/J-Mäusen sind nicht bekannt. Insofern bleibt zur Zeit unklar, inwieweit bei den verschiedenen Mausstämmen (SWR/J, BALB/c, A/J) Unterschiede in der kardialen Expression von MMPs nach CVB3-Infektion bestehen.

Die MMP-2-Aktivität der infizierten Tiere war jedoch im Gegensatz zur unveränderten mRNA-Expression von MMP-2 signifikant erhöht. Die Aussagekraft der mRNA-Expression ist vermutlich begrenzt, da alle extrazellulären MMPs als Proenzyme sezerniert und bis zur Aktivierung inaktiv an EZM-Proteine oder Zellmembranen gebunden sind (189). Darüber hinaus bleibt bei der mRNA-Bestimmung auch der jeweilige Zustand der verschiedenen Inhibitoren unberücksichtigt. Insofern erscheint die Untersuchung der tatsächlichen MMP-Aktivität insbesondere von MMP-2 und MMP-9 aussagekräftiger. So bestand bei DBA/2-Mäusen mit CVB3-Myokarditis eine signifikante Korrelation zwischen der Aktivität von MMP-2 bzw. MMP-9 und dem histologischen Score sowie der kardialen Dysfunktion (240). Das Maximum der Aktivitätszunahme lag am zehnten Tag bei einer Verlaufsbeobachtung bis zu 30 Tagen. Auch Cheung et al. (178) beobachteten einen signifikanten parallelen Anstieg der MMP-2- und

MMP-9-Aktivität bis zum neunten Tag der CVB3-Myokarditis mit nachfolgendem Abfall auf subbasale Werte am 30. Tag p.i.

Der Aktivierungsvorgang von MMP-2 ist sehr komplex und besteht aus mehreren Schritten. MT1-MMP bildet mit TIMP-2 und proMMP-2 einen membranständigen Komplex (191, 201, 202). Bei niedriger Konzentration von TIMP-2 und unvollständiger Absättigung von MT1-MMP wird das im Komplex gebundene proMMP-2 durch benachbarte freie MT1-MMP-Moleküle zu inaktiven, intermediären 68/64 kDa Produkten umgewandelt. Erst daran schließt sich die eigentliche Aktivierung mit der proteolytischen Degradation zur aktiven 62 kDa MMP-2 an. Der letzte Schritt erfolgt offensichtlich durch die Serinprotease Plasmin unabhängig von anderen MMPs oder Proteasen und kann durch Plasmininhibitoren oder Anti-uPA-Antikörper gehemmt werden (241, 242, 243). Hiernach ist neben MT1-MMP vor allem das Plasminogensystem für die MMP-2-Aktivierung von entscheidender Bedeutung. Plasmin selbst wird über die zwei Plasminogenaktivatoren uPA und tPA gebildet, deren Aktivität wiederum durch einen Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI) gehemmt wird.

Die infizierten Tiere der vorliegenden Arbeit wiesen nicht nur einen Anstieg der mRNA von MT1-MMP, sondern auch eine signifikante Steigerung der uPA-Expression auf. In Übereinstimmung mit der geschilderten MMP-2-Bildung stützen und erklären beide Befunde die nachgewiesene Aktivitätssteigerung von MMP-2. Der Zusammenhang mit der entzündlichen Reaktion besteht vermutlich in der vermehrten Bildung von  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{TNF-}\alpha$ , die beide die mRNA-Expression von uPA stimulieren (234, 235). Die tPA-Expression der infizierten Tiere hingegen war gegenüber den Kontrolltieren unverändert, was den Beobachtungen anderer Autoren entspricht (192). Die zentrale Bedeutung des Plasminogensystems für das kardiale Remodeling bei primär entzündlichen und nicht entzündlichen Myokarderkrankungen wird durch zwei Studien untermauert. Zum einen verminderte eine uPA-Geninaktivierung bei CVB3-infizierten Mäusen uPA (-/-) die Expression proinflammatorischer Zytokine ( $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{TGF-}\beta$ ), das T-Zellinfiltrat sowie den Myokardschaden und verhinderte das Auftreten einer linksventrikulären Funktionsstörung bzw. Dilatation (192). Zum anderen waren bei uPA (-/-) Mäusen mit arterieller Hypertonie im Gefolge eines Aortenbandings die linksventrikuläre Hypertrophie, Fibrose und Dilatation gegenüber den Kontrollen oder tPA (-/-) Mäusen deutlich geringer ausgeprägt (244).

Die Behandlung mit Il-4 führte bei den infizierten Tieren abgesehen von einem tendenziellen Abfall der mRNA-Expression von MMP-3 (1,6-fach) zu keiner Veränderung der untersuchten MMPs. Demgegenüber stieg die mRNA von TIMP-4 unter Il-4 signifikant an. Alle Quotienten aus MMP-2, MMP-3 bzw. MMP-9 und TIMP-4 waren um den Faktor 3,5 - 5,3 signifikant vermindert. Da TIMP-4 ein starker Inhibitor aller hier untersuchter MMPs ist (183, 198, 200), kann davon ausgegangen werden, dass die Reduktion der MMP/TIMP-4 Quotienten eine tatsächliche Aktivitätsabnahme des Matrixdegradationssystems widerspiegelt. In Bezug auf MMP-2 kann dies anhand der gemessenen signifikanten Abnahme der MMP-2-Aktivität unter Il-4 direkt nachvollzogen werden. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass auch die mRNA-Expression des Plasminogenaktivators uPA unter Il-4 signifikant abnahm. Insofern kann die verminderte MMP-2-Aktivität sowohl auf die spezifische Hemmung durch TIMP-4 als auch auf die verminderte Aktivierung durch Plasmin zurückgeführt werden. Darüber hinaus scheint Il-4 in humanen Monozyten zumindest die MMP-1- und MMP-9-Aktivität auch direkt über eine Hemmung der Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthese zu supprimieren (245, 246). Bezogen auf MMP-3, MMP-9, TIMP-4 und die MMP-2-Aktivität stimmen die ermittelten Daten mit denen bei CVB3-infizierten BALB/c-Mäusen und einer auf fünf Tage begrenzten Il-4-Gabe überein. Unterschiede bestehen bezüglich der mRNA-Expression von MMP-2 und MT1-MMP, die bei den BALB/c-Mäusen signifikant reduziert waren (221). Vergleichbare Daten zu den MMP/TIMP-4 Quotienten oder der uPA-Expression liegen nicht vor.

Über die Regulation der TIMP-4-Expression ist bislang wenig bekannt. Insofern ist die Beobachtung von Interesse, dass auch die nicht infizierten Kontrolltiere unter Il-4 einen signifikanten Anstieg der mRNA von TIMP-4 aufwiesen. Dies könnte darauf hinweisen, dass Il-4 einen direkten stimulierenden Effekt auf die mRNA-Expression von TIMP-4 besitzt, so wie er für TIMP-1 in konjunktivalen Fibroblasten gezeigt wurde (203). Auf der anderen Seite ist insbesondere bei den infizierten Tieren auch eine indirekte Wirkung über die Suppression der Th<sub>1</sub>-Antwort in Betracht zu ziehen. So hemmen die proinflammatorischen Zytokine Il-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  die Expression von TIMP-3 in endothelialen bzw. kardialen Zellen (236, 247). Jedoch konnte dies für TIMP-2 und TIMP-4 bislang nicht gezeigt werden (247). Zudem führte die Il-4-Gabe in der vorliegenden Arbeit nur zu einer geringen Expressionsminderung von Il-1 $\beta$  und

TNF- $\alpha$ . Ein TIMP-4-Anstieg über eine Suppression der Th<sub>1</sub>-Antwort kann somit nicht eindeutig belegt werden.

Wie oben erwähnt beeinflussen bestimmte Zytokine die EZM nicht nur indirekt über die Regulation des Matrixdegradationssystems, sondern auch direkt durch Eingriff in den Kollagenumbau. Allerdings bestehen hierbei gegensätzliche Effekte. So reduzieren sowohl Il-1 $\beta$  als auch TNF- $\alpha$  in kardialen Fibroblasten von Ratten die Kol I- und Kol III-Synthese und erhöhen die MMP-Gesamtaktivität (168). Auch IFN- $\gamma$  verringert die Kollagenexpression in humanen Fibroblasten (248, 249) und fördert die Degradation durch Induktion von MMP-1 (233). Demgegenüber wird die Kollagensynthese durch TGF- $\beta$  gesteigert (167, 250, 251).

Trotz Induktion der proinflammatorischen Zytokine Il-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  sowie des Anstiegs der MMP-3-mRNA und MMP-2-Aktivität zeigten die infizierten Tiere der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der mRNA-Expression von Kol I oder Kol III. Auch die Il-4-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Kollagenexpression. Li et al. (175) untersuchten die mRNA-Expression von Kol I und den Gesamtkollagengehalt des Herzens bei BALB/c-Mäusen mit CVB3-Myokarditis und fanden ebenfalls keine Veränderung gegenüber den Kontrolltieren. Im Unterschied dazu wurden bei dilatativer Kardiomyopathie ein unproportional stärkerer Anstieg der mRNA-Expression von Kol I, eine Zunahme des Verhältnisses von Kol I/ Kol III und eine Vermehrung des Gesamtkollagengehaltes beschrieben (173, 174).

Die unveränderte Expression von Kol I und Kol III könnte prinzipiell durch die gegenseitige Aufhebung der oben geschilderten gegenläufigen Wirkungen der verschiedenen Zytokine bedingt sein. Dies erscheint jedoch bei gleichzeitiger Berücksichtigung der Ergebnisse der infizierten und mit Il-4 behandelten Gruppe unwahrscheinlich. Bei den infizierten Tieren wäre infolge der dominanten Th<sub>1</sub>-Antwort eher eine Abnahme und bei den mit Il-4 behandelten Tieren infolge der Th<sub>1</sub>-Suppression und TGF- $\beta$  Induktion (88, 106) eine Zunahme der Kollagensynthese zu erwarten gewesen. Ein relevanter Effekt auf die Kollagenexpression hätte sich somit spätestens bei dem statistischen Vergleich beider Gruppen zeigen sollen, was aber nicht der Fall war. Von entscheidender Bedeutung scheint hingegen der Untersuchungszeitpunkt im frühen Stadium der Myokarditis zu sein. Verschiedene Untersuchungen sprechen dafür, dass die CVB3-Myokarditis z.B. im Vergleich zur EMCV-Myokarditis nur langsam progredient verläuft (57,



210, 252) und bei BALB/c- sowie A/J-Mäusen erst später zu stärkerer Kollagenexpression führt (253, 254). Auch bei DBA/2-Mäusen war der myokardiale Kollagengehalt am zehnten Tag p.i. unverändert und stieg erst am 21. bzw. 30. Tag p.i. signifikant an (240). Li et al. (175) fanden mit Western-Blot-Analyse am zehnten Tag p.i., bei unveränderter mRNA-Expression, eine signifikante Zunahme des löslichen Anteils des Kol I. Das lösliche Kollagen ist gekennzeichnet durch gespaltene Quervernetzungen, die eine verminderte Compliance und eine erhöhte Wandsteifigkeit des Ventrikels bedingen. Eine solche Abnahme der stabilen Quervernetzungen konnte auch bei explantierten Herzen mit DCM nachgewiesen werden (255). Ebenso fand sich bei Ratten mit einer durch Aortenbanding verursachten arteriellen Hypertonie parallel zur Entwicklung einer linksventrikulären Funktionsstörung und Dilatation eine Abnahme des Verhältnisses unlösliches zu lösliches Kollagen (256). Die Depolymerisation der Quervernetzungen der Kollagenpolymere erfolgt über aktivierte MMPs (252), wobei besonders MMP-9 von Bedeutung sein soll (257). Unter diesem Gesichtspunkt gewinnt die beschriebene Aktivitätszunahme von MMP-2 und MMP-9 in der subakuten Phase der CVB3-Myokarditis eine ganz besondere Bedeutung. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Befunde kann demnach gefolgert werden, dass bei der frühen CVB3-Myokarditis nicht die Modulation von Kollagensynthese oder -abbau, sondern eine Auflösung von Quervernetzungen im Vordergrund steht, die zur Schädigung des Kollagengerüsts und zur kardialen Dysfunktion führt.

#### **4.4 Hämodynamik**

Für die Einschätzung der Folgen einer Myokarditis bzw. für die Beurteilung des Nutzens einer Myokarditistherapie sind letztlich neben dem harten Kriterium „Überleben“ die hämodynamischen Parameter entscheidend. Im Vordergrund steht hierbei die Funktion des linken Ventrikels, der von der viralen Myokarditis am häufigsten und funktionell am stärksten betroffen ist (1, 2, 258, 259). Für die Untersuchung wurde das von Georgakopoulos et al. (216) beschriebene Konduktanz-Mikromanometersystem mit Zugang über die A. carotis verwandt, das im Gegensatz zu früheren Untersuchungen bei geschlossenem Thorax eingesetzt wird. Die kleinen anatomischen Verhältnisse der Maus, die hohe Empfindlichkeit der Messmethode gegenüber falscher oder instabiler Katheterlage sowie die nötige kritische Beurteilung der Messwerte während des Untersuchungsganges erfordern einen erfahrenen Untersucher. Deshalb

wurden für die vorliegende Arbeit, wie bereits bei früheren Studien (175, 210, 211, 221), die hämodynamischen Untersuchungen von der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Carsten Tschöpe (Klinik für Kardiologie und Pulmologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin) durchgeführt.

Die Parameter für die systolische und diastolische Herzfunktion wurden von den Druck-Volumen-Kurven abgeleitet. Für die Beschreibung der linksventrikulären Funktion wurden der endsystolische Druck (LVESP) als Maß für die maximale Wandspannung, die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dp/dt_{max}$  als Maß für die Kontraktilität und die minimale Druckabfallsgeschwindigkeit  $dp/dt_{min}$  als Maß für die diastolische Relaxation bestimmt. Als Maß für die Herzauswurfleistung wurden das Herzminutenvolumen (CO) und die Ejektionsfraktion (EF) berechnet.

Am 14. Tag der CVB3-Infektion wiesen die Mäuse eine schwere, statistisch signifikante Verschlechterung der Herzleistung gegenüber den nicht infizierten Kontrolltieren auf. Hiervon waren alle untersuchten Funktionsparameter betroffen. Die quantitativ stärksten Veränderungen zeigten die Ejektionsfraktion und das Herzminutenvolumen mit einem Abfall auf weniger als die Hälfte der Kontrollwerte. LVESP,  $dp/dt_{max}$  und  $dp/dt_{min}$  waren um den Faktor 1,3 bzw. 1,6 reduziert. Bei der Abnahme von  $dp/dt_{max}$  und  $dp/dt_{min}$  ist prinzipiell auch die Herzfrequenz zu berücksichtigen, die jedoch bei den infizierten Tieren nur um den Faktor 1,1 abnahm. Die mit Il-4 behandelten wiesen gegenüber den unbehandelten infizierten Tieren überhaupt keine Herzfrequenzveränderung auf.

Hämodynamische Daten anderer Autoren bei SWR/J-Mäusen mit CVB3-Myokarditis liegen zum Vergleich nicht vor. Die Ergebnisse stimmen jedoch mit den hämodynamischen Untersuchungen bei anderen Mausstämmen überein. Herzum et al. (260) und Tschöpe et al. (210) fanden am zehnten Tag einer CVB3-Myokarditis bei DBA/2- bzw. Balb/c-Mäusen ebenfalls eine Abnahme von Herzfrequenz, LVESP,  $dp/dt_{max}$  und  $dp/dt_{min}$ . Die Abnahme der Parameter war mit den histologischen Veränderungen nicht jedoch der myokardialen Viruskonzentration korreliert (260). Der unerwartete Abfall der Herzfrequenz wurde auf die myokardiale Zellschädigung unter Einbeziehung des Reizleitungssystems zurückgeführt (210), wie sie von Terasaki et al. (261) beschrieben wurde. Nishio et al. (252) führten serielle Untersuchungen der Hämodynamik an

neun von insgesamt 14 Tagen an einer Gruppe von DBA/2-Mäusen mit EMCV-induzierter Myokarditis durch. Die am 14. Tag erhobenen Befunde einschließlich CO und EF entsprechen ebenfalls den hier erhobenen Befunden. Jedoch trifft dies nicht für die Herzfrequenz zu, die nicht nur am 14. Tag, sondern zu keinem der vorangegangenen Untersuchungstage verändert war. Die myokardiale Zellschädigung durch EMCV ist bereits früher und stärker ausgeprägt als bei der CVB3-Myokarditis (s.u.) und kommt als Erklärung für die beobachtete Diskrepanz nicht in Betracht. Inwieweit CVB3 eine stärkere Affinität zu Zellen des Reizleitungssystems besitzt als EMCV, ist unklar.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der CVB3- und EMCV-Myokarditis besteht in dem zeitlichen Ablauf der hämodynamischen Veränderungen und dem Auftreten einer Myokarddilatation. Während bei der CVB3-Myokarditis die linksventrikuläre Funktion bis zum siebten Tag p.i. erhalten blieb (260), traten bei der EMCV-Myokarditis bereits ab dem dritten Tag ein deutlicher Abfall von CI („cardiac index“) und EF sowie ab dem fünften Tag eine linksventrikuläre Dilatation auf (252). Demgegenüber wurde bei CVB3-infizierten BALB/c-Mäusen bis zum zehnten (210) bzw. zwölften Tag p.i. (57) keine Myokarddilatation beobachtet. Am 35. Tag p.i. bestand jedoch auch bei CVB3-infizierten Mäusen eine schwere DCM (57). Offensichtlich ist die CVB3-Myokarditis im Vergleich zu der EMCV-Myokarditis durch eine langsamere Entwicklung der funktionellen und morphologischen Veränderungen ausgezeichnet.

Ursächlich kommen für die schwere Beeinträchtigung der Herzleistung der infizierten Tiere ein Verlust an kontraktilen Elementen sowie ein Umbau der extrazellulären Matrix in Frage. Hierzu können eine Reihe von Faktoren beitragen wie direkte virale Myozytenschädigung (49, 53, 54, 55, 56), Elimination virusinfizierter Myozyten durch NK-Zellen (64, 65, 66), zytokinbedingte Funktions- und Zellschädigungen (262, 263), autoreaktive zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (48, 58, 134, 135, 162) sowie Aktivierung des Matrixdegradationssystems (175, 178, 192, 211, 264).

Zur Rolle des akuten Myozytenverlustes durch CVB3 oder NK-Zellen können die vorliegenden Ergebnisse aufgrund des Studiendesigns bzw. des Untersuchungszeitpunktes am 14. Tag p.i. keine weiteren Informationen liefern. Im Hinblick auf die Zytokine ist von Bedeutung, dass sie sowohl direkt als auch indirekt Myokardschäden verursachen können. Bei den infizierten Tieren

lag eine dominante Expression proinflammatorischer Zytokine (Il-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) vor, deren zentrale Rolle für die Entwicklung und Progression der CVB3-Myokarditis wiederholt dokumentiert wurde (52, 80, 81, 82, 83). In Bezug auf die kardiale Funktionsstörung ist von Interesse, dass Il-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in der vorliegenden Studie negativ mit der Ejektionsfraktion korreliert waren. Hierbei ist jedoch offen, worauf diese Beziehung im Einzelnen beruht. Von Il-1 $\beta$  und insbesondere TNF- $\alpha$  ist bekannt, dass sie die linksventrikuläre Funktion direkt vermindern und Apoptosen induzieren können (228, 262, 263, 265). Darüber hinaus sind, wie unter 4.2 und 4.3 diskutiert, die Th<sub>1</sub>-Zytokine aber auch bei der Rekrutierung, Stimulation und Proliferation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (122, 226, 227, 228) sowie der Modulation des Matrixdegradationssystems entscheidend involviert (168, 183, 236). Die signifikant vermehrten CD3-Zellen der infizierten Tiere sprechen dafür, dass die Zytokine über die Stimulation von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zumindest zum Teil zu dem Myokardschaden beigetragen haben. Diese Annahme stimmt mit Beobachtungen anderer Autoren überein, die gezeigt haben, dass die myokardiale Zellschädigung in der späten subakuten Phase vor allem durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verursacht wird (48, 58, 59, 130, 225).

Neben dem Verlust an kontraktilen Elementen durch Myozytolyse und Apoptosen stellt der Umbau der EZM den zweiten wichtigen Faktor in der Entwicklung der linksventrikulären Dysfunktion dar (173, 178, 192, 209, 221, 229). Bei den infizierten Mäusen lagen eine gesteigerte Expression von MMP-3 und uPA, ein Anstieg der MMP-2-Aktivität sowie ein erhöhtes MMP-3/TIMP-4-Verhältnis vor. Alle Befunde sind mit der dominanten Th<sub>1</sub>-Zytokinexpression insbesondere von Il-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  erklärbar. Zusammengenommen sprechen sie dafür, dass das Matrixdegradationssystem aktiviert und an dem kardialen Funktionsverlust der Tiere beteiligt war. In diesem Sinne kann auch die negative Korrelation zwischen uPA und der EF interpretiert werden.

Die mit Il-4 behandelten infizierten Mäuse wiesen im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren eine weitgehend erhaltene Herzfunktion auf. LVESP, CO und EF waren signifikant höher als bei den infizierten Tieren. Der gleiche Trend ergab sich für  $dp/dt_{max}$  bzw.  $dp/dt_{min}$ . Bezogen auf die Mittelwerte der nicht infizierten Kontrollen lagen alle Parameter im Kontrollbereich, lediglich die EF war mit 42,2% gegenüber 51,1% erniedrigt. Zur Zeit liegt nur eine Studie zum Vergleich der Hämodynamikwerte unter einer Il-4-Behandlung vor. Li et al. (221) untersuchten bei CVB3-

infizierten BALB/c-Mäusen die Wirkung einer jeweils fünftägigen Il-4-Gabe am Anfang bzw. Ende einer zehntägigen Studie. Hierbei fanden sie bei den früh behandelten Tieren ebenfalls eine signifikant besser erhaltene Herzleistung bezogen auf LVESP und  $dP/dt_{max}$ , nicht jedoch bei den spät behandelten Tieren. Für CO und EF wurden keine Werte mitgeteilt. Als möglichen Grund für die unterschiedlichen Effekte der beiden Behandlungsschemata diskutierten die Autoren den zeitlich differenten Behandlungsbeginn und dessen Auswirkungen auf die Th<sub>0</sub>-Polarisierung in Th<sub>1</sub>- bzw. Th<sub>2</sub>-Zellen. Murphy et al. (224) zeigten *in vitro*, dass Th<sub>1</sub>-Zellen, die durch Il-12-Stimulation in Gegenwart eines Il-4-Antikörpers generiert wurden, durch Restimulation mit Il-4 in Th<sub>2</sub>-Zellen umgewandelt werden können. Demgegenüber verloren wiederholt mit Il-12 stimulierte, längerfristig polarisierte Th<sub>1</sub>-Populationen ihre Plastizität und wandelten sich nach Restimulation nicht mehr in Th<sub>2</sub>-Zellen um. Insofern wäre denkbar, dass eine nach dem fünften Tag p.i. einsetzende Il-4-Behandlung nicht mehr zur Umkehr der Th<sub>1</sub>-Polarisierung in der Lage ist. Einer anderen Studie zufolge scheint jedoch die Anwesenheit von IL-4 während der Generation von Th<sub>1</sub>-Zellen durch Il-12 notwendig zu sein und die Plastizität bei Abwesenheit von Il-4, wie bei der zuvor genannten Untersuchung, verloren zu gehen (266). Insofern ist unklar, inwieweit die Daten der speziellen experimentellen Bedingungen von Murphy et al. (224) sich auf die Situation *in vivo* übertragen lassen, wo vor und während der Antigenpräsentation NK- bzw. NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Zellen nicht nur Il-12, sondern auch große Mengen Il-4 exprimieren.

Der kardioprotektive Effekt von Il-4 ist offensichtlich auf eine Abschwächung der oben diskutierten Schädigungsmechanismen zurückzuführen. So zeigten die Th<sub>1</sub>-Zytokinexpression, das entzündliche Infiltrat und die Parameter des Matrixdegradationssystems alle eine deutliche Besserung unter der Il-4-Behandlung. Die verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine kann mit der Hemmung der Th<sub>1</sub>-Funktion durch Il-4, wie sie in mehreren Arbeiten beschrieben wurde (88, 106, 118, 120), erklärt werden. Da Il-1 und TNF- $\alpha$  eine aggravierende Wirkung auf den Myokarditisverlauf besitzen (80, 81, 82), ist deren therapeutische Senkung sicher von Bedeutung. Hierbei dürfte der positive Effekt einer Il-1- und TNF- $\alpha$ -Reduktion unter anderem auf einer verminderten Stimulation und Proliferation von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten beruhen. Dem entspricht die Abnahme der infiltrierenden CD3<sup>+</sup>-Zellen bei den mit Il-4 behandelten Tieren. Daneben kann auch Il-4 selbst die zytotoxische T-Zellantwort reduzieren und die autoreaktive Immunantwort abschwächen. Hierfür scheint eine Il-4 bedingte Blockierung

der stimulierenden und differenzierenden Eigenschaften antigenpräsentierender Zellen in Bezug auf die CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten verantwortlich zu sein (267).

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, dass Il-4 auch durch Modulation des Matrixdegradationssystems kardioprotektiv gewirkt hat. In diese Richtung deuten der Abfall von MMP-3- bzw. der MMP/TIMP-4-Quotienten und die Reduktion der MMP-2-Aktivität. Von besonderem Interesse ist die Abnahme der MMP-2/TIMP-4- bzw. MMP-9/TIMP-4-Quotienten, da mehrere Studien gezeigt haben, dass besonders die kardiale Expression von MMP-2 und MMP-9 bzw. die gestörte Balance zwischen MMP-2 sowie MMP-9 und den TIMPs mit dem kardialen Remodeling verknüpft sind (178, 205, 206, 240, 244, 268). Für diese Veränderungen kann zum einen die verminderte Expression von Il-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  verantwortlich sein, von denen eine stimulierende Wirkung auf die MMP-Synthese (besonders MMP-9; 168, 233) und ein hemmender Effekt auf die TIMPs beschrieben wurde (183, 236). Zum anderen scheint Il-4 selbst in humanen Monozyten die MMP-1- und MMP-9-Aktivität über eine Hemmung der Prostaglandin E2-Synthese zu supprimieren (245, 246). Schließlich ist bei der Verschiebung der MMP/TIMP-Relation auch die Reduktion des entzündlichen Zellinfiltrates zu berücksichtigen, da die MMP-Produktion bei der CVB3-Myokarditis zum größten Teil über Makrophagen und Immunzellen erfolgt (175, 178, 221).

Die Untersuchungen von Heymans et al. (192, 244) haben gezeigt, dass bei Mäusen durch eine Hemmung von uPA das kardiale Remodeling bei CVB3-Myokarditis oder akuter Druckbelastung abgeschwächt bzw. verhindert wird. Insofern kann die in der vorliegenden Studie unter der Il-4-Behandlung beobachtete Verminderung der uPA-Expression ebenfalls zum Erhalt der kardialen Funktion beigetragen haben. In dieselbe Richtung deutet die negative Korrelation der uPA-Expression mit der Ejektionsfraktion. Die Hemmung oder der Verlust von uPA führt zu einer Inaktivierung des Plasminogensystems mit verminderter Aktivierung von proMMPs. Damit stimmt überein, dass die mit Il-4 behandelten Tiere auch eine Aktivitätsabnahme von MMP-2 aufwiesen. Die Aktivität anderer MMPs wurde nicht bestimmt. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich die verminderte uPA-Expression nicht nur auf MMP-2, sondern auch auf andere MMPs ausgewirkt hat. Allerdings darf in diesem Zusammenhang der beobachtete Anstieg von TIMP-4 unter der Il-4-Behandlung nicht unerwähnt bleiben. Da TIMP-

4 ein potenter Inhibitor von MMP-1, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 ist (183, 198, 199, 200), ist ebenfalls eine Inaktivierung verschiedener MMPs durch TIMP-4 in Betracht zu ziehen.

Welche der geschilderten Veränderungen unter der Il-4-Behandlung letztlich für den Erhalt der Herzfunktion entscheidend gewesen ist, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht beantwortet werden. Im Hinblick auf die ubiquitäre Beteiligung der proinflammatorischen Zytokine am pathogenetischen Ablauf der CVB3-Myokarditis bietet es sich an, die Suppression der Th<sub>1</sub>-Antwort als entscheidend anzusehen. Dies lässt allerdings die enge Vernetzung und gegenseitige Beeinflussung von Zytokinen, Zellinfiltrat und Matrixdegradationssystem außer Acht. Zudem hat, wie oben gezeigt, Il-4 selbst unabhängig von anderen Zytokinen direkte Effekte auf die verschiedenen Pathomechanismen. Insofern ist zu vermuten, dass die beobachtete kardioprotektive Wirkung von Il-4 durch eine Summation mehrerer Effekte zustande gekommen ist.

Der hemmende Einfluss von Il-4 auf die zytotoxische Aktivität (86) und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten stimulierende Wirkung antigenpräsentierender Zellen (267) sowie die Beobachtungen von Li et al. (221) sprechen für einen möglichst frühzeitigen Behandlungsbeginn. Wie lange Il-4 verabreicht werden sollte, ist auch mit den vorliegenden Ergebnissen nicht zu beantworten. Hierzu sind weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Behandlungszeiten, größeren Fallzahlen und längerfristiger Nachbeobachtung nötig.

#### **4.5 Studienlimitierungen und Ausblick**

Bei der Beurteilung der Studienergebnisse müssen verschiedene Einschränkungen berücksichtigt werden. Die Gruppengröße ist mit sechs Tieren pro Gruppe relativ klein, auch wenn sie für viele Untersuchungsparameter, insbesondere der Hämodynamik, eindeutige statistische Resultate lieferte. Möglicherweise wäre jedoch bei einer größeren Fallzahl der Effekt der Il-4 Behandlung in Bezug auf die tendenziell geringere Expression verschiedener Zytokine deutlicher ausgefallen und statistisch zu sichern gewesen. Die Untersuchungen wurden am Ende der vorgesehenen Behandlungsdauer durchgeführt und geben somit nur einen punktuellen Einblick in den dynamischen Krankheitsablauf und den therapeutischen Effekt. In Bezug auf die

Untersuchungsparameter musste sich die Studie auf eine begrenzte Anzahl von Zytokinen und Komponenten des Matrixdegradationssystems beschränken, wodurch nur ein enger Einblick in die beiden außerordentlich komplexen Netzwerke möglich war. Schließlich können die bei SWR/J-Mäusen mit CVB3-Myokarditis gewonnenen Daten nicht ohne weiteres auf andere Mausstämme oder gar andere virusinduzierte Myokarditiden übertragen werden.

Die hier dargestellten Effekte der Il-4-Behandlung auf die Hämodynamik der infizierten Tiere sind ermutigend. Jedoch lässt die Beendigung der Studie am 14. Tag offen, welche Bedeutung sie für den längerfristigen Verlauf und das Überleben der Tiere haben. Insbesondere unter dem Gesichtspunkt, dass der therapeutische Effekt von Il-4 unter anderem durch eine Modulation des Matrixdegradationssystems bedingt sein kann, sollte in einer zukünftigen Langzeitstudie der Effekt einer auf 14 Tage begrenzten und einer längerfristigen Il-4-Behandlung geprüft werden. In früheren Studien war gezeigt worden, dass auch die Interferone sowohl beim Tier (100, 102, 103) als auch beim Menschen (25) einen günstigen Einfluss auf den Verlauf einer Virusmyokarditis bzw. einer DCM haben. Hierbei scheint eine Hauptwirkung von IFN in der Infektabwehr und Hemmung der viralen Replikation zu bestehen (269, 270, 271). Insofern wäre es von Interesse zu prüfen, ob durch die Kombination der unterschiedlichen Wirkungen von Il-4 und IFN ein additiver therapeutischer Effekt erzielt werden kann. Schließlich sind die langfristig entscheidenden Veränderungen der chronischen Myokarditis bzw. der DCM durch das Matrixdegradationssystem im Sinne des Remodeling bedingt. Von daher erscheint es erfolgversprechend, durch Gabe eines MMP-Inhibitors (TIMP) oder eines Plasminogenaktivator-Inhibitors (PAI) direkt in das System einzugreifen.



## 5 Zusammenfassung

In pathogenetischer Hinsicht zeigt die murine CVB3-Myokarditis einen dreiphasigen Verlauf: eine akute Phase der viralen Infektion, eine subakute Phase der Immunantwort und eine chronische Phase des Myokardumbaus und der Dilatation. Der Ausgang der Myokarditis wird bestimmt von Art und Umfang der entzündlichen Reaktion und dem Umbau der extrazellulären Matrix (EZM). Die vorliegende Arbeit sollte zur Charakterisierung der entzündlichen Reaktion, des matrixregulierenden Systems und der kardialen Funktionsstörung bei SWR/J-Mäusen mit CVB3-Myokarditis beitragen. In einem zweiten Abschnitt sollte das Verhalten der gleichen Parameter unter einer Immunmodulation mit exogen zugeführtem Interleukin-4 (IL-4) untersucht werden.

In die Studie wurden 24 acht Wochen alte, männliche SWR/J-Mäuse aufgenommen. Sechs Tiere dienten als Kontrollen, sechs Tiere wurden mit  $5 \times 10^5$  plaque forming units (PFU) CVB3 (Nancy strain) i.p. infiziert, sechs Tiere dienten als Behandlungskontrollen und wurden mit 200 ng/die rekombinantem murinem Interleukin-4 (rmIL-4) i.p. über 14 Tage behandelt und sechs Tiere wurden gleichzeitig infiziert und mit rmIL-4 behandelt. Am Ende der Studie 14 Tage p.i. wurden alle Tiere nach Messung der Hämodynamik (Herzfrequenz, LVESP,  $dp/dt_{max}$ ,  $dp/dt_{min}$ ) getötet und das Herz für weitere Untersuchungen entnommen. Die Entzündungsreaktion wurde durch Messung der mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-10 mittels semiquantitativer RT-PCR sowie durch immunhistochemische Bestimmung der CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bzw. CD11b<sup>+</sup>-Makrophagen untersucht. Der Zustand des matrixregulierenden Systems wurde durch Bestimmung der mRNA-Expression von MMP-2, MMP-3, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-4, uPA und tPA sowie durch die zymographische Messung der Aktivität von MMP-2 analysiert. Etwaige Veränderungen des Kollagengerüsts wurden mittels der Messung der mRNA-Expression von Kollagen Typ I (Kol I) und Typ III (Kol III) überprüft. Zur Frage der Auswirkungen der Immunmodulation wurden alle Parameter der unbehandelten infizierten Tiere mit denen der behandelten infizierten Tiere verglichen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die infizierten SWR/J-Mäuse gegenüber den Kontrollen eine starke entzündliche Reaktion mit Zytokinexpression und CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration aufwiesen. In Bezug auf das Zytokinmuster dominierte die proinflammatorische Th<sub>1</sub>-Immunantwort. Gleichzeitig bestand

eine Aktivierung des matrixdegradierenden Systems mit einem Anstieg von MMP-3, MMP-3/TIMP-4, uPA und der MMP-2-Aktivität, jedoch ohne Auswirkungen auf die Kol I- oder Kol III-Expression. Alle hämodynamischen Parameter waren im Sinne einer schweren kardialen Dysfunktion verändert. Die mit Il-4 behandelten infizierten Tiere zeigten gegenüber den unbehandelten infizierten Tieren eine Reduktion der entzündlichen Reaktion (proinflammatorische Zytokine und CD3<sup>+</sup>-Zellen) eine Umkehr der matrixregulierenden Parameter (Abfall von MMP-3, MMP/TIMP-Quotienten, MMP-2-Aktivität und uPA) sowie eine unveränderte Kol I-/Kol III-Expression.

Aus den Daten kann abgeleitet werden, dass durch eine langfristige Immunmodulation mit Il-4 eine wesentliche kardiale Funktionsabnahme bis zum Ende der subakuten Phase der CVB3-Myokarditis verhindert werden kann. Ursächlich scheinen hieran sowohl eine Suppression der inflammatorischen Reaktion als auch eine Umkehr der MMP/TIMP-Dysbalance beteiligt zu sein. Die unveränderte Kol I-/Kol III-Expression weist darauf hin, dass bei SWR/J-Mäusen zu diesem Zeitpunkt des Myokarditisverlaufes noch keine quantitativen Veränderungen des Kollagengerüsts vorliegen, was aber qualitative Veränderungen wie z.B. Auflösung von Quervernetzungen nicht ausschließt.

## 6 Literatur

1. O'Connell JB. Diagnosis and medical treatment of inflammatory cardiomyopathy. In: Topol E, Nissen J (Eds). Cardiovascular Medicine, Lippincott-Raven, Philadelphia (1998) p. 2309-2336
2. Mahrholdt H, Goedecke C, Wagner A, Meinhardt G, Athanasiadis A, Vogelsberg H, Fritz P, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Cardiovascular magnetic resonance assessment of human myocarditis: a comparison to histology and molecular pathology. *Circulation* (2004) 109:1250-1258
3. Schultheiss HP, Pauschinger M, Kühl U. Pathogenese der entzündlichen Kardiomyopathie. *Med Klin* (1998) 93:229-235
4. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, Pauschinger M, Schultheiss HP, McCarthy R, Hare J, Bricker JT, Bowles KR, Towbin JA. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. Evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* (2003) 42:466-472
5. Rose NR, Neumann DA, Herskowitz A. Coxsackievirus myocarditis. *Adv Intern Med* (1992) 37:411-429
6. Pauschinger M, Doerner A, Kühl U, Schwimmbeck PL, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation* (1999) 99:889-895
7. Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ, Pham V, Kühl U, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Towbin JA. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* (1999) 99:1348-1354
8. Pankuweit S, Moll R, Baandrup U, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Prevalence of the parvovirus B19 genome in endomyocardial biopsy specimens. *Hum Pathol* (2003) 34:497-

503

9. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with “idiopathic” left ventricular dysfunction. *Circulation* (2005) 111:887-893
10. Kandolf R, Hofschneider PH. Viral heart disease. *Springer Semin Immunol Pathol* (1989) 11:1-13
11. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* (2000) 343:1388-1398
12. Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G, Vogelsberg H, Fritz P, Dippón J, Bock CT, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation* (2006) 114:1581-1590
13. Haas GJ. Etiology, evaluation, and management of acute myocarditis. *Cardiol Rev* (2001) 9:88-95
14. Torres F, Anguita M, Gimenez D, Mesa D, Tejero I, Franco M, Benitez F, Amat M, Valles F. Long-term clinical course of acute myocarditis. Prospective study of a series of 99 patients (1987-1995). *Rev Esp Cardiol* (1996) 49:723-731
15. Kühl U, Daun B, Seeberg B, Strauer BE. Dilatative Kardiomyopathie - eine chronische Myokarditis? *Herz* (1992) 17:97-106
16. Kühl U, Noutsias M, Seeberg B, Schannwell N, Welp LB, Schultheiss HP. Chronic inflammation in the myocardium of patients with clinically suspected dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* (1994) 1:13-25

17. D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, Sinagra G, Di Lenarda A, Silvestri F, Di Sciascio G. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart* (2001) 85:499-504
18. Richardson PJ, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen EG, Thiene G, Goodwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. Report of the 1995 World Health Organization /International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* (1996) 93:841-842
19. Dec GW, Fuster V. Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* (1994) 331:1564-1575
20. Baldasseroni S, Opasich C, Gorini M, Lucci D, Marchionni N, Marini M, Campana C, Perrini G, Desorsola A, Masotti G, Tavazzi L, Maggioni AP. Left bundle-branch block is associated with increased 1-year sudden and total mortality rate in 5517 outpatients with congestive heart failure: a report from the Italian network on congestive heart failure. *Am Heart J* (2002) 143:398-405
21. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* (2000) 342:1077-1084
22. Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG, Archard LC. Detection of Coxsackie-B-virus specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Lancet* (1986) 1:1120-1123
23. Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* (2005) 112:1965-1970
24. 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) 107:2793-2798
25. Sekiguchi, M, Take, M. World survey of catheter biopsy of the heart. In: *Cardiomyopathy: Clinical, Pathological and Theoretical Aspects*, Sekiguchi, M, Olsen, EG (Eds), University Park Press, Baltimore (1980) 217
  26. Wu LA, Lapeyre AC, Cooper LT. Current role of endomyocardial biopsy in the management of dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Mayo Clin Proc* (2001) 76:1030-1038
  27. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, Levine GN, Narcula J, Starling RC, Towbin J, Virmani R. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. *Circulation* (2007) 116:2216-2233
  28. Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clin Proc* (1989) 64:1235-1245
  29. Baughman, KL. Diagnosis of myocarditis. Death of Dallas criteria. *Circulation* (2006) 113:593-595
  30. Grodums EI, Dempster G. Myocarditis in experimental coxsackie B3 infection. *Canad J Microbiol* (1959) 5:605-615
  31. 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
  32. 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)

183:105-108

33. 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) 82:613-618
34. Schmidtke M, Glück 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) 61:518-526
35. Reetoo KN, Osman SA, Illavia SJ, Cameron-Wilson CL, 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) 81:2755-2762
36. Klingel K, Stephan S, Sauter M, Zell R, McManus BM, Bultmann B, Kandolf R. Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: virus dissemination and immune cell targets. *J Virol* (1996) 70: 8888-8895
37. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, Albrecht M, Seemann M, Mall G, Kandolf R. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89:314-318
38. 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
39. Kawai C, Takatsu T. Clinical and experimental studies on cardiomyopathy. *N Engl J Med* (1975) 293:592-597

40. Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM. Differential effects of myocarditic variants of coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage. *Lab Invest* (1991) 64:55-64
41. Joo CH, Hong HN, Kim EO, Im JO, Yoon SY, Ye JS, Moon MS, Kim D, Lee H, Kim YK. Coxsackievirus B3 induces apoptosis in the early phase of murine myocarditis: a comparative analysis of cardiovirulent and noncardiovirulent strains. *Intervirology* (2003) 46:135-140.
42. Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94:3352-3356
43. Bergelson JM, Cunningham JA, Drouguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW. Isolation of a common receptor for Coxsackie B virus and adenoviruses types 2 and 5. *Science* (1997) 275:1320-1323
44. Orthopoulos G, Triantafilou K, Triantafilou M. Coxsackie B viruses use multiple receptors to infect human cardiac cells. *J Med Virol* (2004) 74:291-299
45. Ito M, Kodama M, Masuko M, Yamaura M, Fuse K, Uesugi Y, Hirono S, Okura Y, Kato K, Hotta Y, Honda T, Kuwano R, Aizawa Y. Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* (2000) 86:275-280
46. Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, Wang X, Dekkers D, Houtsmuller AB, Pauschinger M, Bergelson J, Warraich R, Yacoub M, Hetzer R, Lamers J, Schultheiss HP, Poller W. Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins  $\alpha(v)\beta(3)$  and  $\alpha(v)\beta(5)$  on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* (2001) 104:275-280



47. Lyden DC, Olszewski J, Feran M, Job LP, Huber SA. Coxsackievirus B3-induced myocarditis. Effects of sex steroids on viremia and infectivity of cardiocytes. *Am J Pathol* (1987) 126:432-438
48. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* (1999) 99:1091-1100
49. McManus BM, Chow LH, Wilson JE, Anderson DR, Gulizia JM, Gauntt CJ, Klingel KE, Beisel KW, Kandolf R. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* (1993) 68:159-169
50. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of viral myocarditis. *Circulation* (2001) 104:1076-1082
51. Rose NR, Hill SL. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* (1996) 80:S92-S99
52. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation* (1996) 94:2930-2937
53. Klingel K, Kandolf R. The role of enterovirus replication in the development of acute and chronic muscle disease in different immunocompetent mouse strains. *Scand J Infect Dis* (1993) Suppl 88:79-85
54. 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
55. Herzum M, Ruppert V, Kuytz B, Jomaa H, Nakamura I, Maisch B. Coxsackievirus B3 infection leads to cell death of cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* (1994) 26:907-913

56. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, Martone ME, Campbell KP, Rhoads RE, Knowlton KU. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med* (1999) 5:320-326
57. Fairweather D, Rose NR. Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: A model of autoimmune disease for studying immunotoxicity. *Methods* (2007) 41:118-122
58. Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JJ. The role of CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes in Coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol* (1995) 69:6720-6728
59. Lenzo JC, Fairweather D, Cull V, Shellam GR, Lawson CM. Characterisation of murine cytomegalovirus myocarditis: Cellular infiltration of the heart and virus persistence. *J Mol Cell Cardiol* (2002) 34:629-640
60. Morel PA, Oriss TB. Cross-regulation between Th1 and Th2 cells. *Crit Revue Immunol* (1998) 275-303
61. Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A, Kawai C. Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *J Am Coll Cardiol* (1986) 7:868-872
62. Shen Y, Xu W, Chu YW, Wang Y, Liu QS, Xiong SD. Coxsackievirus group B type 3 infection upregulates expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cardiac myocytes, which leads to enhanced migration of mononuclear cells in viral myocarditis. *J Virol* (2004) 78:12548-12556
63. Salazar-Mather TP, Orange JS, Biron CA. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )-dependent pathways. *J Exp Med* (1998) 187:1-14

64. Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Evidence of perforin-mediated cardiac myocyte injury in acute murine myocarditis caused by coxsackie virus B3. *J Pathol* (1993) 170:53-58
65. Godeny EK, Gauntt CJ. Interferon and natural killer cell activity in coxsackie virus B3-induced murine myocarditis. *Eur Heart J* (1987) 8(suppl):433-435
66. Bancroft GJ. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr Opin Immunol* (1993) 5:503-510
67. Kos FJ, Engleman EG. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. *Immunol Today* (1996) 17:174-176
68. Lanier LL, Corliss B, Phillips JH. Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunol Res* (1997) 155:145-154
69. Paya CV, Kenmotsu N, Schoon RA, Leibson PJ. Tumor necrosis factor and lymphotoxin secretion by human natural killer cells leads to antiviral cytotoxicity. *J Immunol* (1988) 141:1989-1995
70. Arase H, Arase N, Ogasawara K, Good RA, Onoé K. An NK1.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> single-positive thymocyte subpopulation that expresses a highly skewed T-cell antigen receptor V beta family. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89:6506-6510
71. Lodge PA, Herzum M, Olszewski J, Huber SA. Coxsackievirus B-3 myocarditis: acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms. *Am J Pathol* (1987) 128:455-463
72. Godeny EK, Gauntt CJ. Involvement of natural killer cells in coxsackie virus B3 viral-induced myocarditis. *J Immunol* (1986) 137:1695-1702

73. Godeny EK, Gauntt CJ. Murine natural killer cells limit coxsackie virus B3 replication. *J Immunol* (1987) 139:913-918
74. Zaragoza C, Ocampo C, Saura M, Leppo M, Wei XQ, Quick R, Moncada S, Liew FY, Lowenstein CJ. The role of inducible nitric oxide synthase in the host response to Coxsackievirus myocarditis. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95:2469-2474
75. Lowenstein CJ, Hill SL, Lafond-Walker A, Wu J, Allen G, Landavere M, Rose NR, Herskowitz A. Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis. *J Clin Invest* (1996) 97:1837-1843
76. Klingel K, Sauter M, Selinka HC, Bültmann B, Kandolf R. Comparative assessment of cytokine mRNA expression in hearts of CVB3-infected permissive and resistant mice. *Path Res Pract* (1998) 194
77. Badorff C, Fichtlscherer B, Rhoads RE, Zeiher AM, Mülsch A, Dimmeler S, Knowlton KU. Nitric oxide inhibits dystrophin proteolysis by coxsackieviral protease 2A through S-nitrosylation: a protective mechanism against enteroviral cardiomyopathy. *Circulation* (2000) 102:2276-2281
78. Kurrer MO, Kopf M, Penninger JM, Eriksson U. Cytokines that regulate autoimmune myocarditis. *Swiss Med Wkly* (2002) 132:408-413
79. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* (1993) 259:1739-1742
80. Huber SA, Polgar J, Schultheiss HP, Schwimmbeck P. Augmentation of pathogenesis of coxsackievirus B3 infections in mice by exogenous administration of interleukin-1 and interleukin-2. *J Virol* (1994) 68:195-206

81. Neumann DA, Lane JR, Allen GS, Herskowitz A, Rose NR. Viral myocarditis leading to cardiomyopathy: do cytokine contribute to pathogenesis? *Clin Immunol Immunopathol* (1993) 68:181-190
82. Lane JR, Neumann DA, LaFond-Walker A, Herskowitz A, Rose NR. Interleukin 1 or tumor necrosis factor can promote Coxsackievirus B3-induced myocarditis in resistant B10.A mice. *J Exp Med* (1992) 175:1123-1129
83. Kubota T, McTierman CF, Frye CS, Demetris AJ, Feldman AM. Cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha causes lethal myocarditis. *J Card Fail* (1997) 3:117-124
84. Lacraz S, Nicod L, Galve-de Rochemonteix B, Baumberger C, Dayer JM, Welgus HG. Suppression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages by interleukin-4. *J Clin Invest* (1992) 90:382-388
85. Yoshimoto K, Swain SL, Bradley LM. Enhanced development of Th<sub>2</sub>-like primary CD4 effectors in response to sustained exposure to limited rIL-4 in vivo. *J Immunol* (1996) 156:3267-3274
86. Oswald IP, Gazzinelli RT, Sher A, James SL. Il-10 synergizes with Il-4 and transforming growth factor-B to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* (1992) 148:3578-3582
87. Inobe J, Slavin AJ, Komagata Y, Chen Y, Liu L, Weiner HL. Il-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th<sub>2</sub> cells and oral administration of Il-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* (1998) 28:2780-2790
88. TanakaT, Hu-Li J, Seder RA, Fazekas de St Groth B, Paul WE. Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon gamma production by naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90:5914-5918

89. Ruppert J, Peters JH. IL-6 and IL-1 enhance the accessory activity of human blood monocytes during differentiation to macrophages. *J Immunol* (1991) 146:144-149
90. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* (1990) 8:253-278
91. Kanda T, McManus JE, Nagai R, Imai S, Suzuki T, Yang D, McManus BM, Kobayashi I. Modification of viral myocarditis in mice by interleukin-6. *Circ Res* (1996) 78:848-856
92. Tanaka T, Kanda T, McManus BM, Kanai H, Akiyama H, Sekiguchi K, Yokoyama T, Kurabayashi M. Overexpression of interleukin-6 aggravates viral myocarditis: impaired increase in tumor necrosis factor-alpha. *J Mol Cell Cardiol* (2001) 33:1627-1635
93. Nishio R, Matsumori A, Shioi T, Ishida H, Sasayama S. Treatment of experimental viral myocarditis with interleukin-10. *Circulation* (1999) 100:1102-1108
94. Shioi T, Matsumori A, Nishio R, Ono K, Kakio T, Sasayama S. Protective role of interleukin-12 in viral myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* (1997) 29:2327-2334
95. Yamamoto N, Shibamori M, Ogura M, Seko Y, Kikuchi M. Effects of intranasal administration of recombinant murine interferon- $\gamma$  on murine acute myocarditis caused by encephalomyocarditis virus. *Circulation* (1998) 97:1017-1023
96. Nishio R, Shioi T, Sasayama S, Matsumori A. Carvedilol increases the production of interleukin-12 and interferon-gamma and improves the survival of mice infected with the encephalomyocarditis virus. *Am Coll Cardiol* (2003) 41:340-345
97. Yamada H, Kaibara N, Okano S, Maeda T, Shuto T, Nakashima Y, Okazaki K, Iwamoto Y. Interleukin-15 selectively expands CD57<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells, which are increased in active rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* (2007) 124:328-335

98. Huntington ND, Puthalakath H, Gunn P, Naik E, Michalak EM, Smyth MJ, Tabarias H, Degli-Esposti MA, Dewson G, Willis SN, Motoyama N, Huang DC, Nutt SL, Tarlinton DM, Strasser A. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat Immunol* (2007) 8:856-863
99. Kanda T, Tanaka T, Sekiguchi K, Seta Y, Kurimoto M, McManus JE, Nagai R, Yang D, McManus BM, Kobayashi I. Effect of interleukin-18 on viral myocarditis: enhancement of interferon- $\gamma$  and natural killer cell activity. *J Mol Cell Cardiol* (2000) 32:2163-2171
100. Matsumori A, Tomioka N, Kawai C. Protective effect of recombinant alpha interferon on coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Am Heart J* (1988) 115:1229-1232
101. Lutton CW, Gauntt CJ. Ameliorating effect of IFN- $\beta$  and anti-IFN- $\beta$  on coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *J Interferon Res* (1985) 5:137-146
102. Deonarian R, Cerullo D, Fuse K, Liu PP, Fish EN. Protective role for interferon-beta in coxsackievirus B3 infection. *Circulation* (2004) 110:3540-3543
103. Horwitz MS, La Cava A, Fine C, Rodriguez E, Ilic A, Sarvetnick N. Pancreatic expression of interferon- $\gamma$  protects mice from lethal coxsackievirus B3 infection and subsequent myocarditis. *Nat Med* (2000) 6:693-697
104. Romagnani S. Induction of Th<sub>1</sub> and Th<sub>2</sub> responses: a key role for the "natural" immune response. *Immunol Today* (1992) 13:379-381
105. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* (1996) 17:138-146
106. 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) 136:2348-2357

107. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* (1997) 18:263-266
108. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* (1989) 7:145-173
109. Huber SA, Sartini D, Exley M. Vgamma4(+) T cells promote autoimmune CD8(+) cytolytic T-lymphocyte activation in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice: role for CD4(+) Th1 cells. *J Virol* (2002) 76:10785-10790
110. Hsieh CS, Macatonia SE, O'Garra A, Murphy KM. T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro. *J Exp Med* (1995) 181:713-721
111. Hosken NA, Shibuya K, Heath AW, Murphy KM, O'Garra A. The effect of antigen dose on CD4<sup>+</sup> T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* (1995) 182:1579-1584
112. Duncan DD, Swain SL. Role of antigen-presenting cells in the polarized development of helper T cell subsets: evidence for differential cytokine production by Th0 cells in response to antigen presentation by B cells and macrophages. *Eur J Immunol* (1994) 24:2506-2514
113. Langhorne J, Cross C, Seixas E, Li C, von der Weid T. A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95:1730-1734
114. Huber SA, Kupperman J, Newell MK. Hormonal regulation of CD4<sup>+</sup> T-cell responses in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *J Virol* (1999) 73:4689-4695
115. Schwartz J, Sartini D, Huber S. Myocarditis susceptibility in female mice depends upon ovarian cycle phase at infection. *Virology* (2004) 330:16-23
116. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) induces T helper type 1 (Th1)-specific



- immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* (1993) 177:1199-1204
117. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* (1990) 145:3796-3806
118. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Ruglu FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* (1992)148:2142-2147
119. Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* (1997) 185:461-469
120. Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Sampognaro S, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, Del Prete G, Romagnani S. IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol* (1992) 149:2977-2983
121. Fiorentino DF, Zlotnick A, Mosmann T, Howard M, O'Garra A. Il-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* (1991) 147:3815-3822
122. Falcone M, Sarvetnick N. Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr Opin Immunol* (1999) 11:670-676
123. Huber SA, Graveline D, Newell MK, Born WK, O'Brien RL. V gamma 1+ T cells suppress and V gamma 4+ T cells promote susceptibility to coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *J Immunol* (2000) 165:4174-4181
124. Huber SA, Graveline D, Born WK, O'Brien RL. Cytokine production by Vgamma(+)-T-cell subsets is an important factor determining CD4(+)-Th-cell phenotype and susceptibility of BALB/c mice to coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol* (2001)

75:5860-5869

125. Leipner C, Grün K, Borchers M, Stelzner A. The outcome of coxsackievirus B3-(CVB3-) induced myocarditis is influenced by the cellular immune status. *Herz* (2000) 25:245-248
126. 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
127. Mena I, Perry CM, Harkin S, Rodriguez F, Gebhard J, Whitton JL. The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *Am J Pathol* (1999) 155:1205-1215
128. Herskowitz A, Beisel KW, Wolfgram LJ, Rose NR. Coxsackievirus B3 murine myocarditis: wide pathologic spectrum in genetically defined inbred strains. *Hum Pathol* (1985) 16:671-673
129. Wolfgram LJ, Beisel KW, Herskowitz A, Rose NR. Variations in the susceptibility to coxsackievirus B3 induced myocarditis among different strains of mice. *J Immunol* (1986) 136:1846-1852
130. Huber SA, Lodge PA. Coxsackievirus B-3 myocarditis in BALB/c mice: evidence for autoimmunity to myocyte antigens. *Am J Pathol* (1984) 116:21-29
131. 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<sup>+</sup> (pan T) and Lyt 1<sup>+</sup>, 23<sup>+</sup> (immature T) subsets in the development of myocarditis. *Circulation* (1987) 61:715-725
132. Hashimoto I, Komatsu T. Myocardial changes after infection with coxsackievirus B3 in nude mice. *Br J Exp Pathol* (1978) 59:13-20

133. Lawson CM, O'Donoghue H, Reed WD. The role of T cells in mouse cytomegalovirus induced myocarditis. *Immunology* (1989) 67:132-134
134. Woodruff JF, Woodruff JJ. Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackievirus B3 heart disease. *J Immunol* (1974) 113:1726-1734
135. Kishimoto C, Abelmann WH. Monoclonal antibody therapy for prevention of acute coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Circulation* (1989) 79:1300-1308
136. Opavsky MA, Penninger J, Aitken K, Wen WH, Dawood F, Mak T, Liu P. Susceptibility to myocarditis is dependent on the response of alpha beta T lymphocytes to coxsackieviral infection. *Circ Res* (1999) 85:551-558
137. Guthrie M, Lodge PA, Huber SA. Cardiac injury in myocarditis induced by coxsackievirus group B, type 3 in BALB/c mice is mediated by Lyt2<sup>+</sup> cytolytic lymphocytes. *Cell Immunol* (1984) 88:558-567
138. Sole MJ, Liu P. Viral myocarditis: a paradigm for understanding the pathogenesis and treatment of dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* (1993) 22(4Suppl A):99A-105A
139. Martino TA, Liu P, Sole MJ. Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Circ Res* (1994) 74:182-188
140. Wessely R, Klingel K, Santana LF, Dalton N, Hongo M, Jonathan Lederer W, Kandolf R, Knowlton KU. Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* (1998) 102:1444-1453
141. 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) 86:522-530

142. Merkle I, Tonew M, Glück B, Schmidtke M, Egerer R, Stelzner A. Coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis in outbred NMRI mice. *J Hum Virol* (1999) 2:369-379
143. 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) 33:1615-1626
144. Kim KS, Tracy S, Tapprich W, Bailey J, Lee CK, Kim K, Barry WH, Chapman NM. 5'-Terminal deletions occur in coxsackievirus B3 during replication in murine hearts and cardiac myocyte cultures and correlate with encapsidation of negative-strand viral RNA. *J Virol* (2005) 79:7024-7041
145. Tam PE. Coxsackievirus myocarditis: interplay between virus and host in the pathogenesis of heart disease. *Viral Immunol* (2006) 19:133-146
146. Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, Lawson CM, Rose NR. From infection to autoimmunity. *J Autoimmun* (2001) 16:175-186
147. Satoh M, Tamura G, Segawa I, Hiramori K, Satodate R. Enteroviral RNA in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* (1994) 15:934-939
148. Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, Schultheiss HP. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* (2005) 112:1965-1970
149. Muir P, Nicholson F, Tilzey AJ, Signy M, English TAH, Banatvala JE. Chronic relapsing pericarditis and dilated cardiomyopathy: serological evidence of persistent enterovirus infection. *Lancet* (1989) i:804-807
150. Rose NR, Hill SL. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* (1996) 80:S92-S99

151. Gauntt CJ, Arizpe HM, Higdon AL, Rozek MM, Crawley R, Cunningham MW. Anti-Coxsackievirus B3 neutralizing antibodies with pathological potential. *Eur Heart J* (1991) 12(Suppl D):124-129
152. Lawson CM, O'Donoghue HL, Reed WD. Mouse cytomegalovirus infection induces antibodies which cross-react with virus and cardiac myosin: a model for the study of molecular mimicry in the pathogenesis of viral myocarditis. *Immunology* (1992) 75:513-519
153. Huber SA. Autoimmunity in myocarditis: relevance of animal models. *Clin Immunol Immunopathol* (1997) 83:93-102
154. Neu N, Rose NR, Beisel KW, Herskowitz A, Gurri-Glass G, Craig SW: Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol* (1987) 139:3630-3636
155. Smith SC, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *J Immunol* (1991) 147:2141-2147
156. Cunningham MW, Antone SM, Gulizia JM, McManus BM, Fischetti VA, Gauntt CJ. Cytotoxic and viral neutralizing antibodies crossreact with streptococcal M protein, enteroviruses, and human cardiac myosin. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89:1320-1324
157. Fairweather D, Lawson CM, Chapman AJ, Brown CMS, Booth TWM, Papadimitriou JM, Shellam GR. Wild isolates of murine cytomegalovirus induce myocarditis and antibodies that cross-react with virus and cardiac myosin. *Immunology* (1998) 94:263-270
158. Neu N, Craig SW, Rose NR, Alvarez F, Beisel KW. Coxsackievirus induced myocarditis in mice: cardiac myosin autoantibodies do not cross-react with the virus. *Clin Exp Immunol* (1987) 69:566-574
159. Rose NR, Mackay IR. Molecular mimicry: a critical look at exemplary instances in human diseases. *Cell Molec Life Sci* (2000) 57:542-551

160. Schwimmbeck PL, Rohn G, Wrusch A, Schulze K, Dörner A, Kühl U, Tschöpe C, Pauschinger M, Schultheiss HP. Enteroviral and immune mediated myocarditis in SCID mice. *Herz* (2000) 25:240-244
161. Huber SA, Lodge PA. Coxsackievirus B-3 myocarditis: identification of different pathogenic mechanisms in DBA/2 and BALB/c mice. *Am J Pathol* (1986) 122:284-291
162. Huber SA. Autoimmunity in myocarditis: relevance of animal models. *Clin Immunol Immunopathol* (1997) 83:93-102
163. Neu N, Beisel KW, Traystman MD, Rose NR, Craig SW. Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to coxsackievirus B3 induced myocarditis. *J Immunol* (1987) 138:2488-2492
164. Bendall JK, Heymes C, Ratajczak P, Samuel JL. Extracellular matrix and cardiac remodeling. *Arch Mal Coeur Vaiss* (2002) 95:1226-1229
165. 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) 82:1387-1401
166. Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* (1998) 8:437-441
167. Igotz 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) 261:4337-4345
168. 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) 86:1259-1265

169. Bishop JE, Lindahl G. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res* (1999) 42:27-44
170. Li YY, McTierman CF, Feldman AM. Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovasc Res* (1999) 42:162-172
171. Chello M, Mastroroberto P, Romano R, Perticone F, Marchese AR. Collagen network remodeling and left ventricular function in constrictive pericarditis. *Heart* (1996) 75:184-189
172. 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) 22:1157-1165
173. Marijianowski MMH, 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) 25:1263-1272
174. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kühl U, Schultheiss HP. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation* (1999) 99:2750-2756
175. Li J, Schwimmbeck PL, Tschöpe C, Leschka S, Husmann L, Rutschow S, Reichenbach F, Noutsias M, Kobalz U, Poller W, Spillmann F, Zeichhardt H, Schultheiss HP, Pauschinger M. Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. *Cardiovasc Res* (2002) 56:235-247
176. Schaper J, Speiser B. The extracellular matrix in the failing human heart. *Basic Res in Cardiol* (1992) 87:303-309

177. 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) 106:857-866
178. Cheung C, Luo H, Yanagawa B, Leong HS, Samarasekera D, Lai JCK, Suarez A, Zhang J, McManus BM. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis. *Cardiovasc Pathol* (2006) 15:63-74
179. Sanchez-Lopez R, Alexander CM, Behrendtsen O, Breathnach R, Werb Z. Role of zinc-binding- and hemopexin domain-encoded sequences in the substrate specificity of collagenase and stromelysin-2 as revealed by chimeric proteins. *J Biol Chem* (1993) 268:7238-7247
180. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2001) 17:463-516
181. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. . Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* (1993) 4:197-250
182. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* (1992) 267:3581-3584
183. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* (1997) 378:151-160
184. Emonard H, Grimaud JA. Matrix metalloproteinases. A review. *Cell Mol Biol* (1990) 36:131-153
185. Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* (1997) 272:24-27



186. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* (1993) 53:288-295
187. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* (1989) 264:1860-1869
188. 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 USA* (1993) 90:4577-4581
189. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res* (2000) 46:214-224
190. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* (2002) 90:520-530
191. 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 USA* (1989) 86:2632-2636
192. 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) 114:565-573
193. Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, Gomis-Rüth FX, Nagase H, Tschesche H, Maskos K. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann NY Acad Sci* (1999) 878:73-91

194. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* (2002) 115:3719-3727
195. Zucker S, Lysik RM, Zarrabi HM, Moll U, Tickle SP, Stetler-Stevenson W, Baker TS, Docherty AJ. Plasma assay of matrix metalloproteinases (MMPs) and MMP-inhibitor complexes in cancer. Potential use in predicting metastasis and monitoring treatment. *Ann NY Acad Sci* (1994) 732:248-262
196. Nagase H, Brew K. Designing TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) variants that are selective metalloproteinase inhibitors. *Biochem Soc Symp* (2003) (70):201-212
197. Rahkonen OP, Koskivirta IM, Oksjoki SM, Jokinen E, Vuorio EI. Characterization of the murine TIMP4 gene, localization within intron 5 of the synapsin 2 gene and tissue distribution of the mRNA. *Biochim Biophys Acta* (2002) 1577:45-52
198. Liu YE, Wang M, Greene J, Su J, Ulrich S, Li H, Sheng S, Alexander P, Sang QA, Shi YE.. Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *J Biol Chem* (1997) 272:20479-20483
199. Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* (1997) 389:77-81
200. Bigg HF, Morrison CJ, Butler GS, Bogoyevitch MA, Wang Z, Soloway PD, Overall CM. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Cancer Res* (2001) 61:3610-3618
201. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* (1995) 270:5331-5338

202. Bernardo MM, Fridman R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J* (2003) 374:739-745
  
203. Leonardi A, Cortivo R, Fregona I, Plebani M, Secchi AG, Abatangelo G. Effects of Th2 cytokines on expression of collagen, MMP-1, and TIMP-1 in conjunctival fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2003) 44:183-189
  
204. Sottrup-Jensen L, Birkedal-Hansen H. Human fibroblast collagenase- $\alpha$ -macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian  $\alpha$ -macroglobulins. *J Biol Chem* (1989) 264:393-401
  
205. Rouet-Benzineb P, Buhler JM, Dreyfus P, Delcourt A, Dorent R, Perennec J, Crozatier B, Harf A, Lafuma C. Altered balance between matrix gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors in human dilated cardiomyopathy: potential role of MMP-9 in myosin-heavy chain degradation. *Eur J Heart Fail* (1999) 1:337-352
  
206. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, Kelly RA, Werb Z, Libby P, Lee RT. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* (2000) 106:55-62
  
207. Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, Mac Lellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, Mann DL. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* (2001) 104:826-831
  
208. Yarbrough WM, Mukherjee R, Brinsa TA, Dowdy KB, Scott AA, Escobar GP, Joffs C, Lucas DG, Crawford FA, Spinale FG. Matrix metalloproteinase inhibition modifies left ventricular remodeling after myocardial infarction in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg* (2003) 125:602-610

209. Pauschinger M, Hoppe K, Schwimmbeck PL. Relevance of myocardial inflammation for the activation of matrix metalloproteinase expression in patients with inflammatory cardiomyopathy. *Circulation* (2003) 108 (Suppl IV):245
210. 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) 491:173-179
211. 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) 7:444-452
212. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* (1987) 162: 156-159
213. 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) 239:487-491
214. Boenisch T. Färbemethoden-Detektionssysteme. In: Boenisch T, Hrsg. *Handbuch Immunologische Färbemethoden*, 3. Aufl. DakoCytomationCorp., Carpinteria, USA 2003: 36-37
215. Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* (1984) 70:812-823

216. Georgakopoulos D, Mitzner WA, Chen CH, Byrne BJ, Millar HD, Hare JM, Kass DA. In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. *Am J Physiol* (1998) 274:H1416-H1422
217. Bortz J. Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin 2004
218. Sachs L, Hedderich J. Angewandte Statistik. Methodensammlung mit R. 12. Auflage, Springer Verlag, Berlin 2006
219. Woodruff JF, Kilbourne ED. The influence of quantitated post-weaning undernutrition on coxsackievirus B3 infection of adult mice. I Viral persistence and increased severity of lesions. *J Infect Dis* (1970) 121:137-163
220. Zhang H, Yousef GE, Ouyang X, Archard LC. Characterization of a murine model of myocarditis induced by a reactivated Coxsackievirus B3. *Int J Exp Path* (1994) 75:99-110
221. Li J, Leschka S, Rutschow S, Schwimmbeck PL, Husmann L, Noutsias M, Westermann D, Poller W, Zeichardt H, Klingel K, Tschöpe C, Schultheiss HP, Pauschinger M. Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine myocarditis. *Eur J Pharmacol* (2007) 554: 60-68
222. Lim BK, Choe SC; Shin JO, Ho SH, Kim JM, Yu SS, Kim S, Jeon ES. Local expression of interleukin-1 receptor antagonist by plasmid DNA improves mortality and decreases myocardial inflammation in experimental coxsackieviral myocarditis. *Circulation* (2002) 105:1278-1281
223. Abehsira-Amar O, Gilbert M, Jolly M, Thèze J, Jankovic DL. IL-4 plays a dominant role in the differential development of Tho into Th1 and Th2 cells. *J Immunol* (1992) 148:3820-3829

224. Murphy E, Shibuya K, Hosken N, Openshaw P, Maino V, Davis K, Murphy K, O'Garra A. Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med* (1996) 183: 901-913
225. Huber SA. Coxsackievirus-induced myocarditis is dependent on distinct immunopathogenic responses in different strains of mice. *Lab Invest* (1997) 76:691-701
226. Muegge K, Williams TM, Kant J, Karin M, Chiu R, Schmidt A, Siebenlist U, Young HA, Durum SK. Interleukin-1 costimulatory activity on the interleukin-2 promoter via AP-1. *Science* (1989) 246:249-251
227. Spits H, Yssel H, Takebe Y, Arai N, Yokota T, Lee F, Arai K, Banchereau J, de Vries JE. Recombinant interleukin 4 promotes the growth of human T cells. *J Immunol* (1987) 139:1142-1147
228. Zhang J, Yu ZX, Hilbert SL, Yamaguchi M, Chadwick DP, Herman EH, Ferrans VJ. Cardiotoxicity of human recombinant interleukin-2 in rats. A morphological study. *Circulation* (1993) 87:1340-135
229. D'Armiento J. Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction. *Trends Cardiovasc Med* (2002) 12:97-101
230. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem* (1995) 376:345-355
231. Mori S, Gibson G, McTiernan CF. Differential expression of MMPs and TIMPs in moderate and severe heart failure in a transgenic model. *J Card Fail* (2006) 12:314-325
232. Sarén P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol* (1996) 157:4159-4165

233. Zhou M, Zhang Y, Ardans JA, Wahl LM. Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor-alpha and caspase 8. *J Biol Chem* (2003) 278:45406-45413
234. Saksela O, Rifkin DB. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol* (1988) 4:93-126
235. Nerlov C, Rørth P, Blasi F, Johnsen M. Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene* (1991) 6:1583-1592
236. Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunaga M, Nagai Y. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol* (1993) 94:145-149
237. Kleiner DE Jr, Tuuttila A, Tryggvason K, Stetler-Stevenson WG. Stability analysis of latent and active 72-kDa type IV collagenase: The role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Biochemistry* (1993) 32:1583-1592
238. Nagaoka I, Hirota S. Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in neutrophils in glycogen-induced peritoneal inflammation of guinea pigs. *Inflamm Res* (2000) 49:55-62
239. Tao ZY, Cavasin MA, Yang F, Liu YH, Yang XP. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci* (2004) 74:1561-1572
240. Meng XH, Wang Y, Zhuang JX, Han XZ, Chen Y, Jin YP, Wang YL, Yu YH, Spires JP, Song GJ. Dynamic changes in myocardial matrix metalloproteinase activity in mice with viral myocarditis. *Chin Med J (Engl)* (2004) 117:1195-1199

241. Mazzieri R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, Mignatti P. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J* (1997) 16:2319-2332
242. Baramova EN, Bajou K, Remacle A, L'Hoir C, Krell HW, Weidle UH, Noel A, Foidart JM. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett* (1997) 405:157-162
243. Monea S, Lehti K, Keski-Oja J, Mignatti P. Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J Cell Physiol* (2002) 192:160-170
244. Heymans S, Lupu F, Terclaver S, Vanwetswinkel B, Herbert JM, Baker A, Collen D, Carmeliet P, Moons L. Loss or inhibition of uPA or MMP-9 attenuates LV remodeling and dysfunction after acute pressure overload in mice. *Am J Pathol* (2005) 166:15-25
245. Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Wahl LM. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J Biol Chem* (1992) 267:515-519
246. Wahl LM, Corcoran ML. Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines. *J Periodontol* (1993) 64(5 Suppl):467-473
247. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovasc Res* (1999) 42:162-172
248. Varga J, Yufit T, Hitraya E, Brown RR. Control of extracellular matrix degradation by interferon-gamma. The tryptophan connection. *Adv Exp Med Biol* (1996) 398:143-148



249. Hashimoto T, Nakamura M, Oshika Y, Tsuchida T, Yamazaki H, Kijima H, Ueyama Y, Minoguchi K, Adachi M, Ota H. Interleukin-10 relieves the inhibitory effects of interferon-gamma on normal human lung fibroblasts. *Int J Mol Med* (2001) 7:149-154
250. Ignatz RA, Endo T, Massagué J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* (1987) 262:6443-6446
251. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* (1999) 13:1774-1786
252. 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) 40:1506-1514
253. Kishimoto C, Kitazawa M, Hiraoka Y, Takada H. Extracellular matrix remodeling in Coxsackievirus B3 myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* (1997) 85:47-55
254. Leslie KO, Schwarz J, Simpson K, Huber SA. Progressive interstitial collagen deposition in Coxsackievirus B3-induced murine myocarditis. *Am J Pathol* (1990) 136:683-693
255. Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, Woessner JF Jr. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol* (1996) 148:1639-1648
256. Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, Meyer TE, Norton GR. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation* (2001) 103:155-160
257. Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N, Sato H, Seiki M. Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV

- collagenase=gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest* (1995) 72:311-322
258. Matsumori A, Kawai C. An experimental model for congestive heart failure after encephalomyocarditis virus myocarditis in mice. *Circulation* (1982) 65:1230-1235
259. Hashimoto I. Myocarditis in mice infected with coxsackievirus B3. *Br J Exp Path* (1986) 67:737-745
260. Herzum M, Weller R, Jomaa H, Wietrzychowski F, Pankuweit S, Mahr P, Maisch B. Left ventricular hemodynamic parameters in the course of acute experimental coxsackievirus B 3 myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* (1995) 27:1573-1580
261. 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
262. Murray DR, Freeman GL. Tumor necrosis factor-alpha induces a biphasic effect on myocardial contractility in conscious dogs. *Circ Res* (1996) 78:154-160
263. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation* (1995) 82:1487-1493
264. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Schultheiss HP. Myocardial remodeling in viral heart disease: possible interactions between inflammatory mediators and MMP-TIMP system. *Heart Fail Rev* (2004) 9:21-31
265. Von Haehling S, Jankowska EA, Anker SD. Tumour necrosis factor-alpha and the failing heart--pathophysiology and therapeutic implications. *Basic Res Cardiol* (2004) 99:18-28

266. Nakamura T, Lee RK, Nam SY, Podack ER, Bottomly K, Flavell RA. Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. *J Immunol* (1997) 158:2648-2653
267. King C, Mueller Hoenger R, Malo Cleary M, Murali-Krishna K, Ahmed R, King E, Sarvetnick N. Interleukin-4 acts at the locus of the antigen-presenting dendritic cell to counter-regulate cytotoxic CD8+ T-cell responses. *Nat Med* (2001) 7:206-214
268. Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, Handy JR, Crumbley AJ 3rd, Spinale FG. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation* (1998) 97:1708-1715
269. Kandolf R, Canu A, Hofschneider PH. Coxsackie B3 virus can replicate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon. *J Mol Cell Cardiol* (1985) 17:167-181
270. Feduchi E, Carrasco L. Mechanism of inhibition of HSV-1 replication by tumor necrosis factor and interferon gamma. *Virology* (1991) 180:822-825
271. Yang Y, Xiang Z, Ertl HC, Wilson JM. Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92:7257-7261

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
AMV	-	avian myeloblastosis virus
APC	-	antigenpräsentierende Zelle
Aqua bidest.	-	zweifach destilliertes Wasser
bp	-	Basenpaare
°C	-	Grad Celsius
CAR	-	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CD	-	cluster of differentiation
cDNA	-	complementary deoxyribonucleic acid
CO	-	cardiac output
CVB <sub>3</sub>	-	Coxsackievirus Typ B <sub>3</sub>
Da	-	Dalton
DCM	-	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	deoxyribonucleic acid
dNTP	-	Desoxynukleosidtriphosphat
$dP/dt_{\max}$	-	maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
$dP/dt_{\min}$	-	minimale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit
EF	-	Ejektionsfraktion
EZM	-	extrazelluläre Matrix
g	-	Gramm
g	-	Gravitationsbeschleunigung
h	-	Stunde(n)
HF	-	Herzfrequenz
HPF	-	high power field
i.p.	-	intraperitoneal
Ig	-	Immunglobulin

IFN	- Interferon
IL	- Interleukin
kDa	- Kilodalton
Kol I	- Kollagen Typ I
Kol III	- Kollagen Typ III
LVESP	- linksventrikulärer endsystolischer Druck
M	- Molar
max	- maximal, Maximum
min	- minimal, Minimum
min	- Minute
mmHg	- Millimeter Quecksilbersäule
MMLV	- moloney murine leukemia virus
MMP	- Matrixmetalloproteinase
mRNA	- messenger ribonucleic acid
MT-MMP	- membrane-type matrix metalloproteinase
n	- Anzahl
NK-Zellen	- Natürliche Killerzellen
OD	- optische Dichte
p	- Wahrscheinlichkeit
P	- Wandspannung
PAGE	- Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	- Plasminogenaktivator-Inhibitor
PBS	- phosphate buffered saline
PCR	- polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFU	- plaque forming unit
pH	- negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionen Konzentration
p.i.	- post infectionem
r	- Korrelationskoeffizient
RNA	- ribonucleic acid
rpm	- rounds per minute
RT	- reverse transcription
RT-PCR	- reverse transcription-polymerase chain reaction

s	- Sekunde
SCID	- severe combined immunodeficiency syndrome
SD	- Standardabweichung
SDS	- Sodiumdodecylsulfat
SPSS	- Statistical Product and Service Solutions
Tab.	- Tabelle
Taq	- DNA-Polymerase
TBE	- Tris-Borate-EDTA
TE-Puffer	- Tris-EDTA Puffer
TGF	- transforming growth factor
T <sub>h</sub> -Zellen	- T-Helfer-Zellen
TIMP	- tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	- Tumornekrosefaktor
tPA	- tissue-type plasminogen activator
Tris	- Trishydroxymethylaminomethan
U	- unit
uPA	- urokinase-type plasminogen activator
UV	- ultraviolett
VP	- Virusprotein
v/v	- Volumenmischungsverhältnis
w/v	- Mischungsverhältnis Gewicht zu Volumen

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

	<b>Seite</b>
Abb. 1.1: Polarisation von CD4 <sup>+</sup> -T-Helferzellen nach Antigenkontakt und Einfluss verschiedener Zytokine	18
Abb. 1.2: Stimulierende und hemmende Einflüsse auf das Matrixdegradationssystem	27
Abb. 2.1: Amplifikation von $\beta$ -Aktin bei verschiedenen Zyklenzahlen	44
Abb. 2.2: Zyklusoptimierung für semiquantitative RT-PCR	44
Abb. 3.1: Nachweis enteroviraler RNA mittels seminested RT-PCR	62
Abb. 3.2a: Vergleich der Genexpression von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ und Il-6 in den einzelnen Gruppen	63
Abb. 3.2b: Vergleich der Genexpression von MMP-2, MMP-3, TIMP-4, MT1-MMP, uPA, tPA und $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen	64
Abb. 3.3a: mRNA-Expression von Il-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ in Relation zur mRNA-Expression von $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen	65
Abb. 3.3b: mRNA-Expression von INF- $\gamma$ , IL-6 und IL-10 in Relation zur mRNA-Expression von $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen	66
Abb. 3.4: mRNA-Expression von MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MT1-MMP in Relation zur mRNA-Expression von $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen	67
Abb. 3.5: mRNA-Expression von TIMP-4 in Relation zur mRNA-Expression	68

von  $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen

Abb. 3.6:	mRNA-Expression von uPA und tPA in Relation zur mRNA-Expression von $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen	70
Abb. 3.7:	mRNA-Expression von Kollagen Typ I und Kollagen Typ III in Relation zur mRNA-Expression von $\beta$ -Aktin in den einzelnen Gruppen	70
Abb. 3.8:	Vergleich der Enzymaktivität von MMP-2 in den einzelnen Gruppen (Coomassie-Gel)	71
Abb. 3.9:	Enzymaktivität von MMP-2 in den einzelnen Gruppen (Boxplot)	71
Abb. 3.10:	Immunhistochemische Färbung der CD3 <sup>+</sup> -Lymphozyten	72
Abb. 3.11:	Immunhistochemische Färbung der CD11b <sup>+</sup> -Makrophagen	73
Abb. 3.12:	CD3 <sup>+</sup> - sowie CD11b <sup>+</sup> -Zellen in den einzelnen Gruppen	74
Abb. 3.13:	Linksventrikuläre Funktionsparameter (LVESP, $dP/dt_{max}$ , $dP/dt_{min}$ und CO) in den einzelnen Gruppen	75
Abb. 3.14:	Linksventrikulärer Funktionsparameter EF in den einzelnen Gruppen	76
Abb. 3.15:	Korrelation nach Pearson zwischen mRNA-Expression von Il-1 $\beta$ / $\beta$ -Aktin bzw. TNF- $\alpha$ / $\beta$ -Aktin und EF	77
Abb. 3.16:	Korrelation nach Pearson zwischen CD3 <sup>+</sup> -Zellzahl und CO bzw. EF	77
Abb. 3.17:	Korrelation nach Pearson zwischen mRNA-Expression von uPA/ $\beta$ -Aktin und EF bzw. mRNA-Expression von Il-1 $\beta$ / $\beta$ -Aktin	78



**7.3 Tabellenverzeichnis**

	<b>Seite</b>
Tab. 2.1: Versuchsgruppen	38
Tab. 2.2: Charakteristika der Primer für den Nachweis von enteroviralem Genom	45
Tab. 2.3: Charakteristika der Primer für die semiquantitative RT-PCR	47

#### 7.4 Publikationsverzeichnis

- Kampf Ch, Rutschow S, Kallwellis-Opara A, Puhl K, Klingel K, Westermann D, Tschöpe C, Schultheiss HP, Pauschinger M. Modulation of inflammation and MMP2 activity by IL4-treatment in a CVB-3 induced chronic myocarditis model in SWR/J-mice. GBM Annual Meeting 2005
- Rutschow S, Kampf Ch, Kallwellis-Opara A, Westermann D, Puhl K, Pauschinger M. Interleukin-4 Behandlung reduziert die myokardiale Entzündung und verbessert das Missverhältnis im Matrix-Degradationssystem im chronischen Myokarditis-Maus-Modell. Clin Res Cardiol (2006) 95: Suppl 5
- Rutschow S, Kampf Ch, Kallwellis-Opara A, Westermann D, Jaeger S, Rother W, Tschöpe C, Pauschinger M. IL-4 suppresses intramyocardial inflammation and improves the imbalance in the matrix degradation system in murine chronic myocarditis. Heart Failure Congress 2006, Helsinki, Finland

## 7.5 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Christina Kampf, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Der Einfluss einer prolongierten Interleukin-4 Behandlung auf Inflammation, Matrix-Degradationssystem und linksventrikuläre Funktion im Myokarditis-Mausmodell“ 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.

Die Erhebung der hämodynamischen Parameter sowie der Daten für Maus- und Herzgewicht erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Tschöpe.

Berlin, 27.05.2008

Christina Kampf

## **7.6 Lebenslauf**

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



## 7.7 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere möchte ich danken:

**Herrn Prof. Dr. H.-P. Schultheiß** für die Möglichkeit, im Rahmen meiner Dissertation im Forschungslaboratorium der Abteilung für Kardiologie und Pulmologie der Medizinischen Klinik II der Charité - Universitätsmedizin Berlin, CBF, zu arbeiten sowie für den großen Freiraum bei der Bearbeitung meines Themas;

**Herrn Prof. Dr. M. Pauschinger** für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit; für die herzliche und unterstützende Betreuung, die vielen Anregungen und Ratschläge sowie die notwendigen Korrekturen. Ohne das stete Interesse von Herrn Prof. Dr. M. Pauschinger sowie seine konstruktive Kritik hätte diese Arbeit nie zu der hier vorliegenden Form gefunden;

**Herrn Priv.-Doz. Dr. Tschöpe** für die Durchführung der hämodynamischen Untersuchungen;

**Herrn Prof. Dr. H. Zeichardt** für die Bereitstellung des CVB<sub>3</sub>-Virus;

**Frau S. Rutschow** für die Einarbeitung in die Methodik und Problematik, die großartige Betreuung bei allen sich ergebenden Fragen und Problemen sowie die freundschaftliche Unterstützung in allen Belangen der Arbeit;

**Frau K. Puhl** für ihre Ideen und die vielfältige Hilfe bei methodischen Problemen sowie die herzliche Arbeitsatmosphäre im Forschungslabor;

**Dem gesamten Team des kardiologischen Forschungslaboratoriums der Charité - Universitätsmedizin Berlin, CBF**, für die Unterstützung bei den verschiedensten Fragen und die zahlreichen Hilfestellungen.