

Aus der Medizinischen Klinik II, Kardiologie und Pulmologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT3 bei Myokarditis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Hilbrandt

aus Lahr

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. M. Pauschinger
2.: Prof. Dr. med. C. A. Nienaber
3.: Prof. Dr. U. Kintscher

Datum der Promotion: 14.06.2009

I. Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| I. Inhaltsverzeichnis | iii |
| II. Abkürzungsverzeichnis | vii |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Klinik | 1 |
| 1.2. Epidemiologie | 2 |
| 1.3. Ätiologie | 2 |
| 1.4. Coxsackieviren | 3 |
| 1.5. Pathogenese der enteroviralen Myokarditis | 3 |
| 1.5.1. Akute virale Myokarditis | 4 |
| 1.5.2. Subakute virale Myokarditis | 5 |
| 1.5.3. Autoimmunmyokarditis | 7 |
| 1.5.4. Dilatative Kardiomyopathie | 8 |
| 1.5.5. Kardiales Remodeling | 9 |
| 1.6. Extrazelluläre Matrix | 10 |
| 1.6.1. Aufbau der extrazellulären Matrix | 10 |
| 1.6.2. Kollagen Turnover | 11 |
| 1.6.3. Matrixmetalloproteinasen | 11 |
| 1.6.4. Regulation des MMP / TIMP Systems | 12 |
| 1.7. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 | 14 |
| 1.7.1. JAK/STAT Signalweg | 14 |
| 1.7.2. Wirkung von STAT3 am Herzen | 15 |
| 2. Problemstellung | 17 |
| 3. Methoden | 18 |
| 3.1. Kurzcharakterisierung der verwendeten Tiere | 18 |
| 3.2. Haltung der Tiere | 18 |
| 3.3. Infektion mit CVB3 | 18 |
| 3.4. Echokardiographie | 19 |
| 3.5. Gewebepreparation | 19 |

| | |
|---|----|
| 3.6. Infektionsnachweis mittels Basis-Cox PCR | 20 |
| 3.7. Molekularbiologische Methoden | 20 |
| 3.7.1. Hinweise zu sauberen RNAse freiem Arbeiten | 20 |
| 3.7.2. RNA Isolierung | 21 |
| 3.7.3. DNase Verdau | 22 |
| 3.7.4. Reverse Transkription | 22 |
| 3.7.5. Polymerase Kettenreaktion, PCR | 23 |
| 3.7.6. Durchführung | 23 |
| 3.7.7. Agarose Gel-Elektrophorese | 26 |
| 3.7.8. Durchführung der Agarose Gel-Elektrophorese | 26 |
| 3.7.9. Auswertung | 27 |
| 3.7.10. Optimierung der PCR | 28 |
| 3.7.10.1. Annealingtemperatur | 28 |
| 3.7.10.2. Zyklenzahl | 29 |
| 3.7.11. <i>Realtime</i> PCR (TaqMan) | 29 |
| 3.8. Immunhistochemie | 31 |
| 3.8.1. Anfertigung der Cryoschnitte | 31 |
| 3.8.2. Färbungen | 32 |
| 3.8.3. Anfertigung der Parafinschnitte | 33 |
| 3.8.4. <i>Sirius Red</i> Färbung | 33 |
| 3.8.5. <i>DeadEnd Colorimetric TUNEL System</i> | 34 |
| 3.8.6. Durchführung des TUNEL Assays | 34 |
| 3.8.7. Immunhistochemische Färbung an Paraffinschnitten | 35 |
| 3.8.8. Auswertung | 36 |
| 3.9. Statistische Auswertung | 36 |
| 3.10. Tierversuchsantrag | 37 |
| 4. Material | 38 |
| 4.1. Arbeitsgeräte | 38 |
| 4.2. Verwendete Software | 40 |
| 4.3. Verbrauchsmaterialien | 41 |
| 4.4. Reagenzien | 42 |
| 5. Ergebnisse | 46 |

| | |
|---|----|
| 5.1. Krankheitsverlauf | 46 |
| 5.2. Gewichtsänderungen während des Krankheitsverlaufs | 46 |
| 5.3. Herzgewicht | 47 |
| 5.4. Echokardiographie | 48 |
| 5.5. Mortalität | 48 |
| 5.6. Virusinfektion | 48 |
| 5.7. STAT3 <i>Knock out</i> | 49 |
| 5.8. Zytokine | 49 |
| 5.8.1. Interleukin 1 β | 50 |
| 5.8.2. Interleukin 6 | 51 |
| 5.8.3. Interleukin 10 | 51 |
| 5.8.4. Interleukin 15 | 52 |
| 5.8.5. Interferon γ | 53 |
| 5.8.6. <i>Tumorgrowthfactor</i> | 54 |
| 5.8.7. Tumornekrosefaktor α | 55 |
| 5.9. Infiltration mit Makrophagen und T-Zellen | 56 |
| 5.9.1. CD3 positive T-Zellen | 56 |
| 5.9.2. Mak 3 | 58 |
| 5.10. Matrixkomponenten | 60 |
| 5.10.1. Kollagen I | 61 |
| 5.10.2. Kollagen III | 63 |
| 5.10.3. Kollagen IV | 64 |
| 5.10.4. Fibronectin | 65 |
| 5.10.5. Laminin | 65 |
| 5.10.6. <i>Sirius Red</i> Färbung | 66 |
| 5.11. Matrixmetalloproteinasen | 67 |
| 5.11.1. Matrixmetalloproteinase 2 | 67 |
| 5.11.2. Matrixmetalloproteinase 3 | 69 |
| 5.11.3. Matrixmetalloproteinase 8 | 71 |
| 5.11.4. Matrixmetalloproteinase 9 | 72 |
| 5.12. <i>Tissue inhibitors of Metalloproteinases: TIMPs</i> | 74 |
| 5.12.1. TIMP1 | 74 |

| | |
|---|-----|
| 5.12.2. TIMP2 | 76 |
| 5.12.3. TIMP3 | 76 |
| 5.12.4. TIMP4 | 76 |
| 5.13. Regulatoren der MMP / TIMP Homöostase | 77 |
| 5.13.1. <i>Plasminogen Activator Inhibitor</i> | 77 |
| 5.13.2. Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator | 78 |
| 5.14. Apoptose | 79 |
| 5.14.1. Bax | 79 |
| 5.14.2. Bcl | 80 |
| 5.14.3. Immunhistochemische TUNEL Färbung | 81 |
| 6. Diskussion | 83 |
| 6.1. Krankheitsverlauf und Mortalität | 83 |
| 6.2. Körpergewicht und Herzgewicht | 84 |
| 6.3. Echokardiographie | 85 |
| 6.4. Subakute Entzündung: Infiltration und Zytokinantwort | 86 |
| 6.5. kardiales Remodeling und Matrixhomöostase | 89 |
| 6.6. Apoptose im Rahmen der CVB3 induzierten Myokarditis | 92 |
| 6.7. Abschließende Bemerkungen | 93 |
| 7. Zusammenfassung | 95 |
| 8. Literaturverzeichnis | 97 |
| 9. Anhang | 107 |
| Abbildungsverzeichnis | 108 |
| Tabellenverzeichnis | 110 |
| Eidesstattliche Erklärung | 111 |
| Lebenslauf | 112 |
| Danksagung | 113 |

II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| α MHC | <i>α myosin heavy chain</i> |
| AF | <i>area fraction</i> |
| CAR | <i>Coxsackie-adenoviral receptor</i> |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> |
| cDNA | copy DNA |
| CTGF | <i>connective tissue growth factor</i> |
| CTL | zytolytische T-Lymphozyten |
| Col | Kollagen |
| CVB3 | Coxsackievirus B3 |
| DAF | decay accelerating factor |
| DCM | dilatative Kardiomyopathie |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ECM | extrazelluläre Matrix |
| ECMV | Encephalomyelitis Viren |
| EMMPRIN | <i>extracellular MMP inducer protein</i> |
| FCS | fetales Kälberserum |
| FN | Fibronektin |
| FS | Verkürzungsfraction |
| HHV6 | Humanes Herpes Virus Typ 6 |
| ICAM | interzelluläre Adhäsionsmoleküle |
| IDCM | idiopathische dilatative Kardiomyopathie |
| IFN | Interferon |
| IgG bzw. M | Immunglobulin G bzw. M |
| IL- | Interleukin |
| inf. | infiziert |
| iNOS | induzierbare NO Synthase |
| IQR | Interquartilsabstand |
| IVSd | Interventrikularseptum in Diastole |
| IVSs | Interventrikularseptum in Systole |
| JAKs | Janus Kinasen |
| kb | Kilobasen |

| | |
|--------------|--|
| KO | <i>Knock out</i> |
| Lam | Laminin |
| LIF | <i>leukaemia inhibiting factor</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LVIDd | linksventrikulärer Innendurchmesser in Diastole |
| LVIDs | linksventrikulärer Innendurchmesser in Systole |
| MHC | Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| MT-MMP | membrangebundene Matrixmetalloproteinase |
| mRNA | Messenger RNA |
| MW | Mittelwert |
| M-W Test | Mann-Whitney-U-Tests |
| NK | Natürliche Killerzellen |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PAI | <i>Plasminogen activator inhibitor</i> |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PFU | <i>plaque-forming units</i> |
| p.i. | <i>post infectionem</i> |
| PVB19 | Parvovirus B19 |
| PWd | Hinterwand in Diastole |
| PWs | Hinterwand in Systole |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SEM | Standardmessfehler |
| SOCS | <i>Suppressors of Cytokine Signaling</i> |
| STAT3 | Signal Transducer and Activator of Transcription 3 |
| TCR | T-Zellrezeptoren |
| TGF β | <i>Tumor growth factor β</i> |
| TH1 bzw. 2 | T-Helferzellen (TH1 bzw. TH2 Typ) |
| TIMP | <i>Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases</i> |
| T-LZ | T-Lymphozyten |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| tPA | <i>tissue-type plasminogen activator</i> |
| uPA | <i>urokinase-type plasminogen activator</i> |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |

WT

Wildtyp

1. Einleitung

Bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts fand der Begriff Myokarditis Eingang in die medizinische Literatur, um Erkrankungen des Herzens zu charakterisieren, die nicht mit Veränderungen der Herzklappen einhergingen [1]. Corvisart beschrieb 1806 eine kardiale entzündliche Erkrankung, die zu progressiver Verschlechterung der Herzfunktion führen konnte und wies auf den möglichen Zusammenhang zwischen chronischer Herzerkrankung und Infektion hin [2]. 1986 wurde mit den Dallas Kriterien der erste Versuch unternommen einen Katalog standardisierter Kriterien für eine histopathologische Klassifikation der Myokarditis zu schaffen [3], ein Unterfangen, das von der Weltgesundheitsorganisation 1995 aufgegriffen wurde [4]. Die Weiterentwicklung molekulargenetischer Methoden, Entdeckung neuer Krankheitsentitäten und Fortschritte in der Diagnostik machten jedoch eine Aktualisierung des alten Klassifikationssystems notwendig. 2006 wurde unter der American Heart Association ein aktuelles Klassifikationssystem der Kardiomyopathien vorgestellt: Myokarditis wird demnach als akut oder chronisch entzündlicher Prozess des Myokards definiert, der durch ein weites Spektrum an Toxinen, Medikamenten und infektiösen Agenzien ausgelöst und durch etablierte histopathologische, histochemische und molekulare Kriterien diagnostiziert wird [5].

1.1. Klinik

Klinische Zeichen einer Myokarditis reichen von milden grippeartigen Symptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit und Muskelschmerzen bis hin zu plötzlichem Herztod [6]. Die Symptomatik variiert mit dem Alter. Während Säuglinge Tachykardie, Inaktivität und Fieber zeigen, ist beim Erwachsenen Brustschmerz häufig initiales Symptom [7]. Des Weiteren können Arrhythmien, Kardiomegalie, oder Belastungsdyspnoe hinzukommen. Die Symptome können denen eines Infarktes ähneln [8]. Nur bei wenigen Patienten kommt es allerdings zu einem fulminanten Verlauf mit malignen Rhythmusstörungen, Pumpversagen und kardialer Dekompensation [8]. Der größte Teil der Myokarditiden verläuft klinisch inapparent.

1.2. Epidemiologie

Wegen der großen Zahl asymptomatischer Verläufe und dem unspezifischen klinischen Erscheinens der Erkrankung ist die Ermittlung epidemiologischer Daten sehr schwierig [6]. Die Gesamtinzidenz der Myokarditis bei Viruserkrankungen wird auf 3-6% geschätzt, unter Berücksichtigung der großen Zahl an Fällen mit der klinisch bestehenden Verdachtsdiagnose „Myokarditis“ liegt sie aber sicher deutlich höher [8]. Fabre *et al.* fanden 2005 bei 8.6% bis 12% aller Fälle plötzlichen Herztodes eine Beteiligung einer Herzmuskelentzündung [9]. Anderen post mortem Studien zufolge liegt die Beteiligung einer Myokarditis an plötzlichem Herztod junger Erwachsener unter 40 Jahren bei ca. 20% [10]. Saphir, Blankenhorn und Gore fanden bei 1% bis 9% der Routineautopsien Zeichen einer myokardialen Entzündung [11], [12], [13].

1.3. Ätiologie

Für die Genese eines entzündlichen Herzmuskelprozesses kommen viele Ursachen in Frage. Sowohl systemische Erkrankungen wie Sarkoidose, Medikamente (Anthrazykline) und Alkohol, als auch Infektionskrankheiten können Auslöser einer Myokarditis sein [8]. Viren, Bakterien, Protozoen und selbst Würmer sind als infektiöse Agenzien bekannt, wobei in Europa und den USA Viren als Erreger von 25% aller Myokarditiden die weitaus häufigste Ursache darstellen [14], [15]. Obwohl Parvovirus B19 und das humane Herpesvirus Typ 6 neueren Studien zufolge deutlich häufiger an der Entstehung einer Myokarditis beteiligt sind [16], bleiben Enteroviren und insbesondere Coxsackievirus B3 die am besten untersuchten Erreger der viralen Herzmuskelentzündung.

1.4. Coxsackieviren

Coxsackieviren sind Enteroviren der Picornavirus Familie. Die Untergruppe A beinhaltet 26, Gruppe B sechs unterschiedliche Serotypen. Ein ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von 30 nm umgibt das Genom des ansonsten hüllenlosen Virus. Das 7,5 kilobasen große Genom der Picornaviren besteht aus einzelsträngiger RNA mit positiver Polarität (Plusstrang) und kodiert für das Kapsid precursor Protein VP0, die Proteasen 2A und 3C und eine RNA abhängige RNA Polymerase [17]. Eine poly-Adenosin-Sequenz findet sich am 3' Ende des Moleküls. Am 5' Ende sitzt ein kovalent gebundenes Protein als Primer für die Replikation [18]. Der natürliche Wirt ist der Mensch, die Züchtung gelingt aber auch auf Baby-Mäusen. Die Übertragung ist auch auf andere Tiere möglich [18]. Das Virus ist säurestabil und übersteht so unbeschadet die Magenpassage [18]. Coxsackieviren werden mit dem Stuhl ausgeschieden und fäkal-oral oder per Tröpfcheninfektion übertragen. Der Krankheitsverlauf bei Maus und Mensch ist nahezu identisch [19], [20], [21], [22], [23], [24].

1.5. Pathogenese der enteroviralen Myokarditis

Eintrittspforte des Virus ist neben dem Nasenrachenraum der Dünndarm [25]. Hier kommt es zur lokalen Vermehrung und anschließend zur sekundären Absiedlung in die Zielorgane Muskeln, Meningen, Haut, Pankreas und Herz [18]. Das Virus wird über rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen [26]. Das Kapsidprotein VP1 bindet als Ligand den *Coxsackie-adenoviral receptor* CAR und ermöglicht bei gleichzeitiger Interaktion mit dem Corezeptor DAF (*decay accelerating factor*) die Internalisierung des Virus. [18], [27]. Die nun internalisierte RNA fungiert als Messenger RNA (mRNA) [28] und wird durch Enzyme der zellulären Proteinbiosynthese in virales monocistronisches Polyprotein umgeschrieben [6], [28], [17]. Virale Proteasen zerschneiden dann das Vorläuferprotein in fertige funktionstüchtige Proteine [17].

Durch Produktion viralen Eiweißes wird die zelluläre Proteinbiosynthese nachhaltig gestört, wobei zelluläre Polysomen umarrangiert werden und Ribosomenkomplexe

formen, die ausschließlich virales Protein synthetisieren [28]. Gleichzeitig zerstört die virale Protease 2A zelluläres Dystrophin, ein Baustein des Zytoskeletts [29]. Die Unterbrechung der Sarkomere der Muskelfasern sorgt für die Dysfunktion der Myozyten [30]. Durch Interaktion des Kapsidproteins V2 mit dem pro-apoptotischen Protein *siva* induziert CVB3 den Zelltod (Apoptose) der infizierten Zelle [31]. Die Freisetzung des Virus erfolgt durch Zelllyse. Störung der zelleigenen Proteinbiosynthese, des Zytoskeletts sowie des kontraktilen Apparates und Induktion von Apoptose sind direkte durch das Virus ausgelöste zytopathische Effekte.

1.5.1. Akute virale Myokarditis

Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus bestimmen die Virusreplikation und die damit einhergehenden zytopathischen Effekte sowie die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren das Erkrankungsbild während der ersten drei Tage nach Infektion. Virustiter erreichen zwischen dem dritten und vierten Tag ihren Höhepunkt [28]. Herzeigene Zellen beginnen mit der Produktion von entzündungsregulierenden Mediatoren, den Zytokinen [32].

In Endothelzellen und interstitiellen Makrophagen konnten drei Tage nach Infektion mit Encephalomyelitis Viren (ECMV) Interleukin 1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) nachgewiesen werden [32]. Auch Interferon γ (IFN γ) trat zur selben Zeit auf [33]. Neben Makrophagen können auch Myozyten selbst TNF α produzieren [34]. TNF α aktiviert Endothelzellen und Makrophagen, spielt bei der Rekrutierung von Entzündungszellen eine wichtige Rolle und reguliert die Ausschüttung von Zytokinen [15]. Gleichzeitig verursacht es Apoptose in Herzmuskelzellen, verringert die Kontraktilität und zeigt negativ inotrope Effekte am Herzen [15], [35]. Es ist also einerseits für die Viruselimination wichtig, trägt aber auf der anderen Seite zum Fortschreiten der Krankheit bei. Neben TNF α induzieren IL-1 β und IFN γ die induzierbare NO Synthase (iNOS) in Herzmuskelzellen, die durch Bildung von reaktiven Stickstoffmetaboliten (NO) die Virusvermehrung kontrolliert [36]. Auch hier wurden schädigende Einflüsse von NO auf Kardiomyozyten beschrieben [37]. Infizierte Myozyten sezernieren IFN α und β und hemmen dadurch die Virusreplikation in benachbarten Zellen [28].

1.5.2. Subakute virale Myokarditis

Die zelluläre Immunantwort bestimmt die subakute Phase der viralen humanen und murinen Myokarditis zwischen Tag vier und 14 nach Infektion und geht mit einem deutlichen Anstieg entzündlicher und anti-entzündlicher Zytokine einher [38], [6]. Natürliche Killerzellen (NK) gehören zu den ersten das Herz infiltrierenden Zellen. Sie werden durch Interleukin 2 (IL-2) und IFN γ aktiviert und tragen entscheidend zur Viruselimination bei [36]. Lodge *et al.* konnten zeigen, dass Mauspopulationen mit verminderter Anzahl an NK-Zellen an einer stärker ausgeprägten Myokarditis litten und höhere Virustiter aufwiesen [39], als Mäuse mit normalem Immunsystem. NK-Zellen unterscheiden zwischen infizierten und nicht infizierten Zellen [28] und lysieren virusbefallene Kardiomyozyten durch die Freisetzung von Perforinen [40]. Perforine bilden Poren in der Membran der Zielzelle, die dadurch zugrunde geht.

Die zweite Zellpopulation, die um den siebten Tag nach Infektion das Herz infiltriert, wird von CD3⁺ T-Lymphozyten gebildet [36]. Während der Virusreplikation präsentieren Kardiomyozyten virale Proteine auf der Zelloberfläche über ein MHC (Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex) Molekül der Klasse I [6]. CD8⁺ zytolytische T-Lymphozyten (CTL) erkennen mit T-Zellrezeptoren (TCR) das über MHC I an der Oberfläche der Kardiomyozyten präsentierte Protein [41]. Die kostimulatorischen Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD 86) auf Myozyten interagieren mit Liganden (CD28 und CD40L) auf der Zellmembran der CTL und sorgen für deren Aktivierung [42]

CTL lysieren die infizierte Zelle durch Einbau von Perforinen in deren Zellmembran. [36]. Hierfür ist ein Zell-Zell-Kontakt unerlässlich, der über interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM) auf Kardiomyozyten vermittelt wird [43], [36]. Die verstärkte Expression sowohl von MHC Moleküle der Klasse I, als auch von ICAM auf Kardiomyozyten wird durch IFN γ und TNF α ausgelöst [43], [36]. Das Auftreten der zytolytischen T-Lymphozyten geht mit den stärksten pathologischen Schäden am Herzen einher [36]. Mäuse, die mit Anti-T-Zell Antikörpern behandelt oder durch Thymektomie und Bestrahlung von T-Zellen befreit wurden, zeigten eine deutlich geringere kardiale Schädigung [44], [45].

Auch CD4⁺ T-Lymphozyten von T-Helfer Typ treten ab dem siebten Tag im Herzen auf, allerdings weniger zahlreich als CD8⁺ CTL [36]. CD4⁺ T-Zellen lassen sich

abhängig von ihrer Zytokinaktivität in zwei unterschiedliche Gruppen gliedern. Sowohl TH1 als auch TH2 Zellen entstehen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle TH0 [18]. Von dendritischen Zellen abgegebenes Interleukin 12 (IL-12) löst die Entwicklung zur TH1 Zelle aus, Interleukin 4 (IL-4) fördert die Bildung von TH2 Zellen [18].

Helferzellen vom TH1 Typ sezernieren IL-2 und IFN γ und aktivieren dadurch Makrophagen (IFN γ), CTL (IL-2) und NK-Zellen (IL-2 und IFN γ). Durch Bildung von IL-2 aktivieren sich TH1 Zellen gegenseitig und regen ihre eigene Proliferation an, gleichzeitig hemmt IFN γ die TH2 Zellentwicklung. TH1 Zellen unterstützen dadurch den zellulären Schenkel der Infektabwehr [18].

Die durch IL-4 aktivierten TH2 Zellen geben dagegen IL-4, IL-5 und IL-10 ab und stärken die humorale Immunantwort. IL-4 regt die Proliferation und Reifung der B-Zelle zur Plasmazelle an, zu ihrer vollständigen Aktivierung und Produktion spezifischer Antikörper bedarf es jedoch die Kostimulation durch Antigene [18]. IL-4 und IL-10 hemmen die Makrophagen- und TH1- Aktivierung. Während der Infektion werden extrazelluläre Viren von Monozyten phagozytiert und in Lysosomen zu Peptidfragmenten reduziert [28]. Die Peptidfragmente assoziieren mit MHC Molekülen der Klasse II in sauren Endosomen und werden zur Zelloberfläche transportiert [18]. Auf MHC II Molekülen präsentierte Peptidfragmente stimulieren CD4 $^{+}$ T-Lymphozyten, die dann ihrerseits abhängig von den von Monozyten gebildeten Zytokinen als TH1 Zellen den zellulären Schenkel aktivieren oder als TH2 Zellen durch B-Zellaktivierung die Bildung virusspezifischer Antikörper fördern [18].

Viruspezifisches IgM ist ab dem zweiten Tag nach Infektion nachweisbar und erreicht den höchsten Titer zwei Tage später. IgM Produktion scheint jedoch T-Zell unabhängig zu sein, da die Antikörperbildung in Mäusen ohne T-Zellen unbeeinträchtigt bleibt [28]. Viruspezifisches IgG erscheint ab Tag sieben mit Höchstwerten um den 14. Tag [28], [36]. Das Auftreten von spezifischen Antikörpern korreliert mit der Abnahme der Virustiter [36], Antikörper spielen also eine essentielle Rolle bei der Viruselimination.

1.5.3. Autoimmunmyokarditis

Aufgaben des Immunsystems ist es die Virusvermehrung zu unterbinden und das Herz von dem infizierenden Agens zu befreien. Andererseits kann die Immunantwort dem Herzen selbst Schaden zufügen [46]: Zelllyse durch Virusvermehrung [47], Induktion von Apoptose [17], Elimination virusinfizierter Zellen durch zytokinaktivierte Makrophagen und NK-Zellen [47], Perforin-gesteuerte Zellzerstörung durch CTL sowie antivirale Zytokine sorgen für den irreversiblen Verlust von Myozyten. Das Gleichgewicht zwischen Viruselimination und Herzschädigung kann sich zugunsten einer ineffizienten Virusbeseitigung und überaggressiven Immunantwort verschieben [15]. Die durch das Virus ausgelöste direkte oder indirekte Zellzerstörung reicht jedoch nicht aus, um den Krankheitsverlauf völlig zu erklären. Die Tatsache, dass trotz erfolgreicher Entfernung des Erregers ein Fortschreiten der Krankheit zu beobachten ist, lässt eine Autoimmunogenese vermuten [28]. Die Wirksamkeit immunsuppressiver Therapie in bestimmten Krankheitsphasen bestätigt diese Theorie [48]. Autoantikörper gegen kardiale Antigene wie Myosin, Kalziumkanäle und ADP/ATP Transporter und die Membranbestandteile Kollagen, Laminin und Fibronectin lassen sich in 80 - 100% aller Myokarditispatienten mit Virusgenese nachweisen [28]. Kurnick *et al.* zeigten 1987, dass CTL aus Biopsien von an Myokarditis erkrankten Patienten Reaktivität gegenüber kardialen Antigenen in Zellkultur erkennen ließen [49]. Neben dem humoralen ist also auch der zelluläre Anteil des Immunsystems an der Entstehung einer Autoimmunmyokarditis beteiligt.

Die durch die Virus vermittelte Zelllyse frei werdenden kardialen Proteine, zum Beispiel Myosin, werden von dendritischen Zellen und infiltrierenden Makrophagen phagozytiert und T-Zellen über MHC Moleküle der Klasse II präsentiert [50], [15]. TH1 und TH2 Zellen produzieren Zytokine (TH1 Zellen IL-2 und IL-1 β , TH2 Lymphozyten IL-4 IL-5 und IL-6), die dann entweder CD8+ CTL oder B-Zellen aktivieren, CD8+ CTL zu Perforin-vermittelter Lyse von Kardiomyozyten oder B-Zellen zur Produktion kardialer Autoantikörper anregen.

Um die Immunprozesse hinter der Erkrankung besser zu verstehen, untersuchten Rose *et al.* 1996 mit kardialem Myosin immunisierte Mäuse und verglichen ihr Erkrankungsbild mit dem CVB3 infizierter Tiere. Für die Erkrankung anfällige Stämme (A/J, A.CA und A.SW) entwickelten nach Behandlung mit Myosin eine

Myokarditis trotz Abwesenheit eines Erregers [37]. Sowohl in virusinfizierten Tieren, als auch in mit Myosin immunisierten Mäusen konnten IgG Antikörper gegen Myosin und andere herzspezifische Antigene festgestellt werden [37].

Die Bedeutung von T-Lymphozyten für den Krankheitsverlauf wurde durch Versuche belegt, in denen gezeigt werden konnte, dass infizierte Tiere mit verminderter T-Zell-Anzahl an einer schwächeren Entzündung litten als intakte Mäuse [37]. Neben Antikörpern und T-LZ sind auch Zytokine an der autoimmun-Pathogenese beteiligt. Gegen postinfektiöse Myokarditis resistente Mausstämme (B10.A) entwickeln unter Behandlung mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) bzw. TNF α oder IL-1 chronische Myokarditis [37]. Zytokine scheinen die Empfänglichkeit des Herzens gegenüber immun-vermittelter Zellschädigung durch verstärkte Expression interzellulärer Adhäsionsmoleküle (ICAM) und MHC-Moleküle zu verstärken [37].

Neben der durch Präsentation kardialer Antigen ausgelöste Immunreaktion könnte auch molekulares Mimikry für die Entstehung einer Autoimmunerkrankung verantwortlich sein [15], [37], [28], [51]. Die Ähnlichkeit viraler und kardialer Proteine hat eine Kreuzreaktivität zytolytischer T-Lymphozyten (CTL) und spezifischer Antikörper, deren Aufgabe die Abwehr des Virus wäre, gegen Myokardzellen zur Folge [51]. An Membranproteine der Myozyten gebundene Antikörper stören deren Funktion und sorgen letztendlich für ihre Vernichtung [52].

Obwohl die Autoimmunbeteiligung inzwischen unbestritten ist, beeinflussen viele Faktoren, unter anderem Alter, Geschlecht, Konstitution und Erbanlagen, das Krankheitsgeschehen und bestimmen die Beteiligung einzelner Komponenten des Immunsystems, den Verlauf und die Schwere der Krankheit [15].

1.5.4. Dilatative Kardiomyopathie

Virus und antivirales Immunsystem tragen zum Verlust von Kardiomyozyten bei und Schädigen irreversibel das Herz [47]. Die anhaltenden schädigenden Effekte verursachen eine Beeinträchtigung der kontraktile Funktion, was wiederum zu Umbauvorgängen des Gewebes und schließlich zum Krankheitsbild der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen kann [27].

Die dilatative Kardiomyopathie wird durch ventrikuläre Dilatation und systolische Dysfunktion bei normaler linksventrikulärer Wanddicke charakterisiert [5]. Lange war

die Ätiologie ungeklärt, bis immunhistochemische und molekularbiologische Methoden einen Zusammenhang zwischen DCM und Myokarditis erkennen ließen [53]. Die hohe virale Prävalenz in Myokardbiopsien von Patienten mit idiopathischer DCM deutet verstärkt darauf hin, dass virale Myokarditis an der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie beteiligt ist [16]. So lässt sich bei Patienten mit DCM virales Genom in einem relevanten Anteil der Herzmuskelbiopsien nachweisen [16], [54]. Antikörper gegen CVB3 wurden nicht nur bei Erkrankten mit Myokarditis, sondern auch bei Patienten mit DCM nachgewiesen [55]. Im Tiermodell führt die Expression nicht replizierender enteroviraler RNA zum klinischen Bild einer Myokarditis [56].

1.5.5. Kardiales Remodeling

Während früher die Schädigung des kontraktiven Apparates, also der Muskelfasern, als Grund für die Entstehung einer myokardialen Dysfunktion galt, ist inzwischen bekannt, dass auch Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix (ECM) eine wichtige Rolle im Krankheitsverlauf spielen [57].

Als Antwort auf Verlust oder Schädigung von Myozyten kommt es zu strukturellen Umbauvorgängen (Remodeling) der ECM. Kollagenab- und Kollagenumbau, Neusynthese, Veränderung der Kollagenquotienten und Vernetzung sind die Folge [58]. Myokardiales Remodeling scheint ein komplexes und hochorganisiertes Phänomen zu sein, bei dem das Zusammenspiel zwischen Myozyten, Entzündungszellen und Zytokinen Zusammensetzung und Architektur der ECM bestimmt [59]. Struktur und Funktionsveränderungen der ECM führen zur Veränderung der Herzgeometrie und resultieren in einer Störung der Herzfunktion [58].

1.6. Extrazelluläre Matrix

1.6.1. Aufbau der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) bildet die Gerüstsubstanz für die Muskelzellen des Herzens und bestimmt unter anderem dessen Struktur und Funktion.

Die ECM setzt sich aus zellulären und nicht-zellulären Bestandteilen zusammen. Fibroblasten stellen den größten Zellanteil und sind am Aufbau durch Produktion von Matrixbestandteilen und an der Regulation der Matrixhomöostase maßgeblich beteiligt [60]. Die nicht-zellulären Makromoleküle lassen sich in Proteoglykane und Faserproteine unterteilen, Proteoglykane sorgen für den Quelldruck (Turgor) des Gewebes, Faserproteine bilden das Grundgerüst der Matrix. [61]. Faserproteine lassen sich wiederum in die Strukturproteine Kollagen (Col) und Elastin und die Adhäsionsproteine Laminin (Lam) und Fibronectin (FN) gliedern [61].

Kollagen ist die Hauptkomponente der Extrazellulärsubstanz, fünf verschiedene Subtypen, Kollagen I, Kollagen III, Kollagen IV, Kollagen V und Kollagen VI finden sich im Herzen, wobei steifes Kollagen I mit 80% und elastisches vom Typ III mit 10% am meisten vorhanden ist. [58]. Die Struktur der ECM und besonders des Kollagennetzwerkes bestimmt die Geometrie des Herzens, erhält die Form der Kammern und ist eng mit dem fibrösen Skelett des Herzens, den Herzklappen, Sehnenfäden (*Cordae tendineae*) und der perivaskulären Matrix verbunden [60].

Fibrilläres Kollagen ist in Lagen organisiert, die einzelne Zellen oder Bündel von Myozyten umgeben und verbinden [60]. Das Epimysium umgibt alle Myozytenbündel des Herzens und verläuft entlang der epi- und endokardialen Oberfläche. Es geht über ins Perimysium, das einzelne Zellen zu Bündeln gruppiert und für eine charakteristische Ausrichtung der Myozyten sorgt. Das Endomysium umgibt einzelne Zellen und verbindet sie untereinander und mit benachbarten Kapillaren. Epi- und Perimysium bestehen aus fibrillärem Kollagen während das Endomysium von Kollagen und Elastin gebildet wird. [60], [62].

Die ECM erfüllt vielfältige Aufgaben: Das Kollagennetzwerk ermöglicht die Kraftübertragung zwischen einzelnen Muskelzellen und erlaubt seitliche Zell-Zell-Kontakte, es sorgt für die Durchlässigkeit von Kapillaren und verhindert ein

Verrutschen der Myozyten [63]. Dank der ECM bleibt die Geometrie des Herzens während des Kontraktionszyklus intakt und eine übermäßige Dehnung der Ventrikel in der Diastole wird verhindert [64]. Die ECM gewährt jedoch nicht nur strukturelle Unterstützung, sondern stellt ein dynamisches System dar, das Myozytendifferenzierung, Proliferation, Wachstum und Zellüberleben beeinflusst. Sie trägt zur Regulierung zellulärer Funktionen bei und spielt eine wichtige Rolle bei interzellulärer Signaltransduktion [60].

1.6.2. Kollagen Turnover

Die extrazelluläre Matrix befindet sich in einem ständigen Fließgleichgewicht zwischen Auf- und Abbau [61], 0,6% der Komponenten des Kollagenetzwerkes werden täglich erneuert [65]. Dieser „Matrix turnover“ ist wichtig für Wachstum, Entwicklung und Wundheilung [61] und wird durch ein organisiertes Zusammenspiel zwischen Serin und Metalloproteinasen und deren Inhibitoren gesteuert [60], [58].

1.6.3. Matrixmetalloproteinasen

MMPs sind zinkabhängige Enzyme und für den Abbau der ECM Komponenten verantwortlich [59]. Die mehr als 20 verschiedenen Typen lassen sich in lösliche und membrangebundene (MT-MMPs) Proteinasen unterteilen [59]. Lösliche MMPs werden als inaktive Proenzyme von Mesenchymzellen, Fibroblasten, und Entzündungszellen wie Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sezerniert und durch Abspaltung des Propeptids unter anderem von Serinproteinasen aktiviert [66], [67].

Nach ihrer Substratspezifität können Metalloproteinasen in drei Gruppen gegliedert werden. Die Kollagenasen MMP1, MMP8 und MMP13 spalten die Tripelhelix des fibrillären Kollagen I und III an einer Gly-Leu Bindung dreiviertel vom N-Terminus entfernt [68], [69], [59], die entstehenden Gelatinfragmente werden von den Gelatinasen MMP2 und MMP9 weiter abgebaut [59]. Stromolysine (MMP3 und 10) verdauen Kollagen I und IV und sind an der Aktivierung anderer MMPs beteiligt [59].

Die Aktivität der MMPs wird von endogenen Inhibitoren, den *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases* (TIMPs) durch Bildung von Enzym-Inhibitor-Komplexen und Blockade des katalytischen Zinkions gehemmt [60], [59].

1.6.4. Regulation des MMP / TIMP Systems

Der Turnover des Kollagennetzwerkes wird durch Ausgewogenheit von MMP Aktivität und deren Hemmung durch TIMPs bestimmt [59]. Viele Prozesse sind an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts beteiligt. MMP Aktivität wird über Genexpression, Aktivierung latenter Proenzyme und kompetitiver Hemmung reguliert [60]. Die daran beteiligten Wachstumsfaktoren, Hormone, Steroide und Phorbol-ester (tPA, *tissue-type plasminogen activator*) beeinflussen zusätzlich die Synthese und Sekretion von MMPs und TIMPs [66].

Das bei der Tumorforschung entdeckte *extracellular MMP inducer protein* (EMMPRIN) induziert in Fibroblasten die Expression von MMP1, MMP2 und MMP3 [61].

Physiologische Aktivierung von MMPs erfolgt unter anderem durch Plasmin. An Fibrin gebundenes tPA (*tissue-type plasminogen activator*) und rezeptorgebundenes uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) spalten Plasminogen zu Plasmin, welches seinerseits MMPs durch Abspaltung des Propeptids aktiviert. *Plasminogen activator inhibitor* (PAI) hemmt die Bildung von Plasmin durch tPA und uPA [69], [70]. Selbst MMP Substrate beeinflussen das MMP/TIMP System. Das Laminin Abbauprodukt SIKVIV induziert MMP9 Expression in Monozyten, ebenso wie das Fibronectinfragment RGD [71], [72].

Nicht zuletzt sind MMPs selbst an ihrer Aktivierung beteiligt. MMP2 und MMP9 werden unter anderem durch MMP13, MMP13 wiederum durch MMP2, MMP3 und MMP10 aktiviert. MMP3 ist Aktivator von MMP1, MMP8, und MMP9. [70].

Im Rahmen eines Entzündungsprozesses üben besonders Zytokine starken Einfluss auf die Matrixhomöostase aus. Die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β gelten als die stärksten MMP Induktoren in Fibroblasten, Monozyten und Makrophagen [66]:

TNF α induziert die Transkription von MMPs und trägt damit zur Entstehung einer linksventrikulären Dilatation bei [73]. IL-1 β fördert die Expression von MMP3 und

MMP9 auf mRNA und Proteinebene [74]. Eine gesteigerte MMP Aktivität konnte nach Gabe von TNF α und IL-1 β in neonataler Kardiomyozytenkultur nachgewiesen werden, gefolgt von einem Verlust extrazellulärer Matrix (Pauschinger 2004). In transgenen Mäusen mit einer verstärkten Expression von TNF α wurde die MMP Aktivität hoch, die TIMP Expression jedoch herunter reguliert [74]. Während kurzfristig der Abbau der ECM überwog, wurde das Herz im chronischen Verlauf fibrotisch [59]. In Lungenfibroblasten zeigten TNF α und IL-1 β die Fähigkeit Kollagenablagerung sowohl zu fördern, als auch zu hemmen [75].

Tumor growth factor β (TGF β) unterdrückt dagegen die proteolytische Aktivität der MMPs und verstärkt die TIMP Expression. Adenovirus-vermittelte Überexpression von TGF β beziehungsweise die Behandlung kardialer Fibroblasten mit TGF β führte zur verstärkten Bildung von Kollagen III. Das TGF β Niveau korreliert mit der Kollagenanreicherung im Herzen [76], [77].

Lacraz *et al.* konnte 1987 zeigen, dass auch von TH2 Zellen produziertes IL-4 die MMP Synthese in Monozyten und Fibroblasten hemmt [78].

Die Immunantwort ist also über Ausschüttung von Zytokinen am myokardialen Remodeling beteiligt [59]. Ihre Übermäßige Synthese im Rahmen einer Entzündung führt zum Ungleichgewicht des MMP/TIMP Systems und kann sich verheerend auf das Herz auswirken [59].

Kim *et al.* (2000) konnten in einem Mausmodell zeigen, dass eine Überexpression von MMP1 linksventrikuläre Dilatation und Entstehung einer Kardiomyopathie zur Folge hatte [79], auch Thomas *et al.* wiesen ein gesteigertes MMP3 und erniedrigtes TIMP Niveau bei dilatativer Kardiomyopathie nach [80]. Kollagendegradation durch Kollagenasen konnte in Herzen von Patienten mit DCM beobachtet werden [65], [66]. MMPs werden während Verletzungen, Infarkten und Dilatation des Herzens verstärkt gebildet und tragen zur Veränderung der Kollagenmenge und Ausrichtung bei [60].

In einem Mausmodell von Li *et al.* (2002) wurde während CVB3 induzierter Myokarditis sowohl MMP3 als auch 9 verstärkt, deren Inhibitoren TIMP1 und 4 jedoch vermindert gebildet. Zwar konnte keine Änderung des Kollagengehaltes auf mRNA und Proteinebene festgestellt werden, die lösliche Kollagenfraktion (Col1) war jedoch erhöht, was auf einen posttranslationalen Kollagenabbau schließen lässt [74]. Die Steigerung der MMP Expression bei fehlendem Gegengewicht durch TIMPs kann zu Schädigungen des Kollagennetzwerkes führen und die Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion begünstigen [74].

1.7. Signal Transducer and Activator of Transcription 3

Der *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) spielt im Rahmen einer Entzündungsantwort eine wichtige Rolle. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass das Signaltransduktionsprotein protektiven Einfluss auf das Herz ausübt und es vor einer übermäßigen Inflammation schützt [81], [82], [83].

Sieben STAT Proteine wurden bisher bei Säugetieren identifiziert. STAT3 ist ein 770 Aminosäure messender Transkriptionsfaktor [84] und besitzt als wichtige funktionelle Gruppen eine DNA-bindende und eine SH2-Domäne. Die SH2-Domäne ermöglicht Rezeptorbindung, Assoziation mit den aktivierenden Janus Kinasen (JAKs) und Homo- bzw. Heterodimerisierung mit anderen STATs [85], die DNA-bindende Domäne ist für die Beteiligung des Proteins an der Transkription unerlässlich [85].

1.7.1. JAK/STAT Signalweg

STAT3 ist an der Signalübertragung der Interleukin 6 ähnlichen Zytokine (IL-6, IL-11, *leukaemia inhibiting factor* LIF, Oncostatin M, *ciliary neurotrophic factor* und Cardiotropin 1) über die Rezeptoruntereinheit gp130 beteiligt [85] [84] [82]. Die Bindung von IL-6 an die gp130 Untereinheit des IL-6 Rezeptors sorgt für dessen Dimerisierung und die Phosphorylierung der rezeptorassoziierten Janus Kinasen [84] [83]. JAKs aktivieren ihrerseits mittels Phosphorylierung STAT3 [86]. Aktiviertes STAT3 löst sich von Rezeptor, dimerisiert, erreicht den Zellkern und bindet an die DNA, um dort als Transkriptionsfaktor zu fungieren [85].

Der JAK/STAT Signalweg wird über negative Feedback Schleifen reguliert. *Suppressors of Cytokine Signaling*, kurz SOCS, binden und inaktivieren die Janus Kinasen. Ihre Genexpression wird von den gleichen Zytokinen, die auch STAT3 aktivieren, gesteuert [87].

1.7.2. Wirkung von STAT3 am Herzen

Der JAK/STAT3 Signalweg ist an vielen Prozessen im Herz beteiligt und weckt besonders durch seinen kardioprotektiven Einfluss Interesse:

STAT3 Aktivierung erfolgt nach Hypoxie und akutem Myokardinfarkt [81] und schützt das Herz durch Induktion antiapoptotischer Gene [82]. Hilfiker-Kleiner *et al.* fanden eine verstärkte Phosphorylierung von STAT3 nach einstündiger Ischämie und anschließender Reperfusion in Wildtyp Mäusen und signifikant größere Infarktareale sowie verstärkte Apoptose von Myozyten in STAT3 Knock out Tieren [88]. Rattenmyozyten mit STAT3 Überexpression wiesen in Experimenten von Staphanou *et al.* verminderte Apoptoseraten nach ischämischen Stress auf [86]. Um den Schutz von STAT3 vor proapoptotischen Verletzungen zu demonstrieren, zeigten Jacoby *et al.*, dass herzspezifische STAT3 Knock out Mäuse anfälliger für das Zytostatikum Doxorubicin waren, dessen Verwendung in der Tumorthherapie durch Auftreten von Kardiomyopathien eingeschränkt ist [81]. Der kardioprotektive Effekt von STAT3 scheint zumindest teilweise über vermehrte Expression des antiapoptotischen Gens Bcl xL und Bcl 2 [81], [82], [89] und verminderte Expression des proapoptotischen Gens Bax [89] vermittelt zu werden.

Die schützende Wirkung von STAT3 im Rahmen einer Entzündung konnte in einem Versuch gezeigt werden, bei dem Mäuse mit herzspezifischem STAT3 Knock out mit bakteriellem Endotoxin (LPS) behandelt wurden: Jacoby *et al.* fanden erhöhte Apoptoseraten im Vergleich zum Wildtyp und verstärkte Sekretion des pro-entzündlichen Zytokins TNF α in Myozytenkultur mit STAT3 Deletion nach LPS Behandlung [81].

STAT3 hat Einfluss auf die Homöostase der extrazellulären Matrix und die Kapillarisierung des Herzens [82]: Herzen von KO Tieren zeigen geringere Kapillardichte und verstärkte interstitielle Fibrose, entwickeln im Alter (ab dem 9. Monat) Symptome einer Herzinsuffizienz und weisen eine Dilatation des linken Ventrikels mit erhöhter Apoptoserate auf [88] [81]. Bei Patienten mit Herzversagen findet sich dementsprechend eine verminderte Expression und Phosphorylierung von STAT3 [83].

Die Expression profibrotischer Gene wie Kollagen 1A1, Kollagen 8A1, PAI, CTGF (*connective tissue growth factor*) und TIMP1 war in Versuchen von Hilfiker-Kleiner *et*

a/. (2004) bei Knock out Tieren erhöht [88]. Studien zeigten dass STAT3 Aktivierung die Expression des das Kapillarwachstum fördernden Wachstumsfaktors VEGF steigert [88], der wiederum durch CTGF gehemmt wird [90]. Auch TIMP1 gilt als potenter antiangiogener Faktor [88].

STAT3 schützt das Herz vor Ischämie, toxischem Stress, reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Apoptose [82] und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation einer Entzündungsantwort [81], dem Auf- und Abbau extrazellulärer Matrix und der Angiogenese [91].

2. Problemstellung

Myokarditis als Folge einer viralen Infektion ist ein relativ häufiges Ereignis. Die Inzidenz der Herzmuskelentzündung beträgt zwischen 3 und 6%, genaue Angaben sind aber auf Grund des unterschiedlichen Spektrums an Krankheitsverläufen fast nicht möglich [8]. Coxsackievirus B3 gilt als häufiger und am besten untersuchter Erreger einer viralen Myokarditis. Eine seltene und dramatische mögliche Folge dieser Infektion ist die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM), die in einer transplantationsbedürftigen Herzinsuffizienz enden kann [46]. Ein genaues Verständnis des zugrunde liegenden Pathomechanismus und Erkenntnisse über Faktoren, die das Krankheitsgeschehen beeinflussen, sind unabdingbar für eine korrekte Diagnosestellung und erfolgreiche Therapie.

Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist an zahlreichen Prozessen im Herz beteiligt: Kardioprotektive Eigenschaften konnten unter anderem im Rahmen eines Infarkts [88], [81], nach ischämischem Stress [86], nach LPS getriggelter Entzündung [81] und bei medikamentös induziertem oxidativem Stress [89] nachgewiesen werden. STAT3 schützt vor Apoptose [82], [81], [89], ist an der Vaskularisierung des Herzens beteiligt [91] und hat Einfluss auf die Homöostase der extrazellulären Matrix [82]. Erkenntnisse über die Rolle von STAT3 im Rahmen einer Myokarditis fehlen, die Auswirkung eines herzspezifischen STAT3 Knock outs während einer CVB3 induzierten Herzmuskelentzündung wurden daher in dieser Studie am Mausmodell untersucht. Neben der Charakterisierung der akuten Virusmyokarditis bei Wildtypmäusen galt folgenden Fragestellungen besondere Aufmerksamkeit:

- Welchen Einfluss hat STAT3 auf den akuten Entzündungsprozess, die Infiltration von Entzündungszellen und die damit einhergehende Zytokinantwort?
- Beeinflusst STAT3 das kardiale Remodeling und welche Rolle spielt es bei der Aufrechterhaltung der Matrixhomöostase im Rahmen der Entzündung?
- Welchen Einfluss hat STAT3 auf den programmierten Zelltod (Apoptose)?

3. Methoden

3.1. Kurzcharakterisierung der verwendeten Tiere

Als Versuchstiere wurden männliche, sechs Wochen alte CB6FI Mäusen von der Arbeitsgruppe Hilfiker *et al.* der Medizinischen Hochschule Hannover bezogen. Der Mausstamm CB6FI wurde durch Kreuzung zwischen C57BL6 und BALB/C Mäusen gezüchtet. Ein herzspezifischen *Knock out* des Signaltransduktionsgens STAT3 wurde von Drexler und Kollegen ebenfalls an der Medizinischen Hochschule Hannover nach Aktivierung des ausschließlich in Myozyten vorhandenen Promotors α MHC bei 19 der 32 Versuchstieren erzeugt (α MHC-Cre^{tg} / STAT3^{TM1PO}). Bei den übrigen 13 Tieren handelte es sich um Mäuse des Wildtyps (STAT3^{TM1PO}).

3.2. Haltung der Tiere

Die Mäuse wurden in Gruppen von 6-8 Tieren in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen vom Typ Makrolon III auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Um die Tiere bei ihrem Fress- und Spielverhalten nicht zu stören wurden die Umweltbedingungen konstant gehalten. Die Temperatur betrug 22 ± 2 °C, die Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 %, die Beleuchtung folgte einem 12h hell-dunkel Rhythmus. Als Nahrung erhielten die Versuchstiere kontinuierlich verabreichte pelletierte Alleindiät, steriles Leitungswasser war frei verfügbar.

3.3. Infektion mit CVB3

Nach einer dreitägigen Gewöhnungsphase an die Haltebedingungen wurden sieben Tiere der Wildtypgruppe und 10 der KO Tiere mit Coxsackievirus B3 (*Nancy Strain*) infiziert. Die Viruscharge wurde aus der Virologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin von Herrn Doktor Zeichert bezogen. Die Infektion erfolgte mit 10^6 PFU, vorliegend in HeLa-Medium. 400 μ l Medium wurden mit 3600 μ l PBS verdünnt und davon 200 μ l in den Bauchraum jedes Tieres injiziert. Kontrolltiere wurden mit 200 μ l

PBS-Medium, (400µl HeLa-Medium + 2%FCS, verdünnt mit 3600µl PBS) scheininfiziert. Die Mäuse wurden nach Infektion täglich beobachtet und gewogen. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

| Gruppe | Anzahl |
|--------------------------|----------|
| STAT3 WT nicht infiziert | 6 Tiere |
| STAT3 WT infiziert | 7 Tiere |
| STAT3 KO nicht infiziert | 9 Tiere |
| STAT3 KO infiziert | 10 Tiere |

Tab. 3.1.: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

3.4. Echokardiographie

Am 10. Tag *post infectionem* wurden die Tiere intraperitoneal mit Trapanal narkotisiert, intratracheal intubiert und mit dem Mausventilator Typ 55-7066 der Firma Harvard Apparatus maschinell beatmet. Eine transthorakale Echokardiographie wurde mit dem Echokardiographiesystem SONOS 5055 der Firma Philips Medizin Systeme GmbH durchgeführt und ein 15-MHz Schallkopf verwendet. Entlang der Längsachse wurde das Herz zweidimensional dargestellt und der linksventrikuläre Innendurchmesser in Systole und Diastole (LVIDs und LVIDd), die Dicke des Kammerseptums und der Hinterwand in Systole und Diastole (IVSs, IVSd, PWs, PWd) bestimmt. Die Verkürzungsfraction ($FS = LVIDd / LVIDs$) als Maß für die Kontraktilität des linken Ventrikels wurde im M-Mode ermittelt.

3.5. Gewebepräparation

Die Eröffnung des Thorax erfolgte unter sterilen Bedingungen in links parasternaler Thorakotomie. Die linken ventralen Rippen wurden teilweise entfernt, um freien Zugang zum Herzen zu gewähren, eine minimale Schnittführung sollte unnötige Blutverluste vermeiden. Das Herz wurde am Gefäßstiel abgesetzt und nach Entfernung der intrakardialen Blutmenge gewogen. Die Vorhöfe wurden entfernt, die Herzkammern horizontal geteilt. Das proximale Viertel des Gewebes wurde für die

Herstellung von Paraffinschnitten in 10% Formalin fixiert, das in sterilem 1xPBS tief gefrorene zweite Viertel diente der Fertigung von Kryoschnitten. Die distalen Anteile wurden direkt bei -80°C konserviert und zur RNA und Proteinisolation verwendet.

3.6. Infektionsnachweis mittels Basis-Cox PCR

Der Nachweis der erfolgreichen Infektion und der Vermehrung des Virus erfolgte mit einer Basis-Cox PCR. Nach RNA Isolation umgeschriebene cDNA wurde im Verhältnis 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt und in Eppendorftubes mit vorgelegtem Aqua dest. gespült. Der anschließend hinzupipettierte Mastermix enthielt 10x Puffer, MgCl_2 , im Verhältnis 1:2,5 verdünnte dNTPs der Firma Biozym, 3' und 5'cox Primer und Taq Polymerase. Ein Tropfen Öl wurde zuletzt in den Ansatz gegeben. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Programm:

| Zeit | Temperatur | Zyklen |
|-------------|----------------------|--------|
| 7 Minuten | 95°C | 1x |
| 45 Sekunden | 95°C | 37x |
| 45 Sekunden | 62°C | |
| 45 Sekunden | 72°C | |
| 10 Minuten | 72°C | 1x |

Tab. 3.2.: Temperatur und Zeitangaben für die Basis-Cox PCR

Die Ergebnisse wurden mittels Agarose Gel-Elektrophorese überprüft, bei Blende 5,6 fotografisch dokumentiert und mit dem Programm *Scan Image* ausgewertet.

3.7. Molekularbiologische Methoden

3.7.1. Hinweise zu sauberen RNase freiem Arbeiten

Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden alle Versuche an sauberen, desinfizierten Arbeitsflächen durchgeführt. Glasgeräte wurden vor Verwendung bei 250°C fünf Stunden lang ausgebacken, Plastikgeräte autoklaviert. In den Versuchen

2.2.1 und 2.2.2 kamen RNase freie Pipettenspitzen mit Filtertip, Reaktionsgefäße und *Pellet Pestles* zum Einsatz, Arbeitsflächen und Handschuhe wurden mit RNase Zap gereinigt. Die Herstellung der verwendeten Reagenzien erfolgte mit DEPC behandeltem Wasser. In Versuchen verwendeten Stocklösungen sowie extrahiertes Protein und isolierte RNA wurden entsprechend den Vorschriften verdünnt und in kleine Mengen aliquotiert, um eine Kontamination des Stocks zu verhindern.

3.7.2. RNA Isolierung

Die Trizol Gewebepräparation erfolgte nach einem leicht modifizierten Protokoll der Firma GibcoBRL. Die bei -80 °C gelagerten Gewebestücke wurden ausgewogen und in Eppendorftubes mit 800µl vorgelegtem Trizol gegeben. Das Gewebe wurde umgehend mit einem Polytron Homogenisator zerkleinert und anschließend fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 160µl Chloroform und fünfzehnsekündigem Schütteln, wurden die Proben 2-3 Minuten bei Raumtemperatur ruhengelassen. Zentrifugieren der Proben (15 Minuten bei 4 °C, 12.000g) ließ drei Phasen entstehen, von denen die wässrige, klare Oberphase die RNA, die beiden unteren DNA und Protein enthielten. Um die RNA zu fällen, wurde die Oberphase abpipettiert, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 400µl Isopropanol dazugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe abermals zentrifugiert (10 min, 12.000g, 4 °C), ausgefallte RNA sammelte sich als kleines Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstandes konnte nun entfernt und das Pellet mit 800µl -20 °C kaltem 75% Ethanol gewaschen werden. Die RNA wurde durch sanftes Mischen mit einer Pipette in Lösung gebracht und die Probe fünf Minuten bei 7.000g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, das Pellet 10-15 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend, entsprechend dem ursprünglichen Gewebegewicht, mit DEPC-behandeltem Wasser versehen. Die Lösemenge entsprach in µl der Gewebemasse multipliziert mit 1,6. Die Konzentration der RNA Menge wurde in 1µl Lösung mit dem Nanodrop ermittelt. Rückschlüsse auf die Qualität der isolierten RNA erlaubte die A260/A280 Ratio, Proben mit einem Wert zwischen 1,6 und 1,8 wurden als qualitativ gut eingestuft.

3.7.3. DNase Verdau

Um nach Durchführung der PCR eine genaue Aussage über den Gehalt der zuvor vorgelegenen zellulären mRNA treffen zu können, wurde chromosomale DNA mit einem DNase Verdau beseitigt. Das Verfahren wurde mit DNase I nach einer Vorschrift der Firma Roche durchgeführt. Nach Isolierung der RNA mittels Trizol Methode und photometrischer Bestimmung der Konzentration sollten 5µg reine RNA pro Probe in einem 50µl Ansatz DNase verdaut werden. Dazu mussten 42µl in DEPC-Wasser gelöste RNA eingesetzt und mit 5µl 10x DNase Puffer und 3µl RNase freier DNase I versetzt werden. Die Inkubation folgte nach aufgeführtem Programm im Thermocycler.

| Zeit | Temperatur |
|-------|------------|
| 1h | 37 °C |
| 5 min | 90 °C |
| 5 min | auf Eis |

Tab. 3.3.: Temperatur und Zeitangaben für DNase Verdau

Die DNase verdaute RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.7.4. Reverse Transkription

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wurde die isolierte und DNase verdaute RNA in cDNA umgeschrieben, um später eine Quantifizierung mittels PCR zu ermöglichen. Die Transkription erfolgte mit einem Kit der Firma Applied Biosystems. Ein µg der nach dem DNase Verdau in einer Konzentration von 0,1µg/µl vorliegenden RNA sollte für einen Einfachansatz eingesetzt werden. Dies entsprach einer Menge von 10µl verdauter RNA. 5µl TaqMan Puffer, 11µl 25mM Magnesiumchlorid, 10µl dNTPs, 25µl random Hexamer, 1µl DNase Inhibitor, 1,25µl Multiscibe Reverse Transkriptase (50U/µl) und 9,25µl RNase freies Wasser komplettierten den 50µl Ansatz. Sollte eine größere Menge RNA umgeschrieben werden wurde eine entsprechend größere Menge der Reagenzien im selben

Verhältnis verwendet. Die Transkription erfolgte im Gradienten Cycler nach dem der Tabelle zu entnehmenden Programm:

| Zeit | Temperatur |
|--------|------------|
| 10 min | 25 °C |
| 45 min | 48 °C |
| 5 min | 95 °C |

Tab. 3.4.: Temperatur und Zeitangaben für Reverse Transkription

Umgeschriebene cDNA wurde im Verhältnis 1:3 mit destilliertem Wasser verdünnt, in 0.2ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -20 °C im Kühlschrank gelagert.

3.7.5. Polymerase Kettenreaktion, PCR

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode bei der geringe Mengen an cDNA in so einem Maße vervielfältigt werden können, dass ein semiquantitativer Vergleich zwischen verschiedenen Proben möglich wird. Spezifische Primer, kurze das Zielgen flankierende komplementäre Oligonukleotide, erlauben die Vervielfältigung des gewünschten cDNA Abschnittes. Durch Erhitzen in einem Thermocycler werden in einem als Denaturierung bezeichnetem Prozess die beiden komplementären DNA Stränge getrennt. Nun können sich bei einer jeweils spezifischen Temperatur die Primer, anlagern (*Annealing*). Die eigentliche Amplifikation wird durch eine thermostabile DNA Polymerase ermöglicht. Das Enzym synthetisiert vom 3' Ende ausgehend den komplementären Strang, so dass nach der Synthesephase wieder zwei komplette Doppelstränge vorliegen. Denaturierung, *Annealing* und Synthese werden nun je nach Gen unterschiedlich oft wiederholt, dabei verdoppelt sich nach jedem Schritt der DNA Gehalt.

3.7.6. Durchführung

Die durchgeführten PCRs dienen dem Nachweis und semiquantitativen Vergleich der in nachfolgender Tabelle zusammen mit spezifischer Annealingtemperatur,

Primersequenzen und Anzahl der durchgeführten Zyklen aufgeführten Transkriptionsprodukte.

In einem Mastermix wurden 4,5µl 10x Puffer, 1,8µl MgCl₂, 2µl dNTPs, für das gewünschte Transkript jeweils 1,8µl spezifische *sense* und *antisense* Primer und 0,2µl Taq Polymerase zu 42µl Aqua dest. pipettiert. Sowohl eine Primer-, als auch eine dNTP- Verdünnung musste zu Beginn aus einem Stock hergestellt werden. Die Primer wurden in einem Verhältnis von 1:20 mit autoklaviertem destilliertem Wasser, die dNTPs im Verhältnis 1:5 verdünnt. Je nach Anzahl der Proben wurde entsprechend dem Verhältnis des Einfachansatzes eine größere Menge Reagenzien eingesetzt. Die Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut vor Gebrauch geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Der Mastermix wurde auf beschriftete Eppendorftubes verteilt. Zuletzt wurden 3µl der zuvor mit Aqua dest. im Verhältnis 1:3 verdünnten DNA in jedes Reaktionsgefäß gegeben und erneut gemischt. Vervielfältigung der DNA Stränge erfolgte in einem programmierten Thermocycler, der durch zyklisches Erhitzen und Abkühlen der Proben die Amplifikation ermöglichte. Die einzelnen Reaktionsphasen sind in folgender Tabelle aufgeführt:

| Zeit | Temperatur | Zyklenzahl | Funktion |
|------------|------------------|---------------|------------------------|
| 5 min | 95 °C | 1 | erste Denaturierung |
| 30 sek. | 95 °C | genspezifisch | Denaturierung |
| 30 sek. | primerspezifisch | genspezifisch | Annealing |
| 35 sek | 72 °C | genspezifisch | Synthese |
| 10 min | 72 °C | 1 | abschließende Synthese |
| unbegrenzt | 4 °C | 1 | |

Tab. 3.5.: Reaktionszyklen der Polymerase Kettenreaktion

Jede PCR wurde doppelt durchgeführt, ein Ansatz mit Aqua dest. diente als Negativkontrolle.

| Amplifikat | Primersequenzen | Annealing-temperatur | Zy- klen- zahl | Länge |
|--------------|--|----------------------|----------------------|--------|
| 18s | 3' CCG GTA CAG TGA AAC TGC GA 5' CGG GAG TGG GTA ATT TGC G | 60 °C | 18 | 435bp |
| EMMPRIN | 3' CGT AGG TGC CAG GGT CAA CAT 5' AAG GTC GGA AAG AAA TCA GAG | 55 °C | 27 | 241 bp |
| Fibronektin | 3' TCC AGC CCC ACC CTA CAA GT 5' CCA GAC CAA ACC ATA AGA AC | 60 °C | 31 | 281 bp |
| IL-15 | 3' GGC ACT GTA TTC CCC TTC TGT 5' ATC CCG TCT TCG TCC AAC TCT | 59.5 °C | 34 | 212 bp |
| Kollagen I | 3' CTG GAA GAG CGG AGA GTA 5' TGG GGT GGA GGG AGT TTA | 62 °C | 33 | 607 bp |
| Kollagen III | 3' CCC AGA ACA TTA CAT ACC ACT 5' CAC CAT TGA GAC ATT TTG AAG | 59 °C | 31 | 548 bp |
| Kollagen IV | 3' CCC TGA AAG CAG GAG ACT TG 5' TGG TAA AGG TGG GGA GAG TG | 55 °C | 31 | 180 bp |
| Laminin | 3' TAC CAG AGG CAC CCG ATT AC 5' GCA TGA TAC TGC CAG GGT TT | 55 °C | 31 | 230 bp |
| MMP 2 | 3' CGG GTC CAT TTT CTT CTT CA 5' GGA GAA GGC TGT GTT CTT CG | 51 °C | 30 | 214 bp |
| MMP 3 | 3' CAG ACT TGT CCC GTT TCC AT 5' GGT GCT GAC TGC ATC AAA GA | 56.5 °C | 35 | 356 bp |
| PAI | 3' ACG CCT GGT GCT GGT GAA TGC CCT CTA CTT 5' AGG AAG ACG CCA CTG TGC CGC TCT CGT TTA | 60 °C | 36 | 529 bp |
| STAT 3 | 3' CTG AGA AGC TCC TAG GGC CTG 5' CTG ATG TCC TTT TCC ACC CAA | 58 °C | 27 | 301bp |
| TGF β | 3' CGG AGA GCC CTG GAT ACC A 5' GAG CGC ACA ATC ATG TTG GA | 58.5 °C | 35 | 346 bp |
| TIMP 1 | 3' TCT GGC ATC CTC TTG TTG CT 5' CAC AGC CAG CAC TAT AGG TCT | 60 °C | 32 | 307 bp |

| | TT | | | |
|--------|--|------|----|--------|
| TIMP 2 | 3' CCA GGT CCT TTT CT CCT GA 5' TCC ATT CGC TGA AGT CTG TG | 59°C | 31 | 438 bp |
| TIMP 3 | 3' AGC TGG CAA AGG CTT AAA CA 5' CAA GCT TCC AGC CAA ACT TC | 51°C | 31 | 152 bp |
| TIMP 4 | 3' CTC TCC CCT CTG TGG TGT GA 5' GTG GTT CCT GGT CCC TAC TA | 60°C | 31 | 399 bp |
| UPA | 3' CCA TCT ACC AGA AGA ACA AGG GAG GAA GTC 5' CAG TCT GAA CAA AAC GGA GCA TCA GTA AAC | 60°C | 37 | 1152bp |

Tab. 3.6.: Sequenzen der Eingesetzten Primer, Zyklenzahlen und Annealingtemperaturen (3' = Sense; 5' = Antisense)

3.7.7. Agarose Gel-Elektrophorese

Die PCR Produkte werden in der dreidimensionalen Gelmatrix des Agarose Gels in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei das negativ geladene DNA Molekül zur positiven Anode wandert. Das in dem Gel vorhandene Ethidiumbromid bindet an die DNA in der Probe, macht sie als fluoreszierende Bande unter UV-Licht sichtbar und ermöglicht mit spezieller Software eine semiquantitative Auswertung.

3.7.8. Durchführung der Agarose Gel-Elektrophorese

Zur Herstellung eines 2%igen Gels wurden 4g Agarose Pulver mit 200ml TBE Puffer aufgegossen. Die Lösung der Agarose erfolgte durch Erhitzen in der Mikrowelle. Verdunstetes Wasser wurde nachträglich zugegeben. Das flüssige Gel wurden mit 8µl Ethidiumbromid (10µg/µl) versehen und in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen. Die Proben mussten vor dem Auftragen mit 9µl (1/6 der Probe bei 6X *Loading Buffer*) aus Saccharose und Bromthymol Blau bestehendem *Loading Buffer* versetzt werden, um das Ausschwemmen der Proben aus den Geltaschen zu

verhindern. Jeweils 10µl einer Probe wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Ein KB Marker (Marker VIII) wurde, um die Fragmentlänge der amplifizierten DNA-Abschnitte zu kontrollieren, ebenfalls aufgetragen. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte in 20 Minuten bei 200 Volt.

3.7.9. Auswertung

Unter UV Licht wurde die mit Ethidiumbromid interkalierte DNA als Banden im Gel sichtbar. Ein Foto des Agarose Gels konnte mit dem Programm BIODOC ANALYZE der Firma Biometra als Bilddatei gespeichert werden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SCN Image, das die Bandenstärke in Pixel (OD Werte) umrechnete und so einen Vergleich einzelner Proben ermöglichte (siehe Abb. 3.1.). Die OD Werte der Proben wurden mit Werten von 18s RNA relativiert. Die zelluläre Expression von 18s RNA ist durch Virusinfektion und STAT3 *Knock out* unbeeinträchtigt. Ein Abgleich mit 18s konnten so falsch hohe oder niedrige Werte, die allein auf die unterschiedliche Ausgangsmengen des *Templates* zurückzuführen gewesen wären, verhindert werden.

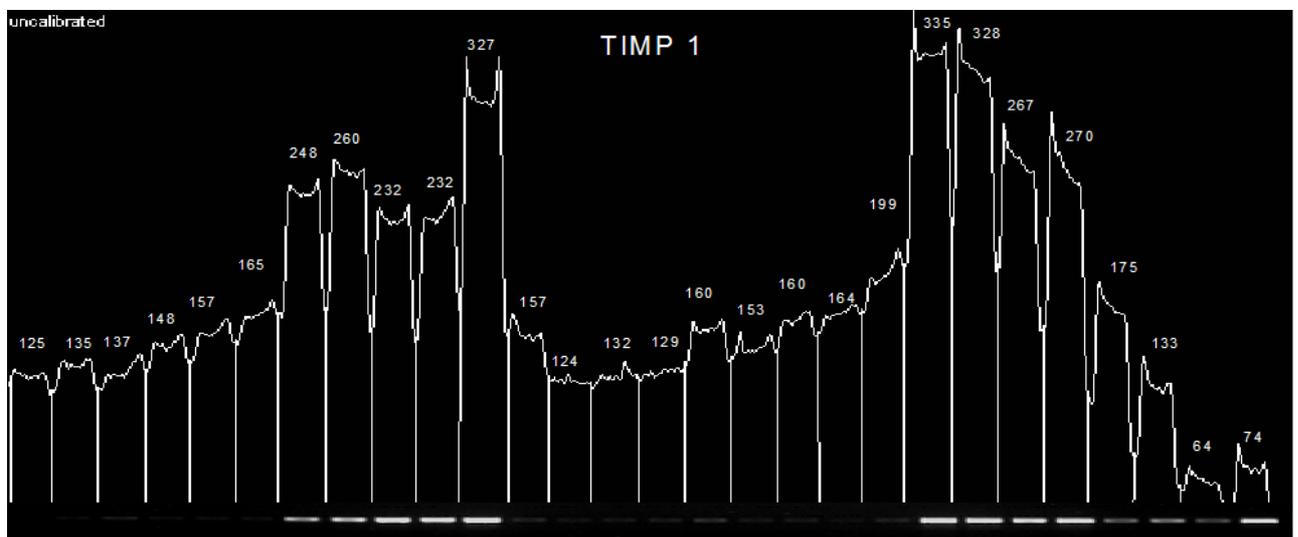


Abb. 3.1.: OD Werte der PCR Banden am Bsp. von TIMP 1

3.7.10. Optimierung der PCR

3.7.10.1. Annealingtemperatur

Vor Amplifikation der Proben ist die Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur unerlässlich. Mit Hilfe der Formel $2^{*(A+T)+4^{*(G+C)} - 3}$ = erwartete Annealingtemperatur in °C konnte die Annealingtemperatur ungefähr abgeschätzt werden, die genaue Überprüfung erfolgte mit PCR und Agarose Gel-Elektrophorese. Die Annealingtemperaturen wurden jeweils an einem DNA-Mix infizierter und nicht infizierter Tiere getestet, um dem unterschiedlichen Gehalt der Gruppen an cDNA Rechnung zu tragen. Dabei wurden von jeder Probe 3µl umgeschriebener und im Verhältnis 1:3 verdünnter cDNA entnommen und gemischt. Zu einem 6x Ansatz wurden 18µl DNA Mischung pipettiert, der Ansatz auf 6 Tubes verteilt und jeweils bei einer um ca. 2°C variierenden Annealingtemperatur im Gradientencycler nach bereits oben beschriebenen Programm erhitzt. Nach Agarose Gel-Elektrophorese und photographischer Darstellung der Proben wurde anhand der Bandenstärke die geeignete Temperatur abgelesen.

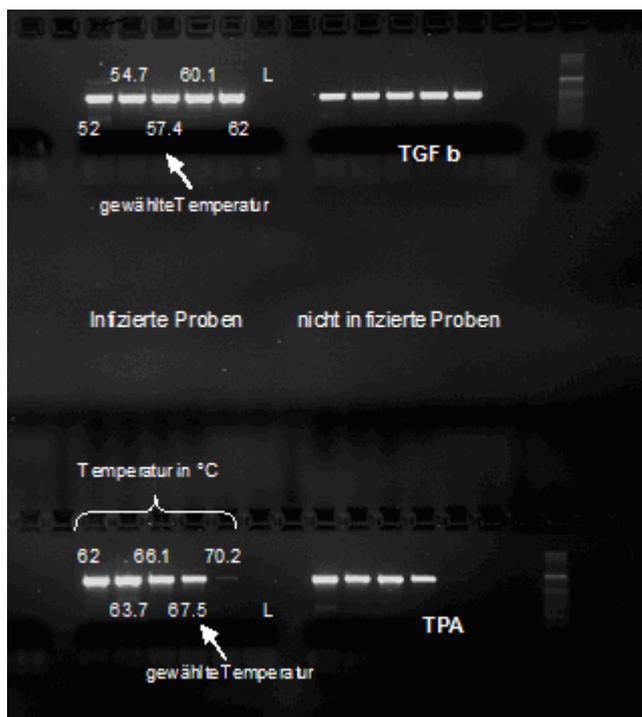


Abb. 3.2.: Optimierung der Annealingtemperatur am Beispiel von TGFβ und TPA

3.7.10.2. Zyklenzahl

Auch die geeignete Zyklenzahl wurde für jedes Amplifikat experimentell ermittelt. Einem wie oben bereits beschriebenen sechsfachen Ansatz wurden 42µl für die Negativkontrolle entnommen und anschließend 15µl im Verhältnis 1:3 verdünnte DNA zugegeben. Die optimale Zyklenzahl wurde für Proben infizierter und nicht infizierter Tiere getrennt bestimmt. Jeweils 45µl des Ansatzes wurden in vier Eppendorftubes überführt und im Thermocycler nach obigen PCR Programm mit einer von Probe zu Probe um zwei Zyklen variierende Zyklenzahl inkubiert. Nach Agarose Gel-Elektrophorese und fotografischer Dokumentation wurden die OD Werte ermittelt und graphisch gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Es wurden Zyklenzahlen im linear ansteigenden Bereich der Kurve gewählt.

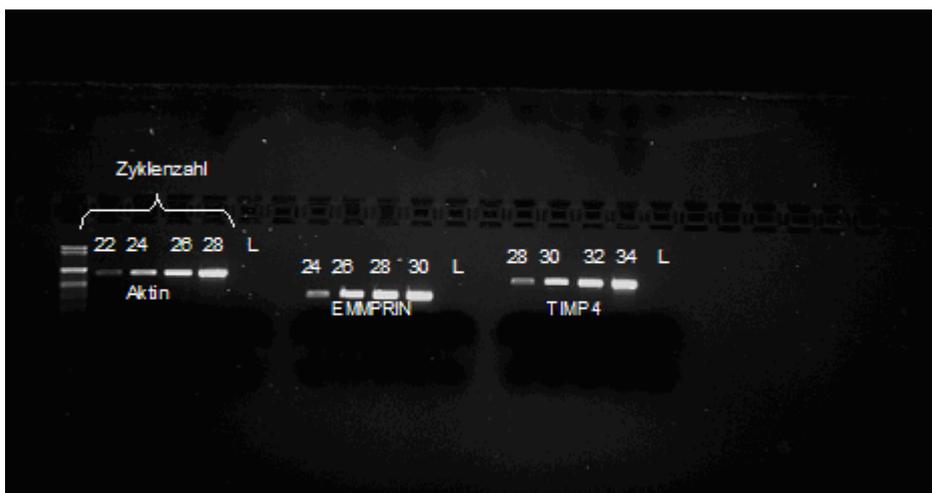


Abb. 3.3.: Unterschiedliche Zyklen bei Aktin-, EMMPRIN- und TIMP 4-PCR

3.7.11. *Realtime* PCR (TaqMan)

Wie bei der bereits oben beschriebenen semiquantitativen PCR werden auch bei der Echtzeit PCR (*Realtime*-PCR) spezifische cDNA Fragmente durch eine Polymerase vervielfältigt. Die RT-PCR erlaubt jedoch einen direkten Rückschluss auf die zu Beginn der Reaktion vorliegende Menge an cDNA-*Templates*.

Beim TaqMan Assay bindet zwischen den Primern ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid, dessen Aktivität von einem am 3'-Ende liegenden *Quencher* unterdrückt wird. Bei der Neustrangsynthese entfernt die Taq-Polymerase den *Quencher* mit ihrer Exonukleaseaktivität und der fluoreszierende Farbstoff wird freigesetzt. Die Fluoreszenz wird, sobald sie einen Schwellenwert überschritten hat, vom Cyler gemessen und ist direkt proportional zur Menge der DNA Matrize im Testansatz. Die Anzahl der Zyklen bei der der Schwellenwert erreicht ist wird als CT-Wert bezeichnet (siehe Abb. 4.4.). Bei geringem cDNA Gehalt wird der CT- Wert später überschritten als bei Proben mit hohem cDNA Anteil. Ausgehend vom CT-Wert kann anschließend die Genexpression berechnet werden.

Die *Realtime* PCR wurde mit einem Kit der Firma Applied Biosystems durchgeführt und die Genprodukte von IL-10, IL-1 β , TNF α , IFN γ , IL-6, bax, bcl, MMP8, MMP9 und MMP13 aus umgeschriebener cDNA quantifiziert. Ergebnisse wurden mit Werten von 18S RNA relativiert. In die Vertiefungen einer *96-well* Platte wurden jeweils 10 μ l *TaqMan-Mastermix*, 1 μ l *Primerassay*, 8 μ l autoklaviertes Aqua dest. und 1 μ l DNA pipettiert. Die Primer für 18S waren mit VIC, die übrigen mit dem Farbstoff FAM markiert. Die Sequenzen sind untenstehender Tabelle zu entnehmen. Folgendes Programm wurde zur Amplifikation der Proben verwandt, wobei Schritt 2-3 zyklisch 41 Mal wiederholt wurden.

| Schritt | Zeit | Temperatur |
|---------|--------|------------|
| 1 | 10 min | 95°C |
| 2 | 15 sek | 95°C |
| 3 | 1 min | 60°C |

Tab. 3.7.: Temperatur und Zyklen der *Realtime*-PCR

Alle Proben wurden doppelt gemessen, bei Abweichung der ermittelten Werte um 0,5 CT Werte wurde eine dritte PCR durchgeführt. Der Nachweis der PCR Produkte erfolgte stichprobenweise mittels Agarose Gel-Elektrophorese.

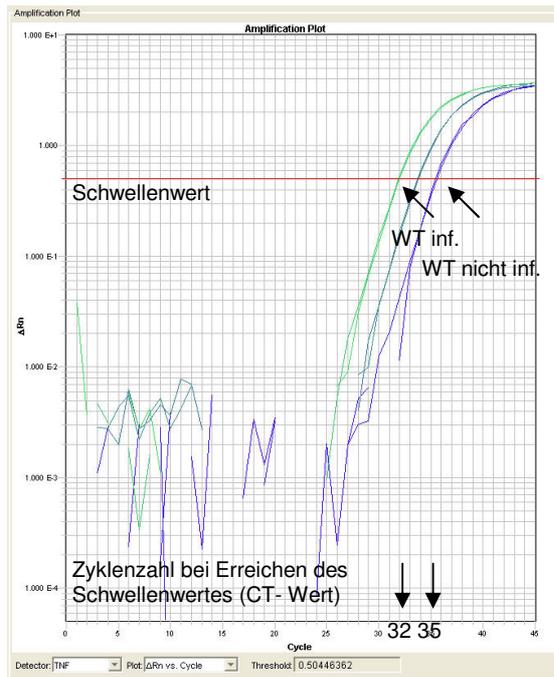


Abb. 3.4.: *Realtime*-PCR; Ermittlung der CT Werte am Bsp. von TNF α

3.8. Immunhistochemie

3.8.1. Anfertigung der Cryoschnitte

Immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von MMP2, 3, und 9, TIMP1 und 4 und Kollagen I und III wurden an Cryoschnitten durchgeführt.

Um eine autolytische Zersetzung zu verhindern, wurde das Gewebe in *Tissue Tec* eingebettet, das *Tissue Tec* in Methylbutan gehärtet und bei -80°C gelagert. Im Kühlschrank auf -20°C erwärmtes Gewebe wurde im Cryostaten in $5\mu\text{m}$ dicke Schichten geschnitten und auf einen Objektträger gebracht, der zuvor in 10% Poly-L-Lysin fünf Minuten inkubiert wurde. Die Fixierung der Schnitte erfolgte durch zehnmünütige Inkubation in reinem 4°C kalten Aceton. Fertige Schnitte wurden im Kühlschrank bei -20°C gelagert.

3.8.2. Färbungen

Vorbereitend wurden die Färbefelder der Objektträger mit dem Diamantschleifer umrandet, um ein Verlaufen der Antikörper zu verhindern. Die Objektträger wurden zunächst 5 Minuten in eine Küvette mit 1XPBS gegeben, um die Schnitte an das Puffer-Milieu zu gewöhnen. Gewebeeigene Peroxidase wurde durch 0,075% H₂O₂ blockiert. Durch zweimaliges jeweils fünf Minuten langes Spülen in 1XPBS wurden die Schnitte von H₂O₂ gereinigt und anschließend die verdünnten Antikörper aufgetragen. Die Verdünnung erfolgte mit 1X PBS und 10% FCS und ist in nachfolgender Tabelle aufgelistet:

| Antikörper | Verdünnung |
|------------|------------|
| MMP2 | 1:75 |
| MMP3 | 1:100 |
| MMP9 | 1:100 |
| TIMP1 | 1:30 |
| TIMP4 | 1:10 |
| Col I | 1:500 |
| Col III | 1:175 |

Tab. 3.8.: Antikörperverdünnung für Cryoschnitte

Die Schnitte wurden für eine Stunde in einer Wärmekammer bei 37°C inkubiert. Nach Abklopfen der Antikörper folgten zwei weitere fünfminütige Waschphasen mit 1XPBS. Anschließend wurde der zweite bereits gebrauchsfertig vorliegende Antikörper auf das Färbefeld aufgetragen und für 30 Minuten in der Kammer inkubiert. Zwei Waschphasen gingen dem Färbeschritt mit Carbazol voraus. In einem Messzylinder wurden 15ml 0,2M Essigsäure und 35ml 0,2M Natriumacetat mit 150ml destilliertem Wasser aufgegossen und zu 50mg, mit 10 ml n,n-Dimethylformamid versetztem 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) gegeben. Nach Zugabe von 100µl 30% H₂O₂ wurde die Küvette 12 Minuten bei Dunkelheit geschüttelt, die Objektträger zweimal gewaschen und durch kurzes Eintauchen mit Hämalan gegengefärbt. Anschließendes Bläuen der Kerne erfolgte unter kaltem fließendem Leitungswasser.

Zuletzt wurden die Schnitte mit Glyceringelatine eingedeckt und mit Deckgläschen versehen. Lagerung der Schnitte erfolgte im Kühlschrank bei -20°C.

3.8.3. Anfertigung der Parafinschnitte

Der Nachweis von CD3, Mac3 und apoptotischer Zellen mittels DeadEnd Colorimetric TUNEL System sowie Färbungen mit Sirius Red wurden an Parafinschnitten durchgeführt.

Die Gewebestücke wurden nach Herzpräparation in 10% Formalinlösung bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert und fixiert, die anschließende Aufarbeitung erfolgte automatisch in einem Gewebeeinbettungsautomaten. Die Proben wurden zweimal 1h mit 70% Ethanol (v/v), dreimal 2h mit 96% Ethanol (v/v), zweimal 1h mit 100% Ethanol, 1h mit 66% Ethanol in Xylol (v/v), 1h mit 33% Ethanol in Xylol (v/v) und zweimal 2h mit Paraplast bei 56°C behandelt und in Parafin eingebettet. Die Parafinblöcke wurden am Rotationsmikrotom in 5µm dicke Schichten geschnitten, einige Minuten im Wärmebad gestreckt und auf einem SuperFrostPlus Objektträger aufgezogen. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei Raumtemperatur.

3.8.4. *Sirius Red* Färbung

Die *Sirius Red* Färbung ermöglicht den Nachweis von Kollagen in den geschnittenen Gewebeproben.

Vor dem eigentlichen Färbeschritt mussten die Proben in absolutem Ethanol zweimal zwei Minuten entparaffiniert und anschließend jeweils einmal zwei Minuten mit 90%, 70% und 30% Ethanol bewässert werden. Die Objektträger wurden kurz in Aqua dest. gespült und zweimal fünf Minuten gewaschen. Die *Sirius Red* Färbelösung wurde wie folgt angesetzt: 12g Pikrinsäure wurde in 1000ml Aqua dest. gelöst, ein pH von 2,0 eingestellt und 1,0g des Farbstoffes *Sirius Red* dazugegeben. Mit einer Spatelspitze Pikrinsäure wurde die Lösung gesättigt. Die Schnitte wurden eine Stunde auf einem Schüttler gefärbt und in 0,01N HCl zwei Minuten gereinigt. Es folgte die Entwässerung der Schnitte in 90% (einmal zwei Minuten) und 100% Ethanol (zweimal zwei Minuten) und Entfernung des Alkohols in zwei fünfminütigen

Xylolbädern. Die Schnitte wurden mit Corbitbalsam eingedeckt und haltbar gemacht. Die Auswertung erfolgte innerhalb von zwei Wochen.

3.8.5. DeadEnd Colorimetric TUNEL System

Mit dem *DeadEnd Colorimetric TUNEL System* gelingt der Nachweis fragmentierter DNA in apoptotischen Zellen. Biotinylierte Nucleotide werden durch die *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* (rTdT) an das 3' Ende der DNA Fragmente angefügt und anschließend mit *Horse Raddish Peroxidase* gekoppeltem Streptavidin (Streptavidin HRP) markiert. Die Behandlung mit Carbazol lässt die Streptavidin HRP sichtbar werden (Promega 2005, Technical Bulletin).

3.8.6. Durchführung des TUNEL Assays

Der TUNEL Assay wurde nach Protokollen der Firma Promega durchgeführt. Entparaffinierung erfolgte wie bereits oben beschrieben in einer absteigenden Ethanolreihe. In 1xPBS sollten die Schnitte an das Puffermilieu gewöhnt und anschließend in 10% gepuffertem Formalin fixiert werden. Zur Demaskierung der Schnittoberflächen wurden die Objektträger mit in Proteinase K Puffer gelöster und im Verhältnis 1:500 verdünnter Proteinase K behandelt, um tiefere Schichten des Schnittes für die weiteren Reaktionsschritte zugänglich zu machen. Nach zweimaligem fünfminütigen Waschen in 1xPBS folgte erneut die Fixierung der Schnitte in Formalin. Zum Nachweis der apoptotischen Zellen wurden die Schnitte mit einem aus Equilibrations Puffer, biotinyliertem Nucleotid Mix (1:10) und dem rTdT Enzym (1:10) bestehenden rTdT Mix versehen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zuvor wurde das Gewebe in Equilibrationspuffer an das Milieu gewöhnt (10 Minuten). In Aqua dest. 1:10 verdünnte SSC Stocklösung (20xSSC Stock → 2xSSC) beendete die Reaktion nach Zugabe und weiteren 15 Minuten Inkubation. Um gewebespezifische Peroxidase zu blockieren und so unspezifische Färbereaktionen des Carbazols zu verhindern, musste das Gewebe mit 0,3% H₂O₂ behandelt werden (fünf Minuten), anschließend erfolgte die Bindung der Streptavidin HRP während einer dreißigminütigen Inkubationszeit. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die

Schnitte jeweils zweimal für fünf Minuten in 1xPBS gereinigt. Die Aktivierung der HRP mit Carbazol und die Gegenfärbung mit Hämalaun erfolgten analog zu der bereits oben beschriebenen immunhistochemischen Färbung.

Eine positiv Kontrolle erhielt eine zehn minütige Behandlung mit in DNase Puffer im Verhältnis 1:5 verdünnter DNase I (Quiagen), welche die Zelleigene DNA fragmentierte und so eine Bindung der biotinylierten Nucleotide nicht nur an DNA apoptotischer Zellen ermöglichte. Die Negativkontrolle wurde statt mit rTdT Mix mit Aqua dest. behandelt.

3.8.7. Immunhistochemische Färbung an Paraffinschnitten

Der immunhistochemischer Nachweis von CD3 und Mac3 wurde an Paraffinschnitten nach der Avidin-Biotin-Komplex Methode durchgeführt. Dabei bindet das Hühnereiweiß Avidin an einen biotinylierten Sekundärantikörper. Die vier Bindungsstellen des Avidins ermöglichen gegenüber dem unbehandelten Antikörper eine vermehrte Anlagerung des Markerenzym, hier Biotin, welches später durch Carbazol sichtbar gemacht wird. Eine Signalverstärkung ist die Folge.

Die Primärantikörper CD3 und Mac3 wurden von den Firmen Serotec und Pharmingen, der Sekundärantikörper von Dako bezogen. Die Entparaffinierung erfolgte wie bereits beschrieben in Alkoholbädern absteigender Konzentration (Xylol, abs. Ethanol, 90%, 70%, 30%, Aqua dest.). Um Bindungsstellen im Gewebe den Antikörpern zugänglich zu machen, wurden die Schnitte 10 Minuten bei 37°C mit Pepsin behandelt und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Pepsin wurde in Pulverform von der Firma Dako bezogen und vor Gebrauch in 100ml 1N HCl und 400ml Aqua dest. gelöst. Gewebseigene Peroxidase wurde in 0,9% H₂O₂ blockiert (15 Minuten), H₂O₂ mit 1xTBS entfernt und die Schnitte mit 0,025% Tween in 1xTBS gereinigt (2x 5 Minuten). Zur Absättigung der elektrostatischen Ladungen der Proteine, musste das Gewebe 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 10% Normalserum in 1xTBS, 1%BSA (*Bovines Serum Albumin*) und vier Tropfen Avidin inkubiert werden. Anschließend konnten die Primärantikörper CD3 und Mac3 auf die Schnitte pipettiert werden (1:50 in 1xTBS und 1%BSA + 4 Tropfen Biotin). Die Inkubationsdauer betrug 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte mit 0,025% Tween in 1xTBS, wurde der zweite Antikörper

aufgetragen (1:100 in 1xTBS und 1%BSA) und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Bildung des ABC Komplexes wurden vor Anwendung jeweils 3 Tropfen der Reagenzien A und B zu 1ml 1xTBS gegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Gewebe wurde eine halbe Stunde mit ABC Reagenz behandelt und anschließend in 1xTBS zwei Mal fünf Minuten gewaschen. Die Carbazol-Färbelösung wurde analog zu den oben beschriebenen immunhistochemischen Färbungen angesetzt und verwendet, die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun. Die Schnitte wurden abschließend mit Glyceringelatine eingedeckt.

3.8.8. Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen und des TUNEL Assays erfolgte an einem Leica DMRB Lichtmikroskop bei 200x Vergrößerung. Die Schnitte wurden meanderförmig durchgemustert, mit Hilfe der Software Lucia G (Nikon & LIM Ltd) ausgewertet und mit einem selbstangepassten Makro quantifiziert. Pro Tier wurden zwei bis vier Schnitte mikroskopiert und teilweise doppelt gesichtet. Bei Auswertung der Sirius Red Färbung kam die gleiche Methode zur Anwendung, es wurde jedoch ein Polarisationsmikroskop eingesetzt. Die Schnitte wurden ebenfalls bei 200x Vergrößerung mikroskopiert. Ränder der Präparate und kollagenreiche Gefäße wurden nicht mit gemessen.

3.9. Statistische Auswertung

Die in den einzelnen Versuchen ermittelten Datensätze wurden mit Hilfe des Programms SPSS Version 12. statistisch ausgewertet. Die Werte der vier Versuchsgruppen Wildtyp nicht infiziert (WT), Wildtyp infiziert (WT inf.), Knock out nicht infiziert (KO) und *Knock out* infiziert (KO inf.) wurden zunächst auf Normalverteilung getestet. Die graphische Darstellung der Daten in Histogrammen und die Berechnung der Lagemaße (Mittelwert, Standardabweichung, Standardmessfehler und Varianz) sollte einen Überblick über die Verteilung der Messwerte innerhalb der Gruppen liefern. Für keine der Versuchsgruppen konnte nach erster explorativer Datenanalyse Normalverteilung angenommen werden. Mit

dem H-Test nach Kruskal und Wallis wurde die Nullhypothese, ob die Wertegruppen derselben Grundgesamtheit entstammten, geprüft. Bei einem p-Wert $< 0,05$ wurde die Nullhypothese verworfen und Einzelvergleiche durchgeführt. Unterschiede zwischen den Gruppen

- WT infiziert und WT nicht infiziert
- KO infiziert und KO nicht infiziert
- WT nicht infiziert und KO nicht infiziert
- WT infiziert und KO infiziert

wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht und die ermittelten p-Werte nach Bonferroni korrigiert (p-Wert des M-W Tests multipliziert mit der Anzahl der durchgeführten Test). Bei p-Werten $> 0,001$ wurde der exakte Wert angegeben, bei $p < 0,001$ wurde dies vermerkt. Unterschiede wurden bei einem korrigierten $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Bei allen im Text angegebenen Mittelwerten (MW) ist zusätzlich der Standardmessfehler (SEM) aufgeführt.

3.10. Tierversuchsantrag

Alle Tierversuche wurden entsprechend den gesetzlichen Richtlinien angemeldet, unter dem Aktenzeichen G0213/03 behördlich genehmigt und gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

4. Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Arbeitgeräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien sind in folgenden Tabellen aufgelistet. Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in *pro analysi* Qualität bezogen.

4.1. Arbeitsgeräte

| Arbeitsgerät | Bezeichnung | Bezug |
|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Autoklaven | | Hartman, Schleswig, BRD |
| Backofen | | Heraeus, Osterode, BRD |
| Betriebssystem | Windows 2000 Professional | Microsoft |
| Beatmungssystem | Mausventilator Typ 55- 7066 | Harvard Apparatus, Boston, USA |
| Computer | Pentium III | Asus |
| Diamantschleifer | Gravier Komplett Set | Proxxon |
| Digitaler Grafikdrucker | Digital Graphic Printer UP- D890 | Biometra, Göttingen, BRD |
| Echokardiographiesystem | SONOS 5055 | Philips Medizin Systeme GmbH |
| Eismaschine | AF-10 | Scotsman, Vernon Hills, USA |
| Elektrophoresekammer | | Biometra, Göttingen, BRD |
| ELISA Reader | Sunrise | Tecan, Schweiz |
| Erlenmeier Kolben 250ml | | Schott Duran, Mainz, BRD |
| Gelschlitten | | Eigenproduktion UKBF |
| Gelkämme | | Eigenproduktion UKBF |
| Gewebeeinbettungs- automat | | Shandon, Frankfurt am Main, BRD |
| Gradientencycler | Mastercycler gradient | Eppendorf, Wesseling- |

| | | |
|---|--|--|
| | | Berzdorf, BRD |
| Heizplatte | Hotplate Magnetic Stirrer | Cenco Instrumenten MIJ.N.V. |
| Homogenisator | Pellet Pestle Motor | Sigmar-Aldrich, Taufkirchen, BRD |
| Inkubator (37°C) | | |
| Inkubationskammer (mobile) | | UKBF |
| Kühlschrank -20 °C | economic super | Bosch AG, Stuttgart, BRD |
| Kühlschrank -20 °C/ 4 °C | economic nofrost | Bosch AG, Stuttgart, BRD |
| Kühlschrank 4 °C | cooler | Bosch AG, Stuttgart, BRD |
| Kühlschrank -80 °C | Nuaire Ultralow Freezer | Zapf Instrumente Sarstedt, BRD |
| Küvetten | | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Kryostat | Jung CM 3000 | Leica, Benzheim, BRD |
| Lichtmikroskop | DMRBE | Leica, Benzheim, BRD |
| Messbecher | 400ml | Simax |
| Messzylinder | 2000:20ml, 1000:20ml, 500:10ml | Brand |
| Messzylinder | 250:5ml, 100:2ml | Simax |
| Magnetrührer | Ikamag Reo | IKA-Labortechnik, Staufen, BRD |
| Mikrowelle | Privileg Microwave 800 | Welabo, Düsseldorf, BRD |
| Multipipette | Multipette plus | Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, BRD |
| Netzgerät | Standard Power Pack P25 | Biometra, Göttingen, BRD |
| PCR Maschine | Programmable Thermal Controller PTC-100 | MJ Research, Inc |
| PCR <i>rack</i> | | UKBF |
| pH Meter | Digital pH Meter 646 | Bayer, Düsseldorf, BRD |
| Pipetten 0,5µl-10µl, 2- 20µl, 10-100µl, 100- | Eppendorf Research | Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, BRD |

| | | |
|---------------------------------|--------------------------------------|---|
| 1000µl | | |
| Polarisationsmikroskop | Eclipse E 600 Pol | Nikon, Tokyo, Japan |
| Präzisionswaage | | Sartorius, Göttingen, BRD |
| <i>Realtime</i> Cyclor | 7900HT Fast Real-Time PCR Systems | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Saugvorrichtung für Pipetten | Bibby Rechargeable | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Schiffchen | | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Schüttler | SM 25 | Edmund Bühler, Tübingen, BRD |
| Thermomixer | Thermomixer Comfort | Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, BRD |
| Tischzentrifuge | Centrifuge 5415R | Eppendorf Wesseling- Berzdorf, BRD |
| UV- Transilluminator | BioDoc Analyse System | Biometra, Göttingen, BRD |
| Waage, elektronisch | DMS 580 | Kern-Elektronik, Albstadt, BRD |
| Wasserbadinkubator | | GFL, Burgwedel, BRD |
| Vortexgerät | MS2 Minishaker | IKA-Labortechnik, Staufen, BRD |

Tab. 4.1.: Arbeitsgeräte mit Erläuterungen und Herstellerangaben

4.2. Verwendete Software

| Software | Erklärung | Bezug |
|-----------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| BioDoc 2.0 | Dokumentation der Gele | Biometra, Göttingen, BRD |
| Excel 2000 | Tabellenkalkulations- programm | Microsoft, Unterschleißheim, BRD |
| Lucia G V3.51ab | Histomorphometrie | Lucia Imaging, Prag, BRD |
| Microsoft | Bildbearbeitung | Microsoft, Unterschleißheim, BRD |

| | | |
|-------------------|---------------------------|---|
| PowerPoint | | |
| Scion Image (SCN) | Auswertung der Gelbanden | Ultra-Violet Products Limited, Cambridge, UK |
| SPSS 12 | Statistikprogramm | SPSS Inc., Chicago USA |
| Word 2000 | Textverarbeitungsprogramm | Microsoft, Unterschleißheim, BRD |

Tab. 4.2.: Verwendete Software

4.3. Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterial | Bezeichnung/ Erklärung | Bezug |
|-------------------------------------|----------------------------|---|
| Deckgläser | 24x50mm | Menzel Gläser, Braunschweig, BRD |
| Eindeckkassetten | Biopsy processing cassetts | Simport, Beloeil, Canada |
| Einmalhandschuhe | Flexam | Cardinal Health, Dublin, Ohio, USA |
| Einmalpipetten, steril | 5 ml | Falcon, Sarstedt, Nürnberg, BRD |
| | 10 ml und 25 ml Stripette | Costar |
| Homogenisierstäbe | Pellet Pestles | Sigma |
| Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl | unsteril | Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, BRD |
| Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl | mit Filtertip | Biozym, Hess. Oldendorf, BRD |
| Mikrotiterplatte | | Falcon, Sarstedt, Nürnberg, BRD |
| Objektträger | Superfrost-Plus | Menzel Gläser, Braunschweig, BRD |
| Objektträger | 76 x 26 mm | Menzel Gläser, Braunschweig, BRD |
| <i>Realtime</i> Platten | MicroAmp | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Reaktionsgefäße | 0,2 ml | Biozym, Hess. Oldendorf, BRD |

| | | |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Reaktionsgefäße | 0,5 ml und 1,5 ml Safe Lock Tubes | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, BRD |
| Reaktionsgefäße | 0,5 ml 1,5 ml und RNase frei | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, BRD |
| Reaktionsgefäße | 15 ml und 50 ml Falcon tubes | Sarstedt, Nürnberg, BRD |

Tab. 4.3.: Verbrauchsmaterialien mit Erläuterungen und Herstellerangaben

4.4. Reagenzien

| Reagenzien | Bezeichnung/ Erklärung | Bezug |
|----------------------------------|--|--|
| ABC-Kit | Vectarstain Standard | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| Aceton | 100% | J.T. Baker, Deventer, Holland |
| Agarosepulver | SeaKem® LE Agarose | Biozym, Hess. Oldendorf, BRD |
| Aprotinin (1 µg/µl) | | Calbiochem, Darmstadt, BRD |
| Aqua bidest. | Ampuwa Spüllösung | Fresenius, Bad Homburg, BRD |
| Antikörper, antigenspezifisch | Anti-CD3 Anti-Kollagen I Anti-Kollagen III Anti-Mak3 Anti-MMP2 Anti-MMP3 Anti-MMP9 Anti-TIMP1 Anti-TIMP4 | Serotec, Düsseldorf, BRD Chemicon, Hofheim, BRD Calbiochem, Darmstadt, BRD Pharmingen, Darmstadt, BRD Chemicon, Hofheim, BRD Chemicon, Hofheim, BRD Chemicon, Hofheim, BRD Chemicon, Hofheim, BRD Chemicon, Hofheim, BRD |
| Antikörper, sekundär | EnVision Dako EO 468 | Dako, Glostrup, Dänemark Dako, Glostrup, Dänemark |
| Avidin-Biotin Blocking | | Vector Laboratories, |

| | | |
|--------------------------------------|---|---|
| Kit | | Burlingame, USA |
| Bromphenolblau | | Sigma, Taufkirchen, BRD |
| BSA | Bovines Serum Albumin | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| CaCl ₂ | Kalziumchlorid | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Carbazol | 3- Amino-9-Ethylcarbazol | Sigma, Taufkirchen, BRD |
| Chloroform | 99% | Sigma, Taufkirchen, BRD |
| Corbitbalsam | | I. Hecht, Kiel, BRD |
| DeadEnd Colorimetric TUNEL System | | Promega, Mannheim, BRD |
| DNase I | | Qiagen, Hilden, BRD |
| DNase freies Wasser | | Promega, Mannheim, BRD |
| DNA Polymerase | BioTherm™DNA polymerase 5u/μl | Rapidozym, Berlin, BRD |
| dNTPs | dATP, dCTP, dGTP und dTTP jeweils 25mM | Epicentre, Madison, USA |
| DPLC- behandeltes Wasser | RNAse freies Wasser | Ambion, Austin, USA |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat | Sigma, Taufkirchen, BRD |
| Essigsäure | | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Ethanol absolut | | J.T. Baker, Deventer, Holland |
| Ethidiumbromid | | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| FCS | Fetales Kälberserum | PAA Laboratories, Pasching, BRD |
| Formalin | 10% gepuffert | Sigma, Taufkirchen, BRD |
| Glyceringelatine | | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxyd | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Hämalaun Färbelösung | | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| HCl | Salzsäure, 1mol/l | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Isopropanol | 2-Propanol | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Kb Ladder | Marker VIII | Fermentas, St. Leon-Rot, BRD |
| KCl | Kaliumchlorid | VWR Merck, Darmstadt, BRD |

| | | |
|--|---|--------------------------------------|
| KH_2PO_4 | Kaliumhydrogenphosphat | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Leupeptin (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | | Sigma, Taufkirchen, BRD |
| MgCl_2 | Magnesiumchlorid | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| MgCl_2 für PCR | 50mM MgCl_2 | Rapidozym, Berlin, BRD |
| Methylbutan | für Spectroskopie | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| NaCl | Natriumchlorid | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Natriumdesoxycholsäure | | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Natriumacetat | | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| N,N-Dimethylformamid | | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Nonidet P-40 | Nonylphenylpolyethylenglycol | Fluka Biochemica, Schweiz |
| Paraffin | | |
| PCR Puffer | 10xBioTherm buffer ohne MgCl_2 | Rapidozym, Berlin, BRD |
| Pepstatin (5mg/ml) | | Sigma, Taufkirchen, BRD |
| Pikrinsäure | | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Primer für PCR | siehe Tabelle im Text | TipMolBiol, Berlin, BRD |
| Proteinase K | | Roche, Grenzach-Whylen, BRD |
| Poly-L-Lysin | | Sigma, Taufkirchen, BRD |
| PMSF, 0.2M | | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Random Hexamer | | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Reverse Transkriptase | Multiscribe Reverse Transkriptase (50U/ μl) | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| RNase Inhibitor | RNasin | Promega, Mannheim, BRD |
| RNase Zap | | Ambion, Austin USA |
| SDS (Natriumdodecylsulfat) | Sodium Lauryl Sulfate | Sigma, Taufkirchen, BRD |
| Sirius Red Farbstoff | | Polyscience, Warrington, |

| | | |
|-----------------------|--|--------------------------------------|
| | | USA |
| Stickstoff, flüssig | | |
| TaqMan Mastermix | | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| TaqMan RT Puffer, 10x | | Applied Biosystems, Foster City, USA |
| Tissue Tec® | | Sakura, Zoeterwoude, Holland |
| Tris-HCl | Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochloric acid | VWR Merck, Darmstadt, BRD |
| Trizol® | | Invitrogen, Karlsruhe, BRD |
| Tween | Tween®20 | Sigma, Taufkirchen, BRD |
| Xylol | | J.T. Baker, Deventer, Holland |

Tab. 4.4.: Reagenzien mit Erläuterungen und Herstellerangaben

5. Ergebnisse

5.1. Krankheitsverlauf

Nach der Infektion mit CVB3 konnte eine Änderung im Verhalten der erkrankten Tiere beobachtet werden. Tiere der infizierten Versuchsgruppen zeigten einen verminderten Spieltrieb, bewegten sich weniger und wurden im Verlauf der Krankheit zunehmend lethargisch. Die Nahrungsaufnahme erfolgte in geringerem Maße als bei den gesunden Mäusen. Das Fell wurde struppig und stumpf. Bei den Kontrolltieren wurde keine Änderung festgestellt.

5.2. Gewichtsänderungen während des Krankheitsverlaufs

Die Gewichtsänderungen der Mäuse zwischen dem ersten und achten Tag nach Infektion (p.i.) wurde untersucht. Der H-Test nach Kruskal und Wallis ergab, dass die einzelnen Wertegruppen unterschiedlichen Grundgesamtheiten entstammten ($p < 0,001$), Einzelvergleiche zwischen den Gruppen

- Wildtyp nicht infiziert (WT) und Wildtyp infiziert (WT inf.)
- *Knock out* nicht infiziert (KO) und *Knock out* infiziert (KO inf.)
- Wildtyp nicht infiziert und *Knock out* nicht infiziert
- Wildtyp infiziert und *Knock out* infiziert

wurden dementsprechend mit dem Mann-Whitney-U-Test (M-W Test) durchgeführt und sind in Abb. 5.1. dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 zugrunde gelegt. Die statistische Auswertung zeigte eine bedeutsame Gewichtsänderung zwischen beiden Wildtyp ($p = 0,016$) und *Knock out* Gruppen ($p < 0,001$): Das Gewicht infizierter WT Mäuse reduzierte sich im Verlauf der Erkrankung von 18,5g \pm 1,09g¹ auf 14,52g \pm 0,94g. Gesunde Tiere nahmen

¹ Standardmessfehler (SEM)

dagegen im Schnitt um 1,22g +/- 0,32g zu. Die Gewichts­differenz zwischen infizierten KO Mäusen und der Kontrollgruppe betrug am zweiten Messzeitpunkt 4,17g +/- 0,42g. Infizierte Tiere wogen am ersten Tag des Versuchs 20,98 +/- 1,13g, am achten nur noch 17,94g +/- 1,68g. In der Kontrollgruppe war eine Gewichtszunahme von 19,34g +/- 0,82g auf 20,47g +/- 1,06g festzustellen.

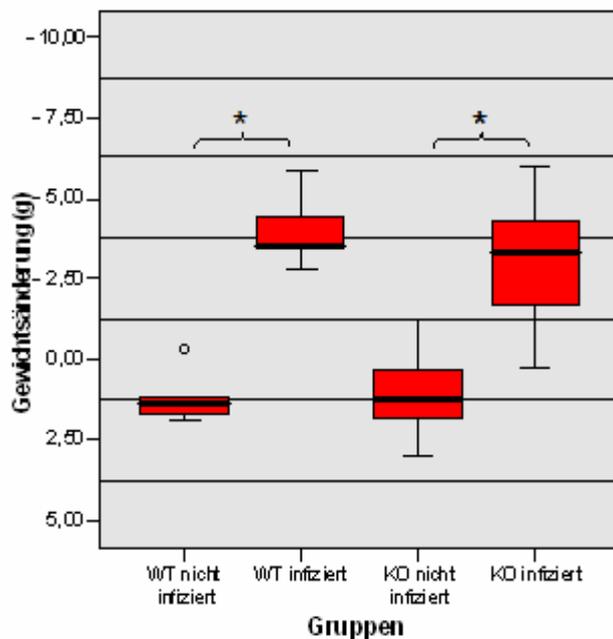


Abb. 5.1.: Darstellung der Gewichtsänderung der Versuchsgruppen zwischen zweitem und achtem Tag nach Virusinfektion im Boxplot. Das rot Rechteck wird vom unteren und oberen Quartil begrenzt, der Median durch den schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Länge der Whisker entspricht dem 1,5 fachen Interquartilsabstand (IQR). Werte außerhalb der Whisker (Ausreißer) werden mit °, signifikante Unterschiede zwischen den Wertegruppen mit * gekennzeichnet.

5.3. Herzgewicht

Nach Tötung der Tiere wurde das Herzgewicht ermittelt. Um dem von vorneherein unterschiedlichen Gewicht Rechnung zu tragen, wurde das Herzgewicht mit dem Körpergewicht der Tiere relativiert und ein Quotient aus beiden Werten gebildet (Herzgewicht nach Entnahme in g / Körpergewicht am achten Tag p.i. in g). Die Mittelwerte der Herzquotienten wurden verglichen ($MW_{WT \text{ inf.}}: 0,0052 \pm 0,00038$;

MW_{WT} : 0,0044 +/- 0,00036; $MW_{KO\ inf.}$: 0,0053 +/- 0,00023; MW_{KO} : 0,0051 +/- 0,00077), es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die einzelnen Wertegruppen unterschiedlichen Grundgesamtheiten entstammten. Einzelvergleiche blieben dementsprechend aus.

5.4. Echokardiographie

Veränderungen der Herzgeometrie sollten echokardiographisch erfasst werden. Der Innendurchmesser der linken Kammer in Systole und Diastole, die Dicke des Kammerseptums und der Hinterwand und die fraktionelle Verkürzung des Herzens sollten beurteilt und verglichen werden. Bei keinem der Parameter wurde nach Durchführung des Kruskal-Wallis Test ein signifikanter Wert errechnet, Einzelvergleiche wurden dementsprechend nicht durchgeführt.

5.5. Mortalität

Jeweils zwei Tiere der beiden infizierten Gruppen starben vor Ablauf der Zehntagesfrist. Am achten Tag verendete jeweils eine Maus der Gruppen WT und KO infiziert, am zehnten Tag starb ein weiteres Tier in beiden Gruppen. Die Sterberate betrug in der Gruppe WT infiziert 28,57% in der Gruppe KO infiziert 20%. Tiere der nicht infizierten Kontrollgruppen überlebten bis Ablauf der Frist.

5.6. Virusinfektion

Um eine erfolgreiche Infektion mit CVB3 nachzuweisen, wurde die Viruslast mit einer Basis-Cox PCR überprüft (siehe Abb. 5.2.). CVB3 Genom konnte in keiner der nicht infizierten Kontrollgruppen nachgewiesen werden.

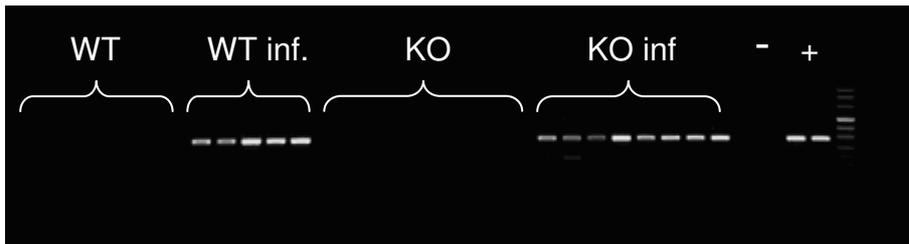


Abb. 5.2.: Basis-Cox PCR. Nur bei infizierten Tieren sind CVB3 Banden im Agarose Gel sichtbar.

5.7. STAT3 *Knock out*

Der Erfolg des STAT3 *Knock outs* wurde mittels PCR untersucht. Deutliche STAT3 Banden im Agrosegel sind im Fall der WT Tiere erkennbar (Abb. 5.3.). Mithilfe des H-Tests konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Versuchsgruppen unterschiedlichen Grundgesamtheiten angehörten ($p < 0,001$), die Einzelvergleiche der WT und KO Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Obwohl auch die KO Gruppen geringe STAT3 mRNA Expression zeigten, waren die Unterschiede zwischen den Gruppen WT infiziert und KO infiziert ($p = 0,004$) und den Gruppen WT nicht infiziert und KO nicht infiziert ($p < 0,001$) signifikant.

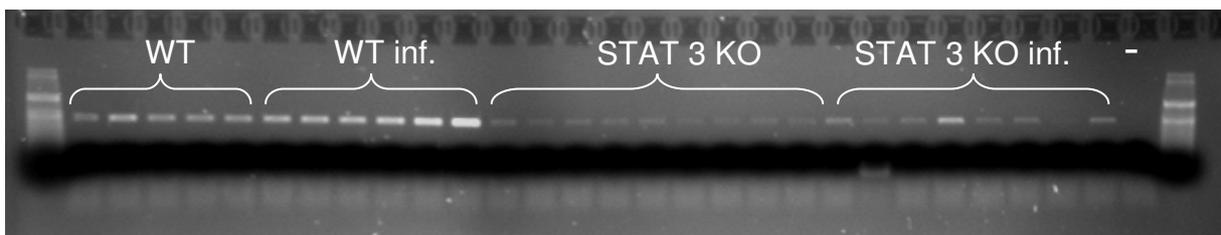


Abb. 5.3.: STAT3 PCR. Deutlich stärkere STAT3 Banden sind bei den WT Gruppen im Agarose Gel zu erkennen.

5.8. Zytokine

Um den Verlauf der Erkrankung zu untersuchen, wurden Entzündungsmediatoren mit Hilfe von PCR und *Realtime* PCR bestimmt. Die mRNA Expression von IL-15 und TGF β wurden mittels PCR, die Genexpression von IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN γ und TNF α mit einer *Realtime* PCR quantifiziert.

Die statistische Auswertung ergab signifikante p-Werte im H-Test nach Kruskal und Wallis bei allen untersuchten Variablen (IL-15: $p=0,013$; TGF β : $p=0,008$; IL-1 β : $p=0,002$; IL-6: $p=0,001$; IL-10: $p<0,001$; IFN γ : $p<0,001$ und TNF α : $p=0,001$). Die Nullhypothese, die Versuchsgruppen entstammten im Bezug auf die jeweilige Variable derselben Grundgesamtheit, konnte also verworfen, und Einzelvergleiche durchgeführt werden.

5.8.1. Interleukin 1 β

Die mRNA Expression von IL-1 β war in der Gruppe der infizierten Wildtypmäuse im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p=0,016$; Abb. 5.4.): Die mittlere Genexpression betrug in der erkrankten Gruppe $1,32E-05 \pm 4,45E-06$, in der gesunden $1,65E-06 \pm 2,67E-07$. Vergleiche zwischen den beiden KO Gruppen zeigten eine leichte Erhöhung der Genexpression der infizierten gegenüber den nicht infizierten Tieren (Genexpression $_{KO \text{ inf.}}$: $6,92658E-06 \pm 1,5518E-06$; Genexpression $_{KO}$ $2,37235E-06 \pm 4,2519E-07$). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

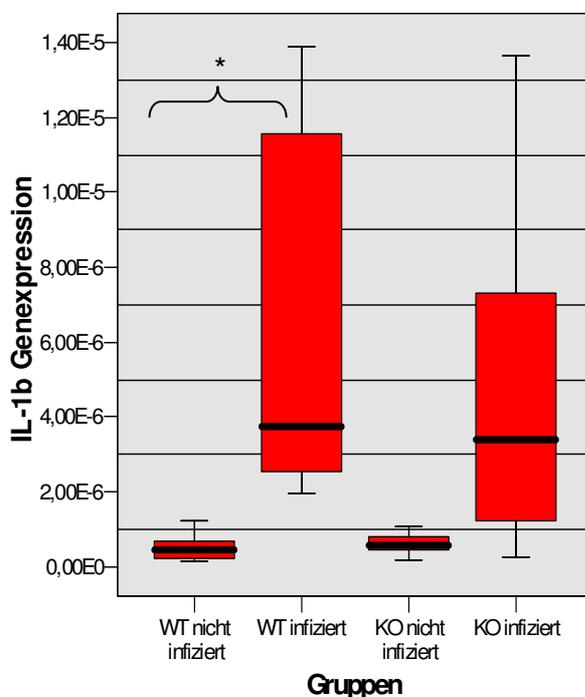


Abb. 5.4.: IL-1 β Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.8.2. Interleukin 6

Auch die IL-6 mRNA Expression der infizierten Tiere war im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen erhöht (Abb. 5.5.). Die mittlere Genexpression der infizierten Wildtypgruppe unterschied sich signifikant von der Expression der Kontrollgruppe (Genexpression_{WT inf.}: $1,00942E-06 \pm 4,309E-07$; Genexpression_{WT}: $6,56405E-08 \pm 1,8936E-08$; $p=0,016$). Signifikante Unterschiede zeigten auch der Vergleich zwischen der infizierten und nicht infizierten Knock out Gruppe (Genexpression_{KO inf.}: $1,27706E-06 \pm 3,7461E-07$; Genexpression_{KO}: $6,3739E-08 \pm 1,5046E-08$; $p=0,016$).

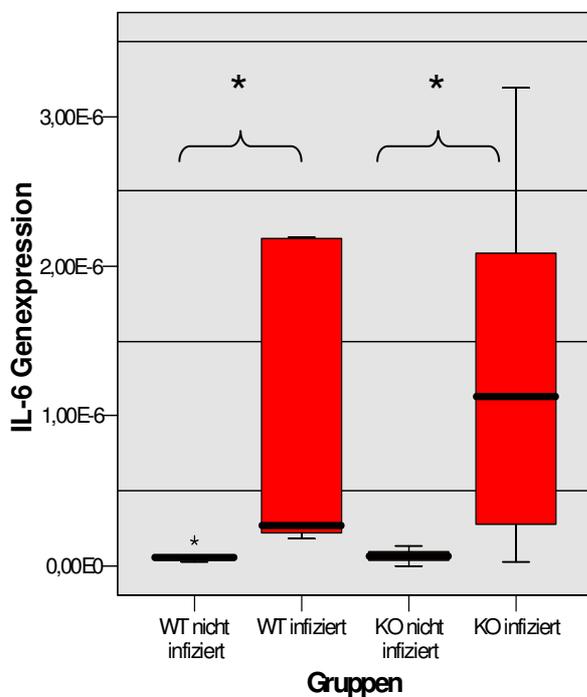


Abb. 5.5.: IL-6 Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.8.3. Interleukin 10

Infizierte Tiere zeigten eine starke Erhöhung der IL-10 mRNA Expression gegenüber den Kontrollmäusen. Die Unterschiede sind in Abb. 5.6. dargestellt. (Genexpression_{WT inf.}: $1,5962E-06 \pm 6,7971E-07$; Genexpression_{KO inf.}: $3,7666E-07 \pm 1,4974E-07$). Die Expression der gesunden Kontrollgruppen war so gering dass sie nicht

erfasst werden konnte. Der Vergleich beider WT Gruppen ergab einen p-Wert von 0,016, der bei den beiden KO Gruppen einen Wert von 0,004 im Mann-Whitney-U-Test. Damit konnte die Nullhypothese, jeweils beide Gruppen entstammten derselben Grundgesamtheit, verworfen werden.

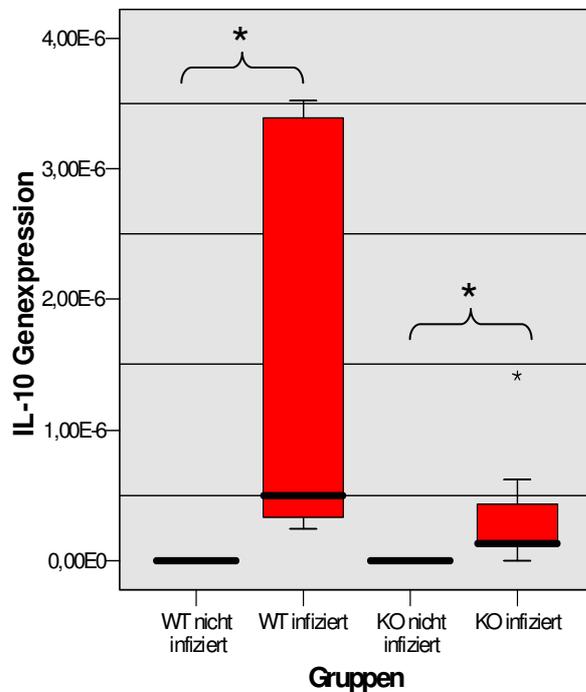


Abb. 5.6.: IL-10 Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.8.4. Interleukin 15

Eine signifikante Zunahme der mittleren mRNA Expression der infizierten Gruppen konnten im Vergleich zu den gesunden Tieren nicht belegt werden. Dennoch zeigte sich eine leichte Erhöhung der IL-15 Genexpression bei infizierten Wildtypenmäusen gegenüber den gesunden Kontrolltieren (Genexpression_{WT inf.}: 0,91 +/- 0,07; Genexpression_{WT}: 0,71 +/- 0,027). Ein signifikanter Unterschied ($p = 0,004$) konnte jedoch zwischen den infizierten WT und KO Mäusen festgestellt werden (siehe Abb. 5.7.).

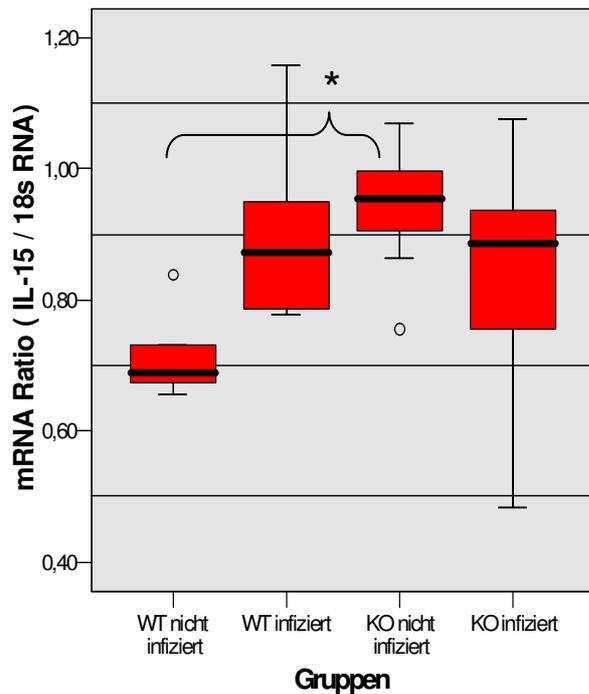


Abb. 5.7.: IL-15 Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.8.5. Interferon γ

Die mittlere Genexpression der infizierten Versuchsgruppen war im Vergleich zu den gesunden Tieren stark erhöht. Infizierte Wildtypmäuse unterschieden sich signifikant von ihrer Kontrollgruppe, (Genexpression $_{WT\ inf.}$: $2,29115E-06 \pm 1,0205E-06$; Genexpression $_{WT}$: $8,60408E-09 \pm 7,8544E-09$; $p=0,016$) ein gleichgerichteter Unterschied war zwischen infizierten und *nicht* infizierten *Knock out* Tieren erkennbar (Genexpression $_{KO\ inf.}$: $6,61323E-07 \pm 1,7919E-07$; Genexpression $_{KO}$: $1,60009E-08 \pm 7,7828E-09$; $p=0,004$). Die Ergebnisse sind in Abb. 5.8. veranschaulicht.

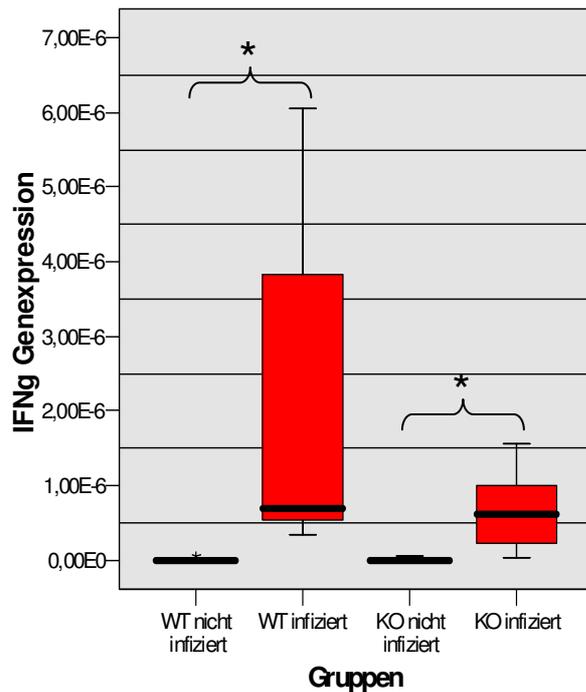


Abb. 5.8.: IFN γ Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.8.6. Tumorgrowthfactor β

Die mRNA Expression war lediglich bei den infizierten KO Tieren im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe signifikant erhöht (Genexpression_{KO inf.}: 0,93 +/- 0,04; Genexpression_{KO}: 0,73 +/- 0,02; $p=0,024$). Die Nullhypothese, beide Wertegruppen entstammten derselben Grundgesamtheit, konnte nach Durchführung des Mann-Whitney-Tests verworfen werden.

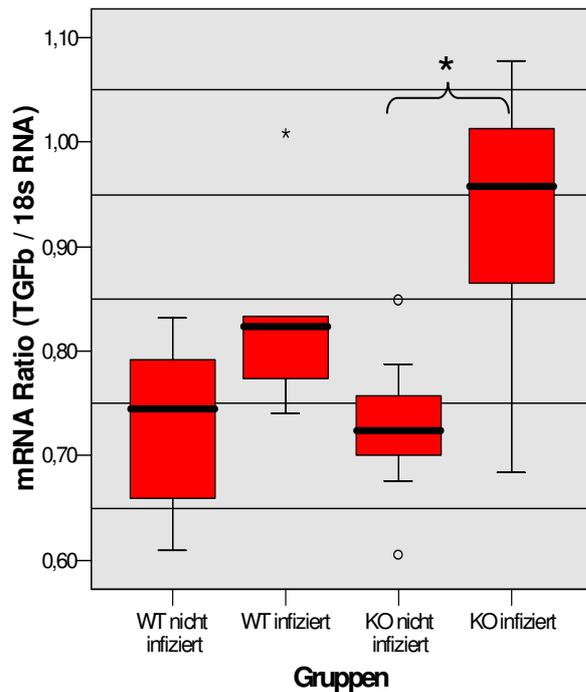


Abb. 5.9.: TGFβ Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.8.7. Tumornekrosefaktor α

Die Bestimmung der mRNA Expression von TNFα zeigte Unterschiede der Mittelwerte, sowohl zwischen den infizierten Wildtypmäußen und den Kontrollmäusen, als auch zwischen den infizierten und nicht infizierten *Knock out* Tieren. (MW_{WT inf.}: 1,31878E-05 +/- 4,4486E-06; MW_{WT}: 1,64858E-06 +/- 2,6672E-07; MW_{KO inf.}: 6,92658E-06 +/- 1,5518E-06; MW_{KO}: 2,37235E-06 +/- 4,2519E-07). Die Durchführung des Mann-Whitney-Tests ergab ein p-Wert von 0,016 für den Vergleich zwischen den WT Gruppen und ein p-Wert von 0,044 für den zwischen den KO Gruppen. Die Nullhypothese konnte daher verworfen werden.

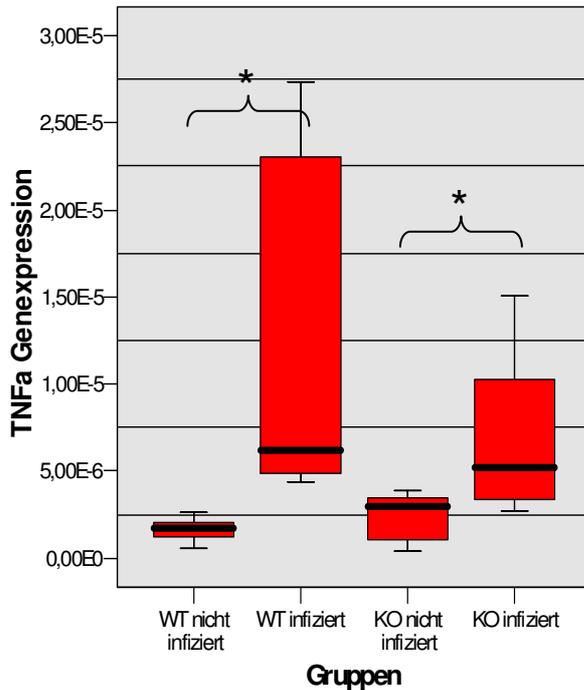


Abb. 5.10.: TNF α Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.9. Infiltration mit Makrophagen und T-Zellen

Immunhistochemische Färbungen wurden durchgeführt, um die Infiltration des Myokards mit Makrophagen (Mak3) beziehungsweise T- Zellen (CD3) nachzuweisen. Um zu testen, ob die einzelnen Versuchsgruppen im Bezug auf die jeweilige Variable derselben Grundgesamtheit angehörten, wurden H-Tests nach Kruskal und Wallis durchgeführt. In beiden Fällen ergab sich ein p-Wert von $p < 0,001$. Die Nullhypothese konnte verworfen und Einzelvergleiche zwischen den bereits erwähnten Versuchsgruppen mit dem M-W Test durchgeführt werden.

5.9.1. CD3 positive T-Zellen

Die Betrachtung der Schnitte am Mikroskop zeigte im Falle der infizierten Tiere teils kleinere teils großflächige Infiltrate. Die Struktur erschien aufgelockert und inhomogen, gesundes Muskelgewebe wurde verdrängt. Die Infiltrate zeigten CD3 positive Zellen. Das Gewebe der gesunden Mäuse wirkte dagegen dicht und

homogen. Exemplarisch sind Gewebepreparate jeder Gruppe in Abb. 5.11. dargestellt.

Die infizierten Mäuse ließen eine deutliche Zunahme der zellulären Infiltration im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe erkennen. Infizierte WT Mäuse zeigten im Mittel $124,38 \pm 41,19$ Signale pro mm^2 , nicht infizierte nur $6,8 \pm 1,37$ pro mm^2 (siehe Abb. 5.12.). Nach Durchführung des M-W Test und einem ermittelten p-Wert von $p=0,016$ konnte die Nullhypothese verworfen und die Unterschiede für signifikant erklärt werden. Auch zwischen infizierten und nicht infizierte KO Mäusen waren die Unterschiede signifikant (MW Signale/ mm^2 KO inf. : $61,88 \pm 18,72$; MW Signale/ mm^2 KO : $4,27 \pm 0,72$; $p=0,004$). Die verstärkte Infiltration der infizierten WT Mäusen gegenüber den infizierten KO Mäusen erwies sich jedoch als statistisch unbedeutend.

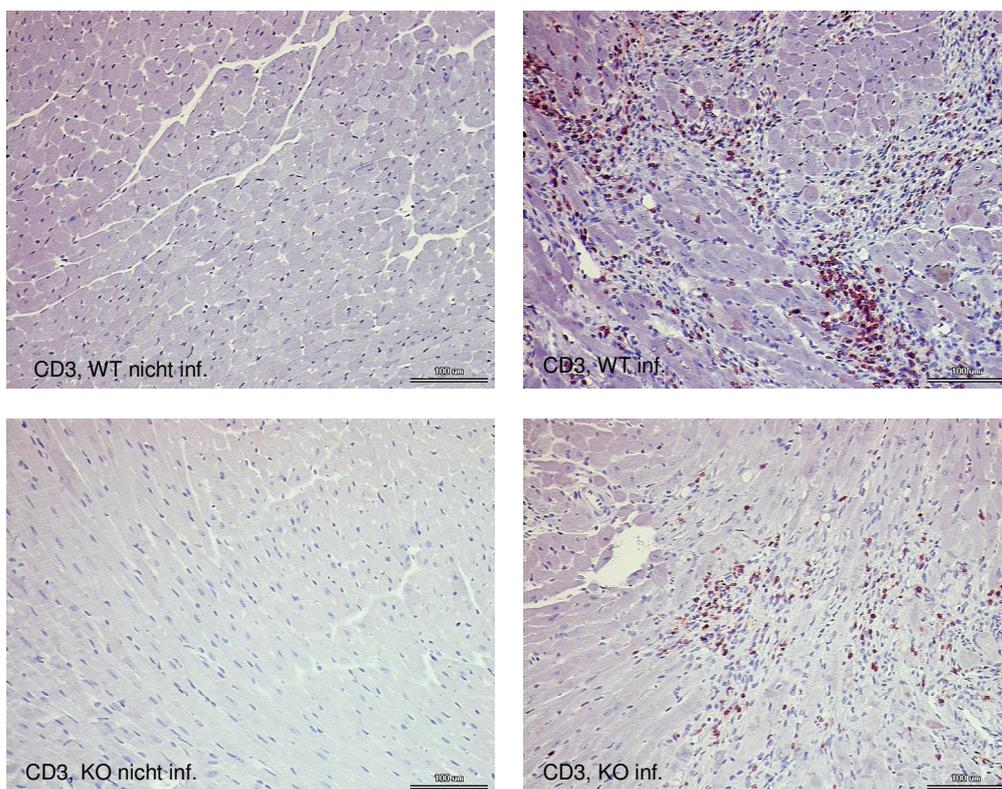


Abb. 5.11.: Immunhistochemische CD3 Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.

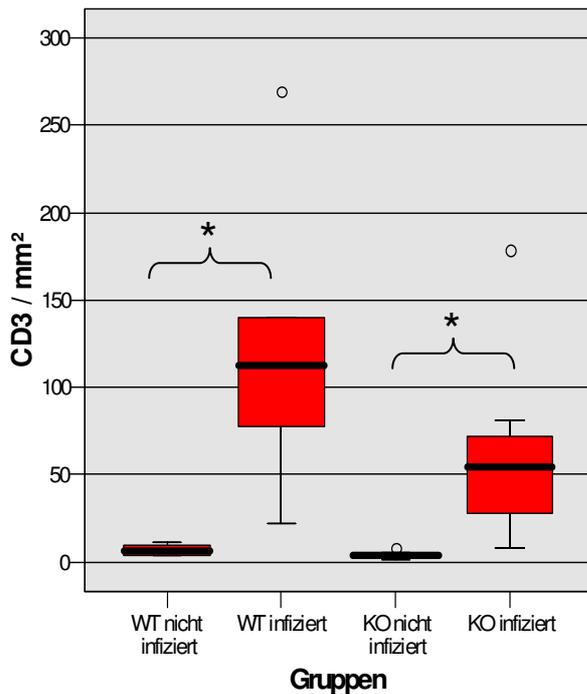


Abb. 5.12.: CD3 positive Signale pro mm². Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.9.2. Mak3

Ähnlich wie im Fall der CD3 immunhistochemischen Färbung konnten auch bei dieser Färbung deutliche Unterschiede zwischen dem Gewebe infizierter und nicht infizierter Mäuse im Mikroskop gesehen werden (Abb. 5.13.) Während das Gewebe der gesunden Tiere durchweg dicht und homogen war, zeigten die Schnitte der infizierten Gruppen ein unruhiges Bild. Der Zusammenhang zwischen den Myozyten war zum Teil massiv gestört und das Gewebe von großen signalreichen Infiltraten durchsetzt.

Das Herzmuskelgewebe der infizierten Wildtypiere war im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren stark durch signalgebende Zellen infiltriert. Infizierte Mäuse zeigten im Mittel $320,09 \pm 92,51$ Signale pro mm², gesunde Tiere dagegen nur $10,26 \pm 2,17$. Ein ähnliches Bild bot der Vergleich zwischen den KO Gruppen (MW Signale/mm² KO inf.: $221,28 \pm 58,15$; MW Signale/mm² KO: $11,97 \pm 2,48$). Der M-W Test konnte zeigen, dass sich infizierte WT und infizierte KO Mäuse von den nicht infizierten Kontrollgruppen signifikant unterscheiden (WT infiziert: $p=0,016$ und KO infiziert: $p=0,004$). Die im Boxplot sichtbaren Unterschiede zwischen den infizierten

KO Tieren und WT Mäusen konnten statistisch jedoch nicht belegt werden (Abb. 5.14.).

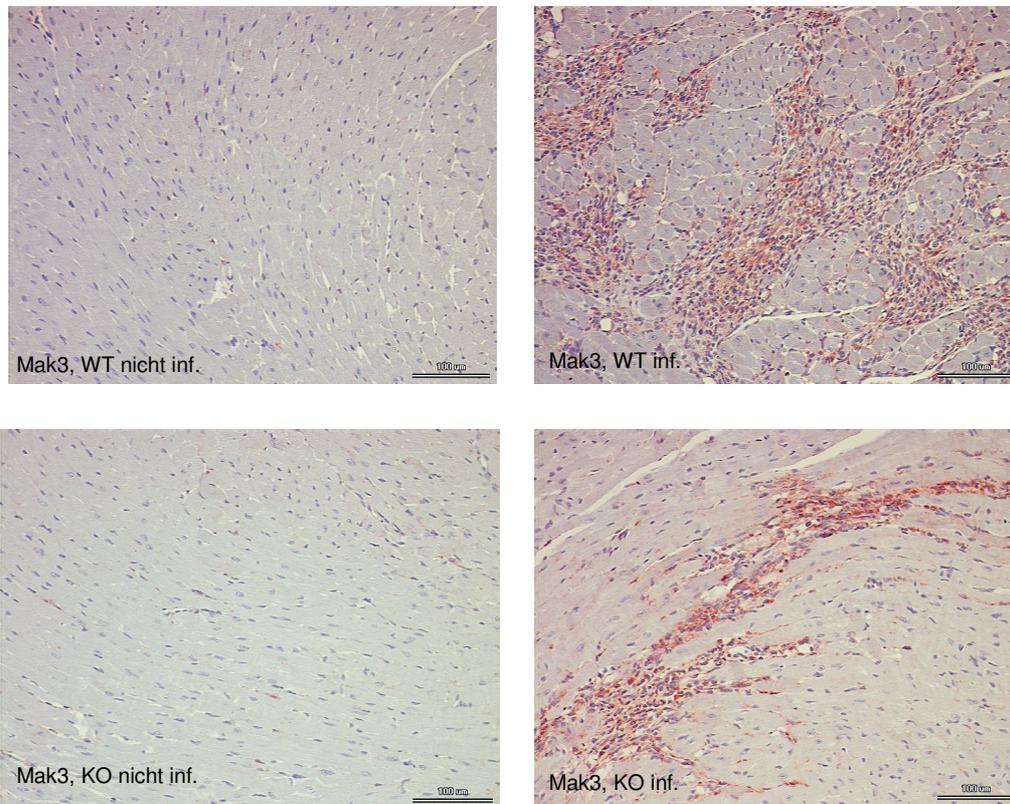


Abb. 5.13.: Immunhistochemische Mak3 Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.

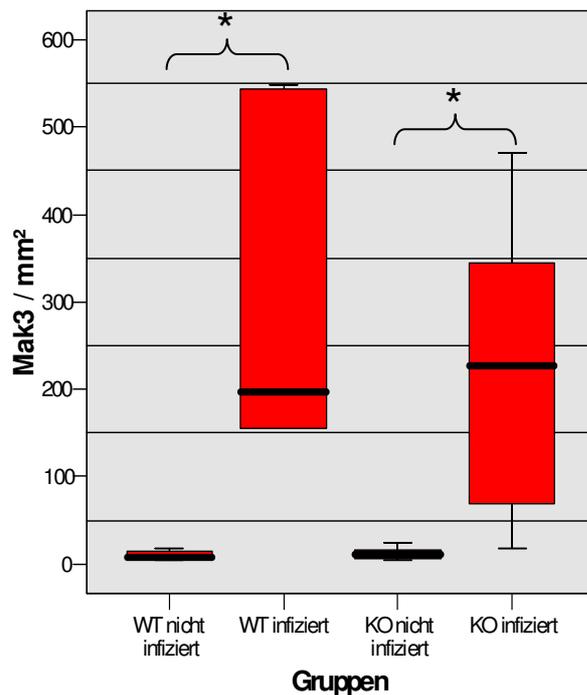


Abb. 5.14.: Mak3 positive Signale pro mm². Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.10. Matrixkomponenten

Es wurden die Matrixkomponenten Kollagen I, III und IV, Fibronectin und Laminin untersucht und eine Sirius Red Kollagenfärbung durchgeführt. Wie bereits oben beschrieben wurden die Versuchsgruppen auf Zugehörigkeit zur gleichen Wertegesamtheit im Bezug auf die jeweilige Variable mit dem H-Test getestet und anschließend einzeln mit dem M-W Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde bei $p=0,05$ angelegt. Im Falle der Kollagen I, der Fibronectin und der Laminin mRNA Expression sowie der immunhistochemischen Färbung für Kollagen III, konnte die Nullhypothese, die Gruppen entstammten derselben Grundgesamtheiten, nicht verworfen werden ($p>0,05$). Einzelvergleiche wurden dementsprechend nur für die Kollagen I Färbung, die Kollagen III PCR, die Kollagen IV PCR und die Sirius Red Färbung durchgeführt.

5.10.1. Kollagen I

Bei Durchsicht der Schnitte am Mikroskop fiel das deutlich veränderte Gewebe der infizierten Tiere auf. Unregelmäßig zerfasertes Gewebe mit gestörtem Allignment der Myozyten stand im Gegensatz zum homogen dichten Muskelgewebe der gesunden Tiere (Abb. 5.15.).

Der Anteil des signalmarkierten Gewebes (*area fraction*) der infizierten WT Mäuse war deutlich vermehrt gegenüber dem der nicht infizierten Tieren. (MW *area fraction*_{WT inf.}: 0,071 +/- 0,016; MW *area fraction*_{WT}: 0,02 +/- 0,004). Die Durchführung des M-W Tests ergab einen p-Wert von 0,016, die Nullhypothese, sowohl infizierte als auch nicht infizierte Tiere entstammten der gleichen Stichprobe, konnte also verworfen werden. Ein ähnliches Bild ergab der Vergleich zwischen den infizierten und nicht infizierten KO Mäusen: Ein signifikanter Unterschied der mittleren AF beider Gruppen konnte festgestellt werden. (MW *area fraction*_{KO inf.}: 0,11 +/- 0,027; MW *area fraction*_{KO}: 0,03 +/- 0,006; p=0,004). Differenzen zwischen beiden infizierten Versuchsgruppen ließen sich nicht zeigen. Übereinstimmungen zwischen Ergebnissen der immunhistochemischen Kollagen I Färbung und der Kollagen I mRNA Expression konnten nur tendenziell beobachtet werden. Die mRNA Expression war im Falle der infizierten WT Mäusen ebenfalls erhöht (Genexpression_{WT inf.}: 0,92 +/- 0,18; Genexpression_{WT}: 0,52 +/- 0,11), signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nicht.

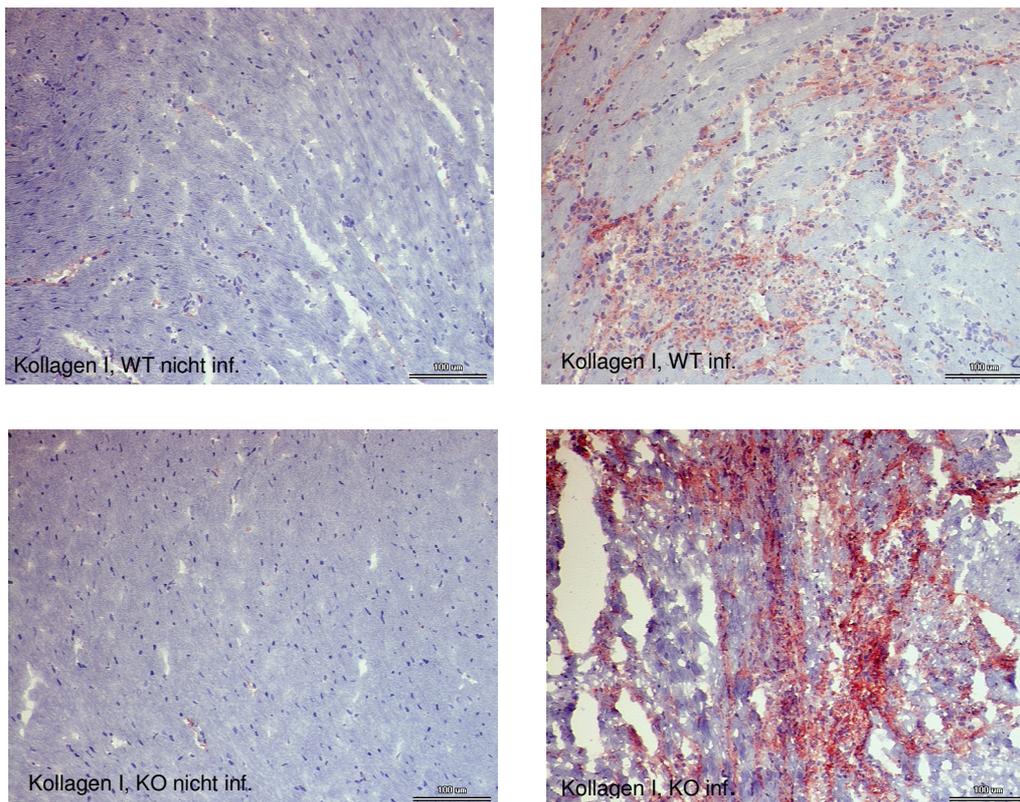


Abb. 5.15.: Immunhistochemische Kollagen I Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.

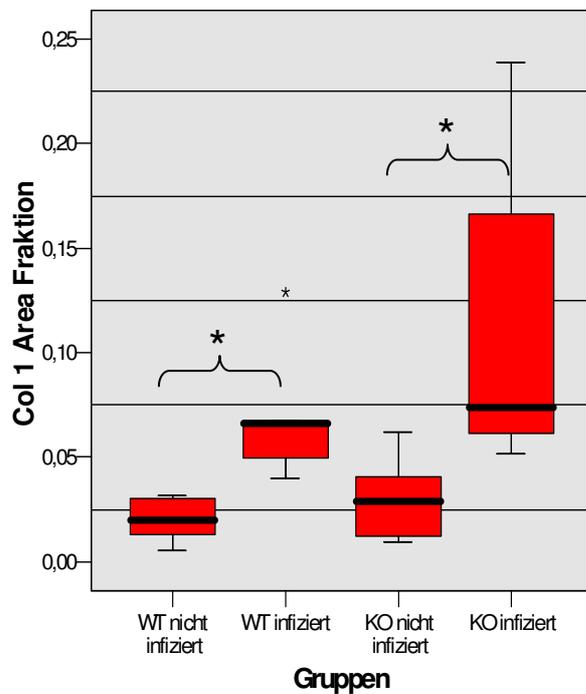


Abb. 5.16.: *Area Fraktion* Kollagen I. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.10.2. Kollagen III

Wie bei den bereits beschriebenen Färbungen, konnten auch im Fall von Kollagen III zwischen Gewebe erkrankter und nicht erkrankter Tieren am Mikroskop unterschieden werden, die Differenzen waren jedoch nicht so ausgeprägt wie im Fall der Kollagen I Färbung (Abb. 5.17.). Auch bei nicht infizierten Tieren waren die Septen zwischen den Myozyten gefärbt, erkrankte Tiere zeigten jedoch zusätzlich unterschiedlich große Infiltrate und das Gewebe stellte sich weniger homogen und dicht dar. Statistisch bedeutsam waren die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aber nicht.

Die mRNA Expression infizierter KO Tiere war im Vergleich zu den nicht infizierten Mäusen signifikant erhöht (Genexpression $_{KO\ inf.}$: 0,85 +/- 0,074; Genexpression $_{KO}$: 0,61 +/- 0,025; $p=0,024$). Auch infizierte WT Mäuse wiesen eine höhere Genexpression als ihre Kontrollgruppe auf (Genexpression $_{WT\ inf.}$: 0,75 +/- 0,086; Genexpression $_{WT}$: 0,54 +/- ,019), hier konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

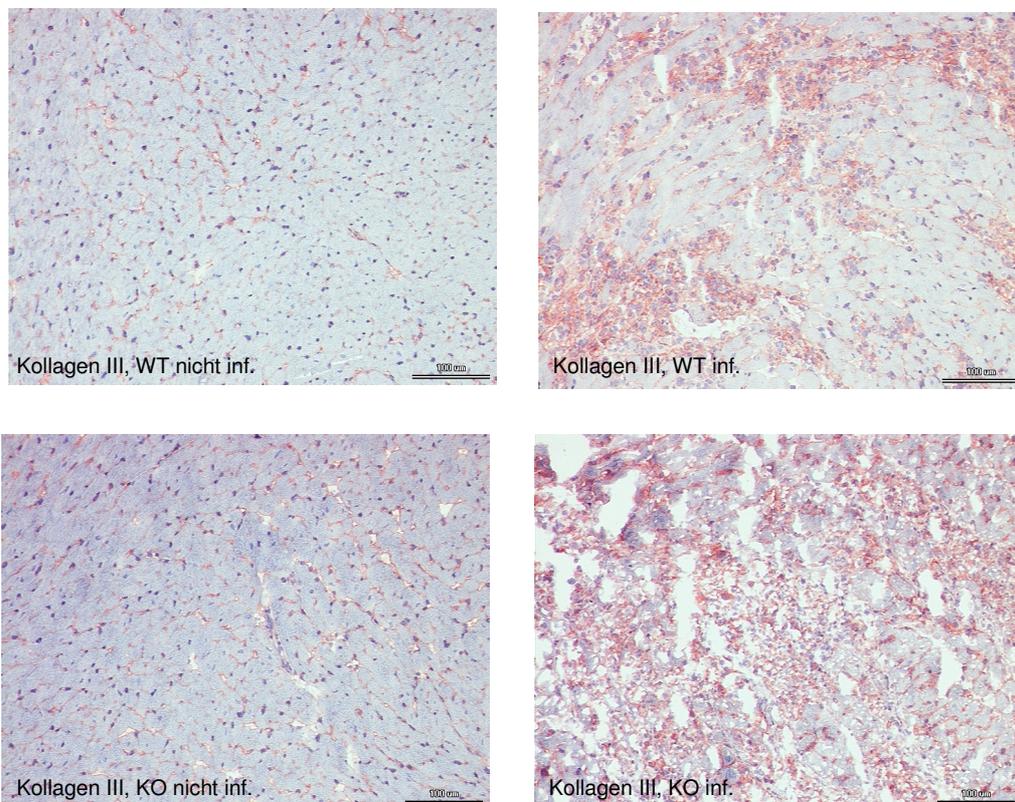


Abb. 5.17.: Immunhistochemische Kollagen III Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.

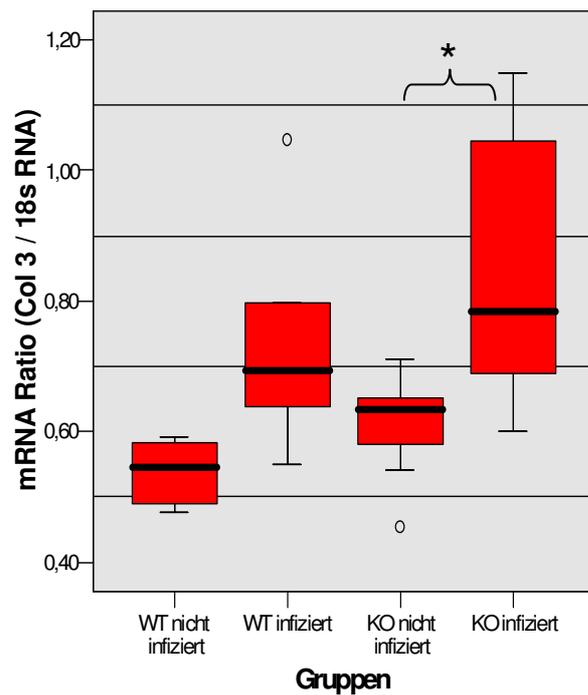


Abb. 5.18.: Kollagen III Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.10.3. Kollagen IV

Einzelvergleiche mit dem M-W Test ergaben lediglich einen signifikanten Unterschied zwischen der mRNA Expression infizierter WT und infizierter KO Mäuse ($p=0,032$). Die mittlere Genexpression infizierter WT Tiere lag bei $1,08 \pm 0,143$, die der infizierten KO Tiere bei $0,88 \pm 0,045$.

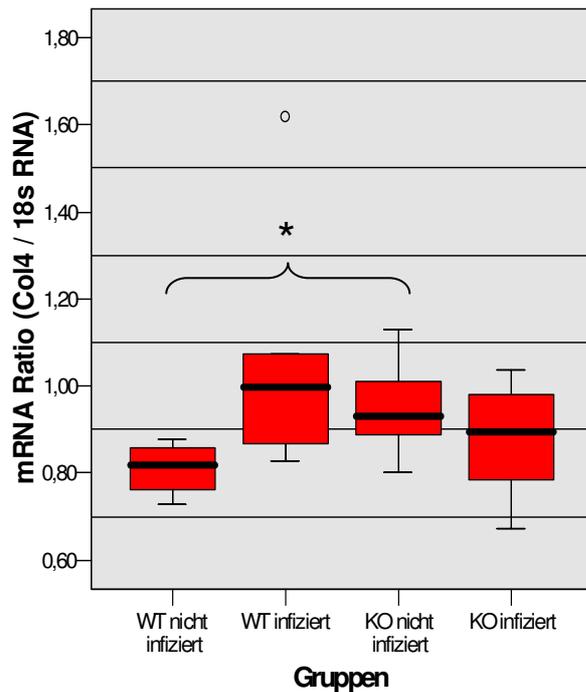


Abb. 5.19.: Kollagen IV Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.10.4. Fibronektin

Infizierte WT Mäuse zeigten eine im Vergleich zur nicht infizierten Gruppe erhöhte mRNA Expression (Genexpression $_{WT\ inf.}$: 1,01 +/- 0,15; Genexpression $_{WT}$: 0,67 +/- 0,05). Die Nullhypothese, die einzelnen Versuchsgruppen entstammten der gleichen Grundgesamtheit, konnte nach Durchführung des Mann-Whitney-Tests jedoch nicht verworfen werden ($p > 0,05$).

5.10.5. Laminin

Infizierte WT Mäuse zeigten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöhte mRNA Expression (Genexpression $_{WT\ inf.}$: 1,12 +/- 0,14; Genexpression $_{WT}$: 0,84 +/- 0,04). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

5.10.6. *Sirius Red* Färbung

Bei Betrachtung des Gewebes fielen Unterschiede zwischen infiziertem und nicht infiziertem Myokard auf: Während das Muskelgewebe kranker Tiere regelrecht von signalreichen Septen durchzogen wurde, fanden sich in gesundem Myokard lediglich einzelne punktförmige Signale in den Zellzwischenräumen (Abb. 5.20.).

Der Anteil signalreichen Gewebes war in infizierten Tieren deutlich erhöht. Die mittlere AF infizierter WT Mäuse betrug $0,003 \pm 0,00062$, die der nicht infizierten $0,0009 \pm 0,0001$. Der M-W Test zeigte, dass beide Versuchsgruppen unterschiedlichen Grundgesamtheiten entstammten ($p=0,016$; Abb. 5.21.), die Nullhypothese konnte verworfen werden. Auch der statistische Vergleich der infizierten mit der nicht infizierten KO Gruppe ergab einen signifikanten p-Wert von $p=0,004$. Die mittlere AF der infizierten Tiere war stark erhöht (MW area fraction $_{KO\ inf.}$: $0,004 \pm 0,00048$; $_{KO}$: $,0014 \pm ,00027$).

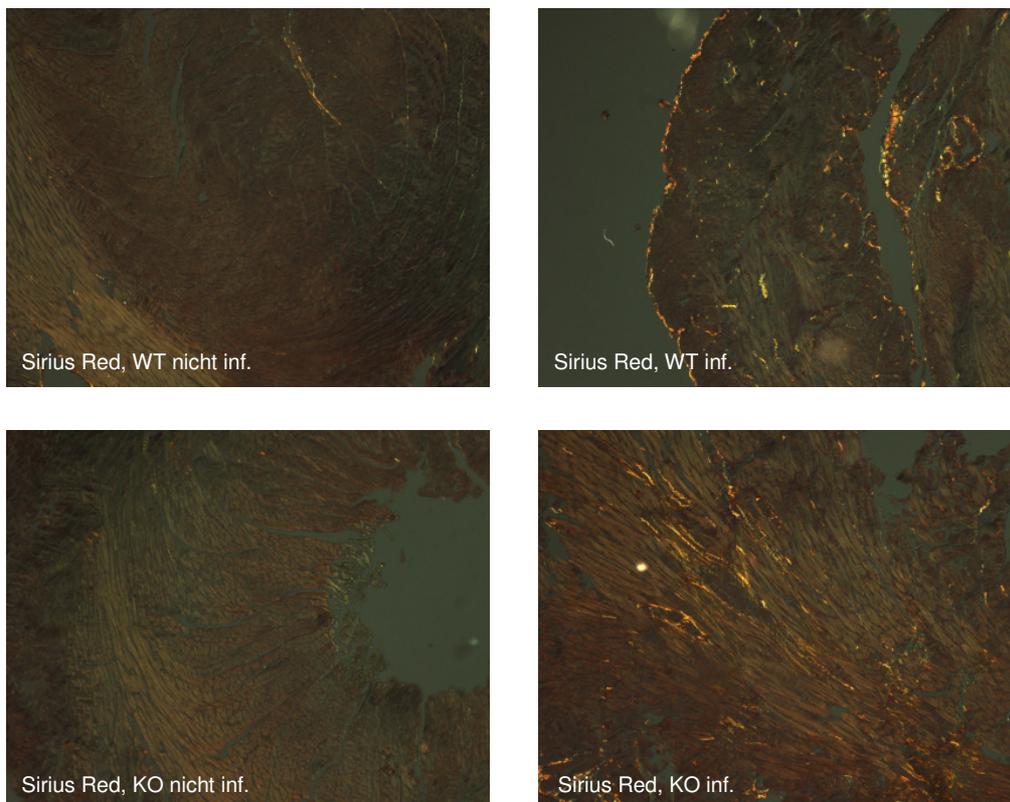


Abb. 5.20.: *Sirius Red* Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung. Die Kollagenfasern erscheinen leuchtend gelb.

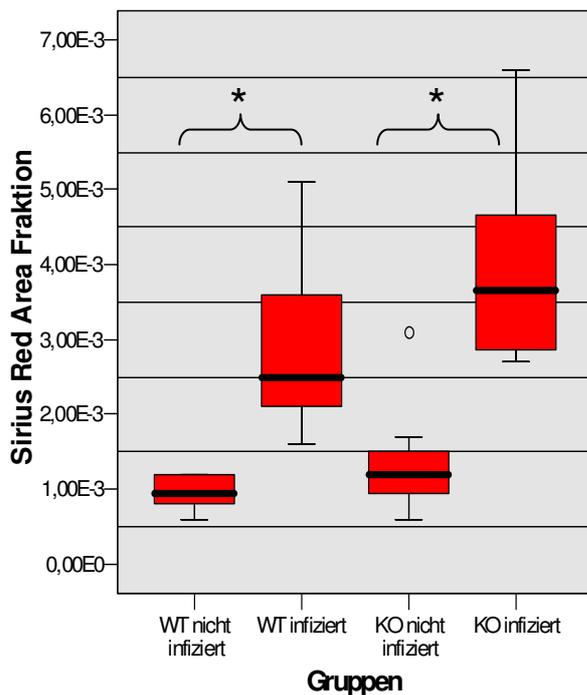


Abb. 5.21.: Anteil gefärbten Myokards mit Sirius Red (AF). Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.11. Matrixmetalloproteinasen

Mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis wurde untersucht, ob die einzelnen Versuchsgruppen im Bezug auf die jeweilige Variable derselben Wertegesamtheit angehörten. Die Nullhypothese konnte für MMP2 (Immunhistochemie $p=0,012$ und PCR $p=0,001$) MMP3 (Immunhistochemie $p=0,001$ und PCR $p=0,003$) MMP8 (*Realtime* PCR $p<0,001$) und MMP9 (Immunhistochemie $p<0,001$) abgelehnt werden. Einzelvergleiche zwischen den Gruppen wurden mithilfe des M-W Tests durchgeführt. Im Fall der *Realtime* PCR von MMP9 und 13 konnten keine Signifikanzen festgestellt werden. Einzelvergleiche blieben aus.

5.11.1. Matrixmetalloproteinase 2

Die mRNA Expression der infizierten Tiere war im Gegensatz zu den gesunden Kontrollmäusen signifikant erhöht ($p=0,016$). Die Genexpression der Gruppe WT infiziert betrug $0,96 \pm 0,12$, die des nicht infizierten Kontrollkollektivs nur $0,64 \pm$

0,02. Auch der Vergleich zwischen infizierten und nicht infizierten KO Mäusen zeigte einen signifikanten Unterschied in der Genexpression. (Genexpression_{KO inf.}: 0,79 +/- 0,1; Genexpression_{KO}: 0,56 +/- 0,03; p=0,032).

Ähnliche Unterschiede fanden sich auch bei der immunhistochemischen Färbung. Infizierte WT Mäuse wiesen im Mittel mehr Signale pro mm² auf als nicht infizierte (MW Signale/mm²_{WT inf.}: 249,12 +/- 60,47; MW Signale/mm²_{WT}: 58,07 +/- 11,52). Das Gewebe der infizierten KO Mäuse war nicht nur gegenüber der Kontrollgruppe, sondern auch im Vergleich zur Gruppe der infizierten WT Tiere signalreicher (MW Signale/mm²_{KO inf.}: 529,18 +/- 209,88; MW Signale/mm²_{KO}: 77,04 +/- 16,47). Die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Insgesamt zeigte sich gesundes Gewebe dichter und von regelmäßigerer Struktur, als das zerklüftete von Infiltraten durchzogene Gewebe der kranken Mäuse (siehe Abb. 5.23.).

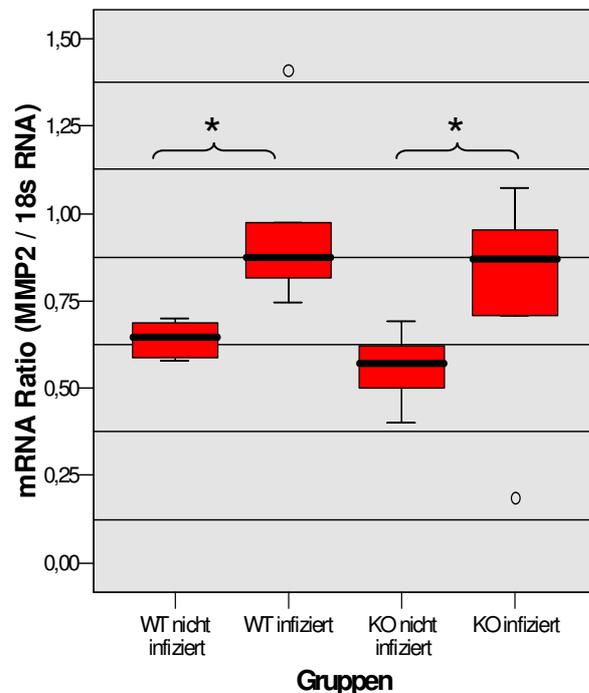


Abb. 5.22.: MMP2 Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

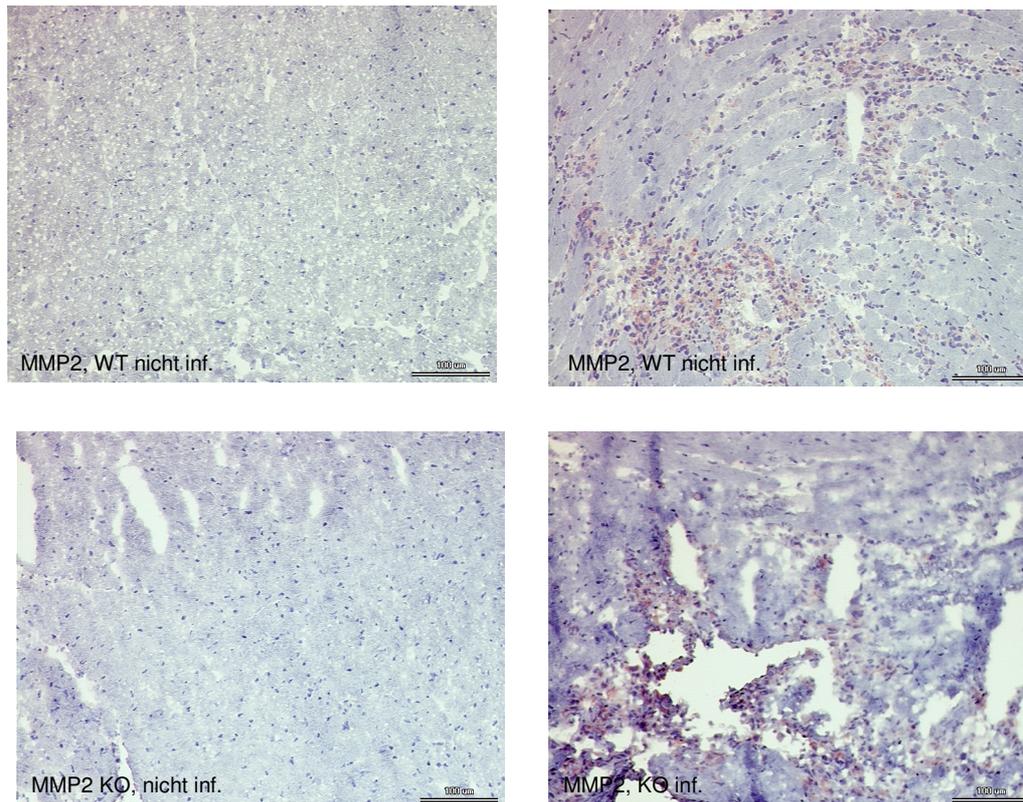


Abb. 5.23.: Immunhistochemische MMP2 Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.

5.11.2. Matrixmetalloproteinase 3

Obwohl die mRNA Expression der infizierten WT beziehungsweise KO Tiere im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren leicht erhöht war, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt werden (Genexpression_{WT inf.}: 0,89 +/- 0,05; Genexpression_{WT}: 0,66 +/- 0,06; Genexpression_{KO inf.}: 0,7 +/- 0,08; Genexpression_{KO}: 0,49 +/- 0,04).

Deutliche Unterschiede waren jedoch bei der Betrachtung der immunhistochemischen Färbung im Mikroskop zu erkennen. Das Gewebe infizierter Tiere war zerklüftet, die normale Struktur durch Infiltrate gestört. Die Muskulatur der nicht infizierten Mäuse zeigte dagegen keine Auffälligkeiten. Schnitte infizierter WT Mäuse zeigten deutlich mehr Signale pro mm² als die nicht infizierter Tiere (MW Signale/mm²_{WT inf.}: 520,68 +/- 126,97; MW Signale/mm²_{WT}: 147,15 +/- 26,09; p = 0,032). Verstärkte MMP3

Expression im Gewebe infizierter KO Tieren war nicht nur im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren zu sehen sondern auch gegenüber den infizierten WT Tieren (MW Signale/mm² KO inf.: 1093,61 +/- 388,12; MW Signale/mm² KO: 113,35 +/- 26,02). Als signifikant erwiesen sich jedoch nur die Unterschiede zwischen beiden KO Gruppen (p=0,008).

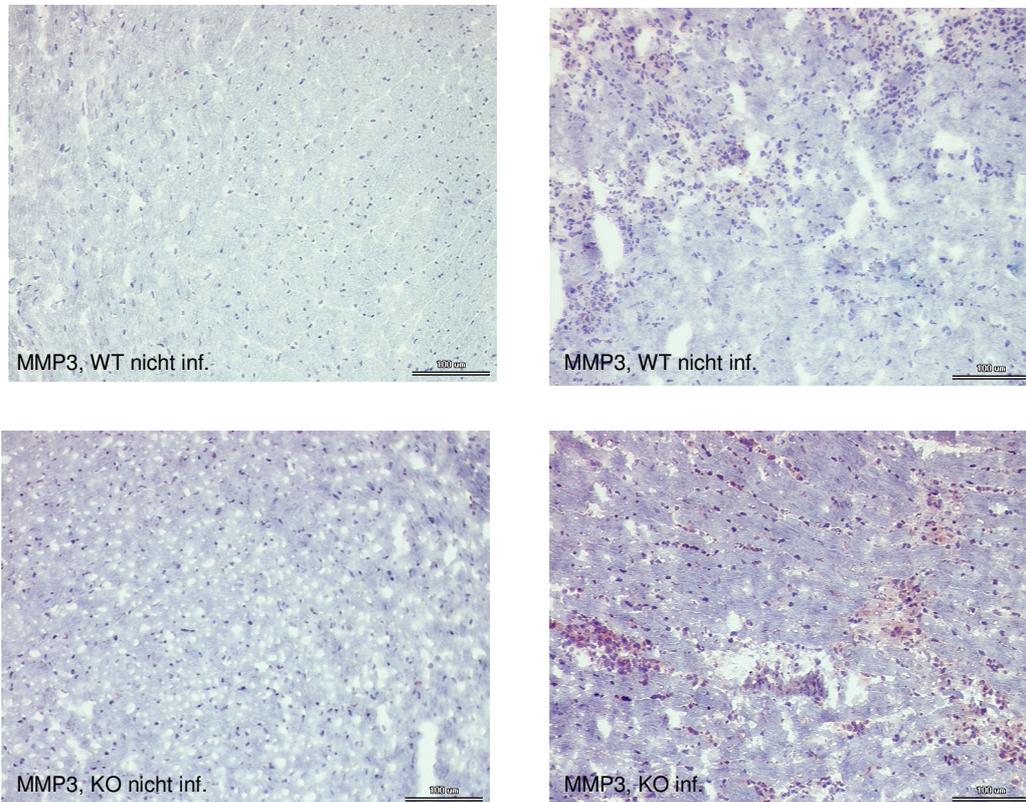


Abb. 5.24.: Immunhistochemische MMP3 Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.

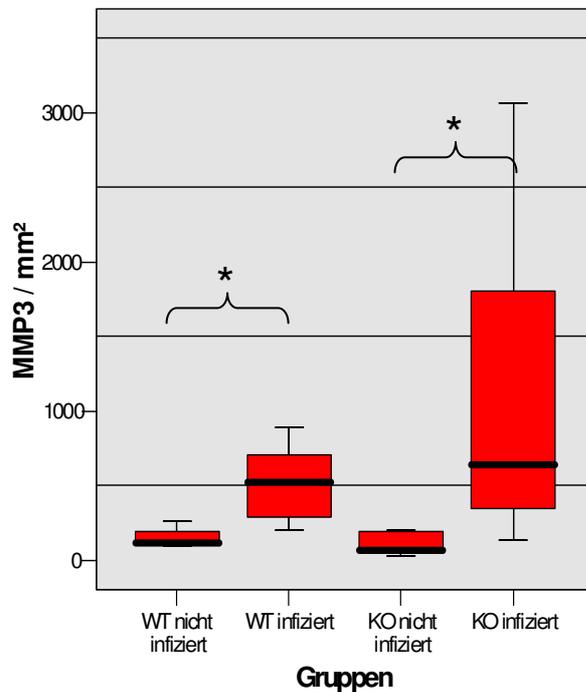


Abb. 5.25.: MMP3 positive Signale pro mm² Herzgewebe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.11.3. Matrixmetalloproteinase 8

Infizierte WT Mäuse wiesen im Vergleich zu nicht infizierten Tieren eine erhöhte mRNA Expression auf (Genexpression_{WT inf.}: $6,43E-07 \pm 1,97E-07$; Genexpression_{WT}: $6,41E-08 \pm 5,40E-09$). Der Mann-Whitney-U-Test zeigte, dass beide Versuchsgruppen unterschiedlichen Wertegesamtheiten entstammten ($p=0,016$), die Nullhypothese konnte verworfen werden. Auch die Genexpression infizierter KO Tiere war gegenüber der nicht infizierten Kontrollgruppe signifikant erhöht (Genexpression_{KO inf.}: $8,46E-07 \pm 2,12E-07$; Genexpression_{KO}: $3,4E-08 \pm 1,75E-09$; $p < 0,001$).

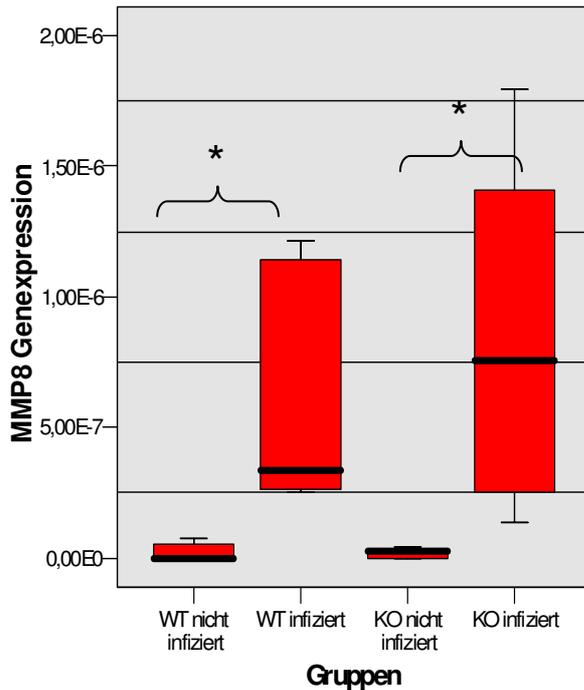


Abb. 5.26.: MMP8 Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.11.4. Matrixmetalloproteinase 9

Die Gewebepreparate ließen unter dem Mikroskop deutliche Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Mäusen erkennen. Gewebe nicht infizierter Tiere zeigte Signale ausschließlich zwischen den Zellen, das Gewebe stellte sich kompakt und homogen dar. In Präparaten infizierter Tiere wurde die gesunde Muskulatur teils großflächig verdrängt. Die Infiltrate zeigten deutliche MMP9 Expression. Die Schnitte wirkten unruhig und das Gewebe zerfasert (siehe Abb. 5.27.).

In infizierten WT Mäusen war ein deutlich größerer Gewebeanteil (AF) signalgebend als in den nicht infizierten Tieren (MW Signale/mm² WT inf.: 0,12 +/- 0,02; MW Signale/mm² WT: 0,03 +/- 0,002; p=0,016). Nach Durchführung des M-W Tests konnte die Nullhypothese, die Versuchsgruppen gehörten gleichen Grundgesamtheiten an, verworfen werden. Auch in infizierten KO Mäusen fand sich ein größerer Anteil an markiertem Gewebe als in der Kontrollgruppe (MW Signale/mm² KO inf.: 0,16 +/- 0,03; MW Signale/mm² KO: 0,04 +/- 0,008; p=0,004; siehe Abb. 6.28.)

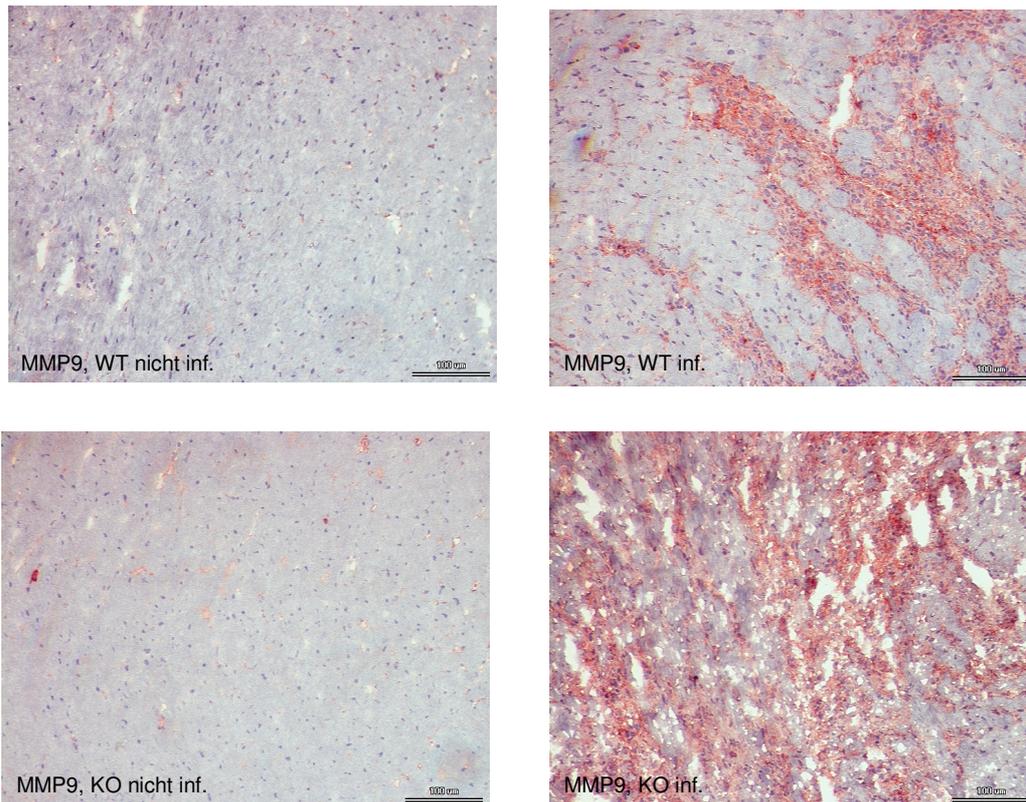


Abb. 5.27.: Immunhistochemische MMP9 Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung. MMP9 exprimierendes Gewebe ist leuchtend rot gefärbt.

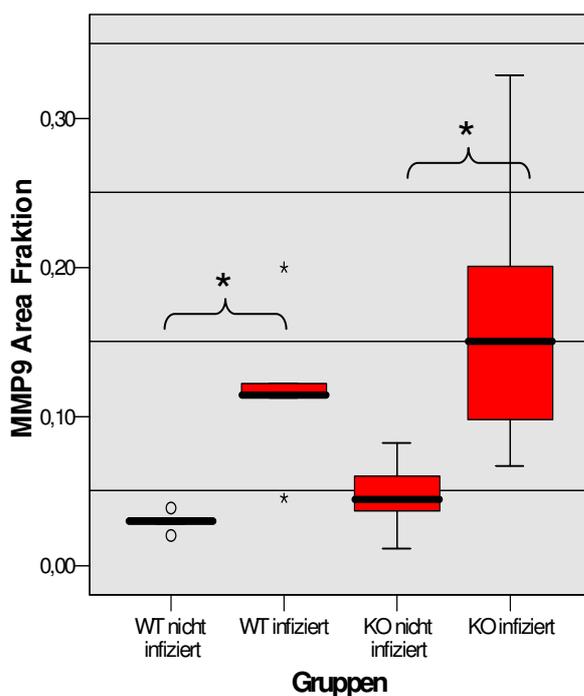


Abb. 5.28.: Anteil des MMP9 markiertem Gewebe an nicht gefärbtem Myokard (AF). Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.12. *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: TIMPs*

Der H-Test nach Kruskal und Walli zeigte, dass alle Wertegruppen unterschiedlichen Grundgesamtheiten entstammten (TIMP1 PCR: $p < 0,001$; TIMP1 Immunhistochemie: $p = 0,003$; TIMP2 PCR: $p = 0,015$; TIMP 3 PCR: $p = 0,046$; TIMP4 Immunhistochemie: $p = 0,011$). Einzig im Falle der TIMP4 mRNA Expression durfte die Nullhypothese nicht verworfen werden. In den übrigen Fällen wurden Einzelvergleiche durchgeführt.

5.12.1. TIMP1

Signifikante Unterschiede konnten zwischen den infizierten und nicht infizierten WT Mäusen ($p = 0,016$), den infizierten und nicht infizierten KO Mäusen ($p = 0,004$) und den nicht infizierten WT und KO Tieren gefunden werden ($p = 0,004$) (Abb. 5.29.). Die mRNA Expression der infizierten Versuchstiere war gegenüber den nicht infizierten erhöht. Die KO Mäuse wiesen eine stärkere Genexpression als die WT Tiere auf. (mRNA Expression $_{WT\ inf.}$: $0,85 \pm 0,1$; mRNA Expression $_{WT}$: $0,34 \pm 0,007$; mRNA Expression $_{KO\ inf.}$: $0,77 \pm 0,09$; mRNA Expression $_{KO}$: $0,42 \pm 0,022$);).

Tendenziell gleichgerichtete Unterschiede ergaben sich nach Auswertung der immunhistochemischen Färbung (Abb. 5.30. und 5.31.). Die Präparate zeigten eine verstärkte TIMP1 Expression der infizierten KO Tiere gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,032$). Der Anteil des signalmarkierten Gewebes war im Falle der infizierten WT Mäuse in Gegenüberstellung mit den Kontrolltieren erhöht, der Unterschied jedoch nicht signifikant (MW AF $_{WT\ inf.}$: $0,02 \pm 0,003$; MW AF $_{WT}$: $0,008 \pm 0,002$; MW AF $_{KO\ inf.}$: $0,07 \pm 0,02$; MW AF $_{KO}$: $0,02 \pm 0,006$). Auch die Gegenüberstellung infizierter KO und WT Tiere ergab trotz einer verstärkten TIMP1 Expression im Gewebe der KO Tiere keinen signifikanten Unterschied.

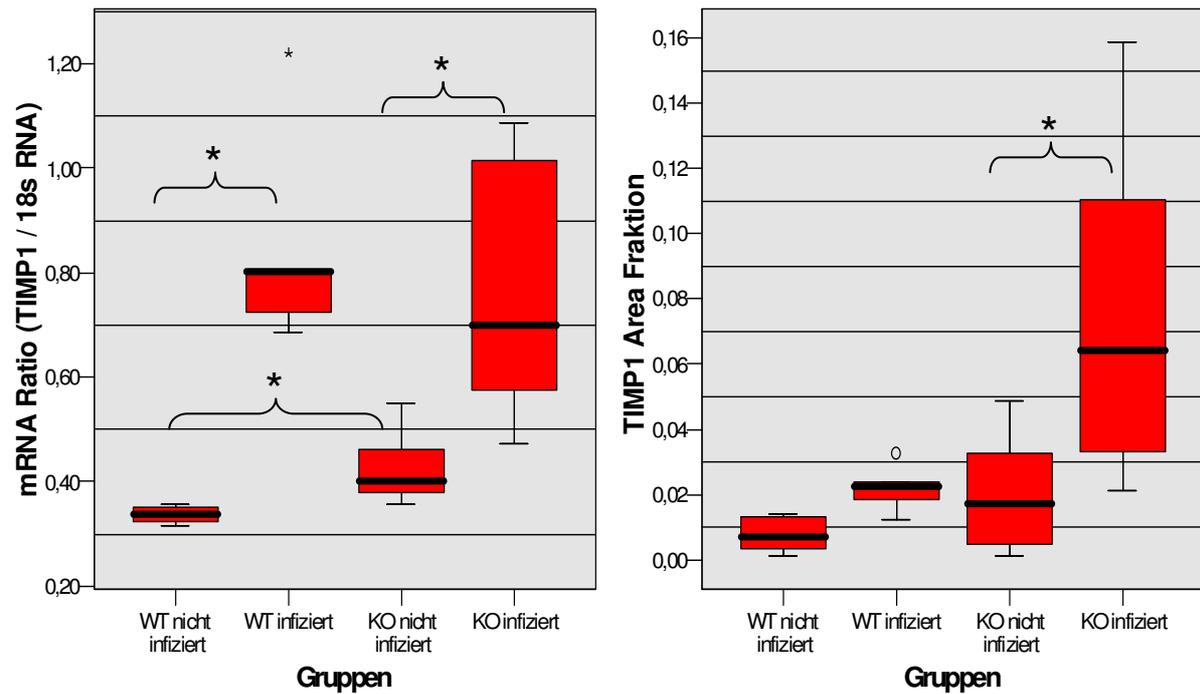


Abb. 5.29. und 5.30.: TIMP1 Genexpression und Anteil TIMP1 gefärbten Gewebes (AF). Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

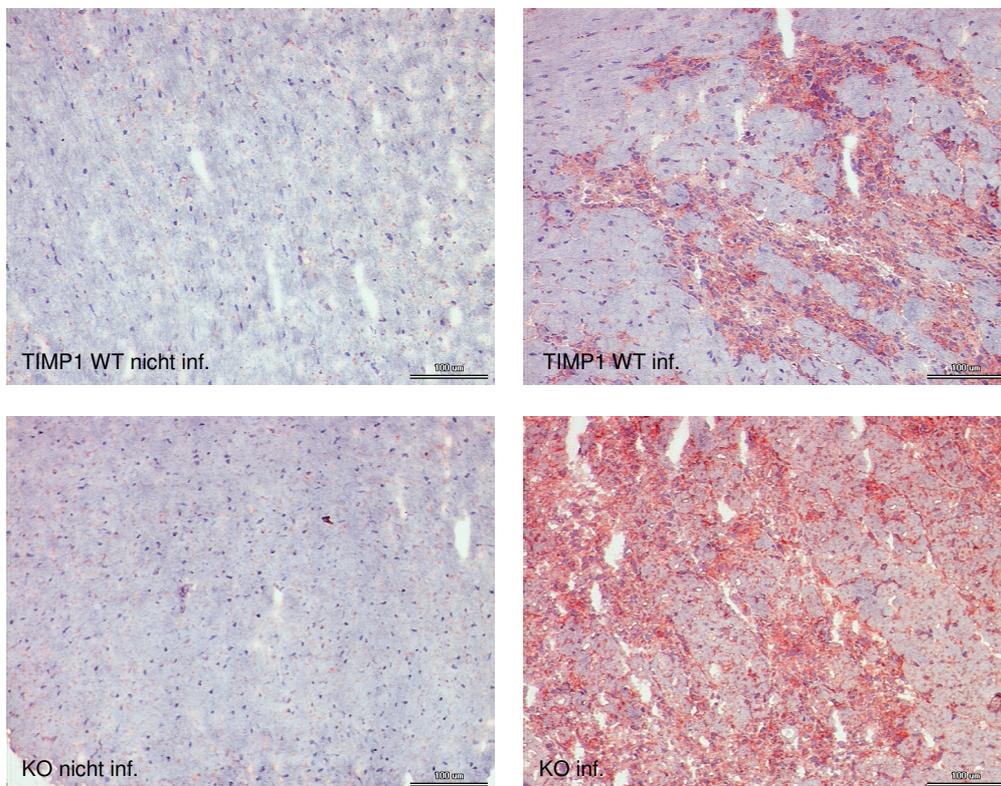


Abb. 5.31.: Immunhistochemische TIMP1 Färbung. Deutliche Unterschiede sind zwischen infizierten und nicht infizierten Mäusen erkennbar.

5.12.2. TIMP2

Es konnten keine signifikanten Unterschiede der TIMP2 mRNA Expression gefunden werden. Die mittlere Genexpression der infizierten WT Tiere waren jedoch gegenüber der nicht infizierten erhöht (Genexpression $_{WT\ inf.}$: 1,04 +/- 0,11; Genexpression $_{WT}$: 0,72 +/- 0,04).

5.12.3. TIMP3

Die Nullhypothese musste im Fall der TIMP3 mRNA Expression beibehalten werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht zu finden. Die mittlere Genexpression der infizierten Tiere gegenüber den Kontrolltieren und der infizierten WT Mäusen im Vergleich zu den KO Mäusen war jedoch erhöht (Genexpression $_{WT\ inf.}$: 0,93 +/- 0,10; Genexpression $_{WT}$: 0,71 +/- 0,04; Genexpression $_{KO\ inf.}$: 0,73 +/- 0,14; Genexpression $_{KO}$: 0,53 +/- 0,05).

5.12.4. TIMP4

Schnitte infizierter KO Mäuse zeigte einen signifikant größeren Anteil an signalmarkiertem Gewebe als nicht infizierte Tiere (MW AF $_{KO\ inf.}$: 0,04 +/- 0,02; MW AF $_{KO}$: 0,007 +/- 0,001; $p=0,024$). Die Nullhypothese durfte verworfen werden (Abb. 5.32.).

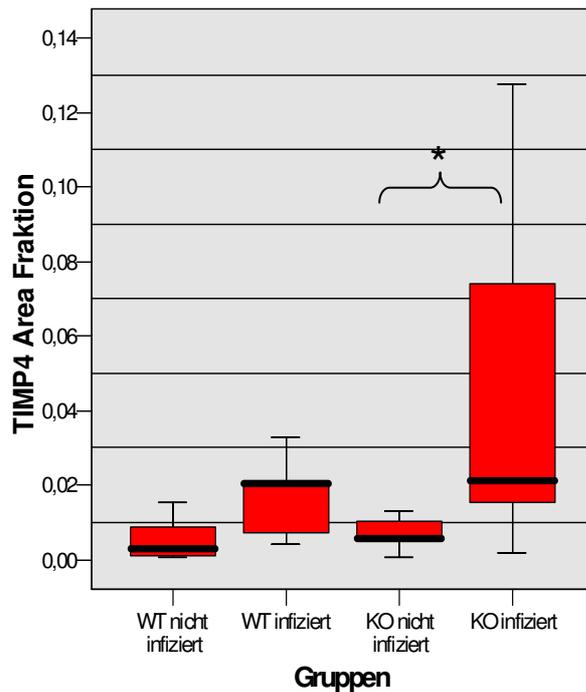


Abb. 5.32.: Mittlere AF der Unterschiedlichen Versuchsgruppen bei immunhistochemischer TIMP4 Färbung. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet

5.13. Regulatoren der MMP / TIMP Homöostase

Die mRNA Expression der Gene EMMPRIN, uPA und PAI wurden untersucht. Die Nullhypothese, ob die Wertegruppen denselben Grundgesamtheiten entstammten, wurde mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis geprüft. Sie musste im Fall von EMMPRIN beibehalten werden. Signifikante p-Werte ergaben sich für PAI ($p=0,017$) und uPA ($p=0,002$). Einzelvergleiche wurden mit dem M-W Test durchgeführt.

5.13.1. Plasminogen Activator Inhibitor

Signifikante Unterschiede fanden sich beim Vergleich der beiden nicht infizierten Gruppen der WT und KO Mäuse (Abb. 5.33.). Die mRNA Expression der WT Tiere war im Vergleich zu den KO Mäusen deutlich erhöht. (Genexpression_{WT}: $0,73 \pm 0,02$; Genexpression_{KO}: $0,47 \pm 0,03$; $p < 0,001$).

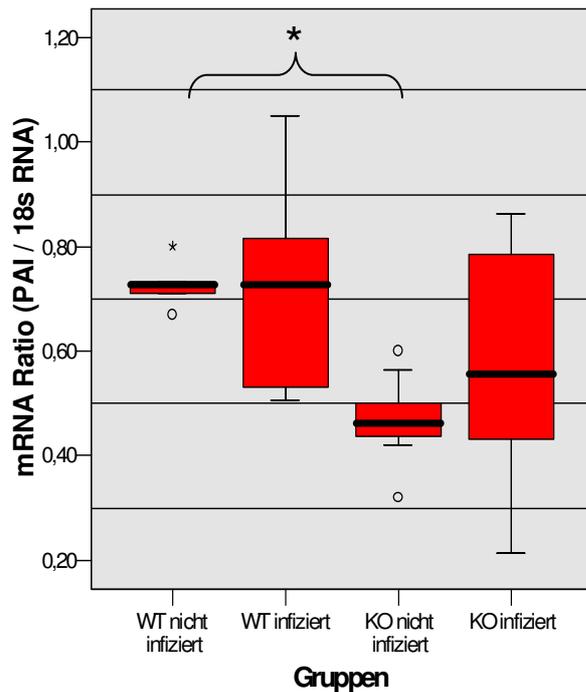


Abb. 5.33.: PAI Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.13.2. Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator

Die mRNA Expression von uPA im Myokard der infizierten WT Tiere war im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren leicht erhöht (Genexpression_{WT inf.}: $0,99 \pm 0,18$; Genexpression_{WT}: $0,65 \pm 0,05$). Auch bei den infizierten KO Mäusen konnte ein Anstieg der mRNA Expression beobachtet werden (Genexpression_{KO inf.}: $0,62 \pm 0,06$; Genexpression_{KO}: $0,42 \pm 0,04$). Die Nullhypothese durfte jedoch nach Durchführung des M-W Tests nicht verworfen werden, ermittelte p-Werte lagen über dem festgelegten Signifikanzniveau. Ein signifikanter Unterschied fand sich beim Vergleich nicht infizierte WT und KO Mäuse ($p=0,048$) (siehe Abb. 5.34.).

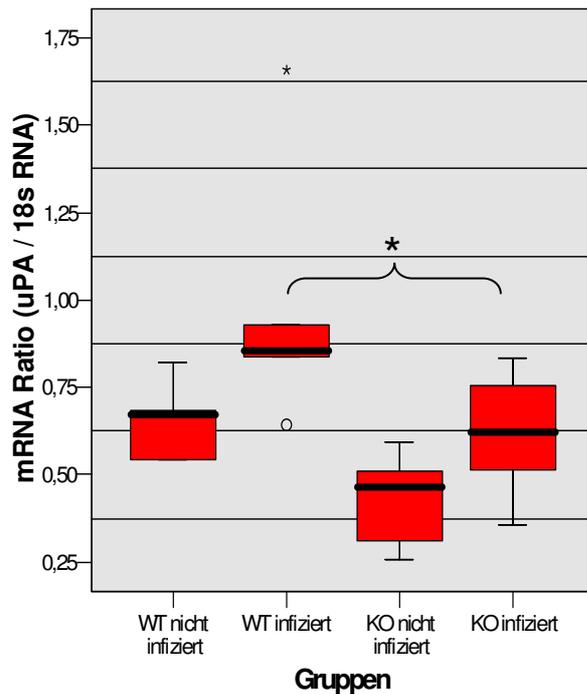


Abb. 5.34.: uPA Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.14. Apoptose

Die vier Wertegruppen der Variablen Bax, Bcl und der immunhistochemischen TUNEL Färbung wurden mit Hilfe des H-Tests nach Kruskal und Wallis auf Zugehörigkeit zur selben Grundgesamtheit getestet. In allen drei Fällen konnte die Nullhypothese verworfen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ergaben sich für alle drei Größen (Bax: $p=0,028$; Bcl: $p=0,019$; TUNEL: $p<0,001$).

5.14.1. Bax

Signifikante Unterschiede der mRNA Expression des proapoptotischen Gens Bax wurden zwischen infizierten und nicht infizierte KO Mäusen gefunden ($p=0,044$). Die Genexpression infizierter Tiere betrug $7,4649E-05 \pm 5,8445E-06$, die der nicht infizierten Tiere $4,9946E-05 \pm 4,9429E-06$. Auch infizierte WT Tiere exprimierten

vermehrt Bax, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Genexpression $_{WT\ inf.}$: $7,12221E-05 \pm 1,4178E-05$; Genexpression $_{WT}$: $4,48128E-05 \pm 2,0706E-06$).

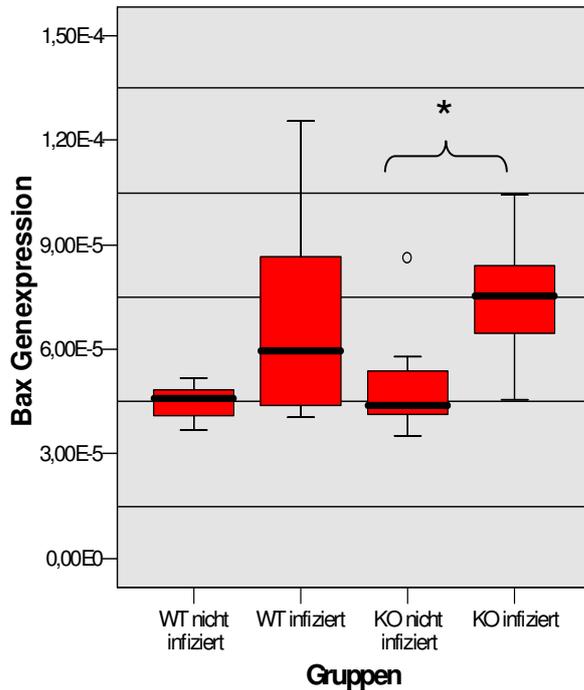


Abb. 5.35.: Bax Genexpression. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.14.2. Bcl

Die mittlere mRNA Expression war bei den infizierten KO Mäusen gegenüber den WT Tieren erhöht (MW Genexpression $_{KO\ inf.}$: $1,90147E-05 \pm 1,822E-06$; MW Genexpression $_{WT\ inf.}$: $1,25885E-05 \pm 1,6805E-06$). Infizierte KO Mäuse zeigten auch gegenüber der Kontrollgruppe gesteigerte Genexpression (MW Genexpression $_{KO\ inf.}$: $1,90147E-05 \pm 1,822E-06$; MW Genexpression $_{KO}$: $1,1431E-05 \pm 1,1449E-06$). Der M-W Test ergab jedoch in keinem der beiden Fälle einen signifikanten Unterschied, die Nullhypothese musste beibehalten werden.

5.14.3. Immunhistochemische TUNEL Färbung

Einzelvergleiche zwischen den Versuchsgruppen ergaben signifikante Unterschiede zwischen den infizierten WT Mäusen und ihren Kontrolltieren sowie den infizierten und nicht infizierten KO Mäusen ($p=0,004$). Das Gewebe infizierter WT Tiere war signalreicher, als das nicht infizierter Mäuse (MW Signale/mm² WT inf.: 16,62 +/- 6,75; MW Signale/mm² WT: 0,18 +/- 0,07; $p=0,016$), infizierte KO Tiere zeigten 5,7230 +/- 1,94389 Signale pro mm², nicht infizierte nur 0,14 +/- 0,06. Der beobachtete Unterschied zwischen infizierten WT und KO Tieren erwies sich als nicht signifikant.

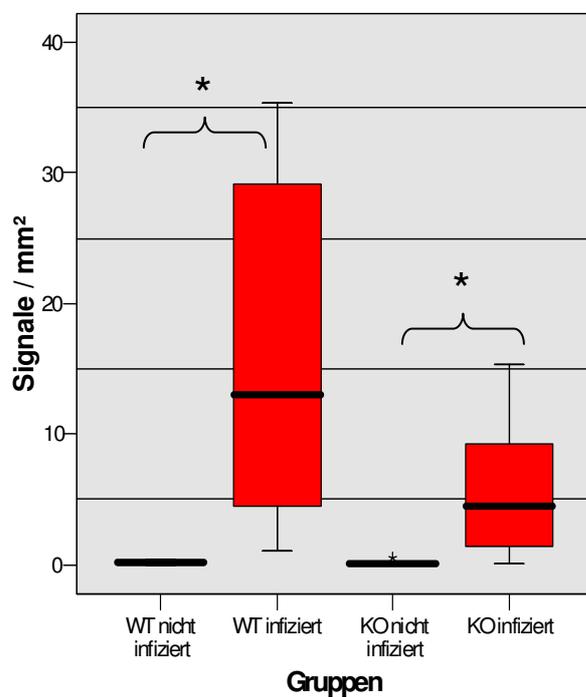


Abb. 5.36.: TUNEL Färbung, Signale pro mm². Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

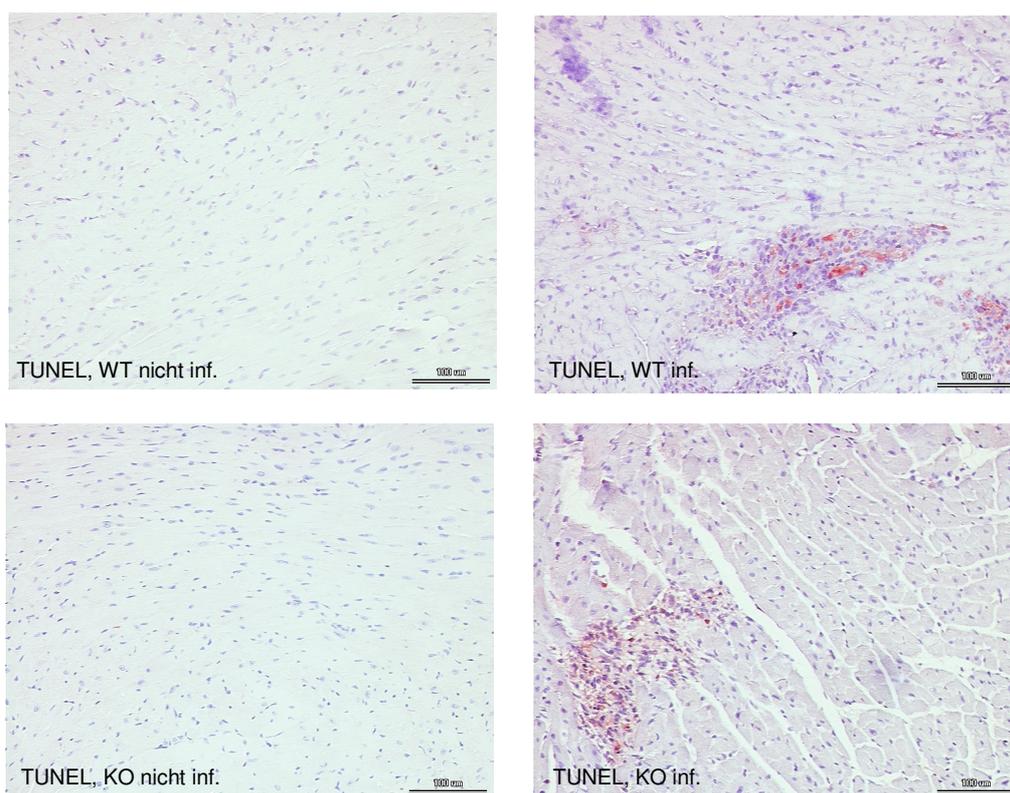


Abb. 5.37.: Apoptose Nachweis mittels TUNEL Assay. Apoptotische Zellen sind rot markiert.

6. Diskussion

Der genaue Pathomechanismus der Coxsackievirus B3 induzierten Myokarditis ist nach wie vor nicht ausreichend verstanden, nicht alle Faktoren, die den Krankheitsverlauf beeinflussen sind hinreichend erforscht. Der kardioprotektive Einfluss des Transkriptionsfaktors *Signal Transducer and Activator of Transkription 3* ist in zahlreichen Studien und unterschiedlichsten experimentellen Settings belegt worden [81], [88], [89], [86], Erkenntnisse über die Wirkung von STAT3 im Rahmen einer CVB3 induzierten Herzmuskelentzündung liegen jedoch nicht vor. Ob der JAK/STAT Signalweg aufgrund seiner kardioprotektiven Eigenschaften einen Angriffspunkt für eventuelle Therapien von Herzerkrankungen bietet ist nur unzureichend geklärt. Der Pathomechanismus der CVB3 induzierten Myokarditis und die Auswirkungen eines herzspezifischen STAT3 *Knock outs* während der subakuten Phase der Erkrankung sind in dieser Arbeit an einem Mausmodell untersucht worden. Die Ergebnisse sollen in folgendem Kapitel diskutiert und mit der aktuellen Literatur verglichen werden.

6.1. Krankheitsverlauf und Mortalität

Der Ausbruch der Erkrankung war den mit Coxsackieviren infizierten Mäusen deutlich anzumerken. Geringer Spieltrieb, verminderte Nahrungsaufnahme und ungepflegtes struppiges Fell fielen auf. Um die Schwere einer Erkrankung zu objektivieren, wird häufig die Mortalität bestimmt. Literaturangaben zu Sterberaten bei Mäusen mit Myokarditis sind jedoch nur schwer zu vergleichen, da viele unterschiedliche Parameter den Krankheitsverlauf beeinflussen. So ist die Mortalität abhängig vom Mausstamm [92], [93], vom infizierenden Virus [94], der im Experiment verwendeten Viruskonzentration [95], [92], und vom Alter der Versuchstiere [96]. Auch im Fall von STAT3 *Knock out* Mäusen sind die Versuchsanordnungen zu unterschiedlich, um sinnvolle Vergleiche ziehen zu können: Während Tiere mit einem universellen *Knock out* nicht lebensfähig sind und bereits intrauterin versterben [81], zeigen Mäuse mit herzspezifischem *Knock out* bis zum sechsten Lebensmonat keine Auffälligkeiten im Phänotyp [81]. Höhere Sterberaten sind bei KO Mäusen im

Vergleich zu Kontrolltieren erst ab dem 9 Monat zu beobachten [88]. Hilfiker *et al.* zeigten jedoch, dass sechs Monate alte STAT3 KO Mäuse bei experimentellem Myokardinfarkt deutlich höhere Mortalität aufwiesen als WT Mäuse [88]. Signifikante Unterschiede der Sterblichkeit zwischen infizierten Wildtyp und *Knock out* Mäusen konnten in dieser Studie nicht festgestellt werden. In beiden Versuchsgruppen starben jeweils zwei Tiere vor Ablauf der Zehntagesfrist. Demgegenüber überlebten alle Tiere der Kontrollgruppen.

6.2. Körpergewicht und Herzgewicht

Während beim Mensch sowohl Gewichtszunahme im Rahmen einer Herzinsuffizienz durch Flüssigkeitseinlagerungen (Aszites), als auch ein mit kardialer Kachexie bezeichneter Gewichtsverlust beschrieben ist [97], sind Literaturangaben im Bezug auf Gewichtsverlust bei BALB/c Mäusen mit CVB3 induzierter Myokarditis eindeutig. Wang und Kim wiesen einhellig auf einen Gewichtsverlust infizierter Tiere in der akuten und subakuten Phase der Erkrankung hin (Tag 3 und 8 p.i.) [98], [95], [99]. Anders beim Herzgewicht: Während Nakamura *et al.* eine Zunahme des Herzgewichts nach wiederholter CVB3 Infektion beschrieben [100], fanden sowohl Kanada als auch Li einen leichten Gewichtsverlust bei Mauserherzen nach zehntägiger viraler Myokarditis (Kanada, [99]). Woodruff *et al.* berichtet von einer Zunahme des Herzgewichts beim Mensch nach subakuter und chronischer Myokarditis [7].

Daten zu Körpergewichtsänderungen bei STAT3 KO Mäusen liegen nicht vor, eine kardiale Überexpression von STAT3 in 12 Wochen alten Mäusen führt jedoch zu einer Hypertrophie des Herzmuskels und ließe eine Zunahme des Organgewichts erwarten [101]. Jacoby *et al.* konnten bei myozytenspezifischen STAT3 *Knock out* Mäusen jedoch erst 9 Monate nach Geburt eine Änderung des Phänotyps feststellen [81]. Eine Abnahme der Herzmuskelmasse wäre dementsprechend bei unseren Versuchstieren nicht zu erwarten.

Der in der Literatur beschriebene Gewichtsverlust CVB3-infizierter Mäuse konnte in unserer Studie nachvollzogen werden. Sowohl infizierte WT als auch KO Mäuse unterschieden sich signifikant von ihren nicht infizierten Kontrollgruppen. Die beobachtete Gewichtsabnahme erkrankter Mäuse ist am wahrscheinlichsten auf ihre verminderte Nahrungsaufnahme zurückzuführen. Keine Gewichtsunterschiede

fanden sich jedoch beim Vergleich der infizierten WT und KO Gruppen. Auch beim Vergleich des Herzgewichtes konnte zwischen keiner der vier Gruppen ein Unterschied festgestellt werden. Ein Ergebnis, welches angesichts des Alters der verwendeten Tiere nicht überrascht. Erst bei Älteren KO Tieren sind phänotypische Veränderungen beschrieben [81].

6.3. Echokardiographie

Um morphologische Veränderungen des Herzens, die durch die Virusinfektion beziehungsweise den STAT3 *Knock out* verursacht wurden, zu erkennen, wurde der Durchmesser des linken Ventrikel in Systole (LVIDs) und Diastole (LVIDd), die Dicke des Kammerseptums und der Hinterwand ebenfalls in Systole (IVSs, bzw. PWs) und Diastole (IVSd bzw. PWd) und die Verkürzungsfraction (FS) als Maß für die Kontraktilität des Herzens im Rahmen einer echokardiographischen Untersuchung bestimmt. Referenzwerte für Wanddicken und Durchmesser der Herzkammern sind bisher nur bei CD1 Mäusen vom *Swiss-Type* ermittelt worden [102]. Ein Vergleich der Werte ist hier aber wenig sinnvoll, da ein anderer Mausstamm in unserer Studie verwendet wurde. Heymans *et al.* verglichen die Herzgeometrie (LVIDs, LVIDd, IVS, PW, FS) bei CVB3 infizierten C57BL Mäusen mit gesunden Kontrolltieren und fanden in den ersten zwei Wochen *post infectionem* keine Veränderungen an Herzen erkrankter Tiere. Eine Zunahme des Kammerinnendurchmessers und eine Abnahme der FS konnte erst 35 Tage nach Virusinfektion beobachtet werden [103].

Eine Änderung der hämodynamischen Parameter bei STAT3 KO Mäusen fand sich erst bei älteren Tieren. Jacoby *et al.* konnten erst bei 200 Tage alten Versuchstieren eine verminderte Verkürzungsfraction (FS) nachweisen [81]. Analog dazu stellten Hilfiker und Kollegen keine Unterschiede zwischen 12 Wochen alten WT und KO Tieren im Bezug auf LVIDs, LVIDd und FS fest [88].

Auch in dieser Arbeit ergab ein Vergleich der einzelnen Versuchgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten WT Mäusen beziehungsweise infizierten WT und KO Tieren. Sowohl KO als auch WT Mäuse waren bei Versuchsbeginn erst sechs Wochen alt und wurden bereits zehn Tage nach Infektion geopfert. Die in der Literatur beschriebenen Veränderungen wurden jedoch erst bei älteren *Knock out* Mäusen beziehungsweise längerer Infektionsdauer

gefunden. Insofern war eine Änderung der Kammerdurchmesser und der Kontraktilität nicht zu erwarten.

6.4. Subakute Entzündung: Infiltration und Zytokinantwort

Die subakute Phase der Coxsackievirus B3 induzierten Myokarditis wird von der Infiltration von T-Zellen und Makrophagen ins Herz sowie der Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine bestimmt. Bereits in den ersten drei Tagen nach Infektion mit CVB3 und Encephalomyelitis Viren (ECMV) werden proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 β , IFN γ und IL-6 von Myozyten, herzeigenen Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen produziert [104], [36], [32]. Seko *et al.* konnten jedoch zeigen, dass nach der schwächeren initialen Zytokinantwort ein massiver Anstieg der proinflammatorischen Entzündungsmediatoren (TNF α , IFN γ , IL-1 β) folgte, der mit der Infiltration von Entzündungszellen ins Herz korrelierte [104]. Auch die Induktion des antiinflammatorischen IL-10 ab Tag 7 nach Infektion war dem Auftreten von infiltrierenden Zellen geschuldet [104]. Die übermäßige Zytokinausschüttung und die damit einhergehende Infiltration durch T-Zellen tragen jedoch nicht nur zur Viruselimination bei, sondern schädigen irreversibel das Herz. [27]: Matsumori *et al.* zeigten, dass die Behandlung von ECMV infizierten Mäusen mit TNF α stärkere Herzmuskelnekrosen zur Folge hatte, der Einsatz von Anti-TNF α Antikörpern den Krankheitsverlauf dagegen verzögerte. Ein zytotoxischer Effekt von IL-1 β , IFN γ und TNF α auf Rattenmyozyten konnte von derselben Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [32]. Auch im Fall von IL-6 lässt sich sowohl ein positiver als auch negativer Effekt auf den Krankheitsverlauf in Abhängigkeit vom Ausmaß der IL-6 Sekretion zeigen: Während niedrige IL-6 Titer die Viruselimination fördern, tragen hohe zur Verschlimmerung der Herzmuskelentzündung bei [105]. Im Gegensatz zu den proinflammatorischen Zytokinen wirkt das antiinflammatorische IL-10 einer Entzündung entgegen [32]: So konnte IL-10 Gabe in einer Studie von Kaya *et al.* die Entstehung einer Myosin-induzierten Autoimmunmyokarditis verhindern [106].

Die in der Literatur beschriebene Entzündungsantwort im Rahmen einer CVB3 Infektion mit Infiltration von CD3 positiven T-Zellen und Ausschüttung von Zytokinen konnte in unsere Studie nachvollzogen werden. Die massive Infiltration von T-Zellen

und Makrophagen war nur in den immunhistochemischen Gewebepräparaten infizierter Mäuse nachzuweisen, die Schnitte gesunder Tiere waren dagegen signalfrei. Die durch die Infiltration der Entzündungszellen bedingte Gewebsschädigung war an den mikroskopischen Schnitten der infizierten Mäuse sichtbar und wurde durch einen Apoptosenachweis, auf den jedoch erst in Kapitel 7.6. eingegangen werden soll, objektiviert. Der mit der Einwanderung von Makrophagen und T-Zellen einhergehende Anstieg der proinflammatorischen Zytokine konnte im Fall von TNF α , IFN γ , und IL-6 eindeutig belegt werden. Sowohl bei infizierten WT als auch bei KO Mäuse war eine signifikante stärkere mRNA Expression zu beobachten als bei nicht infizierten Kontrolltieren. Im Fall von IL-1 β war ein Unterschied nur zwischen den WT Gruppen erkennbar. Auch die starke, für CVB3 typische Induktion des antiinflammatorischen IL-10 konnte in unserer Studie gezeigt werden. Eine deutliche Zunahme der Genexpression war bei infizierten Mäusen zu verzeichnen.

Neben der Charakterisierung der CVB3 induzierten Myokarditis wurde auch die Wirkung des *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* auf die Erkrankung in dieser Arbeit untersucht. Der kardioprotektive Effekt des JAK/STAT3 Signalweges wurde bereits erwähnt, bei infizierten *Knock out* Mäusen, die von der schützenden Wirkung des Signalproteins nicht mehr profitieren können, wäre also eine Verschlimmerung der Entzündungsreaktion im Vergleich zu Wildtypmäusen zu erwarten. Die Wirkung von STAT3 im Rahmen einer Entzündung wurde in Studien von Jacoby *et al.* 2003 untersucht: Um eine Entzündung zu simulieren behandelten Jacoby *et al.* STAT3 *Knock out* Myozyten mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) und fanden eine verstärkte Sekretion von TNF α [81]. In Mäusen mit herzspezifischem STAT3 *Knock out* konnte dieselbe Arbeitsgruppe eine vermehrte Infiltration von mononukleären Entzündungszellen nach LPS Gabe im Herzen feststellen [81]. Mäuse mit einem spezifischen STAT3 *Knock out* in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten reagierten auf Gabe von bakteriellem Endotoxin mit verstärkter Sekretion der inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β , IFN γ und IL-6 [107]. Die normalerweise über den JAK/STAT3 Signalweg vermittelte antiinflammatorische Wirkung von IL-10 kann bei *Knock out* Tieren die übermäßige Entzündungsreaktion nicht beeinflussen [107]. Versuche von Riley *et al.*, die einerseits bei STAT3 und andererseits bei IL-10 *Knock out* Mäusen einen ähnlichen Phänotyp fanden [108] unterstützen die Vermutung, dass die schützende Wirkung

von STAT3 im Rahmen einer Entzündung zumindest teilweise über die Induktion antientzündlicher Zytokine vermittelt wird.

Eine verstärkte Zytokinausschüttung und Einwanderung von Entzündungszellen ins Herz konnte in unserer Arbeit jedoch nicht gefunden werden: Im Gewebe infizierter Wildtypmäuse wurde im Vergleich zu den Präparaten der *Knock out* Tiere mehr Makrophagen und T-Zellen nachgewiesen, auch wenn es sich bei den Unterschieden nur um Tendenzen handelte. Bei Betrachtung der Zytokinantwort hatte der STAT3 *Knock out* keine nachweisliche Wirkung auf die Genexpression der Entzündungsmediatoren. Weder bei den proinflammatorischen Mediatoren TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL-6 und IL-15, noch bei dem antientzündlichen IL-10 und TGF β ließen sich signifikante Unterschiede zwischen infizierten Wildtyp und *Knock out* Mäusen feststellen.

Ein Erklärungsansatz für die nicht nachzuweisende Wirkung von STAT3 findet sich bei Betrachtung des Versuchsaufbaus. Da ein kompletter STAT3 *Knock out* nicht mit dem Leben der Versuchsmäuse vereinbar ist [81], wurde in dieser Studie das STAT3 Gen mithilfe des myozytenspezifischen Promotors α MHC ausschließlich in Herzmuskelzellen entfernt. Neben Myozyten finden sich im Herzen jedoch auch Fibroblasten, Endothelzellen und interstitielle Makrophagen und nicht zuletzt im Rahmen einer Infektion die in den histologischen Präparaten gezeigten einwandernden Entzündungszellen. Neben den herzeigenen sind besonders die infiltrierenden Zellen für die Ausschüttung von Zytokinen verantwortlich [6], [104], all diese Zellen besitzen jedoch auch in den *Knock out* Tieren nach wie vor ein funktionierendes STAT3, das die erwartete übermäßige Entzündung verhindert haben könnte. Die mittels PCR nachgewiesene STAT3 mRNA Expression von Fibroblasten, Endothelzellen und infiltrierenden Immunzellen ist dementsprechend auch als leichte Bande im Agarosegel zu erkennen (siehe Abb. 6.3.).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre das junge Alter der Versuchstiere bei Infektionsbeginn. Hilfiker *et al.* untersuchten Gewebe der linken Herzkammer von Mäusen mit myozytenspezifischem STAT3 *Knock out* und konnten einen Monat nach Geburt STAT3 Protein nachweisen. Erst bei drei Monate alten Mäusen wurde kein STAT3 Proteingehalt im Gewebe mehr gefunden [88]. Ein ausreichender *Knock out* könnte sich also erst nach einiger Zeit einstellen und wäre nach Ergebnissen von Hilfiker *et al.* bei unseren sechs Wochen alten Versuchstieren noch nicht zu erwarten gewesen.

6.5. Kardiales Remodeling und Matrixhomöostase

Die mit verstärkter Zytokinausschüttung und T-Zell-Aktivität einhergehende Entzündungsreaktion im Rahmen einer Virus induzierten Myokarditis schädigt das Herz und triggert Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix, die zur Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie beitragen [109], [27], [58]. Als Antwort auf die Schädigung von Myozyten kommt es zu Kollagenab- und umbau, zu Kollagenneusynthese und Veränderung der Kollagenquotienten und Quervernetzung [58]. Cheung et al. konnten eine Zunahme der Kollagenmenge in der akuten Phase der CVB3 induzierter Myokarditis nachweisen, die mit dem Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins TGF β korrelierte [109]. Pauschinger et al. fanden dagegen weder einen Anstieg der Kollagen 1 mRNA Expression noch der Proteinmenge zehn Tage p.i., zeigten aber einen Zuwachs der löslichen Kollagen I Fraktion, was auf eine posttranslationale Modifikation des Kollagenaufbaus schließen lässt [59], [74]. Im Rahmen einer dilatativen Kardiomyopathie war der Quotient zwischen Kollagen I und III in Richtung Kollagen I verschoben [110], was eine verminderte Dehnbarkeit (Compliance) des Herzmuskels zur Folge hat.

Matrixmetalloproteinasen sind am Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt und werden unter anderem durch Zytokine aktiviert [59], [64]. *Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) sind die endogenen Inhibitoren der MMPs. Ein Ungleichgewicht der delikaten Balance zwischen MMPs und TIMPs durch übermäßige Zytokinaktivierung der MMPs im Rahmen einer Entzündung kann verheerende Folgen für das Herz haben und zur Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie beitragen [74], [59].

Während CVB3 induzierter Myokarditis in Mäusen zeigten sich zehn Tage nach Infektion eine gesteigerte MMP3 und 9, und eine verminderte TIMP1 und 4 Genexpression. Die Änderung der Genexpression ging mit einer gesteigerten Produktion von TNF α , IL-1 β und TGF β einher [74]. Auch Pauschinger et al. fanden im Maus-Myokarditis Modell gesteigerte Bildung der Proteinase MMP3, MMP8 und MMP9 und eine verminderte TIMP4 Menge, die mit einer gesteigerten TNF α und IL-1 β Expression korrelierte [59]. Der Gehalt an Kollagen I, III und der Matrixkomponente Fibronectin änderte sich jedoch nicht. Ein signifikanter Kollagenanstieg ließ sich erst 21 Tage nach Infektion mit CVB3 von Meng Xiau *et al.*

in Mäuseherzen nachweisen [111]. Li *et al.* fanden korrelierend mit Ergebnissen von Pauschinger *et al.* (2004) einen posttranslationalen Kollagenabbau bei gesteigerter MMP 3 und 9 Expression in humaner DCM und muriner Myokarditis [74]. Nicht nur Kollagen, sondern auch andere Matrixkomponenten wie zum Beispiel Fibronectin und Laminin werden durch Metalloproteinasen zersetzt [64]. Sowohl Fibronectin als auch Laminin sind Substrate von MMP2 und 3 [70].

Neben Zytokinen wird das MMP/TIMP Gleichgewicht von einer Reihe anderer Aktivatoren beeinflusst: Das in der Tumorforschung gefundene EMMPRIN stimuliert menschliche Fibroblasten zur Produktion von MMP 1, 2 und 3 [112]. Eine gesteigerte EMMPRIN Expression wurde bei CVB3 induzierter muriner Myokarditis gefunden. Auch Komponenten des Gerinnungssystems sind an der Matrixhomöostase beteiligt und werden im Rahmen einer Entzündung verstärkt gebildet. Durch uPA aktiviertes Plasmin aktiviert MMP3 und 9 [113] und sorgt damit für den Abbau extrazellulärer Matrix. Der physiologische Inhibitor von uPA, PAI verhindert dagegen den Aufbau der ECM durch Hemmung der MMP9 Aktivität [114]. Durch TNF α und TGF β gesteigerte PAI Expression wurde in kardialen Myozyten von Patienten mit Myokarditis gefunden [115].

Auch der kardioprotektive Transkriptionsfaktor STAT3 ist an der Kontrolle der Matrixhomöostase beteiligt [88]. Mäuse mit myozytenspezifischem STAT3 *Knock out* zeigten vier Monate nach Geburt eine leichte, nach sechs Monaten eine deutliche myokardiale Fibrose. Der *Knock out* führte bei diesen Tieren zur Entwicklung einer DCM und hatte bei betroffenen Versuchstieren eine deutlich geringere Lebenserwartung zur Folge [88]. Jacoby *et al.* fanden Hinweise, dass STAT3 die Entstehung einer Fibrose im Rahmen einer Entzündung reguliert: *Knock out* Mäuse zeigten nach Behandlung mit proinflammatorischem LPS eine Entzündungsantwort, die mit einer Fibrose des Herzmuskels einherging [81].

STAT3 kontrolliert die Genexpression in Kardiomyozyten, die an der Regulation einer Herzmuskelfibrose beteiligt ist [88]: Hilfiker *et al.* fanden in STAT3 *Knock out* Mäusen eine Änderung der mRNA Expression mit erhöhten Werten für Kollagen I, PAI, und TIMP1, MMP2 und 9 blieben dagegen vom *Knock out* unbeeinflusst [88].

Der Einfluss der Entzündungsantwort auf die Homöostase der extrazellulären Matrix im Rahmen einer subakuten Coxsackievirus induzierten Myokarditis sowie die Wirkung des *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* wurde auch in dieser Arbeit untersucht. Zytokine als Induktoren der matrixzersetzenden MMPs,

Matrixbestandteile als Substrate der Metalloproteinasen und die Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren (TIMPs) selbst wurden mittels PCR und Immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen.

Die in der Literatur beschriebenen Veränderungen im Rahmen der CVB3 Infektion ließen sich in unsere Studie nur zum Teil nachvollziehen: Analog zu Ergebnissen von Pauschinger *et al.* (2004) fanden sich zwischen infizierten und nicht infizierten Wildtypmäusen keine Unterschiede der mRNA Expression von Kollagen I, III und IV. Wohl aber im Falle der immunhistochemischen Kollagen I Färbung. Hier konnte eine signifikante Zunahme von Kollagen I bei infizierten WT Mäusen nachgewiesen werden. Die Kollagen III Färbung zeigte dagegen keine Differenzen zwischen den Versuchsgruppen. Eine Zunahme von Kollagen I nicht aber von Kollagen III im Gewebepreparat könnte als Hinweis auf eine beginnende Verschiebung des Kollagenquotienten in Richtung Kollagen I gewertet werden. Im Gegensatz zu früheren Studien von Pauschinger *et al.* konnte in dieser Arbeit neben dem immunhistochemischen Kollagen I Nachweis auch eine Zunahme des Kollagengehaltes in Herzen infizierter Mäuse mittels *Sirius Red* Färbung beobachtet werden. Auch Cheung *et al.* fanden einen Zuwachs von Kollagen in Sirius Rot gefärbten Schnitten von Mäusen, die an akuter CVB3 induzierter Myokarditis erkrankt waren, verwendeten allerdings einen anderen Maus- (A/J) und Virusstamm (*Gauntt Strain*) [116]. Eine Zunahme der Matrixbestandteile Fibronectin und Laminin konnte bei keiner der Versuchsgruppen gefunden werden. Hier decken sich die Ergebnisse mit einer von Pauschinger *et al.* 2005 durchgeführten Studie.

Die im Rahmen der Entzündung durch die Zytokinausschüttung bedingte mRNA Expression der MMPs konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden: Die Genexpression von MMP2 war bei infizierten Tieren im Vergleich zu nicht infizierten erhöht, in immunhistochemischen Färbungen konnte jedoch nur ein tendenzieller MMP2 Anstieg beobachtet werden. MMP3 und 9 waren in immunhistochemischen Präparaten hochreguliert, der Unterschied der mRNA Expression bei infizierten und nicht infizierten Mäusen war jedoch zu gering, um als signifikant zu gelten. Weder bei MMP8 noch 13 konnte die erwartete Überexpression bei infizierten WT Mäusen gefunden werden. Das gleiche galt für den MMP Induktor EMMPRIN. Die im Mausmodell von Pauschinger *et al.* beschriebene stärkere Expression in Gewebe infizierter Tiere konnte nicht gefunden werden. Auch auf die Komponenten des Gerinnungssystems uPA und PAI hatte die Entzündung nicht den erwarteten Einfluss.

Die in der Literatur beschriebene verminderte Expression der TIMPs [74] wurde in dieser Studie nicht beobachtet. Unterschiede zwischen den infizierten und nicht infizierten Wildtyptieren fanden sich weder bei TIMP2 TIMP3 noch bei TIMP4. Im Gegenteil zeigte sich eine verstärkte TIMP1 mRNA Expression bei infizierten gegenüber nicht infizierten Mäusen, ein Unterschied, der sich in der immunhistochemischen TIMP1 Färbung tendenziell bestätigte.

Um die Wirkung des *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* auf das kardiale Remodeling zu untersuchen, wurde die Entzündungsantwort infizierter Wildtypmäuse mit infizierten *Knock out* Mäusen verglichen. Nach Literaturangaben wäre in *Knock out* Tieren eine verstärkte Expression profibrotischer Gene (Kollagen, TIMPs, PAI) zu erwarten gewesen [88]. Selbst nicht infizierte KO Mäuse müssten nach Hilfiker *et al.* bereits Zeichen einer beginnenden interstitiellen Fibrose zeigen [88]. In unserer Studie konnte dagegen bei keinem der untersuchten Parameter ein Unterschied zwischen *Knock out* Tieren und der Kontrollgruppe gefunden werden. Ein Grund für die unerwartet fehlende Wirkung von STAT3 in unserem Mausmodell könnte wie bereits oben erwähnt neben dem geringen Alter der Mäuse der myozytenspezifische *Knock out* das STAT3 Gens sein: Der Einfluss des Signaltransduktionsgens in anderen herzeigenen Zellen scheint auszureichen, um den *Knock out* in Kardiomyozyten zu kompensieren.

6.6. Apoptose im Rahmen der CVB3 induzierten Myokarditis

Apoptose bezeichnet einen Prozess, der auch als programmierter Zelltod bekannt ist und eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung, bei der Erhaltung der Gewebekomöostase und bei der Immunantwort spielt [117]. Durch zelleigene Endonukleasen wird die DNA fragmentiert, die Zelle stirbt einen „kontrollierten Selbstmord“, der im Gegensatz zur Nekrose ohne Entzündungsreaktion verläuft. Im Rahmen einer Virusinfektion induzieren zytolytische T-Zellen Apoptose in infizierten Zellen [18]. Auch Zytokine wie TNF α zeigen proapoptotische Wirkung während einer Virusinfektion [118]. Coxsackievirus B3 verursacht durch Interaktion des Capsidproteins VP2 mit dem proapoptotischen Protein *siva* Apoptose während humaner und muriner Myokarditis [31]. Colston *et al.* konnten jedoch während CVB3 induzierter Myokarditis in Mäusen (Mausstämme: C3H.HeJ und CD1) trotz starker

Entzündung nur wenig apoptotische Zellen im TUNEL Assay und keine Korrelation des proapoptotischen Gens Bax mit histopathologischen Ergebnissen nachweisen. Einzig die Expression des antiapoptotischen Gens Bcl2 war leicht erhöht [119].

Der *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* hat sowohl pro- als auch antiapoptotische Eigenschaften [120]. Die proapoptotische Wirkung ist im Rahmen der Differenzierung hämatopoietische Stammzellen zu beobachten, antiapoptotische Effekte wurden vor allem in der Tumorforschung beschrieben [120]. Eine protektive Wirkung von STAT3 durch Hemmung der Apoptose war bei unterschiedlichen Herzerkrankungen zu verzeichnen: In Versuchen von Jacoby *et al.* schützte STAT3 Überexpression in transgenen Mäusen vor Doxorubicin induzierter Apoptose [81]. Als Zeichen einer Überreaktion auf Entzündungsreize zeigten STAT3 *Knock out* Mäuse verstärkt Apoptose nach proinflammatorischer LPS Behandlung und Stephanou *et al.* beschrieben antiapoptotische Eigenschaften von STAT3 im Rahmen von ischämischen Verletzungen am Herzen [86]. Die antiapoptotischen Effekte scheinen zumindest teilweise auf vermehrter Genexpression des antiapoptotischen Bcl2 und verminderter Expression des proapoptotischen Bax zu beruhen [82], [81], [89].

Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse ließen sich nur zum Teil in unserem Mausmodell bestätigen. In unserer Studie fand sich keine Änderung der Genexpression von Bax und Bcl2, apoptotische Zellen konnten jedoch ebenso wie bei Colston *et al.* bei infizierten WT und KO Mäusen in geringem Maße nachgewiesen werden. Die erwartete gesteigerte Bax beziehungsweise verminderte Bcl2 Expression bei KO Mäusen konnte nicht beobachtet werden. Auch die Anzahl der im TUNEL Assay nachgewiesenen apoptotischen Zellen unterschied sich bei den infizierten Gruppen nicht signifikant. Eine protektive Wirkung von STAT3 im Rahmen einer CVB3 induzierten Myokarditis durch Hemmung apoptotischer Gene wurde in dieser Studie nicht gefunden.

6.7. Abschließende Bemerkungen

Der in der Literatur beschriebene Entzündungsprozess im Rahmen einer Coxsackievirus induzierten Myokarditis konnte in unserem Mausmodell nachvollzogen werden: Infizierte Mäuse zeigten eine deutliche Gewichtsabnahme und eine höhere Mortalität im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Die Infiltration

von T-Zellen und Makrophagen in das Herz erkrankter Tiere ging mit einem deutlichen Anstieg pro- und antiinflammatorischer Zytokine einher. Zytokine greifen in die Balance des MMP/TIMP Systems ein und stören das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix [74], [58]. Entsprechend war ein Anstieg der Matrixmetalloproteinasen 2, 3, und 9 zu verzeichnen. Im Rahmen einer gestörten Matrixhomöostase fiel ein vermehrter Kollagengehalt in mit *Sirius Red* gefärbten Präparaten und in der immunhistochemischen Kollagen I Färbung auf. Die fehlende Zunahme von Kollagen III könnte eine Verschiebung des Kollagenquotienten in Richtung Kollagen I vermuten lassen. Apoptotische Zellen als Zeichen der gewebsschädigenden Einflüsse der Virusinfektion und der Entzündung ließen sich im Herzgewebe infizierter Tiere nachweisen, eine Veränderung der mRNA Expression pro- und antiapoptotischer Gene fand sich jedoch nicht.

Ein schützender Einfluss des *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* im Rahmen einer CVB3 induzierten Myokarditis konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden. Die nach Literaturrecherche erwartete verstärkte Entzündung infizierter *Knock out* Tiere zeigte sich nicht in unserem Mausmodell.

Grund hierfür könnte wie bereits angesprochen der nur partiell erfolgte *Knock out* sein: Der durch den myozytenspezifischen Promotor α MHC getriggerte *Knock out* betraf nur Herzmuskelzellen. Herzeigene Zellen anderer Entität (Myofibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, eingewanderte Entzündungszellen etc.) besaßen nach wie vor ein funktionierendes STAT3 Gen mit ausreichender Wirkung, um den *Knock out* in Myozyten zu kompensieren. Da ein kompletter STAT3 *Knock out* in Mäusen nicht mit dem Leben vereinbar ist [81], wäre die Zellkultur eine Alternative zum *in vivo* Modell, um Erkenntnisse über den Einfluss des Transkriptionsfaktors zu gewinnen. In CVB3 infizierten STAT3 KO Myozyten könnte hier *in vitro* die Wirkung des Gens untersucht werden, ohne den störenden Einfluss anderer Zellen, in denen das STAT3 Gen nicht durch den *Knock out* entfernt wurde.

Eine weitere Möglichkeit für die fehlende Wirkung des Transkriptionsfaktors in dieser Studie könnte das zu geringe Alter der Versuchstiere sein. Hilfiker *et al.* fanden in Gewebe von Mäusen mit herzspezifischem *Knock out* noch vier Wochen nach Geburt STAT3 Protein. Erst bei drei Monate alten Tieren konnte der Transkriptionsfaktor nicht mehr nachgewiesen werden [88].

7. Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* spielt eine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündungsprozessen als Teil des Signalweges der Interleukin 6 ähnlichen Zytokine. Protektive Eigenschaften am Herzen wurden in unterschiedlichsten Versuchen belegt: STAT3 schützt das Herz vor überschießender Entzündungsreaktion, hat positiven Einfluss auf das kardiale Remodeling und schützt vor Apoptose. Auswirkungen eines herzspezifischen STAT3 *Knock outs* während der subakuten Phase einer Coxsackievirus B3 induzierten Myokarditis wurden in dieser Arbeit am Mausmodell untersucht.

Dazu wurden 10 sechs Wochen alte männliche CB6FI Mäuse mit einem herzspezifischen STAT3 *Knock out* und sieben Wildtypmäuse intraperitoneal mit 10^6 PFU Coxsackievirus B3 (Nancy Stain) infiziert und zehn Tage *post infectionem* getötet. Die Kontrollgruppen umfassten neun nicht infizierte Mäuse mit herzspezifischem *Knock out* und sechs Tiere des Wildtyps. Echokardiographische Unterschiede zwischen den Herzen der unterschiedlichen Versuchsgruppen konnten nicht ermittelt werden.

Die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen und die damit einhergehende Ausschüttung von Entzündungsmediatoren bestimmen das Krankheitsgeschehen zwischen dem dritten und 14. Tag nach Infektion (subakute Phase). Die Untersuchungen des Gewebes der Versuchstiere zeigten deutliche Infiltrate von Makrophagen und T-Zellen im Myokard infizierter Mäuse und ein Anstieg sowohl der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IFN γ , IL-1 β und IL-6, als auch des antinflammatorischen IL-10. Ein Unterschied zwischen STAT3 *Knock out* Mäusen und den Wildtyptieren ließ sich jedoch nicht feststellen.

Die Zytokinausschüttung im Rahmen der Entzündungsantwort schädigt das Herz und triggert Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix, die zur Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie beitragen. Ursache ist ein Ungleichgewicht des die Matrixhomöostase regulierenden MMP/TIMP Systems. Eine Hochregulation der MMPs (2, 3 und 9) und eine gesteigerte Kollagen 1 Expression ließ sich bei infizierten Tieren nachweisen, die TIMP Expression blieb unbeeinflusst. Ebenso zeigten sich in geringem Maße apoptotische Zellen im Gewebe infizierter Tiere, eine signifikante Änderung der mRNA Expression der Gene Bax und Bcl konnte jedoch

nicht gefunden werden. Eine Auswirkung des STAT3 *Knock outs* auf die untersuchten Parameter fand sich nicht.

Grund für die unerwartet fehlenden Auswirkungen des STAT3 *Knock outs* auf die Erkrankung könnte der myozytenspezifische *Knock out* und ein zu geringes Alter der Versuchstiere sein. Der Einfluss von STAT3 in anderen herzeigenen Zellen könnte ausreichen, um den nur in Herzmuskelzellen erfolgten *Knock out* zu kompensieren.

8. Literaturverzeichnis

1. Mattingly, T.W., *Changing Concepts of Myocardial Diseases*. *Jama*, 1965. **191**: p. 33-7.
2. Wenger, N.K., W.H. Abelmann, and W.C. Roberts, *Myocardial disease*. 5th ed. *Diseases of the heart and blood vessels*, ed. J.W. Hurst, R.B. Logue, and C.E. Rackley. 1982, New York. 1278-99.
3. Aretz, H.T., et al., *Myocarditis. A histopathologic definition and classification*. *Am J Cardiovasc Pathol*, 1987. **1**(1): p. 3-14.
4. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. *Circulation*, 1996. **93**(5): p. 841-2.
5. Maron, B., et al., *Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies*. *Circulation*, 2006(113): p. 1807-1816.
6. Magnani, J.W. and G.W. Dec, *Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment*. *Circulation*, 2006. **113**(6): p. 876-90.
7. Woodruff, J.F., *Viral myocarditis. A review*. *Am J Pathol*, 1980. **101**(2): p. 425-84.
8. Gerok, W., et al., eds. *Innere Medizin*. 10 ed. 2000, Schattauer: Stuttgart New York.
9. Fabre, A. and M.N. Sheppard, *Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death*. *Heart*, 2006. **92**(3): p. 316-20.
10. Drory, Y., et al., *Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age*. *Am J Cardiol*, 1991. **68**(13): p. 1388-92.
11. Saphir, O., *Myocarditis, a general overview, with an analysis of two hundred and forty cases*. *Arch Pathol*, 1941. **32**: p. 1000-51.
12. Gore, I. and O. Saphir, *Myocarditis, a classification of 1402 cases*. *American Heart Journal*, 1947. **34**: p. 827-30.
13. Blankenhorn, M.A. and E.A. Gall, *Myocarditis and myocardosis; a clinicopathologic appraisal*. *Circulation*, 1956. **13**(2): p. 217-23.
14. Baboonian, C. and T. Treasure, *Meta-analysis of the association of enteroviruses with human heart disease*. *Heart*, 1997. **78**(6): p. 539-43.

15. Feldman, A.M. and D. McNamara, *Myocarditis*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1388-98.
16. Kühl, U., et al., *High Prevalence of Viral Genomes and Multiple Viral Infections in the Myocardium of Adults with "Idiopathic" Left Ventricular Dysfunction*. Circulation, 2005(111): p. 887-893.
17. Wessely, R., *Coxsackieviral replication and pathogenicity: lessons from gene modified animal models*. Med Microbiol Immunol, 2004. **193**(2-3): p. 71-4.
18. Hahn, et al., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 5 ed. 2004, Berlin, Heidelberg: Springer.
19. Godman, G.C., H. Bunting, and J.L. Melnick, *The histopathology of Coxsackie virus infection in mice. I. Morphologic observations with four different viral types*. Am J Pathol, 1952. **28**(2): p. 223-57.
20. Grodums, E.I. and G. Dempster, *Myocarditis in experimental Coxsackie B-3 infection*. Can J Microbiol, 1959. **5**: p. 605-15.
21. Grodums, E.I. and G. Dempster, *The pathogenesis of Coxsackie group B viruses in experimental infection*. Can J Microbiol, 1962. **8**: p. 105-13.
22. Herskowitz, A., et al., *Coxsackievirus B3 murine myocarditis: a pathologic spectrum of myocarditis in genetically defined inbred strains*. J Am Coll Cardiol, 1987. **9**(6): p. 1311-9.
23. Kilbourne, E.D., C.B. Wilson, and D. Perrier, *The induction of gross myocardial lesions by a Coxsackie (pleurodynia) virus and cortisone*. J Clin Invest, 1956. **35**(4): p. 362-70.
24. Marboe, C.C., et al., *Characterization of mononuclear cell infiltrates in human cardiac allografts*. Transplant Proc, 1984. **16**(6): p. 1598-9.
25. Mandell, Bennett, and Dolin, *Principles and Practice of infectious Diseases*. 6th ed. 2005: Churchill Livingstone.
26. Banatvala, J.E., ed. *Viral Infections in the Heart*. Animal models: immunological aspects, ed. S.A. Huber. 1993, Edvard Arnold: London, UK. 82-109.
27. Liu, P.P. and J.W. Mason, *Advances in the understanding of myocarditis*. Circulation, 2001. **104**(9): p. 1076-82.
28. Leslie, K., et al., *Clinical and experimental aspects of viral myocarditis*. Clin Microbiol Rev, 1989. **2**(2): p. 191-203.

29. Badorff, C., et al., *Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 320-6.
30. Wessely, R., et al., *Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture: an approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes*. Circulation, 1998. **98**(5): p. 450-7.
31. Henke, A., et al., *Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva*. J Virol, 2000. **74**(9): p. 4284-90.
32. Matsumori, A., *Cytokines in myocarditis and dilated cardiomyopathy*. European Heart Journal Supplements, 2002(4): p. 142-145.
33. Shioi, T., A. Matsumori, and S. Sasayama, *Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice*. Circulation, 1996. **94**(11): p. 2930-7.
34. Meldrum, D.R., *Tumor necrosis factor in the heart*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. R577-95.
35. Bachmaier, K., et al., *Low-molecular-weight tumor necrosis factor receptor p55 controls induction of autoimmune heart disease*. Circulation, 1997. **95**(3): p. 655-61.
36. Kawai, C., *From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future*. Circulation, 1999. **99**(8): p. 1091-100.
37. Rose, N.R. and S.L. Hill, *The pathogenesis of postinfectious myocarditis*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **80**(3 Pt 2): p. S92-9.
38. Seko, Y., et al., *Role of Fas/FasL pathway in the activation of infiltrating cells in murine acute myocarditis caused by Coxsackievirus B3*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(8): p. 1399-403.
39. Lodge, P.A., et al., *Coxsackievirus B-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms*. Am J Pathol, 1987. **128**(3): p. 455-63.
40. Seko, Y., et al., *Evidence of perforin-mediated cardiac myocyte injury in acute murine myocarditis caused by Coxsackie virus B3*. J Pathol, 1993. **170**(1): p. 53-8.

41. Seko, Y., et al., *Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3*. *Circ Res*, 1990. **67**(2): p. 360-7.
42. Freeman, G.J., et al., *B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells*. *J Immunol*, 1989. **143**(8): p. 2714-22.
43. Seko, Y., et al., *Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(4): p. 1327-36.
44. Woodruff, J.F. and J.J. Woodruff, *Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackie virus B3 heart disease*. *J Immunol*, 1974. **113**(6): p. 1726-34.
45. Kishimoto, C. and W.H. Abelmann, *Monoclonal antibody therapy for prevention of acute coxsackievirus B3 myocarditis in mice*. *Circulation*, 1989. **79**(6): p. 1300-8.
46. Kearney, M.T., et al., *Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy: mechanisms, manifestations, and management*. *Postgrad Med J*, 2001. **77**(903): p. 4-10.
47. Kühl, U., M. Pauschinger, and M. Nuntsias, *Diagnosis and treatment of patients with virus induced inflammatory cardiomyopathy*. *European Heart Journal Supplements*, 2002(4): p. 173-180.
48. Mason, J.W., M.E. Billingham, and D.R. Ricci, *Treatment of acute inflammatory myocarditis assisted by endomyocardial biopsy*. *Am J Cardiol*, 1980. **45**(5): p. 1037-44.
49. Kurnick, J.T., C. Leary, and I.F. Palacios, *Culture and characterization of lymphocytic infiltrates from endomyocardial biopsies from patients with idiopathic myocarditis*. *Eur. Heart J.*, 1987. **8**(Suppl): p. 135-139.
50. Braunwald, E., ed. *Atlas of heart Diseases*. *Cardiomyopathies, Myocarditis and pericardial disease*, ed. W.H. Abelmann. Vol. 2. 1995, Library of Congress Cataloging.
51. Knowlton, K.U. and C. Badorff, *The immune system in viral myocarditis: maintaining the balance*. *Circ Res*, 1999. **85**(6): p. 559-61.
52. Braunwald, E., ed. *Atlas of heart disease*. Vol. 2. 1995, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.

53. Hjalmarson, A., M. Fu, and R. Mobini, *Who are the enemies? Inflammation and autoimmune mechanisms*. European Heart Supplements, 2002(4): p. G27-G32.
54. Baboonian, C., et al., *Coxsackie B viruses and human heart disease*. Curr Top Microbiol Immunol, 1997. **223**: p. 31-52.
55. Muir, P., et al., *Chronic relapsing pericarditis and dilated cardiomyopathy: serological evidence of persistent enterovirus infection*. Lancet, 1989. **1**(8642): p. 804-7.
56. Wessely, R., et al., *Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy*. J Clin Invest, 1998. **102**(7): p. 1444-53.
57. Kubota, T., et al., *Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha*. Circ Res, 1997. **81**(4): p. 627-35.
58. Pauschinger, M., K. Chandrasekharan, and J. Li, *Remodeling der extrazellulären Matrix bei Dilatativer Kardiomyopathie*. Herz, 2002(27): p. 677-82.
59. Pauschinger, M., K. Chandrasekharan, and H.P. Schultheiss, *Myocardial remodeling in viral heart disease: possible interactions between inflammatory mediators and MMP-TIMP system*. Heart Fail Rev, 2004. **9**(1): p. 21-31.
60. Fedak, P.W., et al., *Cardiac remodeling and failure From molecules to man (Part II)*. Cardiovasc Pathol, 2005. **14**(2): p. 49-60.
61. Hamacher, S. and S. Matern, *Extrazelluläre Matrix- von der Grundlagen Forschung zur klinischen Bedeutung*. Dtsch Med Wochenschr, 2004(129): p. 1976-1980.
62. Weber, K.T., et al., *Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms*. J Mol Cell Cardiol, 1994. **26**(3): p. 279-92.
63. Feldman, A.M., Y.Y. Li, and C.F. McTiernan, *Matrix metalloproteinases in pathophysiology and treatment of heart failure*. Lancet, 2001. **357**(9257): p. 654-5.
64. Spinale, F.G., *Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart*. Circ Res, 2002. **90**(5): p. 520-30.

65. Weber, K.T., *Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network*. J Am Coll Cardiol, 1989. **13**(7): p. 1637-52.
66. Tyagi, S.C., *Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover*. Mol Cell Biochem, 1997. **168**(1-2): p. 1-12.
67. Woessner, J.F. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases*. Activation of the zymogen forms of MMPs. 2000, New York: Oxford University Press. 72-86.
68. D'Armiento, J., *Matrix metalloproteinase disruption of the extracellular matrix and cardiac dysfunction*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(3): p. 97-101.
69. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. Circ Res, 2003. **92**(8): p. 827-39.
70. Chakraborti, S., et al., *Regulation of matrix metalloproteinases: an overview*. Mol Cell Biochem, 2003. **253**(1-2): p. 269-85.
71. Corcoran, M.L., et al., *Laminin SIKVAV peptide induction of monocyte/macrophage prostaglandin E2 and matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1995. **270**(18): p. 10365-8.
72. Huhtala, P., et al., *Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin*. J Cell Biol, 1995. **129**(3): p. 867-79.
73. Janicki, J.S., et al., *The dynamic interaction between matrix metalloproteinase activity and adverse myocardial remodeling*. Heart Fail Rev, 2004. **9**(1): p. 33-42.
74. Li, J., et al., *Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction*. Cardiovasc Res, 2002. **56**(2): p. 235-47.
75. Diaz, A., et al., *Regulation of human lung fibroblast alpha 1(I) procollagen gene expression by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and prostaglandin E2*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10364-71.
76. Villarreal, F.J., et al., *Adenovirus-mediated overexpression of human transforming growth factor-beta 1 in rat cardiac fibroblasts, myocytes and smooth muscle cells*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(4): p. 735-42.
77. Eghbali, M., et al., *Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen*

- mRNAs and expression of early transcription factors*. Circ Res, 1991. **69**(2): p. 483-90.
78. Lacraz, S., et al., *Suppression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages by interleukin-4*. J Clin Invest, 1992. **90**(2): p. 382-8.
79. Kim, H.E., et al., *Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction*. J Clin Invest, 2000. **106**(7): p. 857-66.
80. Thomas, C.V., et al., *Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1998. **97**(17): p. 1708-15.
81. Jacoby, J.J., et al., *Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12929-34.
82. Hilfiker-Kleiner, D., A. Hilfiker, and H. Drexler, *Many good reasons to have STAT3 in the heart*. Pharmacol Ther, 2005. **107**(1): p. 131-7.
83. Podewski, E.K., et al., *Alterations in Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling in patients with end-stage dilated cardiomyopathy*. Circulation, 2003. **107**(6): p. 798-802.
84. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334** (Pt 2): p. 297-314.
85. Kisseleva, T., et al., *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. Gene, 2002. **285**(1-2): p. 1-24.
86. Stephanou, A., *Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(4): p. 519-25.
87. Aaronson, D.S. and C.M. Horvath, *A road map for those who don't know JAK-STAT*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1653-5.
88. Hilfiker-Kleiner, D., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury*. Circ Res, 2004. **95**(2): p. 187-95.
89. Negoro, S., et al., *Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(4): p. 797-805.
90. Inoki, I., et al., *Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis*. Faseb J, 2002. **16**(2): p. 219-21.

91. Hilfiker-Kleiner, D., A. Limbourg, and H. Drexler, *STAT3-mediated activation of myocardial capillary growth*. Trends Cardiovasc Med, 2005. **15**(4): p. 152-7.
92. Zhang, Y., et al., *Astragaloside IV exerts antiviral effects against coxsackievirus B3 by upregulating interferon-gamma*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47**(2): p. 190-5.
93. Leipner, C., et al., *Coxsackievirus B3-induced myocarditis: differences in the immune response of C57BL/6 and Balb/c mice*. Med Microbiol Immunol, 2004. **193**(2-3): p. 141-7.
94. Joo, C.H., et al., *Coxsackievirus B3 induces apoptosis in the early phase of murine myocarditis: a comparative analysis of cardiovirulent and noncardiovirulent strains*. Intervirology, 2003. **46**(3): p. 135-40.
95. Kim, E.O., et al., *Quantitative analysis of viral RNA in the murine heart and pancreas with different concentration of coxsackievirus B3*. Intervirology, 2006. **49**(4): p. 192-9.
96. Gay, R.T., et al., *An aged host promotes the evolution of avirulent coxsackievirus into a virulent strain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(37): p. 13825-30.
97. Anker, S.D. and A.J. Coats, *Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation*. Chest, 1999. **115**(3): p. 836-47.
98. Wang, Y.X., et al., *Antiviral and myocyte protective effects of murine interferon-beta and -{alpha}2 in coxsackievirus B3-induced myocarditis and epicarditis in Balb/c mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H69-76.
99. Li, J., et al., *Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine myocarditis*. Eur J Pharmacol, 2007. **554**(1): p. 60-8.
100. Nakamura, H., et al., *Repetitive coxsackievirus infection induces cardiac dilatation in post-myocarditic mice*. Jpn Circ J, 1999. **63**(10): p. 794-802.
101. Kunisada, K., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 315-9.

102. Stypmann, J., et al., *Age and gender related reference values for transthoracic Doppler-echocardiography in the anesthetized CD1 mouse*. Int J Cardiovasc Imaging, 2006. **22**(3-4): p. 353-62.
103. Heymans, S., et al., *Inhibition of urokinase-type plasminogen activator or matrix metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis*. Circulation, 2006. **114**(6): p. 565-73.
104. Seko, Y., et al., *Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus b3*. J Pathol, 1997. **183**(1): p. 105-8.
105. Tanaka, T., et al., *Overexpression of interleukin-6 aggravates viral myocarditis: impaired increase in tumor necrosis factor-alpha*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(9): p. 1627-35.
106. Kaya, Z., et al., *Cutting edge: a critical role for IL-10 in induction of nasal tolerance in experimental autoimmune myocarditis*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1552-6.
107. Takeda, K., et al., *Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 39-49.
108. Riley, J.K., et al., *Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16513-21.
109. Cheung, C., et al., *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis*. Cardiovasc Pathol, 2006. **15**(2): p. 63-74.
110. Pauschinger, M., et al., *Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio*. Circulation, 1999. **99**(21): p. 2750-6.
111. Meng, X.H., et al., *Dynamic changes in myocardial matrix metalloproteinase activity in mice with viral myocarditis*. Chin Med J (Engl), 2004. **117**(8): p. 1195-9.
112. Guo, H., et al., *Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(1): p. 24-7.
113. Woodiwiss, A.J., et al., *Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction*. Circulation, 2001. **103**(1): p. 155-60.

114. Oh, C.K., et al., *PAI-1 promotes extracellular matrix deposition in the airways of a murine asthma model*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **294**(5): p. 1155-60.
115. Macfelda, K., et al., *Plasminogen activator inhibitor 1 expression is regulated by the inflammatory mediators interleukin-1alpha, tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta and oncostatin M in human cardiac myocytes*. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. **34**(12): p. 1681-91.
116. Cheung, C., L. Hongli, and B. Ynagawa, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis*. *Cardiovascular Pathology*, 2005.
117. Büttner, R. and C. Thomas, *Allgemeine Pathologie*. 3. Auflage ed. 2002, Stuttgart
New York: Schattauer.
118. Kurrer, M.O., et al., *Cytokines that regulate autoimmune myocarditis*. *Swiss Med Wkly*, 2002. **132**(29-30): p. 408-13.
119. Colston, J.T., B. Chandrasekar, and G.L. Freeman, *Expression of apoptosis-related proteins in experimental coxsackievirus myocarditis*. *Cardiovasc Res*, 1998. **38**(1): p. 158-68.
120. Battle, T.E. and D.A. Frank, *The role of STATs in apoptosis*. *Curr Mol Med*, 2002. **2**(4): p. 381-92.

9. Anhang

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 3.1.: OD Werte der PCR Banden am Bsp. von TIMP 1
- Abb. 3.2.: Optimierung der Annealingtemperatur am Beispiel von TGF β und TPA
- Abb. 3.3.: Unterschiedliche Zyklen bei Aktin-, EMMPRIN- und TIMP 4-PCR
- Abb. 3.4.: *Realtime*-PCR; Ermittlung der CT Werte am Bsp. von TNF α
- Abb. 5.1.: Darstellung der Gewichtsänderung der Versuchsgruppen zwischen zweitem und achtem Tag nach Virusinfektion im Boxplot.
- Abb. 5.2.: Basis-Cox PCR
- Abb. 5.3.: STAT3 PCR.
- Abb. 5.4.: IL-1 β Genexpression.
- Abb. 5.5.: IL-6 Genexpression.
- Abb. 5.6.: IL-10 Genexpression.
- Abb. 5.7.: IL-15 Genexpression.
- Abb. 5.8.: IFN γ Genexpression.
- Abb. 5.9.: TGF β Genexpression.
- Abb. 5.10.: TNF α Genexpression.
- Abb. 5.11.: Immunhistochemische CD 3 Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.
- Abb. 5.12.: CD3 positive Signale pro mm².
- Abb. 5.13.: Immunhistochemische Mak3 Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.
- Abb. 5.14.: Mak3 positive Signale pro mm².
- Abb. 5.15.: Immunhistochemische Kollagen I Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.
- Abb. 5.16.: *Area fraction* Kollagen I.
- Abb. 5.17.: Immunhistochemische Kollagen III Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.
- Abb. 5.18.: Kollagen III Genexpression.
- Abb. 5.19.: Kollagen IV Genexpression.

- Abb. 5.20.: *Sirius Red* Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.
- Abb. 5.21.: Anteil gefärbten Myokards mit *Sirius Red* (AF).
- Abb. 5.22.: MMP2 Genexpression.
- Abb. 5.23.: Immunhistochemische MMP2 Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.
- Abb. 5.24.: Immunhistochemische MMP2 Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.
- Abb. 5.25.: MMP3 positive Signale pro mm² Herzgewebe.
- Abb. 5.26.: MMP8 Genexpression.
- Abb. 5.27.: Immunhistochemische MMP9 Färbung von Myokardgewebe am Beispiel ausgewählter Tiere der Gruppen WT, WT inf., KO und KO inf. bei 200x Vergrößerung.
- Abb. 5.28.: Anteil des MMP9 markiertem Gewebe an nicht gefärbtem Myokard (AF).
- Abb. 5.29.: TIMP1 Genexpression
- Abb. 5.30.: Anteil TIMP1 gefärbten Gewebes (AF).
- Abb. 5.31.: Immunhistochemische TIMP1 Färbung.
- Abb. 5.32.: Mittlere AF der Unterschiedlichen Versuchsgruppen bei immunhistochemischer TIMP4 Färbung.
- Abb. 5.33.: PAI Genexpression.
- Abb. 5.34.: uPA Genexpression.
- Abb. 5.35.: Bax Genexpression.
- Abb. 5.36.: TUNEL Färbung, Signale pro mm².
- Abb. 5.37.: Apoptose Nachweis mittels TUNEL Assay.

Tabellenverzeichnis

- Tab. 3.1.: Gruppeneinteilung der Versuchstiere
- Tab. 3.2.: Temperatur und Zeitangaben für die Basis-Cox PCR
- Tab. 3.3.: Temperatur und Zeitangaben für DNase Verdau
- Tab. 3.4.: Temperatur und Zeitangaben für Reverse Transkription
- Tab. 3.5.: Reaktionszyklen der Polymerase Kettenreaktion
- Tab. 3.6.: Sequenzen der Eingesetzten Primer, Zyklenzahlen und Annealingtemperaturen (3' = Sense; 5' = Antisense)
- Tab. 3.7.: Temperatur und Zyklen der *Realtime*-PCR
- Tab. 3.8.: Antikörperverdünnung für Cryoschnitte
- Tab. 4.1.: Arbeitsgeräte mit Erläuterungen und Herstellerangaben
- Tab. 4.2.: Verwendete Software
- Tab. 4.3.: Verbrauchsmaterialien mit Erläuterungen und Herstellerangaben
- Tab. 4.4.: Reagenzien mit Erläuterungen und Herstellerangaben

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Moritz Hilbrandt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT3 bei Myokarditis“ 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.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Dr. med. Matthias Pauschinger danken, ohne ihn wäre mein Promotionsvorhaben nicht durchführbar gewesen. Dank seiner Hilfe hatte ich die Möglichkeit in gut organisiertem Rahmen und mit ausreichenden Ressourcen, den experimentellen Teil meiner Arbeit zu bestreiten. Mit Anregungen und konstruktiver Kritik stand er mir auch beim Schreiben der Arbeit zur Seite und unterstützte mich, trotz seines Wechsels nach Nürnberg, weiterhin bis zum Abschluss meiner Promotion.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuerinnen Frau Olga Lettau und Frau Dr. Angela Kallwellis-Opara. Sie führten mich in die mir bis dahin unbekannte Laborarbeit ein, halfen mir beim Erlernen der Methodik und standen mir über drei Jahre mit Rat und Tat zur Seite. Ohne sie hätte ich es nicht geschafft über die anstrengenden Phasen, die die Ausführung einer solchen Arbeit mit sich bringt, hinweg zu kommen. Für ihre Hilfe und Anregungen beim Verfassen der Arbeit, und für ihr Engagement und ihre Geduld möchte ich mich noch mal besonders bei Frau Olga Lettau bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der „AG Pauschinger“, die mich von Beginn an freundlich in ihrer Mitte aufgenommen haben, bei Fragen mit viel Geduld für mich da waren und mit ihrer Unterstützung maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Meinen besonderen Dank möchte ich Frau Kerstin Puhl und Frau Franziska Bleis aussprechen. Ohne ihre Hilfe und ihr Engagement bei der Einarbeitung und ohne die vielen Tricks und Tipps, wäre mir die Durchführung der Arbeit sicher deutlich schwerer gefallen.

Ein großes Dankeschön gebührt meinen Freunden Katharina Chwallek und Merlin Deckers, die mit ihren Anregungen, Diskussionen und ihrer fachlichen Expertise unter anderem in Sachen Statistik, eine große Hilfe und nicht zuletzt moralische Stütze beim Schreiben meiner Doktorarbeit waren.

Vielen, vielen lieben Dank vor allem meinen Eltern, die mir nicht nur mein Medizinstudium ermöglichten und die Durchführung meiner Doktorarbeit mit allen Kräften unterstützten, sondern zu jeder Zeit für mich da waren, meine Zweifel ernst genommen haben und ihr Möglichstes taten, mir über die vielen Durststrecken hinweg zu helfen. Ich danke Euch für Eure Hilfe.