

1. Einleitung

Eine kardiale Dysfunktion bei jungen, im übrigen gesunden Menschen ist häufig Folge einer akuten viralen Myokarditis. Als häufigster Auslöser einer viralen Myokarditis beim Menschen gilt Coxsackievirus-B3 (CVB3). Das klinische Erscheinungsbild variiert stark und reicht von milden Verläufen bis zu schwerer Herzinsuffizienz (McCarthy et al., 2000). Als Therapieoption wird derzeit eine Behandlung der Herzinsuffizienz entsprechend den Richtlinien durchgeführt (Eur. Heart J., 2005). Bei fulminanten Verläufen werden auch Herzunterstützungssysteme (*Assist Devices*) eingesetzt. Diese dienen in akut lebensbedrohlichen Situationen zur Überbrückung bis zu einer Stabilisierung der Myokardfunktion oder einer eventuellen Herztransplantation. Eine effektive Therapie unabhängig von diesen Standardtherapieverfahren ist bis heute nicht verfügbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des proteolytischen Enzyms Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) auf den Verlauf einer akuten CVB3-induzierten Myokarditis in einem uPA-*knockout*-Mausmodell (uPA^{-/-}) untersucht. uPA ist ein Aktivator für das Plasminogen/Plasmin-System. Die aktive Form Plasmin aktiviert eine Reihe von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und ist durch perizelluläre Proteolyse am Migrationsprozess von Immunzellen beteiligt. Die Proteinase hat dadurch Einfluss auf die kardiale Inflammation und den Umbau der extrazellulären Matrix im Verlauf einer viralen Myokarditis. Daraus resultierend steht uPA potentiell in Zusammenhang mit der Schädigung und konsekutiver Fehlfunktion des Myokards.

Ziel dieser Arbeit ist es zu klären, welche Bedeutung uPA während einer akuten, murinen CVB3-Myokarditis in Hinsicht auf die extrazelluläre Matrix und die Inflammation im Myokard zukommt und inwieweit dies auch Einfluss auf die myokardiale Funktion hat.

1.1 Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine Herzmuskelerkrankung, die durch eine Einschränkung der links- und rechtsventrikulären Funktion bei gleichzeitiger Dilatation des linken und rechten Ventrikels charakterisiert ist. Nach neuester Studienlage stellt die DCM

neben der koronaren Herzkrankheit die häufigste Ursache für eine Herzinsuffizienz dar. Demzufolge liegt die Prävalenz der durch eine DCM bedingten herzinsuffizienten Patienten in Deutschland bei etwa 500.000. Bei einem relevanten Anteil von Patienten mit DCM wird dieses Krankheitsbild heute als irreversibles Endstadium einer Myokarditis angesehen.

Die Myokarditis wird von der *World Health Organisation* (WHO) und der *International Society and Federation of Cardiology* (ISFC) als eine „entzündliche Erkrankung des Myokards diagnostiziert durch etablierte histologische, immunologische und immunhistologische Kriterien“ definiert (Richardson et al., 1995). Das Krankheitsbild wurde erstmalig 1812 von Corvisart beschrieben (Corvisart J.N., 1812). Der Begriff „Myokarditis“ wurde 1837 von Sobernheim geprägt (Sobernheim J.F., 1837).

Ein kausaler Zusammenhang zwischen Myokarditis und DCM konnte in den letzten Jahren durch die Entwicklung neuer molekularbiologischer und immunologischer Techniken untermauert werden. Man unterscheidet zwischen infektiösen und nichtinfektiösen Myokarditiden (toxisch, metabolisch, idiopathisch). Während zahlreiche infektiöse Erreger wie Bakterien, Spirochäten, Protozoen oder Pilze zu einer Myokarditis führen können, werden klinisch bedeutsame Myokarditiden meist von kardiotropen Viren ausgelöst, insbesondere vom Coxsackievirus der Gruppe B und des Serotyps 3.

Dabei stellen sich die Persistenz des Virus im Herzen sowie eine antikardiale Autoimmunität als pathogenetisch sehr bedeutsam dar. Die Einführung von Endomyokardbiopsien und Standardisierung der histologischen Diagnostik durch die Dallas-Kriterien haben einen großen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese geleistet. Die intrakardiale Inflammation und die Viruspersistenz können durch Untersuchung der Biopsien beurteilt werden, wobei sich die Viruspersistenz als prognostisch ungünstig erwiesen hat (Kühl et al., 2005). Molekularbiologische Methoden wie etwa die Amplifizierung von Virusgenom mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und präzise immunhistologische Quantifizierung von Infiltraten in Myokardgewebe haben sich als Grundlagen der Diagnose und Definition der inflammatorischen Kardiomyopathie (infCM) etabliert. Die aktuelle WHO-Klassifikation definiert die inflammatorische Kardiomyopathie als Nachweis einer intramyokardialen Entzündung in Endomyokardbiopsien von Patienten mit dem klinischen Bild einer DCM. Die infCM hat sich als spezifische Entität innerhalb der ätiopathogenetisch heterogenen DCM etabliert. Wie sowohl klinische Studien als auch tierexperimentelle Untersuchungen belegen,

kann eine akute virale Myokarditis in bis zu 20% der Fälle bis zum klinischen Bild einer chronischen dilatativen Kardiomyopathie fortschreiten. Klinisch ist der Verlauf einer viralen Myokarditis oft inapparent, wobei die Diagnose lediglich durch EKG-Veränderungen der ST-Strecke und T-Welle gestellt werden kann. Symptomatische Formen zeigen ein grippeartiges Bild mit Myalgien und Lymphadenitis. Diese können einen fulminanten Verlauf nehmen. Anamnestisch gehen oft respiratorische Infekte mit Fieber voraus. Es drohen Arrhythmien, Herzinsuffizienz und der plötzliche Herztod. Einige Patienten zeigen die Zeichen eines akuten Myokardinfarktes mit Thoraxschmerz und Serumspiegelerhöhung der Myokardenzyme (Kühl et al., 2003). Die infCM findet sich bei ca. 50% aller DCM-Patienten (Kühl et al., 1996). Bei ca. 60% aller DCM-Patienten lässt sich in endomykardialen Biopsien durch PCR virales Genom nachweisen (Kühl et al., 2005). Als ein sehr wichtiger prognostischer Faktor wird der Immunstatus der Patienten angesehen. Die frühzeitige Elimination des Virus durch die primäre Immunantwort gilt als prognostisch günstig, wohingegen Viruspersistenz häufig mit chronischen Verläufen assoziiert ist (Kearney et al., 2001). Man vermutet, dass die kontinuierliche Produktion geringer Mengen an Virusprotein, die sogenannte *low-level-Expression*, eine fortlaufende Myokardschädigung unterhält, ohne dass dabei infektiöses Virus freigesetzt wird (Wessely et al., 1998).

Liu & Mason beschreiben die Pathogenese einer viralen Myokarditis als dreiphasigen Prozess.

Nach einer initialen viralen Schädigung kommt es zu einer antikardialen Autoimmunität mit einem anhaltenden Inflammationsprozess, der im weiteren Verlauf zum klinischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie führt (Liu & Mason, 2001).

VIRALE → INFLAMMATORISCHE → DILATATIVE
PHASE PHASE KARDIOMYOPATHIE

Man geht heute davon aus, dass die inflammatorische Phase für die Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie von entscheidender Bedeutung ist. Mechanismen, die während der zweiten Phase den Inflammationsprozess vermitteln und unterhalten, sind Gegenstand großer Forschungsbemühungen.

1.2 Coxsackieviren

Beim Coxsackievirus handelt es sich um ein unbehülltes RNA-Virus aus der Familie der Picornaviren mit einem Durchmesser von 30 nm. Das Virion besteht aus einer zentralen etwa 7500 bp langen Plus-Einzelstrang-RNA und einem ikosaederförmigen Kapsid. Der Plusstrang besteht aus einer nicht codierenden Region am 5'-Ende und einer kodierenden Region am 3'-Ende, an die sich eine Poly-Adenosin-Sequenz anschliesst. Das Kapsid besteht aus vier Proteinen, VP1 - VP4. VP1 - VP3 bestimmen die Ausbildung der Virusgestalt, VP4 stabilisiert das Kapsid und interagiert zwischen Virusgenom und Kapsid. Unter Beteiligung des VP1 koppelt das Virus an den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) der Zielzelle an. Es folgen Endozytose, *uncoating* und Überführung des viralen Plus-Stranges mit anschließender Proteinsynthese und RNA-Replikation.

Coxsackieviren werden zur Gruppe der Enteroviren gerechnet. Diese erhielten ihren Namen aufgrund der Fähigkeit sich im Gastrointestinaltrakt vermehren zu können. Aufgrund ihres unterschiedlichen Organotropismus werden zwei Untergruppen A und B unterschieden. Das Coxsackievirus der Gruppe B umfasst 6 humane Serotypen, mit denen sich experimentell unter anderem auch Mäuse und Ratten infizieren lassen. Der Infektionsweg erfolgt fäkal-oral oder als Tröpfcheninfektion. Nach oraler Aufnahme infiziert das Virus epitheliale Zellen der gastrointestinalen und pharyngealen Mukosa und breitet sich danach im submukösen Lymphgewebe aus, wo die Replikation stattfindet. Über die regionalen Lymphknoten folgt eine virämische Ausbreitung und Replikation im retikuloendothelialen System (RES), insbesondere in Makrophagen und B-Lymphozyten. Das RES dient im weiteren Verlauf der Infektion als „extrakardiales Virusreservoir“. Sekundär werden die Zielorgane wie Muskulatur, Pankreas, Myokard, Meningen und Haut befallen.

Die häufigste Manifestation einer Infektion ist eine unspezifische febrile Erkrankung mit Unwohlsein und Kopfschmerzen nach einer Inkubationszeit von drei bis sechs Tagen. Die Symptome dauern in der Regel längstens eine Woche. Schwere durch Coxsackieviren hervorgerufene Erkrankungen sind neben der CVB3-induzierten Myokarditis unter anderem die aseptische Meningitis bei Kindern, die Pleurodynie (Bornholm-Krankheit) und eine generalisierte, sepsisartige Erkrankung bei Neugeborenen.

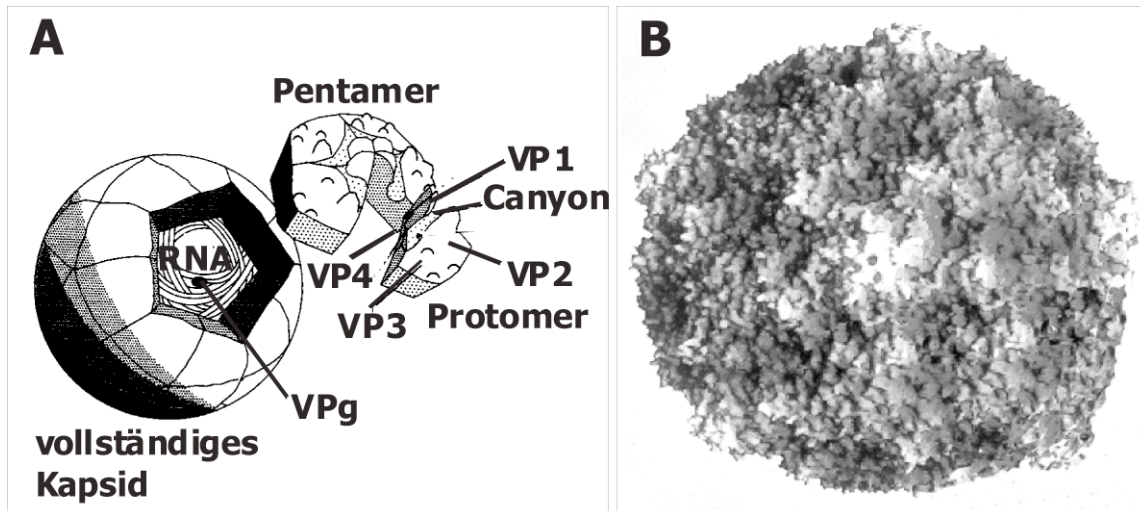


Abb. 1.1 A: Schematische Darstellung des Aufbaus von Picornaviren (nach Rueckert, 1996)
B: Oberflächenstruktur des Coxsackievirus B3, kristallographisch ermittelt
(nach Muckelbauer et al., 1995)

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Erkenntnisse über den Eintrittsmodus und die Persistenz kardiotroper Viren in Kardiomyozyten gewonnen werden. Von großer Bedeutung war hierbei die Klonierung des CAR, eines Rezeptors aus der Immunglobulinsuperfamilie, der zwei strukturell unverwandte Viren bindet. Sowohl das zu den Enteroviren gehörige CVB3 als auch Adenoviren bedienen sich dieses Rezeptors, um in die Zielzellen zu gelangen (Bergelson et al., 1997). CAR spielt wahrscheinlich eine wesentliche Rolle in der molekularen Pathogenese von Coxsackievirus- und Adenovirusinfektionen.

Bei DCM-Patienten beobachtet man eine Induktion des CAR im Myokard. Dies wird als wichtige molekulare Determinante für den Kardiotropismus dieser unverwandten Viren interpretiert (Fechner et al., 2003; Noutsias et al., 2003).

Ein bekannter Co-Rezeptor für CVB3 ist der *decay accelerating factor* (DAF, CD55). Dieser wird im Organismus ubiquitär exprimiert und schützt in seiner Hauptfunktion körpereigene Zellen vor Komplement-vermittelter Lyse. Adenoviren benutzen die Integrine $\alpha_{v\beta 3}$ und $\alpha_{v\beta 5}$ als Co-Rezeptoren (Liu & Mason, 2001).

1.3 Pathogenese der viralen Myokarditis im Mausmodell

Die in der Maus experimentell hervorgerufene Myokarditis durch CVB3 ist die am besten untersuchte entzündliche Kardiomyopathie in einem Tiermodell. Bevorzugt werden in den meisten Studien Mäuse der Stämme A/J, A.SW oder BALB/c verwendet. Diese Tiere können nach Virusinfektion eine Myokarditis entwickeln.

Bei anderen Mausstämmen ist bei alleiniger CVB3-Infektion eine genetische Resistenz für die Entwicklung einer chronischen Myokarditis bekannt. Diese lässt sich jedoch durch die Verabreichung von Immunmodulatoren wie Lipopolysaccharid (LPS), Interleukin-1 (IL-1) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) aufheben (Lane et al., 1991; Lane et al., 1993). Lane et al. beschreiben in einer Studie wie Mäuse des Stammes C57BL/6, die bei CVB3-Infektion eine lediglich minimale kardiale Entzündung zeigen, durch zusätzliche LPS-Verabreichung eine Autoimmunmyokarditis entwickeln, die der Erkrankung bei A/J oder A.SW-Mäusen gleicht. Die alleinige LPS-Injektion bewirkt dabei keine Myokarditis (Lane et al., 1991). Die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildet ein ebensolches Mausmodell, wobei Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet wurden.

Es lassen sich mehrere pathogenetische Mechanismen unterscheiden, die nach viraler Infektion zur Myokardschädigung führen. Zum einen wird die direkte virale Myozytolyse beschrieben, die die Schädigung in der Frühphase der Infektion bewirkt. Nach Infiltration durch Immunzellen sind T-Zell-vermittelte destruktive Immunprozesse beschrieben. In der späteren Phase werden Autoimmunprozesse beobachtet (Kawai et al., 1999).

1.3.1 Dreiphasiger Verlauf der murinen, viralen Myokarditis

Ähnlich wie Liu & Mason unterscheiden Kawai et al. auch bei der Maus drei Stadien der viralen Myokarditis:

- akute Phase (0.- 3. Tag *p.i.*)
- subakute Phase (4. - 14. Tag *p.i.*)
- chronische Phase (ab 15. Tag *p.i.*)

Die akute Phase der Infektion ist charakterisiert durch eine Virus-induzierte Zytotoxizität. Nach intraperitonealer Injektion von CVB3 kommt es innerhalb der ersten drei Tage zu fokal nekrotischen Kardiomyozytenarealen. Zu dieser Zeit sind histologisch noch keine entzündlichen Zellinfiltrate nachweisbar. Demnach gehen infizierte Kardiomyozyten wahrscheinlich im Rahmen der intrazellulären Virusreplikation zu Grunde. Der Virustiter steigt in den ersten Tagen kontinuierlich an und erreicht am 4. Tag maximale Werte.

Gleichzeitig beobachtet man einen Anstieg der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine wie INF- γ , TNF- α und IL-1 β im Myokard (Matsumori et al., 1997). Zytokine sind Peptide oder Glycoproteine mit einem Molekulargewicht zwischen 6.000 und 60.000 kDa, die als Mediatoren interzelluläre Signale übertragen. Bei verschiedenen Entzündungsprozessen im Organismus sind sie induzierbar. Während einer Myokarditis vermitteln und unterhalten sie die Inflammation. Es sind sowohl protektive als auch destruktive Effekte auf das Myokard beschrieben (Matsumori, 1997).

Mit der Bildung neutralisierender Antikörper ist die Viruslast im weiteren Verlauf regredient. Am 10. Tag *p.i.* sind nur noch minimale Titer nachweisbar.

Die direkt virale Myozytolyse, in Abwesenheit einer spezifischen Immunantwort, ist in Mausmodellen gut belegt (Chow et al., 1992).

Erste zelluläre Infiltrate sind ab dem 4. Tag nachweisbar und charakterisieren den Beginn der subakuten Infektionsphase. Der erste Schub infiltrierender Immunzellen besteht hauptsächlich aus Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Diese limitieren die Virusreplikation, indem sie infizierte Zellen erkennen und eliminieren. Ihnen wird ein protektiver Effekt zugesprochen. Eine Studie mit NK-defizienten Mäusen zeigt nach CVB3-Infektion einen agravierten

Myokarditisverlauf (Godeny & Gauntt, 1987). Zwischen dem 7. und dem 14. Tag *p.i.* wird im Myokard eine Welle von infiltrierenden T-Lymphozyten und Makrophagen beobachtet. Interessanterweise beobachtet man in diesem Zeitraum eine gravierende myokardiale Schädigung (Kishimoto et al., 1985).

Opavsky et al. berichten dass CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten-defiziente Mäuse eine geringere kardiale Inflammation und Sterblichkeit nach CVB3-Infektion aufweisen (Opavsky et al., 1999). Wie auch weitere Studien belegen scheint eine suffiziente T-Zell-Antwort für die Ausbildung einer Myokarditis essentiell zu sein (Schwimmbeck et al., 1997; Henke et al., 1995; Kishimoto et al., 1989).

Man beobachtet in der subakuten Phase vermehrt gebildete proinflammatorische Zytokine im Myokard. Shioi et al. beschreiben erhöhte *level* von IL-1 β , TNF- α , IFN- γ und IL-2 bei EMCV-induzierter Virusmyokarditis, die bis zu 80 Tagen nach Infektion erhöht nachweisbar sind (Shioi et al., 1996). Seko et al. untersuchen die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine nach CVB3-Infektion von Mäusen. Sie finden eine erhöhte Expression für IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α und TNF- β in den ersten sieben Tagen *p.i.* (Seko et al., 1997).

Zytokine können von nahezu jedem Zelltyp produziert werden und binden an komplementäre Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Jedes Zytokin kann eine Reihe von Effekten vermitteln. Etwa die Aktivierung verschiedener Zelltypen oder die Ausschüttung anderer Zytokine. Insgesamt ist jedoch der Einfluss einzelner Zytokine schwer zu beurteilen, da die Effekte häufig überlappend sind. Die Wirkungsweise eines Zytokins kann zudem in unterschiedlichen Myokarditismodellen erheblich variieren.

Die Antikörpertiter steigen in der subakuten Phase bis zum 14. Tag kontinuierlich an. Gleichzeitig ist ein Absinken der Viruslast erkennbar. Ab dem 10. Tag sind keine Viren mehr nachweisbar. Die Elimination des Virus ist dabei hauptsächlich auf die humorale, B-Zell vermittelte Immunantwort zurückzuführen, da sie durch T-Zell-Suppression nicht beeinflusst wird (Schwimmbeck et al., 1997; Henke et al., 1995; Kishimoto et al., 1989).

Das sich zunehmend einstellende zelluläre Infiltrat von T-Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten in der subakuten Phase ist offensichtlich grundlegend an der fortschreitenden Myokardschädigung beteiligt.

Die chronische Phase der Myokarditis (ab Tag 15 - 90) ist gekennzeichnet durch eine anhaltende myokardiale Entzündung und Schädigung. Man beobachtet eine Zunahme des

Herzgewichts und der Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio. Es kommt zu einer Dilatation und Fibrosierung des linken Ventrikels. In Untersuchungen unterschiedlicher Arbeitsgruppen kann persistierende virale RNA nachgewiesen werden (Kyu et al., 1992; Wee et al., 1992). Man geht davon aus, dass virale RNA als Promotor eine prolongierte Infiltration durch Immunzellen im Myokard unterhält, was zu einer fortlaufenden Schädigung führt (Why et al., 1994). Diese Vermutung stützen auch Untersuchungen bei verschiedenen immunkompetenten Mausstämmen mit viraler RNA-Persistenz und anhaltender Entzündung nach experimentell induzierter Virusmyokarditis. Diese Tiere entwickeln eine chronische Herzinsuffizienz. Im Gegensatz dazu zeigen DBA/1 J-Mäuse, die virale RNA frühzeitig eliminieren, keine fortbestehende Entzündung sowie keine Neigung zur Chronifizierung (Klingel et al., 1992). Andererseits ist die Viruspersistenz nicht notwendigerweise mit einem chronischen Verlauf assoziiert. Es ist anzunehmen, dass Art und Umfang der Immunantwort bei den jeweiligen Mausstämmen entscheidend den Krankheitsverlauf mitbestimmen.

Alternative Mechanismen für die fortbestehende Myokardschädigung werden vielfach diskutiert. Der veränderte Immunstatus bei CVB3-Infektion könnte demnach das Myokard für eine Schädigung durch andere Erreger empfänglich machen (Woodruff J.F., 1980).

Besonderes Interesse gilt in den letzten Jahren der pathogenetischen Aufklärung von Autoimmunmechanismen. Man vermutet, dass T-Lymphozyten Kardiomyozyten unter anderem auf Grund molekularen Mimikryschädigen. Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Virusproteinen und myokardialen Antigenen führen demnach zu einer Kreuzreaktion mit körpereigenen Strukturen (Gauntt et al., 1995). Bei chronischem Myokarditisverlauf richten sich autoreaktive T-Lymphozyten und Autoantikörper gegen kardiale Strukturen (Neumann et al., 1990; Caforio et al., 1997).

Als wichtiges Autoantigen gilt Myosin in Kardiomyozyten. Dieses Protein weist in seiner Aminosäurefrequenz eine hohe Ähnlichkeit mit Kapsidproteinen des CVB3 auf. Autoreaktive Antikörper richten sich dabei gleichzeitig gegen Viruspartikel und Myosin. In verschiedenen Tiermodellen kann man allein durch Verabreichung kardialen Myosins eine Myokarditis auslösen (Kodama et al., 1994; Pummerer et al., 1996; Inomata et al., 1995).

Man kennt eine Reihe weiterer herzspezifischer Antikörper, die im Sinne einer Kreuzreaktion sowohl mit CVB3-Kapsidproteinen als auch mit kardialen Strukturen reagieren, beispielsweise Anti-Sarkolemm-Antikörper (Wolfgramm et al., 1985;

Cunningham et al., 1992).

Bestandteile von Kardiomyozyten, die dabei zu Grunde gehen, können daraufhin an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen auf dem zellulären Weg Autoimmunität erzeugen.

1.4 Immunzellen und Zytokine

Mann kennt zwei funktionell verschiedene Untergruppen von $CD4^+$ -T-Zellen, sogenannte Th_1 - und Th_2 -Zellen, die sich nach Antigenkontakt aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (Th_0) differenzieren können. Diese sezernieren nach Aktivierung unterschiedliche, für den jeweiligen Subtyp spezifische Zytokinprofile und führen zu unterschiedlichen Immunantworten (Mosmann & Coffman, 1987).

Der Th_1 -Zelltyp wurde ursprünglich durch die Ausschüttung von IL-2, IL-3 und $INF-\gamma$ charakterisiert und begünstigt vor allem die zelluläre Immunität (Cher & Mosmann, 1987). $INF-\gamma$ führt beispielsweise zu Makrophagenaktivierung und vermittelt die allergische Reaktion vom verzögerten Typ (Typ IV). Weitere Th_1 -Zytokine fördern die Differenzierung zytotoxischer T-Zellen (CTLs). Sie führen darüber hinaus zur Aktivierung von NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten. Die zelluläre Immunantwort ist essentiell für die Bekämpfung intrazellulärer Erreger wie Viren, einiger Bakterien und Parasiten. Th_1 -Zellen werden auch als inflammatorische $CD4^+$ -T-Zellen bezeichnet.

Bei Th_2 -Zellen wurde zuerst IL-4 als spezifisches sekretorisches Zytokin beschrieben, später folgten IL-3, IL-5, IL-10 und IL-13. Diese Zytokine stimulieren unter anderem Mastzellen, die daraufhin IgE produzieren. Sie fördern die Proliferation von Eosinophilen- und B-Zellen (Coffman R.L., 2006). Th_2 -Zellen stehen in engem Zusammenhang mit der humoralen Immunantwort. Sie sind auch als $CD4^+$ -T-Helferzellen bekannt.

Die Differenzierung einer Th_0 -Zelle in eine bestimmte Richtung ist von der Art des Antigens abhängig und steht darüber hinaus unter dem Einfluss von Zytokinen. Die Zytokine einer sich ausbildenden Th-Subpopulation haben die Möglichkeit eine Summe gerichteter, antipathogener Effekte zu initiieren und, im Sinne einer positiven Rückkopplung, die Ausreifung des eigenen Zelltyps zu stimulieren.

$INF-\gamma$ und IL-12 begünstigen eine Th_1 -Differenzierung, IL-4 eine Th_2 -Differenzierung.

Darüber hinaus besteht zwischen Th₁- und Th₂-Zellen ein reziproker Hemmmechanismus. Der jeweilige Subtyp kann durch die Ausschüttung seiner spezifischen Zytokine die Entwicklung des anderen Subtyps und dessen Effekte hemmen (Coffman R.L., 2006).

Je nach verwendetem Mausstamm ist in viral induzierten Myokarditismodellen die Dominanz einer Th₁- oder Th₂-Antwort beschrieben. In C57BL/6-Mäusen ist die Dominanz von V γ 1-Zellen, einer T-Zell-Subpopulation, beschrieben, die CD4⁺-Zellen in Richtung einer Th₂-Immunantwort lenken. Das Überwiegen einer Th₂-Antwort wird bei C57BL/6-Mäusen unter anderem für die geringe Empfänglichkeit einer chronischen Myokarditis verantwortlich gemacht (Huber et al., 2000).

Durch die Verabreichung des Immunmodulators LPS wird diese Resistenz aufgehoben. LPS ist ein Molekül, das an die Zellwand gramnegativer Bakterien gebunden ist. Bestehend aus einem toxischen Lipidanteil und Polysacchariden wirkt es als Endotoxin. Experimentell wird LPS vielfach zur Lymphozytenstimulation und Aktivierung des Immunsystems eingesetzt. Es aktiviert unter anderem Makrophagen und B-Zellen und fördert in zahlreichen Geweben die Expression von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen. Veränderte Zytokinexpressionsmuster durch aktivierte Immunzellen mit vermehrter Expression von MHC-Molekülen im Herzgewebe und Induktion einer Th₁-gerichteten Immunantwort werden bei C57BL/6, nach LPS-Verabreichung, als wichtige Faktoren für die gesteigerte Empfänglichkeit einer chronischen CVB3-Myokarditis angesehen (Lane et al., 1991; Lane et al., 1993).

Bei der viralen Myokarditis ist die Expression zahlreicher Zytokine im Myokard gesteigert. Zunächst werden diese wahrscheinlich hauptsächlich von Myozyten, Fibroblasten und Endothelzellen produziert. Mit der zunehmenden Infiltration durch Immunzellen sind auch diese an der Zytokinproduktion beteiligt.

Bei Patienten mit Myokarditis oder DCM findet man unter anderem erhöhte Plasmakonzentrationen von TNF- α , INF- γ , IL-1 α und IL-1 β (Levine et al., 1990; Matsumori et al., 1994). TNF- α und INF- γ induzieren unter anderem das intermolekulare Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1). Dieser Rezeptor wird auf Kardiomyozyten exprimiert und ist pathogenetisch bedeutsam für die Erkennung und Schädigung von Kardiomyozyten durch zytotoxische T-Lymphozyten (Seko et al., 1993).

Zahlreiche Zytokine haben über die Induktion der myokardialen Stickstoffmonoxyd-

synthetase (NOS) Einfluss auf die Hämodynamik. So zeigen TNF- α , IL-2 und IL-6 in isolierten Hamsterherzen einen negativ inotropen Effekt (Finkel et al., 1992). Für IL-1 sind multiple, teilweise gegensätzliche Effekte beschrieben. In einigen Versuchen kann ein negativ inotroper Effekt nachgewiesen werden (Evans et al., 1993; Hosenpud et al., 1998). Rekombinantes IL-1 α hingegen hatte einen positiv inotropen Effekt (Li et al., 1993).

Das Zytokin TGF- β regt die Fibroblastenproduktion an und ist ebenfalls hämodynamisch wirksam. Es aktiviert das vasokonstriktorische Endothelin und erhöht dadurch den Blutdruck (Weber K.T., 1997; Eghbali et al., 1991).

Darüber hinaus regulieren etliche Zytokine die Expression der Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Dies sind extrazelluläre Enzyme, die entscheidend die Textur und Funktionalität der extrazellulären Matrix beeinflussen.

1.5 Die extrazelluläre Matrix

1.5.1 Zusammensetzung der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist ein dynamisches System, bestehend aus dreidimensional vernetzten Kollagenen und Glykoproteinen sowie Proteo- und Glycosaminoglykanen. Diese Komponenten bilden ein Netzwerk für funktionelle Herzzellen. Kardiomyozyten und Fibroblasten sind über Adhäsionsmoleküle mit der ECM verbunden, was zum einen die strukturelle Integrität im Myokard gewährleistet und zum anderen die Kontraktion der einzelnen Kardiomyozyten in eine koordinierte, globale Pumpfunktion überträgt. Durch die kontinuierliche, systematische Verknüpfung der verschiedenen Herzzellen wird eine geordnete Interaktion ermöglicht.

Die Zell-Matrix-Wechselwirkungen werden teilweise über Integrine vermittelt. Diese Zelloberflächenproteine werden auf etlichen Zelltypen, wie Kardiomyozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Immunzellen exprimiert.

Den Hauptbestandteil der ECM bilden Kollagene. Kollagen Typ I ist im Myokard mit 85% der vorherrschende Kollagentyp. Es besitzt eine hohe Steifheit und wird vermehrt in mechanisch beanspruchten Geweben vorgefunden. Kollagen Typ III besitzt eine größere

Elastizität als Kollagen Typ I und macht im gesunden Herzen ca. 11% am Gesamtkollagengehalt aus. Mengenmäßig kleinere Anteile in der ECM bilden Glykoproteine wie Fibronectin, Elastin und Laminin. Daneben gibt es sogenannte matrizelluläre Proteine, wie Tenascine, Thrombospondine, Osteonektin und Osteospondin. Sie werden im Organismus hauptsächlich während der Embryogenese und bei pathologischen Prozessen exprimiert. Sie vermitteln Zell-Matrix-Interaktionen und beeinflussen die Zellfunktion (Schellings et al., 2004; Kuznetsova et al., 2004). Die Expression der meisten ECM-Komponenten unterliegt der Regulation durch Zytokine.

Es besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Synthese- und Abbauvorgängen der Bestandteile der ECM. Die Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes ist für die Funktionalität des Herzens entscheidend. Bei zahlreichen myokardialen Erkrankungen werden strukturelle Veränderungen (*remodeling*) in der extrazellulären Matrix beobachtet.

Bei der viralen Myokarditis und der dilatativen Kardiomyopathie kommt es zu einer vermehrten myokardialen Fibrose (Kishimoto et al., 1997; Pauschinger et al., 1999). Des Weiteren kommt es auch zu funktionellen Störungen der ECM. Gunja-Smith et al. zeigen, dass die Anzahl der Quervernetzungen zwischen den Kollagenfibrillen stark reduziert ist (Gunja-Smith et al., 1996). Auch kommt es zur Verschiebung des Verhältnisses der beiden Kollagentypen. Pauschinger et al. weisen in Endomyokardbiopsien von Patienten mit DCM und Herzinsuffizienz (EF < 50%) eine Zunahme der Kollagen Typ I / Kollagen Typ III-Ratio nach (Pauschinger et al., 1999).

1.5.2 Matrixmetalloproteinasen und myokardiales *remodeling*

Die extrazelluläre Matrix unterliegt einem ständigen Umbau. Für diesen Prozess werden verschiedene Enzymeaktivitäten benötigt. Man unterscheidet mehrere Gruppen von extrazellulären Enzymen, die das dynamische Gleichgewicht in der ECM aufrechterhalten. Eine bedeutende Gruppe matrixdegradierender Enzyme bilden die Matrixmetalloproteinasen (MMPs). MMPs sind Proteasen, die ein zentrales Zinkatom im katalytischen Zentrum besitzen. Sie werden von verschiedenen Zellen, wie Endothelzellen, Fibroblasten, Kardiomyozyten und zahlreichen Tumorzelltypen synthetisiert. Zunächst liegen sie als

inaktive Proenzyme (pro-MMPs) vor und werden in dieser Form in den Extrazellulärraum sezerniert. Dort werden sie proteolytisch aktiviert. MMPs bauen fibrilläres Kollagen ab und sind teilweise für einzelne Kollagentypen spezifisch. Bei der viralen Myokarditis und der DCM ist die Expression und die Aktivität verschiedener MMPs im Myokard gesteigert. MMPs werden auf Grund ihrer Substratspezifität, ihrer Struktur oder ihrer Lokalisation in verschiedene Untergruppen eingeteilt (Beaudeau et al., 2004).

- Kollagenasen: MMP-1, MMP-8, MMP-13 bauen vor allem fibrilläre Kollagene ab.
- Gelatinasen: MMP-2, MMP-9 bauen vor allem denaturiertes Kollagen (Gelatin) ab.
- Stromelysine: MMP-3, MMP-10, MMP-11 bauen Kollagene, Gelatin, Proteoglykane und Glykoproteine ab.
- Membran-Typ MMPs (MT-MMPs): MT-1-MMP bis MT-6-MMP, EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*).
MT-MMPs sind membranständige Proteine, die unter anderem andere MMPs aktivieren.
- Matrilysine: MMP-7, MMP-26 sind niedermolekulare Proteine mit einer breiten Substratpalette. MMP-7 kann pro-MMPs aktivieren und die β -Kette von Insulin spalten.
- Metalloelastase: MMP-12 baut unter anderem Elastin und Vitronektin ab.

Die physiologische Halbwertszeit von Kollagenfibrillen liegt zwischen 30 und 200 Tagen und der tägliche Kollagenumsatz im linken Ventrikel liegt bei etwa 5% - 9%. Diese Rate kann bei der DCM und auch anderen kardialen Erkrankungen auf über 50% ansteigen (Li et al., 1999). Durch die strukturelle Umgestaltung der extrazellulären Matrix mit Veränderung der Kollagenratio, vermehrter Kollagenablagerung und verminderter Quervernetzung der Kollagenfibrillen büßt die ECM ihre Verankerungsfunktion für den kontraktilem Apparat des Myokard ein. Die strukturelle Integrität des Herzens geht durch den Umbau des Kollagennetzwerks verloren. Dieser pathologische Vorgang wird meist von Zellnekrose, Fibroblastenproliferation und Hypertropie der Kardiomyozyten begleitet. Das Zusammenwirken dieser Prozesse kann zu einer kardialen Dilatation mit Einschränkung der Kontraktilität und konsekutiver Dysfunktion führen.

Man geht davon aus, dass pathologisches *remodeling* durch ein Missverhältnis in der Expression und Aktivität matrixaktiver Enzyme hervorgerufen werden kann (Spinale F.G., 2002).

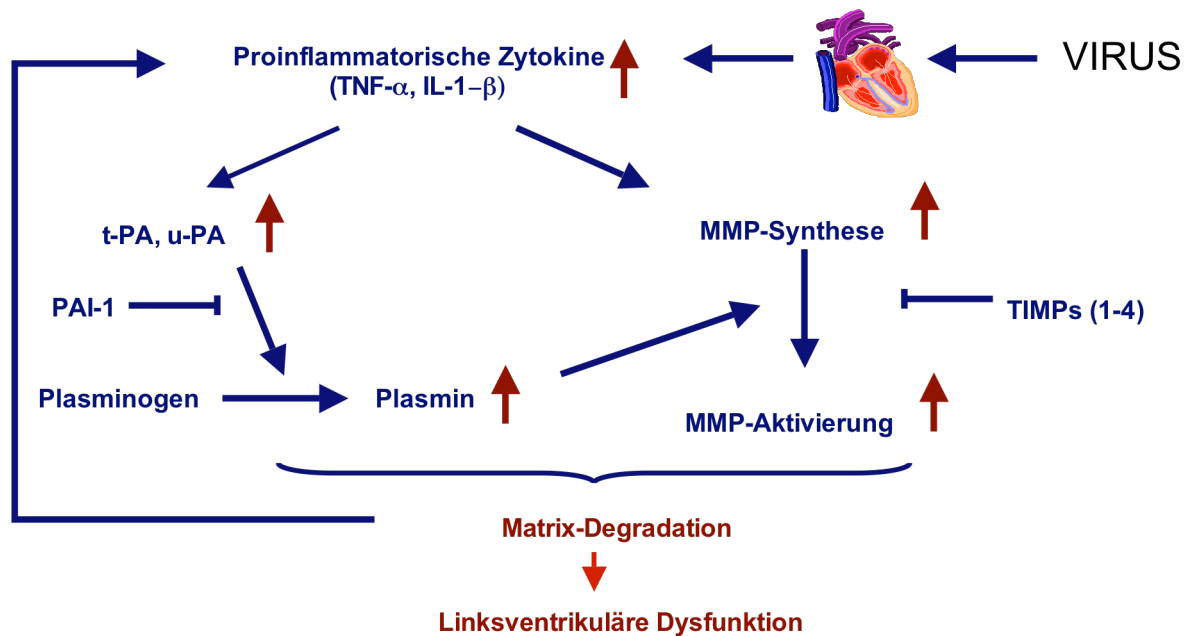


Abb. 1.2 Regulationsmechanismen bei myokardialer *remodeling*
(nach Pauschinger, 2006)

1.5.3 Regulation des kardialen *remodeling*

Die Regulation der MMPs und anderer matrixdegradierender Enzyme erfolgt entsprechend ihrer wichtigen Funktion auf mehreren Ebenen. Die Kontrolle erfolgt auf Transkriptionsebene und extrazellulär durch Aktivierung der Proenzyme und Interaktion mit spezifischen Inhibitoren. Zahlreiche Mediatoren, wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone kontrollieren die Transkription der MMPs. So inhibieren beispielsweise das Zytokin TGF-β, etliche Steroide und Heparin die Transkription von MMPs. TNF-α, PDGF und IL-1 hingegen fördern die Transkription (Kerrigan et al., 2000; Beaudoux et al., 2004). Eine transkriptions- und aktivitätsfördernde Wirkung ist auch für Stickstoffmonoxid (NO) beschrieben

(Eberhardt et al., 2000; Zaragoza et al., 2002).

Posttranslational erfolgt die Regulation durch die proteolytische Spaltung der inaktiven Proenzymformen, den pro-MMPs. Als wichtigster *in vivo*-Aktivator für pro-MMPs gilt Plasmin. Die bekannteste Funktion der Protease ist die Fibrinolyse, ein wichtiger Vorgang bei der Wundheilung und der Rekanalisierung von Blutgefäßen. Plasmin ist zudem nach Aktivierung der Proenzymform Plasminogen für eine schnelle Aktivierung einer Reihe von pro-MMPs zuständig (Saksela & Rifkin, 1988; Moscatelli & Rifkin, 1988; Kirchheimer et al., 1989). Darüber hinaus aktivieren bereits aktive MMPs über eine Rückkopplungsschleife weitere pro-MMPs. So sind etwa MMP-3 und eine Reihe von Membran-Typ MMPs in der Lage Proenzymformen von MMP-2 oder MMP-13 zu spalten (Spinale F.G., 1999; Beaudoux et al., 2004).

Die dritte Ebene der MMP-Regulierung erfolgt durch physiologische Inhibitoren. Die Gruppe der „*tissue inhibitors of metalloproteinases*“ (TIMPs) inhibieren aktive MMPs spezifisch. Es sind vier TIMPs bekannt (TIMP-1, -2, -3, -4). TIMPs binden mit hoher Affinität an das aktive Zentrum von MMPs und bilden einen nicht-kovalenten Komplex (Feldmann et al., 2001).

Die Regulation der TIMPs unterliegt ebenfalls verschiedenen Mediatoren. Wichtige Induktoren der TIMP-1-Expression sind beispielsweise TGF- β und IL-6. Dagegen hemmen TNF- α und IL-1 die Transkription (Shingu et al., 1994; Sivasubramanian et al., 2001).

Bei der dilatativen Kardiomyopathie kann eine *downregulation* der TIMP-Expression beobachtet werden (Li et al., 1998). Eine Studie zeigt bei CVB3-iduzierter Myokarditis eine Verringerung der Expression von TIMP-1 und TIMP-4 bei gleichzeitig erhöhter MMP-3- und MMP-9-Expression (Li et al., 2002; rezensiert in Pauschinger et al., 2004).

Der physiologische Umbau der ECM scheint von einem intakten Verhältnis zwischen MMPs und TIMPs abhängig zu sein. Bei der viralen Myokarditis und der DCM ist das Gleichgewicht entscheidend gestört. Das MMP/TIMP-Missverhältnis führt zu einer relativen MMP-Überaktivität, wodurch pathologisches *remodeling* verursacht werden kann (Ducharme et al., 2000; Kim et al., 2000).

1.6 Das Plasminogen/Plasmin-System

Das fibrinolytische System (Plasminogen/Plasmin-System) ist im Organismus von Säugetieren in eine Reihe von proteolytischen Prozessen involviert. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese und der Wundheilung. Im Blutgefäßsystem ist es an der Angiogenese und der Thrombolysen beteiligt.

Für das inaktive Proenzym Plasminogen sind mehrere physiologische Aktivoren bekannt. Faktor XIIa (Hageman-Faktor), ein Bestandteil der Gerinnungskaskade, ist ein Plasminogenaktivator im Blut und wird von Endothelzellen synthetisiert. Daneben sind zwei Serinproteasen, „*tissue-type plasminogen activator*“ (tPA) und „*urokinase-type plasminogen activator*“ (uPA) wichtige Plasminogenaktivatoren. Der Gewebe-Typ Plasminogenaktivator findet sich im Gefäßgewebe und ist weitestgehend spezifisch für Fibrin, da Plasminogen durch tPA nur in Gegenwart von Fibrin aktiviert wird. Urokinase-Typ Plasminogenaktivator hingegen aktiviert Plasminogen nach Bindung an seinen hochaffinen Rezeptor (uPAR) unabhängig von Fibrin (Carmeliet et al., 1994; Collen & Lijnen, 1991).

Zahlreiche invasive Zelltypen, zum Beispiel Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen und Tumorzellen können uPA synthetisieren und sezernieren. uPA wird aktiviert, indem es nach Sekretion an seinen Rezeptor uPAR, ein membrangebundenes Glykoprotein, bindet. uPAR wird ebenfalls auf uPA-sezernierenden Zellen exprimiert.

Die Interaktion von uPA und uPAR führt durch die Aktivierung von Plasmin zu perizellulärer Proteolyse und begünstigt dadurch entscheidend die Migration dieser Zellen. Bei Entzündungsprozessen und Metastasierung fördert Plasmin dadurch die Gewebsinvasion von Immunzellen und Tumorzellen (Carmeliet et al., 1994). Nach uPA/uPAR-Interaktion wird membrangebundenes Plasminogen proteolytisch in die aktive Form Plasmin umgewandelt. Aktives Plasmin wirkt reziprok aktivierend auf inaktives uPA. Dieser Mechanismus der „reziproken Zymogenaktivierung“ bewirkt eine schnelle Generierung von Plasmin, das durch zirkulierende Inhibitoren wie α_2 -Antiplasmin schnell inaktiviert wird (Plesner et al., 1997).

Die physiologischen Inhibitoren der uPA-Aktivierung sind die „*plasminogen activator inhibitors*“ (PAI-1 und PAI-2).

Plasmin hat eine breite Substratpalette. Die Protease kann mehrere Bestandteile der ECM abbauen und aktiviert etliche Prokollagenasen, vor allem auch MMPs (Carmeliet et al., 1997).

Für MMP-1, MMP-3 und MMP-9 gilt uPA mittels Plasmin als wichtigster physiologischer Aktivator (Beaudeau et al., 2004; Heymans et al., 1999; Rohde et al., 1999). Aufgrund dieser Wirkungsweise und des Einflusses auf migrierende Immunzellen sind Plasmin und uPA potentiell wichtige Faktoren in der Pathogenese einer Reihe entzündlicher Erkrankungen.

Heymans et al. berichten in einem akuten Myokardinfarktmodell nach Inaktivierung des uPA-Gens über verzögerte Wundheilung und Angiogenese bei Mäusen (Heymans et al., 1999). Ein anderes Mausmodell mit akuter Volumenbelastung des linken Ventrikels kann nach uPA-*knockout* (uPA^{-/-}) vermindertes kardiales *remodeling* und eine signifikant bessere Herzfunktion nachweisen (Heymans et al., 2005).

Moriwaki et al. zeigen in einem Myokardinfarktmodell mit uPA-Überexpression oder Deletion des PAI-Gens eine vermehrte Fibrosierung des Herzens (Moriwaki et al., 2004), wohingegen eine Deletion des Plasminogen-Gens vor Fibrose schützt (Creemers et al., 2000).

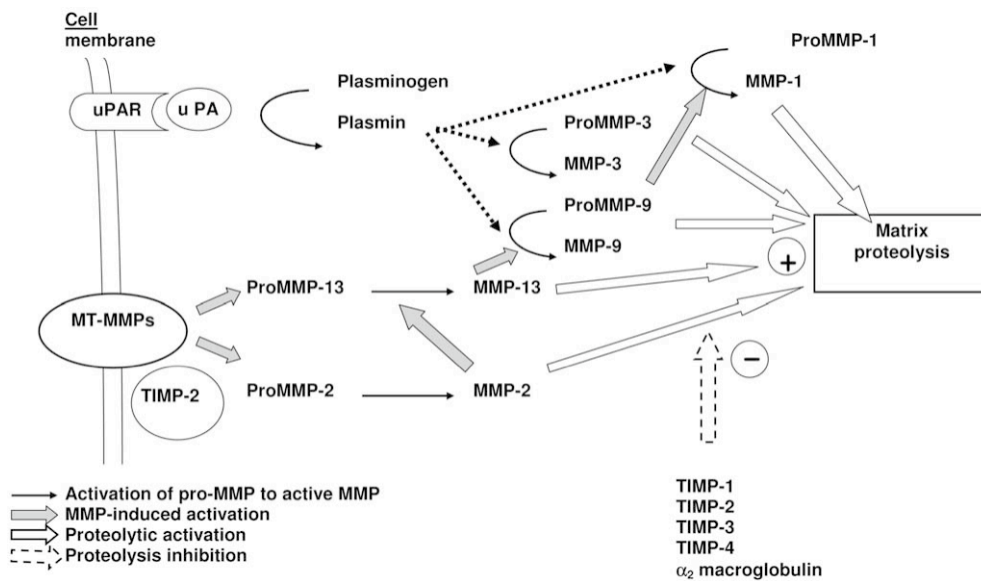


Abb. 1.3 Zelloberflächenassoziierte MMP-Aktivierungswege (nach Beaudeau et al., 2004)

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Der Verlauf einer viralen Myokarditis ist beim Menschen sehr variabel. Milde Verläufe sind oft subklinisch oder werden wegen der unspezifischen Symptomatik übersehen, was eine Datenerhebung zu der Inzidenz und dem Verlauf der Erkrankung erschwert.

Die molekularen Mechanismen in der Pathogenese der viralen Myokarditis und DCM sind bis zum heutigen Zeitpunkt nicht hinreichend verstanden. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Tiermodelle etabliert, um die zugrunde liegenden Pathomechanismen zu erforschen. Mausmodelle haben sich in der Myokarditisforschung vielfach bewährt.

Es gibt in den letzten Jahren vermehrt Hinweise, dass uPA den Verlauf verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen wie zum Beispiel Arteriosklerose oder das *remodeling* und die Angiogenese nach Myokardinfarkt erheblich beeinflussen kann. Zum Einfluss von uPA auf die Immunpathogenese der viralen Myokarditis liegen bislang keine Daten vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich die Expression von uPA in einem akuten, CVB3-induzierten Myokarditismodell auf die kardiale Inflammation und die Bestandteile der ECM auswirkt. Dazu wurde ein murines uPA-*knockout*-Modell verwendet.

Konkret wurde versucht, folgende Fragen zu klären:

- Wie ändert sich die mRNA-Expression von uPA bei akuter, CVB3-induzierter Myokarditis im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen?
- Wie verändert sich die Expression proinflammatorischer Zytokine?
- Welche Veränderungen treten in der Expression wichtiger ECM-Komponenten und matrix-aktiver Enzyme auf?
- Wie verändert sich die Aktivität der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9?
- In welchem Maße wird das Myokard durch Immunzellen infiltriert?
- Inwiefern werden die genannten Effekte durch Deletion des uPA-Gens beeinflusst?