

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer uPA-Deletion auf den Verlauf einer viral induzierten, murinen Myokarditis analysiert. Die dargestellten Ergebnisse charakterisieren die kardiale Inflammation und die extrazelluläre Matrix in der akuten Myokarditisphase am 7. Tag nach CVB3-Infektion. In der akuten Phase der Infektion ließen sich erhöhte Transkriptions-*level* proinflammatorischer Zytokine und extrazellulärer Matrixbestandteile, sowie eine erhöhte Expression und Aktivität matrixaktiver Proteasen nachweisen. Zudem zeigte sich eine massive Infiltration durch inflammatorische Zellen.

Eine uPA-Deletion reduzierte die Zytokinexpression und hemmte die myokardiale Infiltration durch Entzündungszellen in entscheidendem Maße.

Die Expression verschiedener MMPs änderte sich bei uPA-Deletion in unterschiedlicher Weise. Eine signifikante *downregulation* konnte für MMP-8 und MMP-9 nachgewiesen werden. Zudem wurde bei Infektion die Aktivität von MMP-9 durch uPA-Deletion signifikant gesenkt.

Insgesamt verringerte eine uPA-Deletion die kardiale Entzündungsreaktion in der akuten Phase einer CVB3-induzierten Myokarditis und schützte dadurch vor einer kardialen Schädigung.

4.1 Erhöhte Expression von uPA bei akuter viraler Myokarditis

Mittels RT-PCR konnte bei akuter CVB3-Myokarditis eine signifikante Expressionssteigerung von uPA nachgewiesen werden, wohingegen die Expression von tPA bei Infektion oder uPA-Deletion unverändert blieb. Eine erhöhte uPA-Expression ist bei verschiedenen Herz- und Gefäßerkrankungen nachweisbar. In einem akuten murinen Myokardinfarktmodell ist eine erhöhte Expression und Aktivität von uPA mit Entzündungsinfiltraten von neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen im Myokard assoziiert, was darauf hindeutet, dass diese Zellen in entscheidendem Maße uPA produzieren. Die tPA-Expression bleibt dabei unverändert (Heymans, et al., 1999).

Carmeliet et al. berichten über stark erhöhte uPA-Expression und Aktivität in der Gefäßwand arteriosklerotisch bedingter Aortenaneurysmen in einem Mausmodell. Sie zeigen, dass uPA

dabei hauptsächlich von infiltrierenden Makrophagen produziert wird. Die tPA-Expression ist auch in dieser Studie nicht erhöht (Carmeliet et al., 1997).

Es ist anzunehmen, dass die erhöhte uPA-Expression im vorliegenden Modell ebenfalls hauptsächlich durch die massive Entzündungszellinfiltration bedingt war. Dabei kommen sowohl Lymphozyten als auch Granulozyten und Makrophagen als potentiell uPA-exprimierende Zellen in Betracht.

4.2 Erhöhte Expression und Aktivität des MMP/TIMP-Systems bei akuter viraler Myokarditis

Zahlreiche Veröffentlichungen belegen, dass die Expression von MMPs bei viraler Myokarditis erhöht ist. Erhöhte MMP-Expressionsmuster sind dabei mit einer erhöhten Expression von Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α oder TGF- β assoziiert (Li et al., 2002; Kishimoto et al., 1997). Für alle gemessenen MMPs, einschließlich der membranassoziierten MMPs, wurde in der vorliegenden Arbeit bei CVB3-Infektion ein signifikanter Expressionsanstieg gefunden.

Die zymographische Aktivitätsbestimmung von MMP-2 und MMP-9 zeigte bei Infektion einen deutlichen Aktivitätsanstieg der Gelatinasen, der vor allem bei MMP-9 sehr ausgeprägt war { $p^*(K, I)$ jeweils $< 0,05$ }.

Für MMP-3, MMP-8 und MMP-9 war mittels RT-PCR bei den nicht infizierten Kontrollgruppen (K, K uPA^{-/-}) kein Signal detektierbar. Es ist anzunehmen, dass die MMPs -3, -8 und -9 beim verwendeten Mausstamm C57BL/6 physiologischer Weise in sehr geringen Mengen exprimiert wurden. Bei den verwendeten Zyklenzahlen, bei denen ein effektiver MMP-Nachweis bei den infizierten Gruppen möglich war, war die amplifizierte DNA-Menge mittels Gelelektrophorese bei den nicht infizierten Tieren nicht nachweisbar. Für die MMPs -2, -12, -13, MT-1-MMP und EMMPRIN war das detektierbare Signal bei den nicht infizierten Kontrollgruppen relativ schwach ausgeprägt.

Bekanntlich werden MMPs unter konventionellen Bedingungen in Geweben nur schwach exprimiert (Beaudeau et al., 2004). Die Expression steigt bei physiologischen und pathologischen Prozessen des Geweberemodelings unter dem Einfluss transkriptionsregulierender Faktoren an.

Der Vergleich der infizierten Gruppen (I, I uPA^{-/-}) zeigte bei den uPA^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen eine signifikante *downregulation* für MMP-8 und MMP-9 und eine leichte, nicht signifikante *downregulation* für MMP-3. Bei MMP-9 wurde in der infizierten uPA^{-/-}-Gruppe zusätzlich eine signifikante Aktivitätsminderung um mehr als das 10fache, verglichen mit den WT-Mäusen, gemessen $\{p^*(I, I \text{ uPA}^{-/-}) < 0,05\}$.

Für MMP-9, das zum Plasminogensystem gezählt wird, gilt uPA mittels Plasmin als wichtigster *in vivo*-Aktivator (Beaudeau et al., 2004; Heymans et al., 1999). Folglich ist bei uPA-Deletion eine reduzierte MMP-9-Aktivität erwartungsgemäß.

MMP-9 kommt während des *remodeling* im Myokard eine wichtige Bedeutung zu. In einem Mausmodell verhindert eine MMP-9-Deletion eine linksventrikuläre Dilatation und Fibrose nach induziertem Myokardinfarkt. Es kann eine Reduktion der myokardialen Infiltration durch Makrophagen beobachtet werden (Ducharme et al., 2000).

Eine andere Studie zeigt nach experimentell induziertem Myokardinfarkt eine verringerte Infiltration durch Leukozyten bei MMP-9-Deletion (Heymans et al., 1999).

Eine reduzierte MMP-9-Aktivität ist durch die Verringerung der kardialen Inflammation auch bei der viralen Myokarditis ein potenziell protektiver Einflussfaktor.

Bei MMP-2, MMP-12 und den membranassoziierten MMPs konnte bei den infizierten uPA^{-/-}-Mäusen tendenziell eine Expressionssteigerung gegenüber den infizierten WT-Mäusen beobachtet werden. Ein signifikanter Anstieg stellte sich jedoch nicht dar.

Für MT-1-MMP zeigte sich interessanterweise innerhalb der Kontrollgruppen (K, K uPA^{-/-}) ein signifikanter Expressionsanstieg bei der uPA^{-/-}-Gruppe.

Ein Erklärungsansatz für die tendenzielle Mehrexpression von MMP-2, MMP-12, MT-1-MMP und EMMPRIN bei uPA-Deletion liegt im Aktivierungsweg begründet. Neben dem Plasminogen/Plasmin-System fungieren MT-1-MMP und EMMPRIN als membranassoziiertes Aktivierungssystem für eine Reihe von MMPs (Spinale F.G., 2002). Über eine Aktivierungskaskade werden unter anderem MMP-2 und MMP-13 aktiviert (Beaudeau et al., 2004). Durch den Ausfall des Plasminogen/Plasmin-Systems bei uPA-Deletion könnten die Transkriptions-*level* dieses MMP-Aktivierungssystems gegenregulatorisch gesteigert sein.

Ein Expressionsanstieg von MMP-2, MMP-13 und TIMP-1 kann auch nach MMP-9-Deletion oder MMP-7-Deletion beobachtet werden (Ducharme et al., 2000; Rudolph-Owen et al., 1997). Die exakten Mechanismen dieser kompensatorischen MMP-Regulierung sind jedoch nicht beschrieben.

Die Expression der MMP-Inhibitoren stellte sich heterogen dar. Für TIMP-1, das zum Plasminogen/Plasmin-System gerechnet wird (Heymans et al., 1999), konnte bei den nicht infizierten Kontrollgruppen (K, K uPA^{-/-}) kein Signal detektiert werden. Bei Infektion (I, I uPA^{-/-}) waren TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 deutlich induziert. Dabei war tendenziell jeweils bei der infizierten uPA^{-/-}-Gruppe die stärkste Expression erkennbar. Die Mehrexpression gegenüber der infizierten WT-Gruppe stellte sich jedoch bei keinem der TIMPs signifikant dar.

Die Expression der TIMPs wird unter anderem durch Zytokine reguliert. IL-1 β kann beispielsweise die TIMP-Expression in Endothelzellen inhibieren (Shingu et al., 1994). Bei TNF-transgenen Mäusen führt die TNF-Überexpression zu einer vermehrten MMP-Expression und gleichzeitig zu verminderter TIMP-1-Expression (Sivasubramanian et al., 2001). Die relativ höhere Zytokinexpression bei den infizierten WT-Mäusen im Vergleich zu den infizierten uPA-deletierten Mäusen könnte auch im vorliegenden Mausmodell innerhalb der infizierten Gruppen bei den WT-Mäusen eine relative TIMP-downregulation hervorgerufen haben. Das TIMP-4-Transkript wurde weder durch Infektion, noch durch uPA-Deletion reguliert.

Der physiologische uPA-Inhibitor PAI-1 war auf mRNA-Ebene bei CVB3-Infektion entsprechend der Expressionssteigerung von uPA signifikant vermehrt exprimiert. Bei den infizierten uPA^{-/-}-Mäusen war PAI-1 im Vergleich zu den infizierten WT-Tieren deutlich geringer exprimiert $\{p^*(I, I uPA^{-/-}) < 0,05\}$. Die uPA-Deletion bewirkte vermutlich eine Expressionsminderung des physiologischen Inhibitors.

4.3 Verringerte kardiale Inflammation bei uPA-Deletion

Die Infektion mit dem CVB3 führte bei den WT-Mäusen zu einer ausgeprägten Infiltration des Herzens durch neutrophile Granulozyten, CD4⁺-Lymphozyten, zytotoxische CD8⁺-Lymphozyten und Makrophagen. Durch uPA-Deletion wurde die Infiltration bei Infektion in allen genannten Färbungen signifikant verringert. Dieser Effekt ist durch eine reduzierte perizelluläre Proteolyse bei uPA-Deletion erklärbar.

uPA wird in hohem Maße auf der Oberfläche invasiver Zellen gefunden, was darauf schließen lässt, dass uPA die Migration dieser Zellen durch perizelluläre Proteolyse fördert. Dabei können uPA und uPAR hauptsächlich auf der in Migrationsrichtung zugewandten, adhären

Zelloberflächenseite nachgewiesen werden (Vassalli et al., 1991). Kindzelskii et al. zeigen ebenfalls, dass uPA die Migrationsfähigkeit von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten stark begünstigt (Kindzelskii et al., 2004).

Diese Ergebnisse zeigen für uPA zum einen eine inflammationsfördernde Wirkung und zum anderen durch eine vermehrte MMP-Aktivierung eine Verstärkung des kardialen *remodeling*.

Um zu überprüfen, inwiefern sich die verringerte kardiale Entzündung und die verringerte MMP-Aktivität bei uPA-Deletion auf die Zytokinexpression auswirken würden, wurden die mRNA-level von IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-15, TNF- α , TGF- β und IFN- γ gemessen. Für alle genannten Zytokine wurde bei den infizierten WT-Tieren eine signifikante Induktion beobachtet. Für IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ konnte bei den nicht infizierten Kontrollen (K, K uPA^{-/-}) aufgrund geringer Expression kein Signal detektiert werden. Die Expression der übrigen Zytokine war bei diesen Gruppen ebenfalls relativ gering ausgeprägt. Die Zytokinexpression von IL-1 β und IL-6 war nach Infektion bei den uPA^{-/-}-Tieren im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Die Expression von IL-10, IL-15 und TGF- β war bei uPA-Deletion tendenziell ebenfalls reduziert. Für TNF- α und IFN- γ konnten bei Infektion aufgrund großer Expressionsunterschiede zwischen den Tieren innerhalb einer Gruppe keine Veränderungen zwischen WT und uPA^{-/-} erfasst werden.

Die Expressionssteigerung proinflammatorischer Zytokine hat in der akuten Myokarditisphase zwei unmittelbare Effekte. Zum einen wird durch die Induktion von Zelladhäsionsmolekülen die Infiltration durch Makrophagen, neutrophile Granulozyten und NK-Zellen gefördert, zum anderen wird durch die Induktion der NOS vermehrt NO freigesetzt, dass auf replizierendes Virus direkt toxisch wirkt (Vallejo & Mann, 2003).

4.4 Expression extrazellulärer Matrixbestandteile und Kollagennachweis

In der vorliegenden Arbeit wurde bei CVB3-Infektion für beide im Myokard vorherrschenden Kollagentypen, Kollagen I und Kollagen III eine signifikante Expressionssteigerung gefunden. Es existieren verschiedene Erklärungsansätze für die beobachtbare Expressionssteigerung der Kollagene. Hinglais et al. zeigen bei hypertensiven Ratten eine Steigerung der Kollagenexpression in mykardialen Fibroblasten abhängig von der Präsenz von Lymphozyten und Makrophagen (Hinglais et al., 1994).

Da Kollagene zytokinabhängig reguliert werden, ist eine Expressionssteigerung bei Infektion durch erhöhte *Zytokin-level* ebenfalls denkbar (Kovacs E.J., 1991). Unter anderem spielt TGF- β eine wichtige Rolle für die Genaktivierung der Kollagene. Die Kollagen I- und III-Gene enthalten in ihren Promotorregionen TGF- β -aktivierbare Domänen (Ritzenthaler et al., 1991). Für TGF- β wurde bei den infizierten Wildtypmäusen im Einklang dazu eine signifikante Expressionssteigerung gefunden. Innerhalb der infizierten Gruppen (I, I uPA^{-/-}) ließ sich für die Kollagene keine Expressionsänderung ausmachen. Die TGF- β -Expression wurde durch uPA-Deletion bei Infektion ebenfalls nicht beeinflusst.

Neben der erhöhten Kollagenexpression wurde bei Infektion eine signifikante Induktion des Fibronectintranskripts gefunden. Innerhalb der infizierten Gruppen (I, I uPA^{-/-}) blieb die Expression unverändert. Für Fibronectin sind ebenfalls zytokin- und inflammationsabhängige Regulationsmechanismen beschrieben. TGF- β gilt auch hier als wichtiger Genaktivator.

Schmidt et al. beschreiben in einem Arteriosklerosemodell bei Mäusen eine Induktion der Fibronectinexpression nach Verabreichung von TGF- β (Schmidt et al., 2006). In einem Nephropathiemodell sind eine gesteigerte Fibronectinexpression und Fibrosierung ebenfalls mit erhöhter TGF- β -Expression verbunden (Li et al., 2006).

Letztlich könnten die erhöhten mRNA-*level* auch auf einen verringerten mRNA-Umsatz zurückzuführen sein.

Die histologische Analyse des totalen Kollagengehaltes mit *Sirius red* zeigte am 7. Tag *p.i.* zwischen den Gruppen keine Unterschiede im myokardialen Kollagengehalt.

Die Expressionssteigerung der Kollagene und des Glykoproteins Fibronectin bei CVB3-Infektion würde jedoch im weiteren Krankheitsverlauf eine zunehmende Fibrosierung des Myokards begünstigen. Dabei könnte die uPA-Deletion mit daraus resultierendem vermindertem kardialen *remodeling* und verminderter Inflammation einer Fibrosierung tendenziell entgegenwirken (Heymans et al., 2006).

4.5 Regulationsmechanismen der kardialen Inflammation durch uPA und MMPs

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen führte eine uPA-Deletion bei CVB3-Infektion zu geringerer Immunzellinfiltration, Zytokinexpression, MMP-Expression und -Aktivität im Myokard.

Der Inflammationsprozess ist während einer CVB3-induzierten Myokarditis entscheidend an der Herzschädigung beteiligt (Hashimoto et al., 1983; Kishimoto et al., 2001).

Dies deutet darauf hin, dass uPA und MMPs die kardiale Entzündung während einer viralen Myokarditis durch verschiedene Mechanismen beeinflussen.

Zunächst stellt die ECM für invasive Entzündungszellen eine natürliche Barriere dar. uPA führt mittels Plasmin zu einer Degradation der ECM, was die Infiltration durch Immunzellen begünstigt. uPA und Plasmin sind teilweise substratspezifisch und können daher nicht alle Bestandteile der ECM abbauen. Plasmin kann jedoch MMP-9 aktivieren, was bei uPA-Deletion durch eine verminderte Aktivität dieser Protease belegt wurde.

Eine erhöhte MMP-Aktivität könnte darüber hinaus auch durch infiltrierende neutrophile Granulozyten verursacht worden sein. Diese setzen Cathepsine, Elastasen und reaktive Sauerstoffmetabolite frei und fördern dadurch die MMP-Aktivierung (St. Pierre & Potworowski, 2000). Die kombinierte Aktivitätssteigerung von uPA und verschiedener MMPs führt zu sich ergänzenden Proteolysevorgängen in der ECM, was wiederum die Infiltration durch verschiedene Entzündungszellen begünstigt. Dies wird daran deutlich, dass eine uPA^{-/-}-Deletion zu einer signifikant geringeren Infiltration durch T-Zellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen führte.

Bemerkenswerterweise sind uPA, MMP-2 und MMP-9 die einzigen matrixdegradierenden Enzyme, die in T-Zellen beschrieben werden und diesen die Migration in die ECM ermöglichen (St. Pierre & Potworowski, 2000).

Im Einklang mit der Beobachtung einer reduzierten Immunzellinfiltration nach uPA-Deletion steht auch eine Studie, die durch Inhibition von Serine-Elastase, einer weiteren Serinprotease, bei viraler Myokarditis eine verminderte Inflammation und Nekrose beschreibt (Lee et al., 1998).

Des Weiteren ist uPA ein direkter Modulator der neutrophilen- und T-Zell-Aktivierung und hat Einfluss auf die Zytokinexpression (Gyetko et al., 1996; Gyetko et al., 2004). Die Beobachtung einer verminderten kardialen T-Zell-Infiltration nach uPA-Deletion steht im Einklang mit Beobachtungen bei anderen entzündlichen Erkrankungen.

Gyetko et al. fanden bei uPA-Deletion eine reduzierte T-Zell-Antwort nach einer pulmonalen *Cryptococcus neoformans*-Infektion (Gyetko et al., 1996). *In vitro*-Untersuchungen zeigen darüberhinaus bei uPA-Deletion eine verminderte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten während einer *Pseudomonas aeruginosa*-Pneumonie (Gyetko et al., 2004).

uPA fördert die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TGF- β (Plesner et al., 1997). Diese Zytokine tragen, wie auch andere Studien belegen, zur Herzschädigung bei (Huber et al., 1983; Li et al., 1999). Abgesehen von ihrer Funktion als effektive T-Zell-Modulatoren können sie auch das sensible Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs stören, was zu einer erhöhten MMP-Aktivität führen kann (Pauschinger et al., 2004; Spinale F.G., 2002). Inwiefern die reduzierte Zytokinexpression in der vorliegenden Arbeit direkt durch uPA-Deletion oder indirekt durch eine verminderte Zahl zytokinproduzierender Entzündungszellen bedingt wurde, kann nicht sicher beurteilt werden.

Ein dritter Mechanismus für den protektiven Effekt einer uPA-Deletion erklärt sich über die Immunzellaktivierung durch degradierte Matrixbestandteile. Abbauprodukte der ECM fördern die Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen und könnten dadurch im Sinne einer positiven Rückkopplung zur Verstärkung des Inflammationsprozesses beitragen (Gundersen et al., 1997; Vaday et al., 2000).

Beispielsweise fördert die uPA-vermittelte Degradation von Tenascin-C, einem Marker bei viraler Myokarditis, die T-Zell-Migration *in vitro*, ohne deren Funktion zu beeinflussen (Gundersen et al., 1997; Sato et al., 2002). Die *in vivo*-Bedeutung dieser Beobachtung bedarf weiterer Erforschung.

Eine Reihe weiterer matrizellulärer Proteine wie etwa Thrombospondine und Osteopontin, welche die T-Zell-Funktion beeinflussen und dadurch in den Verlauf einer viralen Myokarditis eingreifen können, müssen ebenfalls genauer charakterisiert werden (Kuznetsova & Roberts, 2004).

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Zahlreiche Veröffentlichungen belegen die schädigenden Einflüsse der überschießenden myokardialen Immuneinfiltration und Zytokinproduktion während einer viralen Myokarditis (Lane et al., 1991; Bryant et al., 1998; Mann D.L., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine uPA-Deletion in der akuten Phase einer viralen Myokarditis zu einer verringerten Infiltration durch Entzündungszellen, einer verringerten Zytokinexpression und einer teilweise reduzierten MMP-Expression und -Aktivität führt. Insgesamt wurde der myokardiale Inflamationsprozess durch uPA-Deletion deutlich reduziert.

Die Untersuchungen zeigen uPA und MMPs als zentrale Vermittler der kardialen Inflammation während einer CVB3-induzierten Myokarditis. Die Inhibition des Plasminogen/Plasmin-Systems erwies sich als wirksame Methode, eine gesteigerte myokardiale Zytokinexpression und Entzündungszellinfiltration zu unterbinden.

Die Ergebnisse der Studie zeigen eine neue Option für die experimentelle Inhibition der destruktiven kardialen Entzündungsreaktionen während einer akuten viralen Myokarditis auf. Die Entwicklung spezifischer Proteaseinhibitoren ohne zytokinregulierende Nebenwirkungen könnte künftig eine neue Form der Behandlung viraler Myokarditiden darstellen. Diese therapeutische Richtung könnte dabei auch für eine Reihe weiterer inflammatorischer Kardiomyopathien wie beispielsweise bei kardialer Sarkoidose, der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie und nach kardialer Ischämie von Bedeutung sein.

Die weitere Erforschung molekularer und zellulärer Mechanismen, die ein besseres Verständnis des myokardialen *remodeling* ermöglichen, könnten zudem in Zukunft neue Wege für die Behandlung entzündlicher Herzmuskelerkrankungen aufzeigen.