

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

DISSERTATION

**Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT3
in der chronischen Myokarditis**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Marggraf

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Pauschinger
 2. Prof. Dr. med. C. Tschöpe
 3. Prof. Dr. C.-T. Bock

Datum der Promotion: 18.11.2011

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie.....	1
1.1.1 Bedeutung der Myokarditis.....	1
1.1.2 Inflammatorische und dilatative Kardiomyopathie.....	2
1.2 Mausmodell der viralen Myokarditis.....	4
1.2.1 Coxsackieviren.....	4
1.2.2 Akute Phase der Myokarditis (1.-3.Tag p.i.).....	5
1.2.3 Subakute Phase der Myokarditis (4.-14.Tag p.i.).....	6
1.2.4 Chronische Phase (ab dem 15. Tag p.i.).....	8
1.3 Extrazelluläre Matrix.....	10
1.3.1 Kollagen.....	11
1.3.2 Matrixmetalloproteinasen (MMPs).....	11
1.3.3 <i>Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase</i> (TIMPs).....	12
1.3.4 Regulation des myokardialen Remodelings.....	12
1.3.5 Remodeling bei kardialen Funktionsstörungen.....	13
1.4 STAT3.....	14
1.4.1 Bedeutung allgemein.....	14
1.4.2 Signalübertragung.....	14
1.4.3 STAT3 im Herzen.....	15
2 Problemstellung.....	19
3 Methoden.....	20
3.1 Versuchstiere.....	20
3.2 STAT3 <i>Knockout</i>	20
3.3 Tierhaltung.....	20
3.4 Virusinfektion.....	21
3.5 Gruppeneinteilung der Versuchstiere.....	21
3.6 Hämodynamik.....	21
3.7 Gewebepräparation.....	22
3.8 Molekularbiologische Methoden.....	23
3.8.1 Vermeiden von Kontaminationen.....	23
3.8.2 RNA-Isolierung.....	23

3.8.3 Verdau von DNA	24
3.8.4 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	24
3.8.4.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion	24
3.8.4.2 Reverse Transkription.....	24
3.8.4.3 Nachweis des STAT3 KO	25
3.8.4.3.1 Durchführung der semiquantitativen PCR.....	25
3.8.4.3.2 Optimierung der PCR-Bedingungen	26
3.8.4.3.3 Agarosegelelektrophorese	26
3.8.4.3.4 Auswertung der PCR-Banden.....	27
3.8.4.4 Prinzip der <i>Realtime</i> -PCR (TaqMan®)	27
3.8.4.5 Durchführung der <i>Realtime</i> -PCR.....	28
3.8.4.6 Auswertung der <i>Realtime</i> -PCR.....	29
3.8.4.7 Nachweis des Coxsackie B3 Genoms	29
3.8.4.8 Primer	30
3.9 Proteinchemische Methoden	31
3.9.1 Proteinextraktion	31
3.9.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	31
3.9.3 Prinzip der Zymographie	32
3.9.4 Durchführung der Zymographie	32
3.9.5 Auswertung der Gelatinase-Banden	33
3.10 Immunhistochemie	33
3.10.1 Prinzip der Immunhistochemie	33
3.10.2 Anfertigung von Cryoschnitten	36
3.10.3 Anfertigung von Paraffinschnitten	36
3.10.4 Immunhistochemische Färbung mit EnVision™	37
3.10.5 Immunhistochemische Färbung nach der ABC-Methode.....	38
3.10.6 Charakterisierung der Antikörper	39
3.10.7 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	39
3.11 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	40
3.12 Tierversuchsantrag	41
4 Material	42
4.1.1 Arbeitsgeräte	42
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	43

4.1.3 Reagenzien	44
4.1.4 Software	47
5 Resultate	48
5.1 Krankheitsverlauf	48
5.1.1 Krankheitssymptome	48
5.1.2 Körpergewicht	48
5.1.3 Herzgewicht und Herzquotient	49
5.1.4 Viruslast	49
5.1.5 Mortalität	50
5.2 Hämodynamik	50
5.2.1 Parameter der systolischen Funktion	51
5.2.2 Parameter der diastolischen Funktion	53
5.3 STAT3 <i>Knockout</i>	55
5.4 Zytokine	56
5.4.1 Proinflammatorische Zytokine	56
5.4.2 Antiinflammatorische Zytokine	57
5.5 Zelladhäsionsmoleküle	58
5.5.1 ICAM	58
5.5.2 VCAM	59
5.6 Infiltration mit Entzündungszellen	61
5.6.1 Makrophagen	61
5.6.2 CD3 ⁺ T-Lymphozyten	62
5.7 Apoptose	64
5.7.1 Bax und Bcl-2	64
5.8 Matrixkomponenten	64
5.8.1 Kollagen I	64
5.8.2 Kollagen III	66
5.8.3 Ratio Kollagen I / Kollagen III	66
5.9 Matrixmetalloproteinasen (MMPs)	67
5.9.1 MMP-2	67
5.9.2 MMP-3, MMP-8, MMP-9 und MMP-12 (MT1-MMP)	68
5.9.3 MMP-13	69
5.10 <i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i> (TIMPs)	69

5.10.1 TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4	69
6 Diskussion	71
6.1 Krankheitsverlauf und Viruslast	71
6.2 Chronische Inflammationsreaktion und Apoptose	74
6.3 Myokardiales Remodeling der extrazellulären Matrix	78
6.4 Hämodynamische Veränderungen	81
6.5 Perspektive STAT3 und Myokarditis	86
7 Zusammenfassung	89
8 Literaturverzeichnis	90
9 Anhang	I
9.1 Abbildungsverzeichnis	I
9.2 Tabellenverzeichnis	II
9.3 Abkürzungsverzeichnis	III
9.4 Eidesstattliche Erklärung	V
9.5 Lebenslauf	VI
9.6 Danksagung	VII

1 Einleitung

1.1 Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie

1.1.1 Bedeutung der Myokarditis

Die Myokarditis ist ein akut oder chronisch entzündlicher Prozess des Herzmuskels, der durch ein breites Spektrum an infektiösen Agenzien, Toxinen und Autoimmunerkrankungen ausgelöst und durch etablierte histopathologische, immunhistochemische und molekulare Kriterien diagnostiziert wird.¹ Das Krankheitsbild der akuten Myokarditis ist sehr variabel und reicht von einem asymptomatischen Verlauf bis zum plötzlichen Herztod. Viele Patienten weisen milde grippeähnliche Symptome wie Schwächegefühl, Muskelschmerzen und Fieber auf. Des Weiteren können Tachykardien, Rhythmusstörungen oder Zeichen der Herzinsuffizienz auftreten.² In seltenen Fällen kommt es zu einem fulminanten Verlauf mit malignen Rhythmusstörungen und kardialer Dekompensation.³ Die Symptomatik ist altersabhängig. Kinder, insbesondere Neugeborene, zeigen häufig einen schwereren Verlauf als Erwachsene.^{4,5}

Die Myokarditis ist eine weltweit relativ häufig vorkommende Erkrankung. Aufgrund der inapparenten und unspezifischen Krankheitsverläufe ist die Bestimmung der Inzidenz schwierig. Bei Autopsien plötzlicher Todesfälle von jungen Erwachsenen in Großbritannien und Australien ergaben neuere Studien in 8,6–12 % eine Myokarditis als Todesursache.^{6,7} Schätzungen über die Inzidenz liegen zwischen 8 und 10 / 100.000 Einwohnern, wobei die viralen Myokarditiden überwiegen.⁸ Die Spontanheilungsrate ist bei viraler Genese relativ hoch, jedoch kommt es in ungefähr 20 % der Fälle zu einem chronischen Verlauf mit der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie und einer progredienten Herzinsuffizienz.^{8,9} Dieses Krankheitsbild ist auch bei jungen, zuvor herzgesunden Patienten zu beobachten.

In den westlichen Industrienationen sind Viren die häufigste Ursache einer Myokarditis, wobei geografisch und zeitlich eine unterschiedliche Verteilung der viralen Agenzien zu beobachten ist.^{10,11} Lange Zeit galten Enteroviren, insbesondere das Coxsackievirus B3 (CVB3), als häufigster Auslöser der Myokarditis. In neueren Studien wurden jedoch in vielen Fällen andere Erreger wie Adenoviren, Parvovirus B19 und das Humane Herpesvirus Typ 6 bei Myokarditis nachgewiesen, wobei multiple Infektionen

häufig sind.^{2, 10, 12} Diese Veränderung im Erregerspektrum wird auf neue molekularbiologische Untersuchungsmöglichkeiten wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie die Entwicklung von Herdenimmunität in der Bevölkerung zurückgeführt.¹² Neben Viren können auch Bakterien, Pilze, Parasiten (z.B. *Trypanosoma cruzi* als Erreger der Chagas-Krankheit in Südamerika), Toxine, Hypersensitivitätsreaktionen, systemische Erkrankungen und Autoimmunkrankheiten für eine Myokarditis verantwortlich sein.¹³

Die im Jahr 1987 veröffentlichten Dallas-Kriterien stellen einen Versuch dar, Diagnostikkriterien für Myokarditis zu standardisieren.¹⁴ Dieser Ansatz weist jedoch einige Schwächen auf, da Stichprobenfehler und untersucherabhängige Auswertung die Objektivität mindern.^{15, 16} Des Weiteren erfüllen viele Patienten mit Myokarditis nicht die beschriebenen Dallas-Kriterien, obwohl eine Persistenz von viralem Genom nachweisbar und prognostisch bedeutend ist.² Neuere Bemühungen, virale und autoimmune Herzerkrankungen zu definieren, führten zu dem sogenannten „Tod der Dallas-Kriterien“.¹⁷ Gemäß den Leitlinien der *World Health Organization* (WHO) von 1995 ist der Gold-Standard derzeit die Endomyokardbiopsie, die neben den histologischen Untersuchungen eine immunhistochemische Auswertung und eine PCR auf virale Bestandteile umfasst.¹⁸ Neuere Diagnostikmöglichkeiten wie die kardiale Magnetresonanztomographie gewinnen jedoch immer mehr an Bedeutung.^{19, 20}

Bis zum heutigen Tag konnten weder eine kausale Therapie noch eine Prävention der Myokarditis etabliert werden.²¹ Die symptomatische Therapie der akuten Myokarditis beinhaltet körperliche Schonung und eine medikamentöse Behandlung der Herzinsuffizienz, bei foudroyanten Verläufen sind intensivtherapeutische Maßnahmen zur Aufrechterhaltung der kardialen Funktion notwendig. Der Befund der Endomyokardbiopsie kann wegweisend für eine Behandlung mit Interferon (IFN) bei Virusgenom-Nachweis oder für eine immunsuppressive Therapie bei sekundärer Immunpathogenese sein. Diese Therapieformen finden jedoch noch im Rahmen von klinischen Studien statt.¹³ Zukünftige Therapiemöglichkeiten könnten auch Verfahren der Immunadsorption und Immunmodulation sein.^{22, 23}

1.1.2 Inflammatorische und dilatative Kardiomyopathie

Eine erste Klassifikation der Kardiomyopathien wurde von der WHO im Jahr 1980 erstellt und im Jahr 1995 von der Arbeitsgruppe für Myo- und Perikarderkrankungen

wesentlich erweitert.²⁴ Kardiomyopathien sind demnach definiert als Herzmuskelerkrankungen, die mit einer Fehlfunktion des Herzens einhergehen.¹⁸ Nach einer aktualisierten Definition der *American Heart Association* aus dem Jahr 2006 bezeichnen Kardiomyopathien eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards, die mit einer mechanischen und/oder elektrischen kardialen Funktionsstörung einhergehen.¹ Im klinischen Alltag ist die Einteilung in folgende Kardiomyopathiehauptformen sinnvoll: dilatative Kardiomyopathie, hypertrophe Kardiomyopathie, restriktive Kardiomyopathie, arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie und unklassifizierte Kardiomyopathien.^{18, 25} Die chronische Verlaufsform der Myokarditis wird auch als inflammatorische Kardiomyopathie bezeichnet, die durch den molekularbiologischen Nachweis einer Virusinfektion des Myokards und/oder durch den histologischen bzw. immunhistologischen Nachweis einer Inflammationsreaktion definiert ist und meist als dilatative Kardiomyopathie imponiert.¹⁸ Bei der dilatativen Kardiomyopathie findet sich als pathologisches Korrelat eine Kardiomegalie mit interstitieller Fibrose und strukturellen Veränderungen der extrazellulären Matrix. Hämodynamisch weist die dilatative Kardiomyopathie eine systolische Funktionsstörung mit einer eingeschränkten Ejektionsfraktion auf.²⁶ Zusätzlich können Pumpfehler in der Diastole auftreten, die auf einer inkompletten Relaxation und vermehrten Steifigkeit des Myokards beruhen.¹² Mit einer Prävalenz von ungefähr 13 / 100.000 Einwohnern und einer Inzidenz von schätzungsweise 3 / 100.000 Einwohnern ist sie die häufigste Kardiomyopathie, wobei Männer dreimal so häufig wie Frauen erkranken.²⁷ Insgesamt ist eine Zunahme der inflammatorischen Kardiomyopathie zu beobachten. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass durch das Einführen neuer molekularbiologischer Techniken und den Einsatz der Immunhistochemie eine höhere Sensitivität in der Diagnostik erzielt wird. Kühl et al. wiesen in einer aktuellen Studie mittels PCR bei 67 % der Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie die Präsenz viralen Genoms nach, jedoch war in keinem der endomyokardialen Biopsien eine Inflammationsreaktion nach der Dallas-Klassifikation erkennbar.² Die dilatative Kardiomyopathie weist eine relativ schlechte Prognose auf und gehört weltweit zu den häufigsten Indikationen für eine Herztransplantation.²⁸

1.2 Mausmodell der viralen Myokarditis

Die Pathogenese der Myokarditis wird durch verschiedene Interaktionen zwischen Virus und Wirt bestimmt. Sowohl die Infektion der Myozyten durch das Coxsackievirus als auch die körpereigene Immunreaktion nach der Infektion spielen bei der Schädigung der Herzmuskelzellen und somit der Herzfunktion eine entscheidende Rolle.²⁹ Die durch CVB3-induzierte Myokarditis in der Maus ist das am besten untersuchte Tiermodell der Myokarditis. Hier konnten Kenntnisse über die Pathogenese der murinen Myokarditis erlangt, schematisiert und auf andere Formen der Myokarditis übertragen werden. Nach Kawai et al.³⁰ können drei Phasen der viralen murinen Myokarditis differenziert werden:

- akute Phase der viralen Myokarditis: 1.-3. Tag *post infectionem* (p.i.)
- subakute Phase der viralen Myokarditis: 4.-14. Tag p.i.
- chronische Phase der viralen Myokarditis: ab dem 15. Tag p.i.

Der Modellcharakter dieser Einteilung verdeutlicht, dass ein direktes Übertragen des Krankheitsverlaufs auf den Menschen nicht sinnvoll ist. Verschiedene Phasen können parallel verlaufen und chronologische Sprünge in ein früheres oder späteres Krankheitsstadium sind möglich.³¹ Nichtsdestotrotz veranschaulicht dieses „Dreiphasenmodell“ sehr gut die Entwicklung von der akuten zur chronischen Inflamationsreaktion und stellt dar, inwieweit sowohl das Virus selbst als auch die Immunantwort des betroffenen Organismus zu dem Übergang von der Myokarditis in die dilatative Kardiomyopathie führen können.

1.2.1 Coxsackieviren

Coxsackieviren gehören zu der Gattung Enteroviren und der Familie Picornaviridae, die kleine, unbehüllte Viren mit einem Durchmesser von 22–30 nm umfasst. Als Genom besitzen die Picornaviren eine lineare, einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNA), die direkt als Positivstrang eingesetzt wird. Bisher sind von den Coxsackieviren 26 Serotypen der Untergruppe A und sechs Serotypen der Untergruppe B bekannt. Im Mausmodell induzieren die Serotypen der Gruppe A eine diffuse Myositis, wohingegen die Serotypen der Gruppe B neben einer herdförmigen Myositis auch andere Organläsionen wie Myokarditis, Endokarditis, Pankreatitis und Enzephalomyelitis auslösen können.³² Der natürliche Wirt der Coxsackieviren ist der Mensch, wobei experimentell eine Infektion auch bei Mäusen und anderen Tieren möglich ist.^{32, 33}

Das Genom der Coxsackieviren ist 7,5 kbp groß und von einem ikosaederförmigen Kapsid umgeben. Die enterovirale RNA besteht aus einer nicht-kodierenden Region am 5'-Ende und einer kodierenden Region am 3'-Ende, gefolgt von einer Poly-Adenosin-Sequenz. Am 5'-Ende befindet sich ein kovalent gebundenes Protein, das als Initiator für die Replikation dient. Das Viruskapsid besteht aus den vier Proteinen VP1–VP4. VP1 wird zur Endozytose des Virus in die Zielzelle benötigt, VP1–VP3 determinieren die Ausbildung der Virusgestalt und VP4 dient der Interaktion zwischen Kapsid und Virusgenom sowie der Stabilisierung des Kapsids.³⁴

Die Infektion mit Coxsackieviren erfolgt als Tröpfcheninfektion oder fäkal-oral. Nach dem Eintritt des Virus über den Nasenrachenraum bzw. den Dünndarm kommt es zu einer lokalen Besiedlung und einer viralen Proliferation im lymphatischen Gewebe, gefolgt von einer sekundären Ausbreitung über Blut- und Lymphbahnen. Bei Erreichen der Zielorgane Herz, Pankreas, Muskel, Meningen oder Haut erfolgt eine Endozytose des Coxsackievirus. Dies geschieht durch Ligandenbindung des enteroviralen Kapsidproteins V1 an den *Coxsackie-Adenoviral Receptor* (CAR) bei gleichzeitiger Interaktion mit dem Corezeptor *Decay Accelerating Factor* (DAF, CD55).³⁵ Die internalisierte enterovirale RNA wird als *messenger RNA* (mRNA) genutzt und zelluläre Ribosomen im Rahmen der Virusreplikation so umgestaltet, dass ausschließlich virales Protein hergestellt wird.^{36, 37}

1.2.2 Akute Phase der Myokarditis (1.-3.Tag p.i.)

Die akute Phase ist durch die direkte Zytotoxizität des kardiotropen Virus und die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren gekennzeichnet. Die Virustiter steigen kontinuierlich an und erreichen am dritten bis vierten Tag maximale Werte.³⁶ Die Virusreplikation stört nachhaltig die zelleigene Proteinsynthese und induziert durch Interaktion des Kapsidproteins V2 mit dem pro-apoptischen Protein *siva* die Apoptose der infizierten Zelle.³⁸ Coxsackieviren produzieren die Protease 2A, die durch Zerstörung zytoskelettaler Proteine wie Dystrophin und Sarkoglykan den Viruseintritt erleichtert.³⁹ Die Spaltung des Dystrophin-Sarkoglykan-Komplexes führt zu einer Schädigung des Grundgerüsts der Myofibrille mit konsekutiven Nekrosen sowie kardialer Dilatation und Dysfunktion.⁴⁰ Durch Zellyse erfolgt die Freisetzung des Virus, das von Makrophagen phagozytiert wird. Über Toll-like Rezeptoren erkennen Zellen des angeborenen Immunsystems das körperfremde Material, so dass im Myokard bereits ab

dem 3. Tag p.i. erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interferon γ (IFN- γ) nachweisbar sind.^{41, 42} TNF- α spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Inflammationszellen und der Regulation der Zytokinausschüttung, induziert jedoch die Apoptose von Kardiomyozyten und zeigt somit eine negativ inotrope Wirkung am Herzen.^{28, 43} IL-1 β , TNF- α und IFN- γ induzieren die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in Kardiomyozyten, die nicht nur zur Einschränkung der Virusreplikation beiträgt, sondern auch schädigende Einflüsse auf die Herzmuskelzellen ausübt.^{30, 44} Die proinflammatorischen Zytokine sind demnach auf der einen Seite für die Viruselimination von entscheidender Bedeutung, auf der anderen Seite können sie aber auch die Kardiomyozyten schädigen und somit die Herzfunktion mindern. Herzmuskelschädigungen sind in der akuten Phase der murinen Myokarditis jedoch vor allem viral und zum geringeren Teil durch die Entzündungsmediatoren bedingt. Bei der fulminanten Myokarditis scheint die Unterbrechung der Verbindung zwischen den Myozyten und der kardialen Matrix von Bedeutung zu sein.^{45, 46}

1.2.3 Subakute Phase der Myokarditis (4.-14.Tag p.i.)

Die subakute Phase ist durch die Infiltration des Myokards mit Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten und durch deren Ausschüttung von immunmodulierenden Zytokinen charakterisiert.

Zu Beginn kommt es zu einer Invasion von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in den Herzmuskel. Durch Ausschüttung von Perforinen töten die NK-Zellen infizierte Kardiomyozyten ab und limitieren somit die Virusreplikation.⁴⁷ Die Bedeutung der NK-Zellen für die Viruselimination wird in verschiedenen Mausmodellen mit einer CVB3-induzierten Myokarditis deutlich, in denen bei einer verminderten NK-Zell-Antwort ein erheblich schwererer Verlauf der Myokarditis zu beobachten war.^{48, 49}

Zwischen dem siebten und dem 14. Tag p.i. liegt eine vermehrte Infiltration von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL, CD8⁺) vor, die mit der größten Schädigung des Myokards einhergeht.⁵⁰ Infizierte Kardiomyozyten präsentieren über ihren Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I virale Antigene, die von den CTL über den T-Zell-Rezeptor erkannt werden. Daraufhin induzieren die CTL mit Hilfe von Perforinen und Granzymen die Apoptose der betroffenen Zellen. Im Gegensatz zur kardioprotektiven Funktion der NK-Zellen scheinen die zytotoxischen T-Lymphozyten

zum großen Teil für die Ausbildung der überschießenden Inflammationsreaktion im Herzen verantwortlich zu sein.⁵¹ Kishimoto et al. zeigten bei mit CVB3-infizierten Mäusen, dass durch monoklonale Antikörper gegen T-Zellen weniger myokardiale Inflammation und Nekrose sowie ein längeres Überleben der Tiere erreicht werden können.⁵² Henke et al. konnten nachweisen, dass bei CTL-defizienten Mäusen zwar eine höhere Viruslast, jedoch eine geringere Ausprägung der Myokarditis als bei Wildtyp Mäusen auftreten.⁵³ Die geringere myokardiale Schädigung bei Fehlen der CTL-Aktivität verdeutlicht die destruktive Komponente der zellulären Immunantwort.

Ab dem siebten Tag ist neben der CD8+ Lymphozyten-Infiltration ein Auftreten von CD4+ Lymphozyten (T-Helferzellen) zu beobachten, wobei die T-Helferzellen in geringerem Maße als die CTL vorzufinden sind. Hierbei werden zwei verschiedene Zellpopulationen unterschieden: Th1- und Th2-Helferzellen.⁵⁴ Auf MHC II-Molekülen werden den T-Helferzellen Peptidfragmente von phagozytierten Viren präsentiert, die sich dann in Abhängigkeit von der Zytokinstimulation zu Th1- oder Th2-Zellen differenzieren. Während Th1-Zellen vor allem die zelluläre Immunantwort fördern und die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α ausschütten, fördern Th2-Zellen die humorale Immunantwort und sezernieren insbesondere die pro- und antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Th1-Zellen aktivieren durch ihre Zytokinproduktion Makrophagen, NK-Zellen, neutrophile Granulozyten und zytotoxische T-Lymphozyten, wohingegen Th2-Zellen eosinophile Granulozyten sowie die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen stimulieren und die Makrophagenaktivität mindern. Des Weiteren fördern die von den einzelnen Subpopulationen gebildeten Zytokine die eigene Entwicklung und hemmen den anderen Subtyp. Huber et al. konnten nachweisen, dass bei weiblichen Mäusen die Th2-Antwort überwog und eine geringere Ausprägung der Myokarditis als bei männlichen Versuchstieren vorlag.⁵⁵ Henke et al. verdeutlichten, dass das Fehlen von CD4+ Lymphozyten im Tiermodell zwar die Mortalität in der akuten und frühen subakuten Phase senkte, es jedoch zu einem deutlich schwereren Verlauf der Myokarditis kam.⁵³ Somit kann die CD4+ Antwort sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die Entwicklung der Herzmuskelentzündung haben. Hierbei scheinen Art, Umfang und Zeitpunkt der Zytokinproduktion von entscheidender Bedeutung zu sein.

In der frühen Phase der Immunantwort überwiegt vor allem die Th1-Zellantwort. Seko et al. konstatierten in einem Mausmodell, dass am siebten Tag nach einer CVB3-Infektion

die Expression von IL-1, TNF- α und IFN- γ ihr Maximum erreichte, während die Expression von IL-2, IL-4 und IL-10 erst ab diesem Zeitpunkt zunahm.⁵⁶ Hier liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Th1-Zytokine vor allem durch die ortsständigen Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert werden, wohingegen die Th2-Zytokine vor allem durch die eingewanderten Inflammationszellen produziert werden, die sich ab dem siebten Tag p.i. in Form von massiven Infiltraten im Myokard befinden.⁵⁶

Neben den infiltrierenden mononukleären Zellen sind neutralisierende Antikörper für die Viruselimination von entscheidender Bedeutung. Die Viruskonzentration erreicht am vierten Tag p.i. ihr Maximum und fällt mit steigenden Antikörpertitern.^{30, 57} Während die Produktion von IgM am vierten Tag p.i. Höchstwerte erreicht und unabhängig von T-Zellen zu sein scheint, ist virusspezifisches IgG erst am siebten Tag p.i. im Myokard nachweisbar und erreicht 14 Tage p.i. maximale Titer.^{30, 36} Nach der Senkung der Viruslast im Myokard ist die Immunantwort von entscheidender Bedeutung für das Fortschreiten der myokardialen Schädigung.

Für die Migration von Immunzellen in das Myokard spielen Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle.⁵⁸ Die Expression der Zelladhäsionsmoleküle *Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM) und *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM) auf Endothelzellen und Leukozyten wird durch proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α induziert, so dass ICAM und VCAM ab der subakuten Phase der Myokarditis vermehrt an der Zelloberfläche vorgefunden werden.^{59, 60} Hierbei korreliert die Expression der Zelladhäsionsmoleküle mit der Schwere der Endotheldysfunktion.⁶¹ Neben der Erleichterung der Leukozytenmigration und des Viruseintritts hat ICAM auch eine Bedeutung in proinflammatorischen Signalwegen, die der Rekrutierung von Makrophagen und Granulozyten dienen.^{59, 62} Sowohl in Tiermodellen als auch in der humanen Myokarditis wird eine myokardiale Expression von ICAM und VCAM beobachtet, die in der chronischen Phase persistiert.⁶⁰

1.2.4 Chronische Phase (ab dem 15. Tag p.i.)

Die chronische Phase der murinen Myokarditis manifestiert sich durch eine geringere Entzündungsreaktion und eine zunehmende Fibrosierung des Myokards mit konsekutiver Dilatation der Ventrikel. Hierbei sind große Ähnlichkeiten zu den

pathologischen Veränderungen des Herzens bei Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie zu beobachten.⁶³

Die Persistenz viraler RNA scheint in der Entwicklung der chronischen Myokarditis von Bedeutung zu sein. Klingel et al. beschreiben, dass bei DBA/1-Mäusen nach einer frühen Elimination des Coxsackievirus keine chronische Myokarditis entstand, während in den Mausstämmen A.CA, A.BY und SWR die enterovirale RNA im Myokard persistiert und eine andauernde Inflammationsreaktion die Folge war.⁶⁴ Cronin et al. konnten mittels in situ Hybridisierung in mit Enzephalomyokarditis-Virus infizierten Mäusen noch drei Wochen p.i. virale RNA im Herzen nachweisen.⁶⁵ Des Weiteren können eine Viruspersistenz in extrakardialen Kompartimenten wie Lymphknoten, Leber, Milz, Pankreas und Gehirn vorliegen^{65, 66} und die kontinuierliche oder periodische Ausschüttung der infizierten Zellen eine chronische Inflammationsreaktion im Myokard hervorrufen.⁶⁷

Die Viruspersistenz als fortbestehender antigener Reiz reicht jedoch als alleinige Erklärung für die Entwicklung einer chronischen Myokarditis nicht aus. Vielmehr scheint die Art der Immunantwort in diesem Prozess eine übergeordnete Rolle zu spielen.⁶⁸ Woodruff et al. wiesen bereits im Jahr 1974 nach, dass eine Depletion von T-Lymphozyten zu einer geringeren Inflammation und Nekrose des Myokards führte, obwohl eine Viruspersistenz vorlag.⁵¹ Des Weiteren lässt sich in verschiedenen Mausmodellen eine Autoimmunmyokarditis auslösen, die der viralen Myokarditis sehr ähnlich ist. Hierbei spielt molekulare Mimikry eine große Rolle. Der Begriff wurde von Damian geprägt und beschreibt ursprünglich die Induktion einer Immunantwort durch homologe antigene Determinanten, die auf einem wirtseigenen Protein und einem infektiösen Antigen vorliegen.⁶⁹ Autoreaktive T-Lymphozyten reagieren auf Strukturen von Kardiomyozyten, ohne dass ein Virusbefall vorliegt.^{70, 71} Zudem bilden aktivierte B-Lymphozyten eine große Zahl an Autoantikörpern, die unter anderem gegen den ADP/ATP-Transporter, den β 1-Adrenorezeptor, den Kalziumkanal sowie mitochondriale und kontraktile Proteine wie Myosin gerichtet sind und somit zur Einschränkung der Kontraktilität beitragen.^{72, 73} Rose et al. erzeugten in sensiblen Mausstämmen durch Immunisierung mit kardialem Myosin eine Autoimmunmyokarditis trotz Abwesenheit eines Erregers.⁴⁴ Des Weiteren konnte in resistenten Mausstämmen durch Gabe von TNF- α oder IL-1 eine chronische Myokarditis ausgelöst werden.⁴⁴ Hierbei zeigten sich große Ähnlichkeiten zu der CVB3-induzierten Myokarditis. Jedoch konnten keine

Übereinstimmungen in der Gensequenz des kardialen Myosins und der Gensequenz des CVB3-Genoms konstatiert werden.⁷⁴ Zudem ergaben Untersuchungen mit B- und T-Zellen keine Kreuzreaktivität zwischen Myosin und CVB3.⁷⁵ Vielmehr scheint die virale Zelllyse mit der konsekutiven Präsentation von kardialen Autoantigenen durch Makrophagen und dendritische Zellen die T-Zellen zu einer Immunreaktion anzuregen, die mit einer Lyse von Kardiomyozyten durch zytotoxische T-Zellen und einer Produktion von Autoantikörpern durch B-Lymphozyten einhergeht.²⁸ Dieser Theorie zufolge kommt der humoralen und zellulären Immunreaktion in der chronischen Myokarditis eine übergeordnete Rolle zu.

Sowohl das Virus als auch die Immunantwort tragen somit zu dem irreversiblen Verlust von Kardiomyozyten und der chronischen myokardialen Inflammationsreaktion bei. Letztere ist charakterisiert durch eine persistierende Infiltration von Entzündungszellen, eine fortbestehende Zytokinexpression und ein pathologisches Remodeling der extrazellulären Matrix mit einem Ungleichgewicht im MMP/TIMP-System.^{41, 76, 77} Die Charakteristika der extrazellulären Matrix und die Umbauprozesse bei kardialen Funktionsstörungen werden im folgenden Kapitel genauer betrachtet. Das pathologische Remodeling des Myokards führt schließlich zu der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie, die mit einer fortschreitenden systolischen und diastolischen Funktionseinschränkung einhergeht.

1.3 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix besteht aus einem komplizierten Netzwerk von Strukturproteinen, die ein Stützwerk für die Kardiomyozyten darstellen und somit an der Herzmechanik wesentlich beteiligt sind.⁷⁸ Wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix sind Kollagene, Proteoglykane, Glykosaminoglykane und biologisch aktive Signalproteine.⁷⁹ Diese Substanzen dienen als Substrat für Zelladhäsionen und beeinflussen durch Bindung an Integrinrezeptoren die zellulären Funktionen von Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Immunzellen.⁸⁰ Es besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation der extrazellulären Matrix, das für zahlreiche physiologische Prozesse wie z.B. Wachstum, Wundheilung oder die Embryonalentwicklung von großer Bedeutung ist.⁸¹ Für den Abbau der extrazellulären Matrix sind Serin/Threonin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteinasen verantwortlich.⁸²

In der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielen neben Veränderungen der kardialen Myozyten und des kontraktiven Apparats die Umbauprozesse der extrazellulären Matrix eine entscheidende Rolle.⁸³ Veränderungen in Struktur und Funktion der extrazellulären Matrix führen zu einer veränderten Herzgeometrie mit konsekutiver Störung der systolischen und diastolischen Herzfunktion.^{84, 85} Der Zusammenhang zwischen einer chronischen myokardialen Inflammation und dem vermehrten Umbau der extrazellulären Matrix konnte bislang jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden.

1.3.1 Kollagen

Kollagen Typ I (80 % des gesamten Kollagengehalts im Myokard) und Kollagen Typ III (10 % des gesamten Kollagengehalts im Myokard) sind die Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix und verantwortlich für die strukturelle und funktionelle Integrität des Herzens.^{86, 83} Während Kollagen Typ I dem Gewebe vor allem Zugfestigkeit und Steifigkeit verleiht (z.B. Sehne), ist Gewebe mit Kollagen Typ III durch eine größere Elastizität charakterisiert (z.B. Haut).^{83, 87}

Die Synthese dieser beiden fibrillären Kollagene findet in myokardialen Fibroblasten statt, die Prokollagene in den extrazellulären Raum sezernieren.⁸⁸ Dort spalten spezifische Proteinase das N-terminale und C-terminale Propeptid ab, so dass die Bildung von Fibrillen möglich ist.⁸⁹ Die Kollagensynthese wird durch verschiedene Faktoren induziert. Dazu zählen mechanische Dehnung, Zytokine, *Transforming Growth Factor* β (TGF- β) Angiotensin II, Aldosteron und Wachstumsfaktoren.^{90, 91, 92} Exzessive Kollagenproduktion führt zur Ummauerung der Kardiomyozyten und somit zu einer Minderung der Kontraktilität des Herzens.⁸⁸ In der dilatativen Kardiomyopathie wird ein Missverhältnis in der Ratio von Kollagen I zu Kollagen III zugunsten von Kollagen I beobachtet.^{83, 93}

1.3.2 Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

Die Synthese und der Abbau von Kollagen unterliegen strengen Kontrollmechanismen, wobei die Degradation vor allem durch die Balance zwischen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und ihren Inhibitoren, den *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases* (TIMPs), reguliert wird.^{94, 95} Die MMPs gehören zu einer Familie von zinkabhängigen Enzymen und sind für den Abbau von Kollagen verantwortlich.⁹⁶ Mittlerweile sind über 20 verschiedene MMPs charakterisiert, wobei man membrangebundene und in die

extrazelluläre Matrix sezernierte MMPs unterscheidet.^{97, 98} Letztere stellen die Mehrheit der MMPs dar und werden in einer inaktiven Proenzymform in den extrazellulären Raum abgegeben. Dort werden sie von verschiedenen Serinpeptidasen wie z.B. Plasmin durch enzymatische Spaltung der Propeptidregion aktiviert und können somit diffus wirken.^{88, 96} Im Gegensatz dazu ist die enzymatische Aktivität der membrangebundenen MMPs (MT-MMPs) lokal begrenzt.

Kollagenasen wie MMP-1, MMP-8 und MMP-13 spalten die Tripelhelix der Kollagenfibrillen in Gelatinefragmente, die durch Gelatinasen wie MMP-2 und MMP-9 weiter verdaut werden.^{99, 100} Stromelysine wie MMP-3 degradieren unterschiedliche Bestandteile der extrazellulären Matrix, darunter Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV und Proteoglykane.⁹⁶ Des Weiteren ist MMP-3 in der Lage, andere Matrixmetalloproteinasen zu aktivieren.¹⁰¹

Die Synthese der MMPs findet in Fibroblasten, Kardiomyozyten, Endothelzellen, neutophilen Granulozyten sowie zahlreichen Tumorzellen statt.¹⁰² Die Regulation der Aktivität der MMPs erfolgt auf den Ebenen der Transkription, der Aktivierung der Proenzyme und der Interaktion der MMPs mit ihren Inhibitoren, den TIMPs.^{76, 103} Bei der Aktivierung von MMPs spielen Plasmin, das *Extracellular MMP Inducer Protein* (EMMPRIN) und nicht zuletzt die MMPs selbst eine entscheidende Rolle.^{104, 105}

1.3.3 Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase (TIMPs)

Die TIMPs sind für die Regulation der Aktivität der Matrixmetalloproteinasen verantwortlich. TIMPs gehören zur Familie der Kollagenaseinhibitoren und besitzen eine N-terminale Region, die mit der aktiven zinkbindenden Domäne der MMPs interagiert.¹⁰⁶ Dadurch kommt es zu einer Hemmung der MMP-Aktivität. Vier verschiedene TIMPs (TIMP-1, -2, -3, -4) wurden bisher identifiziert, wobei im Myokard TIMP-4 am häufigsten vertreten ist.¹⁰⁷ TIMP-4 kann MMP-3 und MMP-9 blockieren,¹⁰⁸ während TIMP-1 Komplexe mit MMP-3 und MMP-9 bildet.⁹⁷ Somit kann eine erhöhte TIMP-Aktivität zu einer Akkumulation der extrazellulären Matrix führen.⁸¹

1.3.4 Regulation des myokardialen Remodelings

Myokardiales Remodeling bezeichnet die quantitative und qualitative Umgestaltung des Herzmuskels. Täglich werden ca. 0,6 % des Kollagennetzwerks im linken Ventrikel erneuert, bei kardialen Erkrankungen kann der Umsatz jedoch über 50 % betragen.¹⁰⁹

Die Balance im MMP/TIMP-System ist dabei von entscheidender Bedeutung. Eine große Zahl an Neurohormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen beeinflusst die Expression von MMPs und TIMPs.¹¹⁰

Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β spielen beim myokardialen Remodeling durch die Hochregulation der MMP-Expression und -Aktivität eine bedeutende Rolle. Sowohl prä- als auch posttranskriptionelle Mechanismen scheinen hierbei beteiligt zu sein.^{111, 112} Li et al. konnten nachweisen, dass die durch TNF- α und IL-1 β induzierte Zunahme der MMP-Aktivität in neonatalen Kardiomyozyten und Fibroblasten zu einer Abnahme der extrazellulären Matrix führte.¹¹³ Während kurzfristig der Abbau der extrazellulären Matrix zu überwiegen scheint, kommt es langfristig jedoch zu einer Fibrosierung des Myokards.^{110, 114} Kubota et al. veranschaulichten in einer Studie mit transgenen Mäusen, dass eine Überexpression von TNF- α eine dilatative Kardiomyopathie zur Folge hatte.¹¹⁵ Dabei scheint die durch TNF- α verstärkte MMP-Aktivität im Sinne einer positiven Rückkopplung auf die Aktivität von TNF- α zu wirken.^{43, 116}

Die Wirkung des Zytokins TGF- β auf den Umbau der extrazellulären Matrix ist nicht abschließend geklärt. Die Kollagenproduktion scheint durch TGF- β sowohl in vivo als auch in vitro gesteigert zu werden.¹¹⁷ Eghbali et al. wiesen nach, dass TGF- β die Kollagensynthese der kardialen Fibroblasten stimulierte und der Kollagenanteil im Herzen mit dem Level von TGF- β korrelierte.⁹¹ Während TGF- β die Synthese und Aktivität von den Kollagenasen MMP-1 und MMP-3 senkt, steigt die Expression der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 unter Einfluss von TGF- β .^{118, 119} Dabei scheint die Wirkung von TGF- β vom Zelltyp und -alter abhängig zu sein.¹²⁰

1.3.5 Remodeling bei kardialen Funktionsstörungen

Verschiedene tierexperimentelle Studien wiesen auf einen Zusammenhang zwischen dem myokardialen Remodeling und Funktionsstörungen des Myokards hin. Spinale et al. demonstrierten in einem Herzinsuffizienzmodell eine Kausalität zwischen myokardialer Expression von MMPs und einer Progression der linksventrikulären Funktionsstörung.¹⁰² Chancey et al. zeigten, dass der Umbau der extrazellulären Matrix und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch den Einsatz von spezifischen MMP-Inhibitoren verhindert werden konnte.¹²¹ In einem transgenen Tiermodell von Li et al. mit kardialer Überexpression von TNF- α führte die erhöhte MMP-Aktivität zu einem

kardialen Remodeling mit konsekutiver Herzinsuffizienz, wobei diese Entwicklung durch den frühen Einsatz von MMP-Inhibitoren aufgehalten werden konnte.¹²²

Zudem erbrachten verschiedene Patientenstudien den Nachweis, dass auch beim Menschen ein Missverhältnis zwischen MMPs und TIMPs bei verschiedenen kardialen Funktionsstörungen zu finden ist. Patienten mit progredienter Herzinsuffizienz wiesen in einer Studie von Gunja-Smith et al. eine erhöhte MMP-Aktivität sowie eine Abnahme der Quervernetzungen von fibrillären Kollagenen im Myokard auf.¹²³ Thomas et al. und Li et al. konnten bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eine Zunahme der MMP-Expression in Kombination mit einer Abnahme der TIMP-Expression nachweisen.^{76, 77} Auch in der Myokarditis spielt die Dysregulation des MMP/TIMP-Systems eine entscheidende Rolle für die Progression der Herzinsuffizienz.¹²⁴ Interessanterweise stellten Li et al. einen Rückgang der MMP-Aktivität im Myokard von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz fest, deren Herzen durch temporären mechanischen Herzersatz entlastet wurden.¹²⁵

1.4 STAT3

1.4.1 Bedeutung allgemein

Der *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) gehört zu einer Familie von Proteinen, die eine ähnliche Struktur aufweisen, sich funktionell jedoch erheblich unterscheiden.¹²⁶ Bisher wurden bei Säugetieren sieben STAT Proteine (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6) identifiziert,¹²⁷ die sowohl Inhibitoren als auch Promotoren des zellulären Wachstums sind.^{128, 129} Während es bei Fehlen der anderen STAT Proteine nur zu diskreten Veränderungen des Phänotyps kommt,¹³⁰ führt ein genereller *Knockout* von STAT3 in tierexperimentellen Modellen zu embryonaler Letalität.¹³¹ STAT3 besteht aus 770 Aminosäuren und besitzt eine DNA-bindende Domäne und eine *Src-homology 2* (SH2)-Domäne als wichtige funktionelle Gruppen.^{132, 133} Zahlreiche Studien wurden und werden weiterhin der Identifizierung der Zielgene und der Regulation der Genexpression von STAT3 gewidmet.

1.4.2 Signalübertragung

Die Aktivierung von STAT3 erfolgt durch zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine, vor allem durch Interleukin-6-ähnliche Proteine wie Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11

(IL-11), *Leukemia Inhibitory Factor*, *Ciliary Neurotrophic Factor*, Oncostatin M und Cardiotrophin-1.¹³² Nach Ligandenbindung an den Glykoproteinrezeptor gp130 phosphorylieren die zytoplasmatischen Janus-Kinasen (JAK) STAT3 über eine SH2-bindende Domäne. Daraufhin kommt es zu einer Homo- und Heterodimerisierung von STAT3, das in den Nukleus transloziert und als DNA-bindendes Protein agiert.¹³⁰ Hierdurch erfolgt eine schnelle transkriptionelle Autoregulation von Zielgenen, die nach aktuellen Erkenntnissen durch *Mitogen-Activated Protein Kinases*, p38 und *Jun Kinases* induziert wird.¹³⁰

Eine negative Regulation und somit Aktivitätskontrolle erfolgen mit Hilfe der *Suppressors of Cytokine Signaling* (SOCS) durch Blockade des Glykoproteinrezeptors, so dass die JAK/STAT Signalübertragung verhindert wird.^{127, 133} Hierbei wird im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus die Genexpression der SOCS durch STAT3 selbst initiiert.¹³⁴ Einen weiteren Autoregulationsmechanismus stellt die durch STAT3 induzierte Aktivierung von *Protein Inhibitors of Activated STATs* (PIAS) dar, die eine DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität von STAT3 unterbindet.¹³⁵ Die Aktivität von STAT3 in einer Zelle ist somit von der Summe aller positiven und negativen Regulationsmechanismen abhängig.¹²⁷

1.4.3 STAT3 im Herzen

Im Herzen reguliert STAT3 die Genexpression von Proteinen, die an der Steuerung von Angiogenese, Inflammation, Apoptose, dem Umbau der extrazellulären Matrix und zellulären Signalwegen beteiligt sind.^{136, 137} Somit ist der JAK/STAT Signalweg für die Zytoprotektion und Hypertrophie von Herzmuskelzellen von entscheidender Bedeutung.^{138, 139} Die Signalübertragung und Regulation von STAT3 im Herzen werden in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.

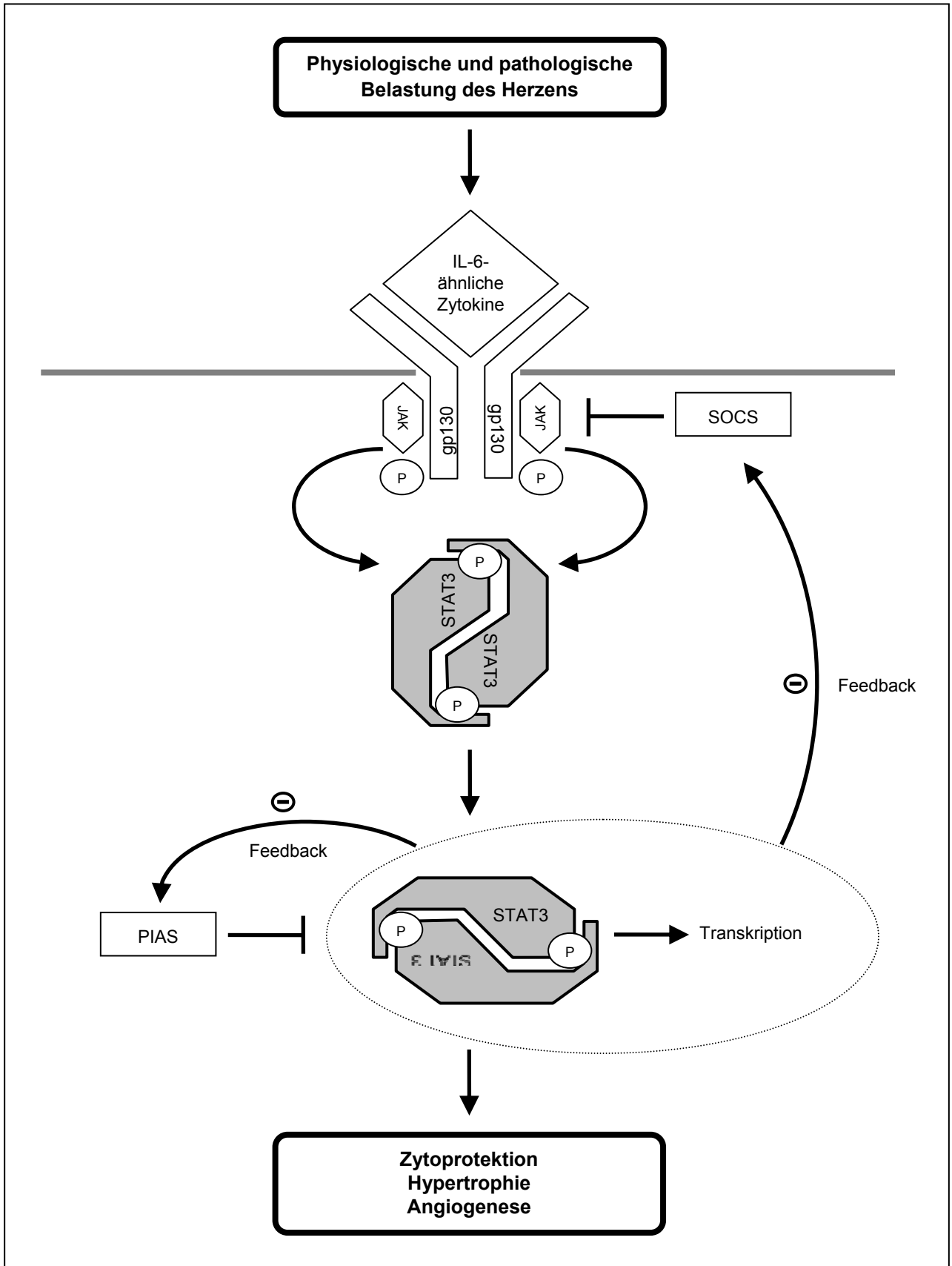


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der JAK/STAT Signalübertragung im Herzen, in Anlehnung an Hilfiker-Kleiner¹²⁶ und Fischer¹⁴⁰

STAT Proteine sind im Herzen in Endothelzellen, in glatten Muskelzellen, in Kardiofibroblasten und in Kardiomyozyten zu finden.^{141, 142} Die systemische Deletion von STAT3 führt im Mausmodell zu einer fehlenden Bildung von Mesoderm und einer Wachstumsstörung des Herzens mit dünnen, dilatierten Ventrikeln, so dass die Tiere embryonal versterben.¹³¹ Im Gegensatz dazu konnten bei kardiomyozytenspezifischem *Knockout* erste strukturelle Veränderungen des Myokards nicht vor dem Alter von drei Monaten festgestellt werden.¹³⁶ Im Verlauf entwickelten die KO Mäuse jedoch eine Fibrosierung mit Dilatation der Ventrikel und infolgedessen eine Herzinsuffizienz.^{143, 144} Dies wird auf eine erhöhte Inflammationsreaktion sowie eine verminderte kardiale Perfusion und vermehrte Apoptose als Antwort auf schädliche Umwelteinflüsse und oxidativen Stress zurückgeführt.^{143, 144}

Bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz scheint die Balance zwischen Hypertrophie und Apoptose der Kardiomyozyten eine wichtige Rolle zu spielen.¹⁴⁵ Biomechanische Belastung löst bei Mäusen mit einem ventrikelspezifischen *Knockout* des Glykoproteinrezeptors gp130 eine massive Apoptose der Kardiomyozyten aus, die zu einer Herzinsuffizienz im Sinne einer dilatativen Kardiomyopathie führt.¹⁴⁶ Im Endstadium der dilatativen Kardiomyopathie konstatierten Podewski et al. eine verminderte Expression und Phosphorylierung von STAT3.¹⁴⁷ Während der Plasmaspiegel von IL-6 nach einem Herzinfarkt und bei terminaler Herzinsuffizienz erhöht ist und somit als Marker für Mortalität gilt,^{148, 149} sind die myokardiale Expression von IL-6 und dadurch auch die Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs reduziert.¹⁴⁷ Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von STAT3 eine Hypertrophie der Kardiomyozyten induzierte.^{138, 146}

Die Kontrolle der Hypertrophie ist in Situationen der Volumenbelastung des Herzens von entscheidender Bedeutung. Eine ungenügende Hypertrophie der Kardiomyozyten durch Überexpression von SOCS, den Inhibitoren von STAT3, führt zu einer Störung der Sarkomerstruktur und einer vermehrten Apoptose. Aus unkontrollierter exzessiver Hypertrophie durch mangelnde Aktivierung von SOCS resultiert jedoch auch eine Störung der Herzmechanik. Demnach können sowohl eine Überexpression als auch eine ungenügende Expression von SOCS die Entwicklung einer Herzinsuffizienz begünstigen.^{150, 151}

Im Myokardinfarkt wird STAT3 eine kardioprotektive Rolle zuteil. Der JAK/STAT Signalweg scheint die durch Ischämie und Reperfusion induzierte Apoptose zu mindern,

die Neovaskularisation und Wundheilung zu fördern und somit die Infarktgröße zu reduzieren.^{152, 136} Innerhalb von Minuten nach einem Herzinfarkt ist eine Hochregulation von STAT3 zu beobachten, die bis zu sieben Tage nach dem Infarkt nachweisbar ist.¹⁵¹ Nichtsdestotrotz wird der JAK/STAT Signalweg auch mit diastolischer Dysfunktion und Arrhythmien nach einem Myokardinfarkt in Verbindung gebracht.¹⁵³ Wang et al. wiesen in einem Tiermodell nach, dass bei Fehlen des TNF- α -Rezeptors neben einer geringeren kardialen Dysfunktion auch eine größere Expression von SOCS3, eine geringere Expression von IL-6 und eine geringere Aktivität von STAT3 im Herzen zu beobachten waren.¹⁵⁴ Hier liegt die Annahme nahe, dass genaue Kontrollmechanismen des JAK/STAT Signalwegs bei myokardialer Ischämie von entscheidender Bedeutung sind.

In der Myokarditis ist der JAK/STAT Signalweg von großer Bedeutung für den Schutz vor viralen und bakteriellen Infektionen. In einem Mausmodell mit einer kardiomyozytenspezifischen Überexpression von SOCS1 konnten eine erhöhte Replikation von Coxsackieviren, eine größere myokardiale Schädigung und eine erhöhte Mortalität konstatiert werden.¹⁵⁵ Yajima et al. zeigten, dass es bei einem kardiomyozytenspezifischen *Knockout* von gp130 und einer Überexpression von SOCS3 zu einer erhöhten Anfälligkeit für virale Infektionen kommt.¹⁵⁶ Nichtsdestotrotz ist auch in der Myokarditis die kontrollierte Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs ausschlaggebend, da eine Dysbalance wie im Falle einer kontinuierlichen IL-6-Produktion zu einer gestörten Zytokinantwort und erhöhten Viruslast mit myokardialen Schaden führt.¹⁵⁷

2 Problemstellung

Die Ätiopathogenese der Myokarditis bleibt trotz zahlreicher Studien unzureichend verstanden. Während bei den meisten Patienten asymptomatische oder milde Verläufe zu beobachten sind, führt bei anderen Patienten die Myokarditis zu einer chronischen Inflammationsreaktion mit der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie. Bisher ist dieser Krankheitsverlauf unvermeidbar, da es weder eine Prävention noch eine etablierte kausale Therapie der Myokarditis gibt. Verschiedene Studien beschreiben die kardioprotektive Rolle von STAT3 in der myokardialen Ischämie, in der Herzinsuffizienz und in der akuten myokardialen Inflammation.^{126, 151} Über den JAK/STAT Signalweg wird STAT3 durch IL-6-ähnliche Proteine aktiviert und reguliert die Genexpression von Proteinen, die an der Steuerung von Angiogenese, Inflammation, Apoptose und dem Umbau der extrazellulären Matrix im Herzen beteiligt sind.^{136, 143, 146} Bis jetzt liegen jedoch keine Untersuchungen zu der Bedeutung von STAT3 in der chronischen Myokarditis vor.

Unsere Hypothese lautete, dass der Transkriptionsfaktor STAT3 in der chronischen Myokarditis eine kardioprotektive Rolle spielt. Um die Bedeutung von STAT3 näher zu untersuchen, wurden Mäuse mit einem kardiomyozytenspezifischen *Knockout* generiert und mit Coxsackievirus B3 infiziert. Neben der Charakterisierung der chronischen Virusmyokarditis sollen folgende Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit genauer betrachtet werden:

- Welchen Einfluss hat STAT3 auf den Krankheitsverlauf und die Viruspersistenz in der chronischen murinen Myokarditis?
- Verändert ein Fehlen von STAT3 die Apoptose, die Inflammationsreaktion und die damit verbundene Zytokinantwort in der chronischen Myokarditis?
- Inwieweit beeinflusst STAT3 das myokardiale Remodeling und somit auch die linksventrikuläre kardiiale Funktion?

3 Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 24 männliche Mäuse des CB6FI-Stammes im Alter von sechs Wochen von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. rer. nat. Hilfiker-Kleiner der Klinik für Kardiologie und Angiologie, Medizinische Hochschule Hannover, bezogen. Der Mausstamm CB6FI entspricht einer Kreuzung zwischen C57BL/6 und Balb/c Mäusen. 11 Tiere besaßen einen kardiomyozytenspezifischen *Knockout* des STAT3-Gens (α MHC-Cre^{tg} / STAT3^{TM1PO}), 13 Tiere waren Wildtyp Mäuse (STAT3^{TM1PO}).

3.2 STAT3 *Knockout*

Der STAT3 *Knockout* erfolgte mittels des Cre/LoxP-Rekombinasesystems (Cre: *Causes Recombination*, LoxP: *Locus of crossing over of P1 phage*). In undifferenzierte Stammzellen wurde ein Inaktivierungsvektor eingeschleust und durch homologe Rekombination in die DNA eingebaut. Durch Einpflanzen der rekombinierten Zellen in die Blastozyste einer Leihmutter entwickelten sich Chimären, die durch Kreuzungen zu homozygoten Tieren gezüchtet wurden. Da die Cre-Rekombinase über den kardiomyozytenspezifischen Promotor *α -Myosin Heavy Chain* (α MHC) verfügt, wurde das STAT3-Gen nur auf den Allelen des Herzens inaktiviert.¹⁵⁸

3.3 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in Gruppen von sechs bis acht Tieren in transparenten Polycarbonatkäfigen vom Typ Makrolon III (42 x 26 x 15 cm) auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Um die Tiere bei ihrer Nahrungsaufnahme sowie in ihrem Lebensrhythmus nicht zu stören, wurden die Umweltbedingungen konstant gehalten: Raumtemperatur 22 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 %, Beleuchtung in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Nahrung bestand aus kontinuierlich verabreichter pelletierter Alleindiät, Trinkwasser war über Tränkeflaschen ad libitum verfügbar. Die Tiere wurden täglich beobachtet und ihre Verhaltensweisen protokolliert.

3.4 Virusinfektion

Im Alter von sechs bis sieben Wochen wurden neun Tiere der Wildtyp Gruppe und sieben Tiere der STAT3 KO Gruppe einmalig mit 5×10^7 *Plaque-Forming Units* (PFU) Coxsackievirus B3 infiziert. Das Virus (Coxsackie B3 Nancy Strain) wurde von Herrn Prof. Dr. med. Zeichhardt aus dem Institut für Virologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, bezogen und bei 80 °C in HeLa-Medium gelagert. Direkt vor Gebrauch wurden 400 µl Virusmedium mit 3600 µl Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS: 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,3) verdünnt, im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und 200 µl jedem der zu infizierenden Tiere intraperitoneal appliziert. Den vier Wildtyp Kontrolltieren und den vier STAT3 KO Kontrolltieren wurden 200 µl PBS-Medium (400 µl HeLa-Medium ohne Virus + 3600 µl PBS) in den Bauchraum injiziert.

3.5 Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Die Versuchstiere können nach dem STAT3 *Knockout* und der CVB3-Infektion in folgende vier Versuchsgruppen eingeteilt werden:

Versuchsgruppe	Genotyp und Behandlung
1 (n=4)	Wildtyp (WT)
2 (n=4)	STAT3 <i>Knockout</i> (STAT3 KO)
3 (n=9)	WT infiziert (WT Inf)
4 (n=7)	STAT3 <i>Knockout</i> infiziert (STAT3 KO Inf)

Tabelle 3.1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

3.6 Hämodynamik

Die Messung der hämodynamischen Funktionsparameter erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Carsten Tschöpe, Klinik für Kardiologie und Pulmologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, und wurde von Dr. med. Alexander Riad durchgeführt. Am 28. Tag p.i. wurden alle infizierten Tiere intraperitoneal mit 125 µg/kg Körpergewicht Thiopental narkotisiert, mit einer 18 G Kunststoffkanüle intubiert und mit einem Mausventilator der Firma Harvard Apparatus maschinell beatmet. Die Beatmungsfrequenz betrug 200 min^{-1} und das

Beatmungsvolumen 8 $\mu\text{l/g}$ Körpergewicht. Die rechte Arteria carotis communis wurde mit minimaler Schnittführung dargestellt, ein zwei French Millar Tip - Konduktanzkatheter in das Gefäß eingebracht und retrograd über die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt. Mit einem *Linearcorder* der Firma Graphtec Corporation wurden folgende kardiale Funktionsparameter aufgezeichnet.

Parameter der systolischen Funktion:

- Herzfrequenz (in min^{-1})
- linksventrikulärer endsystolischer Druck (in mmHg)
- maximaler linksventrikulärer Druck (in mmHg)
- maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit des linken Ventrikels (in mmHg/s)
- linksventrikuläres endsystolisches Volumen (in μl)
- Schlagvolumen (in μl)
- Herzminutenvolumen (in $\mu\text{l}/\text{min}$)
- Ejektionsfraktion (in %).

Parameter der diastolischen Funktion:

- linksventrikulärer enddiastolischer Druck (in mmHg)
- minimaler linksventrikulärer Druck (in mmHg)
- maximale Druckabfallsgeschwindigkeit des linken Ventrikels (in mmHg/s)
- linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (in μl).

3.7 Gewebepräparation

Am 28. Tag p.i. wurden die Herzen der nicht infizierten Tiere (WT und STAT3 KO) direkt und die Herzen der infizierten Tiere (WT Inf und STAT3 KO Inf) nach den hämodynamischen Messungen unter sterilem Arbeiten am Gefäßstiel abgesetzt. Nach Entfernen der intrakardialen Blutmenge konnten die Herzen gewogen und anschließend die Vorhöfe entfernt werden. Die Ventrikel wurden durch Schnittführung senkrecht zur Herzlängsachse geviertelt. Das erste proximale Viertel wurde für die Fertigung von Paraffinschnitten in 10%iger Formalinlösung bei Raumtemperatur fixiert. Das zweite proximale Viertel wurde für die Herstellung von Cryoschnitten sofort in Tissue Tec® eingebettet, in Methylbutan gehärtet und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Stickstoff konserviert. Die distalen Anteile wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Stickstoff schockgefroren und später zur RNA- und Proteinisolation verwendet.

3.8 Molekularbiologische Methoden

3.8.1 Vermeiden von Kontaminationen

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden für die Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten ausschließlich sterile, RNase-freie Substanzen und Materialien verwendet. Arbeitsflächen sowie Einmalhandschuhe wurden mit RNase-Zap gereinigt. Die Herstellung der nicht erworbenen Reagenzien erfolgte mit Wasser, das zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt wurde.

3.8.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Präparation wurde mit Trizol®-Reagenz und den dazugehörigen Protokollen der Firma GibcoBRL in leicht veränderter Form durchgeführt. Die bei -80 °C in Stickstoff gelagerten Gewebeproben wurden gewogen, in Eppendorf-Tubes mit 800 µl Trizol® gegeben, mit einem Polytron-Homogenisator zerkleinert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 160 µl Chloroform hinzugefügt, der Ansatz 15 Sekunden lang stark geschüttelt und weitere drei Minuten inkubiert. Durch zehnmütiges Zentrifugieren bei 12.000 g und 4 °C konnten drei Phasen separiert werden: Die klare Oberphase enthielt RNA, die mittlere und die untere Phase Protein und DNA. Zur Fällung der RNA wurde die Oberphase abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und 400 µl Isopropanol wurden hinzugefügt. Die Probe wurde zehn Minuten inkubiert und anschließend bei 12.000 g und 4 °C für weitere zehn Minuten zentrifugiert, so dass sich die RNA als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes absetzte.

Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet mit 800 µl 75%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren für fünf Minuten bei 7.500 x g und 4 °C wurde der Überstand wieder verworfen und das RNA-Pellet 20 Minuten lang an der Luft getrocknet. Im nächsten Schritt wurde es mit DEPC-behandeltem RNase-freiem Wasser nach folgender Formel versetzt: Lösemenge in µl Aqua dest. = Gewebemasse der Probe in mg × 1,6. Zur vollständigen Lösung der RNA wurde das Pellet für zehn Minuten bei 55 °C inkubiert. Abschließend wurden Konzentration und Reinheit der isolierten RNA photometrisch bei 260 und 280 nm mit Hilfe des Nanodrops bestimmt, wobei eine A260/280-Ratio von 2,0-2,2 als qualitativ hochwertig eingestuft wurde.

3.8.3 Verdau von DNA

Zur Eliminierung chromosomaler DNA aus den RNA-Proben wurde nach Isolierung der Nukleinsäuren und deren photometrischer Konzentrationsbestimmung ein DNase-Verdau durchgeführt. Das Verfahren fand mit DNase I nach Protokollen der Firma Roche statt. Der Ansatz bestand pro Probe aus 5 µg RNA in 42 µl DEPC-Wasser, 5 µl 10 × DNase-Puffer und 3 µl RNase-freier DNase I. Im Thermocycler wurde die Lösung zuerst bei 37 °C zwei Stunden lang inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurde sie anschließend für fünf Minuten bei 90 °C inkubiert und zuletzt fünf Minuten lang auf Eis gekühlt. Nach dem DNase-Verdau wurde die RNA wieder bei -80 °C gelagert.

3.8.4 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

3.8.4.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein molekulargenetisches Verfahren zur selektiven Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Ein Zyklus besteht aus folgenden Reaktionsschritten:

1. Denaturierung: Die beiden komplementären DNA-Stränge werden durch Erhitzen voneinander getrennt.
2. *Annealing*: Komplementäre Oligonukleotide (Primer), die das Zielgen flankieren, hybridisieren an die spezifische DNA-Sequenz.
3. Elongation: Eine thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert vom 3'-Ende aus den komplementären Strang, so dass wieder zwei komplette Doppelstränge vorliegen.

Nach jedem Zyklus verdoppelt sich folglich der DNA-Gehalt, so dass durch Wiederholung dieser Reaktionsschritte eine exponentielle Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen erreicht wird.

3.8.4.2 Reverse Transkription

Aus der gewonnenen DNA-freien RNA konnte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase *complementary* DNA (cDNA) synthetisiert werden, welche für die PCR benötigt wird. Mit dem Kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents der Firma Applied Biosystems wurde ein Einfachansatz (50 µl) aus folgenden Substanzen hergestellt: 5 µl TaqMan® Puffer (10 x), 11 µl 25 mM Magnesiumchlorid, 10 µl dNTPs, 2,5 µl Random-Hexamer, 1 µl RNase-Inhibitor, 1,25 µl Multiscibe Reverse Transkriptase (50 U/µl) und

1 µg RNA in 19,25 µl RNase-freiem Wasser. Die Reverse Transkription erfolgte im Gradienten Cyler die ersten zehn Minuten bei 25 °C (Inkubation), anschließend 45 Minuten bei 48 °C (Transkription) und die letzten fünf Minuten bei 95 °C (Denaturierung der Reversen Transkriptase). Umgeschriebene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.8.4.3 Nachweis des STAT3 KO

3.8.4.3.1 Durchführung der semiquantitativen PCR

Der Nachweis des kardiomyozytenspezifischen STAT3 *Knockouts* erfolgte mit Hilfe der semiquantitativen PCR. Um Variationen in der Ausgangsmenge der umgeschriebenen RNA auszugleichen und eine Expressionsveränderung von STAT3 semiquantitativ erfassen zu können, wurde das Transkriptionsprodukt mit dem *Housekeeping*-Gen 18S rRNA abgeglichen. *Housekeeping*-Gene werden konstitutiv exprimiert und sind somit vom Stimulationszustand der Zelle weitestgehend unabhängig, d.h. die zelluläre Expression von 18S rRNA als Bestandteil der ribosomalen RNA wird weder durch den *Knockout* noch durch die Virusinfektion verändert.

Die für den Mastermix benötigten Reagenzien wurden bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch auf Eis aufgetaut, geschüttelt und zentrifugiert. Folgende Mengenverhältnisse wurden für jede Probe eingesetzt: 4,5 µl 10 × PCR-Puffer, 1,8 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl dNTPs (5 mM), 1,8 µl STAT3 Sense Primer (50 ng/µl), 1,8 µl STAT3 Antisense Primer (50 ng/µl), 0,2 µl Taq-Polymerase (2,5 U), 31,9 µl Aqua dest. Kurz vor Beginn der PCR wurden in jedes Reaktionsgefäß 1 µl cDNA des entsprechenden Versuchstiers hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Amplifikation im Thermocycler nach folgendem Programm:

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
1	erste Denaturierung	95 °C	5 min
2	Denaturierung	95 °C	30 sec
3	<i>Annealing</i>	58 / 60 °C	30 sec
4	Elongation	72 °C	35 sec
5	abschließende Elongation	72 °C	10 min
6	Reaktionsstopp	4 °C	mind. 5 min

Tabelle 3.2: Reaktionsschritte der Polymerase-Kettenreaktion

Die Schritte zwei bis vier (Denaturierung, *Annealing*, Synthese) wurden für STAT3 entsprechend der optimalen Zyklenzahl 27 Mal und für 18S rRNA 21 Mal zyklisch wiederholt. Die *Annealing*-Temperatur betrug für STAT3 58 °C und für 18S rRNA 60 °C. Um methodische Fehler zu verringern und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu belegen, wurde die PCR als Doppelbestimmung durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde anstelle von cDNA steriles Wasser in den Reaktionsansatz gegeben.

3.8.4.3.2 Optimierung der PCR-Bedingungen

Bei der semiquantitativen PCR sollen Unterschiede in der Genexpression mit einer hohen Sensibilität erfasst, unspezifische Signale jedoch vermieden werden.

Die Gradienten-PCR ermöglicht eine Optimierung der PCR-Bedingungen bezüglich der Primeranlagerungstemperatur (*Annealing*-Temperatur). Mit Hilfe der Kenntnis über die Bindungsstärke der DNA-Basenpaare lässt sich folgende Formel aufstellen: *Annealing*-Temperatur (in °C) = $2(A+T) + 4(G+C) - 3$. Eine systematische Testung erfolgte in Probeläufen mit sonst unveränderten PCR-Bedingungen bei Temperaturen oberhalb und unterhalb des errechneten Werts.

Die Sättigungs-PCR dient der Ermittlung der optimalen Zyklenzahl. Um Unterschiede in der Genexpression zu detektieren, muss die Zyklenzahl im linear ansteigenden Bereich der DNA-Amplifikationskurve liegen, bevor eine Sättigung des Amplifikationsprodukts erreicht ist. Zur Kenntnis der optimalen Zyklenzahl fand auch hier eine systematische Testung bei sonst unveränderten PCR-Bedingungen statt.

3.8.4.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese, deren Prinzip auf der Wanderung von geladenen Molekülen im elektrischen Feld beruht. Die Nukleinsäuren besitzen aufgrund ihrer Phosphat-Gruppen bei dem pH-Wert des verwendeten Laufpuffers eine negative Ladung. Folglich wandert die DNA in der dreidimensionalen Gelmatrix des Agarosegels von der Kathode zur Anode, wobei ihre Geschwindigkeit und somit ihre Laufstrecke bei konstanter Porengröße und konstanter elektrischer Feldstärke von der Menge ihrer Basenpaare abhängen.

Zur Herstellung eines 2%igen Gels (w/v) wurden 4 g Agarose Pulver durch Erhitzen in der Mikrowelle in 200 ml 0,5x TBE-Puffer (45 mM Trisborat, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Die Lösung wurde zur späteren Darstellung unter UV-Licht mit 8 µl 1%igem

Ethidiumbromid (v/v) versehen und zur Formgebung in einen Gelschlitten gegossen. Damit das Amplifikationsprodukt nur innerhalb der Matrix des Agarosegels wandert, wurde jede Probe mit 9 µl 6 x Ladepuffer (40 % Sucrose (w/v), 0,25 % Bromphenolblau (w/v)) beschwert. Je Probe wurden 10 µl der mit Ladepuffer versetzten DNA in die Taschen des Gels gegeben. Neben der Negativkontrolle wurde bei jedem Lauf auch ein kbp-Marker der Firma Roche aufgetragen, der DNA-Fragmente bekannter Größe (0,019-1,11 kbp) enthält und somit Auskunft über die Fragmentlänge der amplifizierten DNA-Abschnitte gibt. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 Volt für 20 Minuten.

3.8.4.3.4 Auswertung der PCR-Banden

Die Visualisierung der mit Ethidiumbromid interkalierten DNA erfolgte in einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm. Mit dem System BioDoc Analyze der Firma Biometra konnten die PCR-Banden bei einer Belichtungszeit von 1000 ms und einer Blende von 4,0 bzw. 5,6 digitalisiert werden. Mit Hilfe des Programms Scion Image 2000 wurde die Bandenstärke in Pixel (OD-Werte) umgerechnet und mit den OD-Werten von 18S rRNA abgeglichen.

3.8.4.4 Prinzip der *Realtime*-PCR (TaqMan®)

Die *Realtime* (Echtzeit)-PCR ermöglicht ähnlich wie die semiquantitative PCR eine exponentielle Amplifikation von Nukleotidsequenzen. Simultan zur Vervielfältigung erfolgen jedoch Fluoreszenzmessungen, mit deren Hilfe eine bessere Quantifizierbarkeit der DNA-Stränge (*Templates*) erreicht wird.

Hierfür wird eine für die Zielsequenz spezifische Sonde eingesetzt, die am 3'-Ende einen *Quencher* (Rhodaminderivat) und am 5'-Ende einen *Reporter* (Fluoreszeinderivat) besitzt. Die Taq-Polymerase besitzt neben ihrer Synthesefunktion eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, die während der Elongationsphase eine Spaltung von *Reporter* und *Quencher* bewirkt. Mit jedem Amplifikationszyklus steigt proportional zur Vervielfältigung der *Templates* die Fluoreszenz des freigesetzten *Reporters*. Nach einer bestimmten Zyklenzahl wird ein Schwellenwert (*Threshold*) erreicht, bei dem der erste deutliche Anstieg des Sondensignals erfasst wird. Je mehr Matrizenstränge bei Beginn der PCR vorliegen, desto früher wird ein linearer Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Der dazugehörige Zyklus wird als Schwellenzyklus (*Threshold Cycle* (CT)) bezeichnet. Er ist ein zuverlässiger Parameter für die Quantifizierung der zu Beginn einer PCR vorhandenen cDNA-*Templates* und ermöglicht somit die Berechnung der

Genexpression. Am Ende der PCR stellt sich eine Plateauphase ein, in der aufgrund des Verbrauchs der PCR-Reagenzien und der Akkumulation großer Amplifikatmengen keine signifikante Neusynthese mehr stattfindet.

3.8.4.5 Durchführung der *Realtime*-PCR

Die *Realtime*-PCR wurde mit einem Kit der Firma Applied Biosystems für folgende Genprodukte durchgeführt:

- Proinflammatorische Zytokine: IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α
- Antiinflammatorische Zytokine: IL-10, TGF- β
- Matrixkomponenten: Kollagen I, Kollagen III
- Matrixmetalloproteinasen: MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13
- *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase*: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-4
- Apoptosefaktoren: Bax, *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2)
- *Housekeeping*-Gen: 18S rRNA.

Als *Reporter* wurde für alle Primer der Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM-phosphoramidit (FAM) verwendet. Je Probe wurde ein Ansatz aus 6,25 μ l TaqMan®-Mastermix (2 x), 0,625 μ l Primer/Sonden-Assay (20 x), 3,625 μ l nukleasefreies Aqua dest. und 1 μ l cDNA hergestellt und in die vorgesehenen Kavitäten der 96-Well-Mikrotierplatte gegeben. Nach folgendem Programm erfolgte die Quantifizierung der eingesetzten cDNA:

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
1	erste Denaturierung	95 °C	10 min
2	Denaturierung	95 °C	15 sec
3	<i>Annealing</i> und Elongation	60 °C	1 min

Tabelle 3.3: TaqMan®-Programm

Die Schritte zwei bis drei wurden 40 Mal zyklisch wiederholt. Zum Ausschluss von Kontaminationen und Pipettierfehlern erfolgte für jede Probe eine Doppelbestimmung sowie auf jeder Platte eine Negativkontrolle mit Aqua dest. anstelle von cDNA.

3.8.4.6 Auswertung der *Realtime*-PCR

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression erfolgte die Normierung mit dem *Housekeeping*-Gen 18S rRNA nach der delta-CT-Methode. Aus den beiden CT-Werten der Doppelbestimmung des untersuchten Gens konnte bei geringen Abweichungen ein Mittelwert berechnet werden, von dem der CT-Wert von 18S rRNA der entsprechenden Probe subtrahiert wurde: $\text{delta-CT} = \text{CT Zielgen} - \text{CT Housekeeping-Gen}$. Da unter idealen Bedingungen in jedem Zyklus eine Verdopplung des Amplifikats erfolgt, wird zur Berechnung der Genexpression folgende arithmetische Formel verwendet: $2^{-\text{delta-CT}}$.

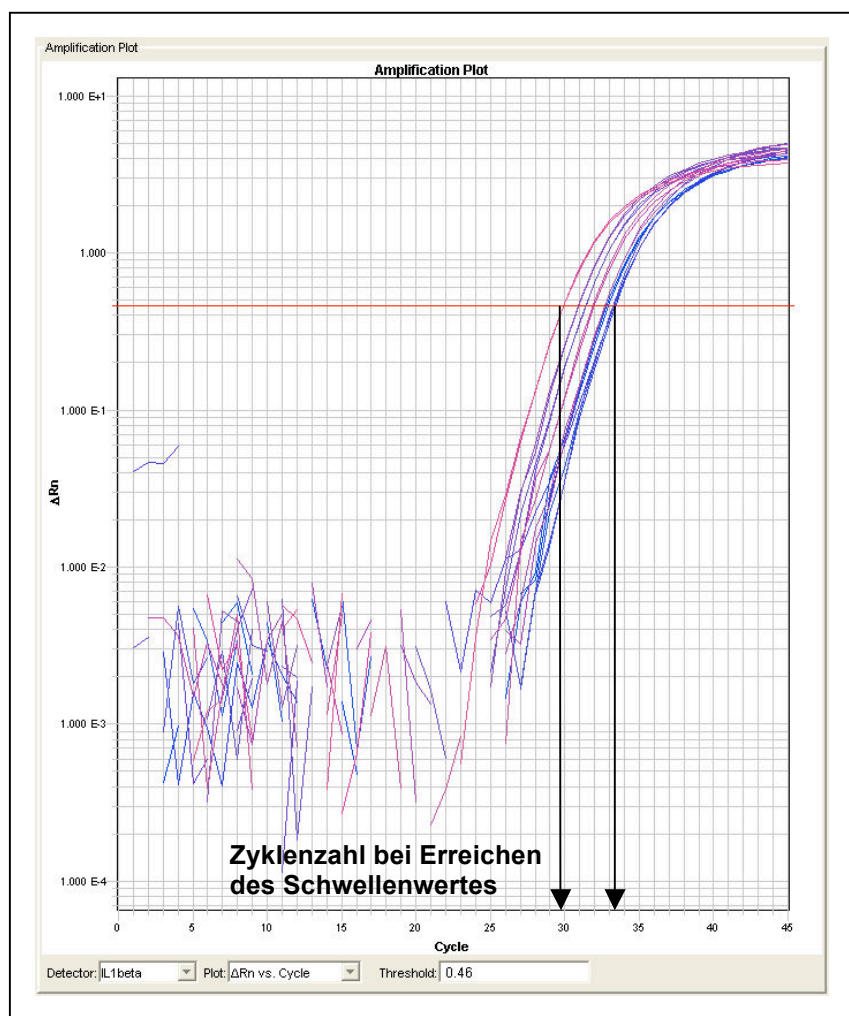


Abbildung 3.1: Exemplarische Darstellung der *Realtime*-PCR am Beispiel von IL-1 β

3.8.4.7 Nachweis des Coxsackie B3 Genoms

Der Nachweis des Coxsackie B3 Genoms erfolgte mit Hilfe der *Realtime*-PCR, wobei der Primer/Sonden-Assay ein Geschenk des Instituts Kardiale Diagnostik und Therapie

(IKDT) war. Je Probe wurde dazu ein Ansatz aus 6,25 µl TaqMan®-Mastermix (2 x), 0,625 µl Primer/Sonden-Assay (20 x), 3,625 µl nukleasefreiem Aqua dest. und 2 µl cDNA (entsprechend 20 ng RNA) hergestellt und nach dem unter 3.8.4.5 beschriebenen Programm im Thermocycler amplifiziert. Anhand einer Verdünnungsreihe des CVB3-exprimierten Plasmids mit bekannter CVB3-Kopienzahl konnte eine absolute Quantifizierung des CVB3-Genoms vorgenommen werden, so dass eine Ermittlung der Viruslast jedes infizierten Tiers möglich war. Zur Kontrolle des fehlenden Virusnachweises wurde die *Realtime*-PCR auch für die Proben der nicht infizierten Tiere sowie für einen Ansatz ohne cDNA durchgeführt.

3.8.4.8 Primer

In der folgenden Tabelle sind für die TaqMan®-Kits der Firma Applied Biosystems die Bestellnummern und für die semiquantitative PCR sowie den CVB3-Nachweis mit Primern der Firma TipMolBiol die Länge und Sequenz aufgelistet.

Primer	Länge	Sequenz / Bestellnummer
18S rRNA	435 bp	Sense: 5'-CCG GTA CAG TGA AAC TGC GA-3' Antisense: 5'-CGG GAG TGG GTA ATT TGC G-3'
18S rRNA		Hs 99999901_s1
Bax		Mm 00432050_m1
Bcl-2		Mm 00477631_m1
Kollagen I		Mm 00483888_m1
Kollagen III		Mm 00802331_m1
CVB3		Geschenk des IKDT
IL-1β		Mm 00434228_m1
IL-6		Mm 00446190_m1
IL-10		Mm 00439616_m1
INF-γ		Mm 00801778_m1
MMP-2		Mm 00439508_m1
MMP-3		Mm 00440295_m1
MMP-8		Mm 00439509_m1
MMP-9		Mm 00442991_m1
MMP-12		Mm 00500554_m1

Primer	Länge	Sequenz / Bestellnummer
MMP-13		Mm 00439491_m1
STAT3	301 bp	Sense: 5'-CTG AGA AGC TCC TAG GGC CTG-3' Antisense: 5'-CTG ATG TCC TTT TCC ACC CAA-3'
TGF- β 1		Mm 00441724_m1
TIMP-1		Mm 00441818_m1
TIMP-2		Mm 00441824_m1
TIMP-4		Mm 00446568_m1
TNF- α		Mm 00443258_m1

Tabelle 3.4: Sequenzen / Bestellnummern der eingesetzten Primer

3.9 Proteinchemische Methoden

3.9.1 Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurde das vorgesehene Myokardgewebe zuerst gewogen und die notwendige Menge an RIPA-Lysepuffer in μ l berechnet, die der Gewebsmasse in $\text{mg} \times 10$ entsprach. Der RIPA-Puffer wurde aus 250 ml 1x PBS, 5 ml Nonidet P-40, 2,5 g Natriumdesoxycholsäure und 2,5 ml 20%igem Natriumdodecylsulfat SDS (w/v) hergestellt. Zur Hemmung von endogenen Proteasen wurden kurz vor Gebrauch 10 μ l Aprotinin (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 2 μ l Leupeptin (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 2 μ l Pepstatin (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in MetOH) und 10 μ l 0,2 M PMSF zu 10 ml Puffer hinzugefügt.

Mit einem Stabhomogenisierer wurden die Proben auf Eis homogenisiert, danach für 15 Minuten im Thermomixer bei 4 °C und 660 Umdrehungen pro Minute geschüttelt und abschließend 15 Minuten lang bei 4 °C und 16.000g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgetragen, in kleine Mengen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.9.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce anhand der dazugehörigen Protokolle. Die Grundlage dieser Methode stellt die Biuretreaktion dar, in der zweiwertige Kupferionen im alkalischen Medium einen farbigen Komplex mit den Peptidbindungen der Proteine eingehen. Diese Reaktion wird durch Bicinchoninicsäure (BCA) verstärkt, so dass eine kolorimetrische Messung der Gesamtproteinmenge möglich ist.

Eine Standardverdünnungsreihe von 5 µg/ml bis 1000 µg/ml wurde aus Rinderserumalbumin (BSA Standard 2,0 mg/ml) und Aqua dest. angefertigt und als Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Verdünnung der zu bestimmenden Proteinproben mit Aqua dest. im Verhältnis 1:50 und 1:100, wobei pro Probe 10 µl Proteinlösung eingesetzt und eine Dreifachbestimmung vorgenommen wurden. Die BCA-Arbeitslösung wurde aus den mitgelieferten Reagenzien A und B im Verhältnis 50 + 1 hergestellt und pro *Well* 200 µl hiervon zum verdünnten Protein bzw. Standard hinzugefügt. Nach Inkubation in einem 60 °C warmen Wasserbad entstanden Farbkomplexe, deren Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm in einem Photometer der Firma Tecan gemessen wurde. Durch Vergleich der Absorption der Proteinproben mit der Absorption der Eichkurve ist eine Bestimmung der Proteinkonzentration möglich. Um eine Kreuzreaktion zwischen dem RIPA-Lysepuffer der Proteinproben und der BCA-Arbeitslösung auszuschließen, wurde zur Kontrolle der Probenpuffer ebenfalls im Verhältnis 1:50 und 1:100 mit Aqua dest. verdünnt und die Absorption bestimmt.

3.9.3 Prinzip der Zymographie

Die Zymographie ist eine proteinchemische Methode zum Nachweis von Enzymaktivität. Sie basiert auf der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page), die eine elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach deren Größe ermöglicht. Ein Gel aus Polyacrylamid wird hierbei mit Natriumdodecylsulfat versetzt, um die Eigenladung der Proteine zu maskieren, so dass eine Wanderung der Proteine durch die dreidimensionale Gelmatrix zur Anode stattfindet.

In der Zymographie wird das Gel zusätzlich mit einem Substrat des gesuchten Enzyms polymerisiert. Zum Nachweis von Gelatinasen wie z.B. MMP-2 wird dem Gel Gelatine zugesetzt. Die enzymatisch gespaltenen Areale erscheinen mit Hilfe einer Gegenfärbung als ungefärbte Banden, ihre Helligkeit und Bandenbreite geben Auskunft über die Aktivität des proteolytischen Enzyms.

3.9.4 Durchführung der Zymographie

Zum Nachweis der Enzymaktivität von MMP-2 wurde ein 10%iges Gelatinegel der Firma BioRad verwendet. 10 µg jeder Proteinprobe wurden mit Aqua dest. auf 10 µl

aufgefüllt und mit jeweils 10 µl 2x Sample-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10% Glycerin (v/v), 1% SDS (w/v), 0,005% Bromphenolblau (w/v), pH 6,8) bei Raumtemperatur inkubiert. Je 20 µl der vorbereiteten Proben wurden auf das Gel aufgetragen und im Elektrophoresepuffer (250 mM Trishydroxymethylaminomethan, 192 mM Glycin, 0,1% SDS (w/v), pH 8,3) 100 Minuten lang bei einer konstanten Spannung von 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Vermeidung einer irreversiblen Wärmedenaturierung der Gelatinasen wurde die Elektrophorese im Eisbad durchgeführt. Zum Entfernen des im Sample-Puffer enthaltenen SDS wurde das Gel anschließend dreimal 20 Minuten in 1x Renaturierungspuffer (2,5 % Triton X-100 (v/v)) unter leichtem Schütteln gewaschen. Die Reaktivierung der Enzymaktivität und somit der Verdau von Gelatine erfolgten durch Inkubation in einem Entwicklungspuffer (5 mM Tris, 20 mM NaCl, 0,5 mM CaCl₂, 1 mM ZnCl, 0,002% NaN₃ (w/v)) für zweimal 20 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 18 Stunden bei 37 °C. Danach wurde das Gel 30 Minuten lang in einer Färbelösung (0,5% Coomassie-Blue G-250 (w/v)) unter leichtem Schütteln gefärbt. Abschließend erfolgte eine Inkubation in einem Entfärbemedium (10% Essigsäure (v/v), 30% Methanol (v/v)) für 30 Minuten, so dass sich Banden mit gelatinolytischer MMP-2-Aktivität deutlich vom blau gefärbten Hintergrund mit ungespaltener Gelatine abhoben.

3.9.5 Auswertung der Gelatinase-Banden

Die Auswertung der Zymographie und somit die Aktivitätsbestimmung von MMP-2 erfolgten nach Digitalisierung mittels des Systems GelDoc 2000 der Firma BioRad unter Anwendung des Programms Quantity One. Auf jedem Gel wurden Proben von Tieren aus unterschiedlichen Versuchsgruppen, eine Kontrollprobe als Abgleich für Helligkeitsschwankungen, eine Positivkontrolle sowie ein kDa-Marker zur Größenbestimmung des Proteins aufgetragen, wobei der Marker aufgrund seiner blauen Farbe auf dunklem Hintergrund auf dem digitalisierten Bild nicht erkennbar ist.

3.10 Immunhistochemie

3.10.1 Prinzip der Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung dient der spezifischen Darstellung bestimmter Gewebestrukturen mit Hilfe von sensitiven monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern.

In der indirekten Methode (siehe Abbildung 3.2) richtet sich nach Bindung eines unkonjugierten Primärantikörpers an das Gewebeantigen ein Sekundärantikörper gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Der Sekundärantikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, das durch Zugabe von Substrat eine Farbreaktion hervorruft: Farbreaktion = Antigen + unkonjugierter Primärantikörper + Sekundärantikörper mit Enzym + Substrat.

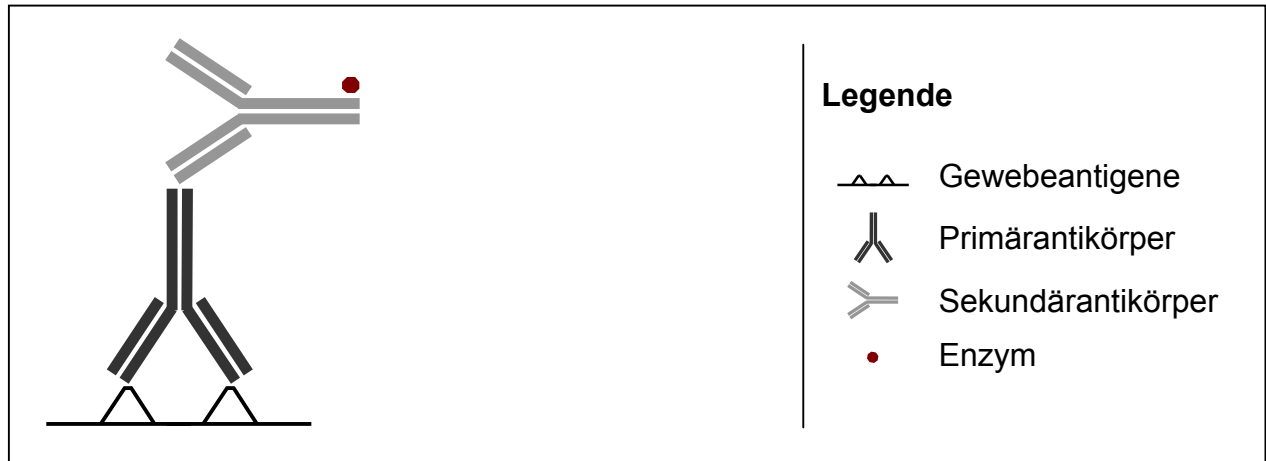


Abbildung 3.2: Darstellung der indirekten Methode

Die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode (siehe Abbildung 3.3) ermöglicht eine hohe Sensitivität durch Nutzung der Affinität des Glykoproteins Avidin für Biotin, das vier Bindungsstellen für Avidin besitzt. Hierbei wird ein biotinylierter Sekundärantikörper eingesetzt, so dass über Avidin die Bindung des Avidin-Biotin-Enzymkomplexes an die Biotinmoleküle des Sekundärantikörpers erfolgt. Auf diesem Weg wird eine Signalverstärkung der Farbreaktion erreicht: Farbreaktion = Antigen + unkonjugierter Primärantikörper + biotinylierter Sekundärantikörper + Avidin-Biotin-Enzymkomplex + Substrat.

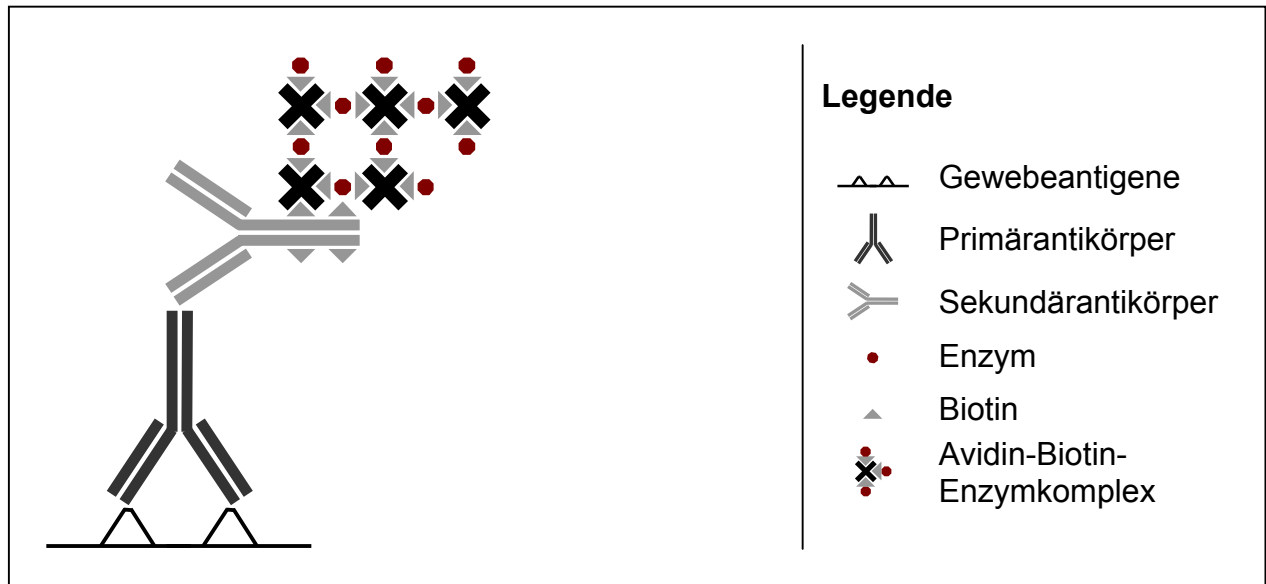


Abbildung 3.3: Darstellung der ABC-Methode

Die EnVision™-Methode (siehe Abbildung 3.4) basiert auf dem Einsatz eines Sekundärantikörpers, der an ein Dextranpolymer konjugiert ist. An das Dextranpolymer sind wiederum durchschnittlich weitere zehn Moleküle Sekundärantikörper und 70 Enzymmoleküle gebunden. Der Vorteil dieser Methode ist neben ihrer hohen Sensitivität ihre große Spezifität, da unspezifische Farbreaktionen durch endogenes Biotin ausgeschlossen sind: Farbreaktion = Antigen + unkonjugierter Primärantikörper + Sekundärantikörper mit Dextranpolymer und Enzym + Substrat.

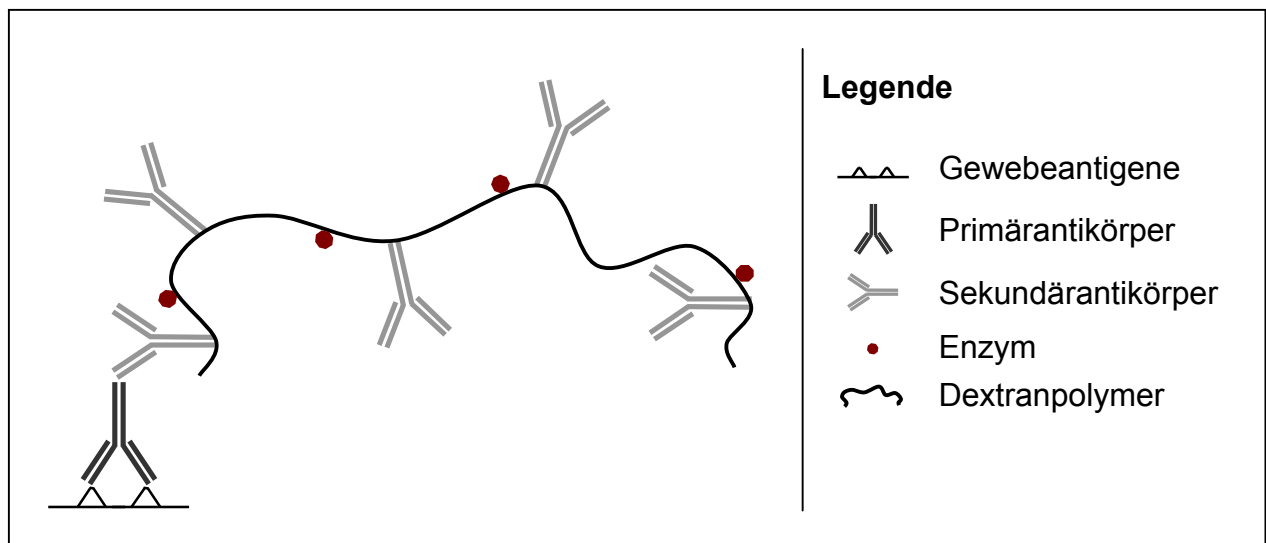


Abbildung 3.4: Darstellung der EnVision™-Methode

In dieser Studie wurden die drei beschriebenen Färbemethoden mit spezifischen monoklonalen Antikörpern verschiedener Spezies angewendet (siehe Abschnitt 3.10.6). Die Färbungen mit dem Sekundärantikörper Dianova erfolgten nach der unveränderten indirekten Methode, die Färbungen mit EnVision™ nach dem EnVision™-Prinzip und die Färbungen mit Dako EO 468 nach der ABC-Methode. Durch Oxidation mit Hilfe des Enzyms Meerrettichperoxidase (HRP) nahm die Substrat-Chromogenlösung 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) einen rötlichen Farbton an, der lichtmikroskopisch als spezifisches Signal detektiert werden konnte. Zur Kontrolle der spezifischen Bindung des Sekundärantikörpers wurden bei jeder Färbung Myokardschnitte nur mit Verdünnungspuffer anstelle des Primärantikörpers inkubiert.

3.10.2 Anfertigung von Cryoschnitten

Zum Nachweis von Kollagen I und III, MMP-2 und MMP-9, ICAM und VCAM wurden immunhistochemische Färbungen an Cryoschnitten vorgenommen. Das in Tissue Tec eingebettete und bei -80 °C gelagerte Gewebe wurde im Cryostaten bei einer Kammertemperatur von -28 °C zu seriellen Cryoschnitten mit einer Dicke von 5 µm verarbeitet und auf mit 10 % Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgetragen. Durch zehnmündige Inkubation in kaltem Aceton wurden die Cryoschnitte fixiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

3.10.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Mit Hilfe von Paraffinschnitten konnten T-Lymphozyten und Makrophagen anhand von immunhistochemischen Färbungen dargestellt werden. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Pathologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin. Nach Formalinfixierung des Gewebes erfolgte die weitere Aufarbeitung an einem Gewebereinbettungsautomaten in folgenden Schritten: zweimal eine Stunde in 70 % Ethanol (v/v), dreimal zwei Stunden in 96 % Ethanol (v/v), zweimal eine Stunde in 100 % Ethanol, eine Stunde in 66 % Ethanol in Xylol (v/v), eine Stunde in 33 % Ethanol in Xylol (v/v), eine Stunde in Xylol, abschließend zweimal zwei Stunden in Paraffin bei 56 °C. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden aus den nach dem Ausgießen und Abkühlen entstandenen Paraffinblöcken serielle Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Diese wurden auf Superfrost-Plus-Objektträger geschichtet und bei Raumtemperatur gelagert.

Vor der immunhistochemischen Färbung sind eine Entparaffinierung und Rehydrierung erforderlich. Hierzu wurden die Objektträger zweimal zehn Minuten lang in Xylol inkubiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils fünf Minuten in 100 %, 90 %, 70 %, 30 % Ethanol (v/v)) schrittweise rehydriert. In formalinfixierten Präparaten ist außerdem eine weitere Vorbehandlung zur Demaskierung von Epitopen notwendig. Um eine Verbesserung der Gewebespermeabilität der Antikörper zu erreichen, wurden die entparaffinierten Myokardschnitte zehn Minuten lang bei 37 °C in 4 mg/ml Pepsin in 0,2 M HCl inkubiert. Zuletzt folgte ein zweimaliger Waschschrift in destilliertem Wasser.

3.10.4 Immunhistochemische Färbung mit EnVision™

Die Färbungen von Kollagen I, Kollagen III, MMP-2 und MMP-9 erfolgten nach der EnVision™-Methode, die Färbung von ICAM nach der unveränderten indirekten Methode. Zur Begrenzung des Färbefelds wurden die aufgetauten Cryoschnitte mit einem Diamantschleifer umrandet. Um die Schnitte an das Puffermilieu zu gewöhnen, wurden die Objektträger fünf Minuten in 1x PBS gewaschen. Zur irreversiblen Blockierung der endogenen Peroxidase folgte darauf eine zehnmünütige Inkubation in 1x PBS mit 0,075% H₂O₂, das durch zwei weitere Waschschriffe von jeweils fünf Minuten in 1x PBS wieder entfernt werden konnte. Anschließend wurde der in 1x PBS mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) verdünnte Primärantikörper auf die Färbefelder aufgetragen und die Objektträger 60 Minuten lang in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur belassen. FCS diente hierbei der Absättigung elektrostatischer Proteinladungen, um eine Bindung des Primärantikörpers an unspezifische Gewebeproteine zu verhindern. Nach einem weiteren Waschschrift folgte die Inkubation des unverdünnten Sekundärantikörpers EnVision™ für 30 Minuten ebenfalls in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Die Färbung von ICAM erfolgte nach denselben Färbeschritten, wobei jedoch als Sekundärantikörper Dianova in einer Verdünnung von 1:100 verwendet wurde. Nach zwei Waschphasen wurden die Cryoschnitte mit der Substratlösung (0,025 % 3-Amino-9-Ethylcarbazol AEC (w/v), 5 % N,N-Dimethylformamid (v/v), 3 mM Essigsäure, 7 mM Natriumacetat, 0,01 % H₂O₂ (v/v) in Aqua dest.) zwölf Minuten lang unter Schütteln bei Dunkelheit gefärbt, zweimal fünf Minuten in 1x PBS gewaschen und durch kurzes Eintauchen in Hämalaunlösung gegengefärbt. Mit Hilfe von kurzem Spülen unter lauwarmem Leitungswasser wurde

eine Blaufärbung der Zellkerne erreicht. Abschließend wurden die Objektträger mit Glyceringelatine und Deckgläschen versehen.

3.10.5 Immunhistochemische Färbung nach der ABC-Methode

Die Färbungen von CD3, Mac3 und VCAM wurden nach der ABC-Methode durchgeführt. Nach dem Auftauen der Cryoschnitte (VCAM) bzw. der Vorbehandlung der Paraffinschnitte (CD3 und Mac3, siehe 3.10.3) folgten eine Begrenzung des Färbefelds und ein fünfminütiger Waschschrift in 1x TBS (2,7 mM KCl, 10 mM Trishydroxymethylaminomethanhydrochlorid, 137 mM NaCl, pH 7,5) zur Gewöhnung der Schnitte an das Puffermilieu. Eine Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte in 1x TBS mit 0,075% H₂O₂, das durch ein fünfminütiges Waschen in 1x TBS wieder entfernt wurde. Für die Cryoschnitte wurde dieser Waschschrift ein zweites Mal wiederholt, für die Paraffinschnitte folgten zwei weitere Waschschrift in 1x TBS mit 0,025% Tween zur Freilegung der Bindungsstellen des Primärantikörpers. Die Absättigung elektrostatischer Proteinladungen und die Blockierung des endogenen Biotins erfolgten durch dreißigminütige Inkubation der Schnitte in einer Lösung aus 10 % Normalserum, 1 % Rinderserumalbumin (BSA) und pro Milliliter vier Tropfen Avidin in 1x TBS. Nach vorsichtigem Abklopfen der Lösung folgte die Inkubation des verdünnten Primärantikörpers für 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Der Primärantikörper war in 1x TBS mit 1% BSA und pro Milliliter vier Tropfen Biotin zur Blockierung des endogenen Avidins verdünnt. Anschließend wurden die Cryoschnitte zweimal fünf Minuten in 1x TBS bzw. die Paraffinschnitte zweimal fünf Minuten in 1x TBS mit 0,025 % Tween gewaschen. Der biotinylierte Sekundärantikörper war in 1x TBS mit 1 % BSA gelöst und wurde für die Bindung an den Primärantikörper 60 Minuten lang bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf den Schnitten belassen. Darauf folgten zwei weitere Waschschrift mit 1x TBS. Zur Bildung des Avidin-Biotin-Enzymkomplexes wurden jeweils 3 Tropfen der Reagenzien A und B zu 1ml 1x TBS gegeben und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde das ABC-Reagenz 30 Minuten lang auf den Schnitten belassen, so dass eine Bindung des ABC-Komplexes an den biotinylierten Sekundärantikörper erfolgen konnte. Anschließend folgten zwei weitere Waschschrift mit 1x TBS, die Inkubation der Substratlösung 3-Amino-9-Ethylcarbazol bei Dunkelheit unter konstantem Schütteln sowie zwei abschließende Waschschrift in 1x TBS. Zuletzt folgten die Gegenfärbung durch kurzes

Eintauchen in Hämalauflösung, ein kurzes Spülen unter lauwarmem Leitungswasser zur Blaufärbung der Zellkerne und das Eindecken der Objektträger mit Glyceringelatine und Deckgläschen.

3.10.6 Charakterisierung der Antikörper

Durch serielle Titration konnte die optimale Verdünnung für den Primärantikörper ermittelt werden. In der folgenden Tabelle werden der Primärantikörper mit Firma, Spezies und Verdünnung sowie der Sekundärantikörper für jede immunhistochemische Färbung aufgelistet.

1. Antikörper	Firma	Vdg.	Spezies	2. Antikörper	Vdg.
CD3	Serotec	1:50	Ratte	Dako EO 468	1:100
Kollagen I	Chemicom	1:500	Kaninchen	EnVision™	unverd.
Kollagen III	Calbiochem	1:175	Kaninchen	EnVision™	unverd.
ICAM	BD Biosciences	1:50	<i>Armenian</i> Hamster	Dianova	1:100
Mac3	BD Biosciences	1:50	Ratte	Dako EO 468	1:100
MMP-2	Chemicom	1:50	Kaninchen	EnVision™	unverd.
MMP-9	Chemicom	1:100	Kaninchen	EnVision™	unverd.
VCAM	BD Biosciences	1:50	Ratte	Dako EO 468	1:200

Tabelle 3.5: Charakterisierung der Antikörper

3.10.7 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte an dem Lichtmikroskop Leica DMRB bei 200facher Vergrößerung. Mit der Software Lucia G Version 3.51 der Firma Imaging Laboratories wurde das Gewebe systematisch gemustert; je nach Größe des Schnitts konnten 20–30 Gesichtsfelder einfach sowie stichprobenweise doppelt ausgewertet werden. Artefakte wurden von den Messungen mit Hilfe einer Schablone ausgeschlossen und der gewebefreie Hintergrund von der gemessenen Gesamtfläche subtrahiert. Um eine größtmögliche Sensitivität und Spezifität in der Signalerkennung zu gewährleisten, erfolgte für jede vorgenommene Färbung eine Anpassung des Datenverarbeitungsmakros an die jeweilige Farbreaktion. Mit Hilfe dieses Makros

konnten die spezifischen Signale quantifiziert und in Zellen pro Quadratmillimeter Gewebsfläche im Falle der Entzündungszellen bzw. in *Area Fraction* (prozentuale Signalfläche pro Quadratmillimeter Gewebefläche) im Falle der Matrixbestandteile umgerechnet werden.

3.11 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 5.00. Die vier Versuchsgruppen Wildtyp nicht infiziert (WT), STAT3 *Knockout* nicht infiziert (STAT3 KO), Wildtyp infiziert (WT Inf) und STAT3 *Knockout* infiziert (STAT3 KO Inf) wiesen unterschiedliche Stichprobenumfänge und kleine Gruppengrößen auf. Aus diesem Grund konnten nach der ersten explorativen Datenanalyse weder eine Normalverteilung der Messwerte in der jeweiligen Grundgesamtheit noch eine Homogenität der Fehlervarianzen angenommen werden. Demzufolge wurde die Nullhypothese, ob die vier verschiedenen Wertegruppen derselben Grundgesamtheit entstammten, mit einem nicht-parametrischen Verfahren geprüft. Hierfür wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis verwendet und bei einem Wert von $p < 0,05$ die Nullhypothese verworfen, so dass Einzelvergleiche durchgeführt werden konnten. Diese erfolgten mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests, wobei Unterschiede zwischen folgenden Gruppen untersucht wurden:

- WT und STAT3 KO
- WT und WT Inf
- STAT3 KO und STAT3 KO Inf
- WT Inf und STAT3 KO Inf.

Die ermittelten p-Werte wurden nach Bonferroni korrigiert (p-Wert des Mann-Whitney-U-Tests multipliziert mit der Anzahl der durchgeführten Tests). Bei einem korrigierten Wert von $p < 0,05$ wurden Unterschiede als signifikant betrachtet.

Eine Ausnahme stellt die Auswertung der Ergebnisse der hämodynamischen Messungen dar, da hier aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht alle Kontrolltiere untersucht werden konnten. Aus diesem Grund wurden nur die Gruppen WT Inf und STAT3 KO Inf mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests statistisch geprüft.

Die grafische Darstellung der Daten erfolgte in Form von *Box-Whisker-Plots*, wobei der Balken den Median und der Kasten die Werte von der 25. bis zur 75. Perzentile darstellen. Die *Whiskers* (Linien) wurden nach Tukey gewählt, so dass die letzten Werte oberhalb und unterhalb des 1,5-fachen Interquartilabstands gekennzeichnet sind. Ausreißer, die mehr als das 1,5-Fache des Interquartilabstands betragen, wurden mit einem Kreis markiert. Die im Ergebnistext angegebenen Daten sind als Mittelwert und Standardmessfehler angegeben.

3.12 Tierversuchsantrag

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

4 Material

Die folgenden Tabellen liefern Auskunft über in dieser Studie verwendete Arbeitsgeräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Software.

4.1.1 Arbeitsgeräte

Arbeitsgerät	Bezeichnung	Hersteller
Autoklaviergerät		Hartmann, Madgeburg, D
Beatmungsgerät	Mausventilator Typ 55-7066	Harvard Apparatus, Boston, USA
Brutschrank	Function Line	Heraeus-Christ, Osterode, D
Computer	Pentium III	Asus, Ratingen, D
Cryostat	Jung CM 3000	Leica, Benzheim, D
Diamantschleifer	Gravier Komplett Set	Proxxon, Wildeshausen, D
Eismaschine	AF-10	Scotsman, Gießen, D
Elektrophoresekammer	a) für Agarosegele b) für Zymographie	a) Biometra, Göttingen, D b) BioRad, München, D
Gelkämme	Eigenproduktion	CBF, Charité, Berlin, D
Gelschlitten	Eigenproduktion	CBF, Charité, Berlin, D
Gewebeeinbettungs- automat		Shandon, Frankfurt / Main, D
Hämodynamische Messapparatur	a) DC Bridge Amplifier Type 660 b) Differentiator Slope Quotient Coupler 575 c) Heart Rate Module Type 669	Hugo-Sachs, March- Hugstetten, D
Homogenisator	Pellet Pestle Motor	Sigma - Aldrich, Taufkirchen, D
Horizontalschüttler	SM-25	Edmund Bühler, Tübingen, D
Lichtmikroskop	DMRBE	Leica, Benzheim, D
<i>Linearcorder</i>	WR3101 Mark VII	Graphtec Corporation, Tokyo, J
Magnetrührer	Ikamag Reo	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Millar Tip - Katheter	SPR-407 Ultraminiature Pressure Transducer, 2 F	Millar Instruments, Houston, USA

Arbeitsgerät	Bezeichnung	Hersteller
Multipipette	Multipette plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Nanodrop	NanoDrop® ND-1000	Agilent Technologies, Boeblingen, D
PCR-Maschine	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
PCR-Netzgerät	Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen, D
pH-Meter	Digital pH-Meter 646	Bayer, Düsseldorf, D
Photometer	Sunrise Absorbance Reader	Tecan, Männedorf, CH
Pipetten	Eppendorf Research, 0,5–10 µl, 10–100µl, 1000µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Präzisionswaage	TE 214 S	Sartorius, Göttingen, D
<i>Realtime</i> -Cycler	7900HT Fast Real Time-PCR Systems	Applied Biosystems, Foster City, USA
Rotationsmikrotom	Jung CM 3000	Leica, Bensheim, D
Thermomixer	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
UV-Transilluminator	BioDoc Analyze System	Biometra, Göttingen, D
Vortexgerät	MS2 Minishaker	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Waage	elektronisch, DMS 580	Kern-Elektronik, Albstadt, D
Wasserbadinkubator		GFL, Burgwedel, D

Tabelle 4.1: Hersteller und Bezeichnung der Arbeitsgeräte

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsartikel	Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser	24 x 50 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Einmalhandschuhe	Flexam	Cardinal Health, Dublin, USA
Falcon-Tubes	steril, 10 ml und 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Homogenisierstäbe	Pellet Pestles	Sigma, Taufkirchen, D
Kunststoffkanüle	18 G	Braun, Meisungen, D

Verbrauchsartikel	Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatte		Sarstedt, Nümbrecht, D
Objektträger	a) 26 x 76 mm b) SuperFrost-Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
PCR-Tubes	200 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Pipettenspitzen	a) unsteril, 10 µl, 100 µl, 1000 µl b) RNase-frei, mit Filtertip, 10 µl, 100 µl, 1000 µl	a) Eppendorf, Hamburg, D b) Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Reaktionsgefäße	Safe-Lock oder RNase-frei, 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf, D
<i>Realtime</i> -Platten	MicroAmp	Applied Biosystems, Foster City, USA

Tabelle 4.2: Hersteller und Bezeichnung der Verbrauchsmaterialien

4.1.3 Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Reagenzien in *pro analysi* Qualität bezogen.

Reagenzien	Bezeichnung	Hersteller
3-Amino-9-Carbazol		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
ABC-Kit	Vectarstain Standard	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Aceton	100%	J.T. Baker, Deventer, NL
Agarose	SeaKem LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Antikörper, primär	a) Anti-CD3 b) Anti-ICAM c) Anti-Kollagen I d) Anti-Kollagen III e) Anti-Mac3 f) Anti-MMP2 g) Anti-MMP9	a) Serotec, Düsseldorf, D b) BD Biosciences, Darmstadt, D c) Chemicon, Hofheim, D d) Calbiochem, Darmstadt, D e) BD Biosciences, Darmstadt, D f) Chemicon, Hofheim, D g) Chemicon, Hofheim, D

Reagenzien	Bezeichnung	Hersteller
Antikörper, primär	h) Anti-VCAM	h) BD Biosciences, Darmstadt, D
Antikörper, sekundär	a) EnVision™ b) Dako EO 468 c) Dianova	a) Dako, Glostrup, DK b) Dako, Glostrup, DK c) Dianova, Hamburg, D
Aprotinin	1 µg/µl	Calbiochem, Darmstadt, D
<i>Aqua bidest.</i>	Ampuwa Spüllösung	Fresenius, Bad Homburg, D
Avidin-Biotin-Blocking-Kit		Vector Laboratories, Burlingame, USA
Bovines Serumalbumin	BSA	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Bromphenolblau		Sigma, Taufkirchen, D
Chloroform	99 %	Sigma, Taufkirchen, D
DEPC – behandeltes Wasser	Diethylpyrocarbonat – behandeltes Wasser, RNase-frei	Ambion, Austin, USA
DNA-Polymerase	BioTherm Taq DNA-Polymerase 5 u/µl	Rapidozym, Berlin, D
DNase I		Roche, Penzberg, D
dNTPs	dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 25 mM	Epicentre, Madison, USA
EDTA	Ethylenediaminetetra-aceticacid	Sigma, Taufkirchen, D
Essigsäure	100 %	VWR Merck, Darmstadt, D
Ethanol	absolut	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	1 %	VWR Merck, Darmstadt, D
FCS	Fetales Kälberserum	PAA Laboratories, Pasching, D
Formalin	10 % gepuffert	Sigma, Taufkirchen, D
Glyceringelatine		VWR Merck, Darmstadt, D
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	VWR Merck, Darmstadt, D
Hämalaun-Färbelösung		VWR Merck, Darmstadt, D
HCl	Salzsäure, 1 mol/l	VWR Merck, Darmstadt, D
Isopropanol	2-Propanol	VWR Merck, Darmstadt, D
CaCl ₂	Kalziumchlorid	VWR Merck, Darmstadt, D

Reagenzien	Bezeichnung	Hersteller
kbp-Marker	Marker VIII (0.019-1.11 kbp)	Roche, Penzberg, D
KCl	Kaliumchlorid	VWR Merck, Darmstadt, D
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	VWR Merck, Darmstadt, D
Leupeptin	5 µg/µl	Sigma, Taufkirchen, D
Methanol		J.T. Baker, Deventer, NL
MgCl ₂ für die PCR	50 mM Magnesiumchlorid	Rapidozym, Berlin, D
N,N-Dimethylformamid		VWR Merck, Darmstadt, D
NaCl	Natriumchlorid	VWR Merck, Darmstadt, D
Natriumacetat		VWR Merck, Darmstadt, D
Natriumdesoxycholsäure		VWR Merck, Darmstadt, D
Nonidet P-40	Nonylphenylpolyethylen- glycol	Sigma, Taufkirchen, D
PCR-Primer	a) für die semiquantitative PCR b) für die TaqMan®-PCR c) für den CVB3-Nachweis	a) TipMolBiol, Berlin, D b) Applied Biosystems, Foster City, USA c) Geschenk des IKDT, siehe 3.8.4.8
PCR-Puffer	10x BioTherm-Puffer, ohne MgCl ₂	Rapidozym, Berlin, D
Pepstatin	5 mg/ml	Sigma, Taufkirchen, D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, 0.2 M	VWR Merck, Darmstadt, D
Poly-L-Lysin		Sigma, Taufkirchen, D
Protein Assay Kit	BCA	Roche, Grenzach- Whylen, D
Random-Hexamer		Applied Biosystems, Foster City, USA
Reverse Transkriptase	Multiscribe Reverse Transkriptase, 50 U/µl	Applied Biosystems, Foster City, USA
RNase-Inhibitor	RNasin	Applied Biosystems, Foster City, USA
RNase-Zap		Ambion, Austin, USA
SDS	Natriumdodecylsulfat	Sigma, Taufkirchen, D

Reagenzien	Bezeichnung	Hersteller
TaqMan® RT-Puffer	10x	Applied Biosystems, Foster City, USA
Taq-Polymerase	2,5 U	Rapidozym, Berlin, D
Tissue Tec®		Sakura, Zoeterwoude, NL
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)amino-methanhydrochlorid	VWR Merck, Darmstadt, D
Trizol®-Reagenz		Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween	Tween®20	Sigma, Taufkirchen, D
Xylol		J.T. Baker, Deventer, NL
Zymographie-Gel	Precast Ready Gel, 10 %	BioRad, München, D

Tabelle 4.3: Hersteller und Bezeichnung der Reagenzien

4.1.4 Software

Software	Erklärung	Hersteller
BioDoc V2.0	Digitalisierung der PCR	Biometra, Göttingen, D
Excel 2000	Tabellenkalkulationsprogramm	Microsoft, Unterschleißheim, D
GelDoc 2000	Digitalisierung der Zymographie	BioRad, München, D
GraphPad Prism V5.00	Statistikprogramm	GraphPad Software, San Diego, USA
Lucia G V3.51ab	Histomorphometrie	Laboratory Imaging, Prag, CZ
Quantity One 4.5.0	Auswertung der Zymographie	BioRad, München, D
Scion Image 2000	Auswertung der PCR	Ultra-Violet Products Limited, Cambridge, GB
Windows 2000 Professional	Betriebssystem	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Word 2000	Textverarbeitungsprogramm	Microsoft, Unterschleißheim, D

Tabelle 4.4: Hersteller und Erklärung der Software

5 Resultate

5.1 Krankheitsverlauf

5.1.1 Krankheitssymptome

Nach der CVB3-Infektion konnte bei den Mäusen ab dem vierten Tag p.i. eine Veränderung in Verhalten und Aussehen beobachtet werden. Die Tiere zeigten einen geringeren Spiel- und Fresstrieb, bewegten sich deutlich weniger und ihr Fell wurde zunehmend struppig und stumpf. Dieses Erscheinungsbild war zwischen dem siebten und 14. Tag am deutlichsten ausgeprägt. Ab dem 14. Tag erholten sich die Mäuse. Ihr Fell regenerierte sich und die Tiere nahmen das gewohnte Spiel- und Fressverhalten wieder auf. Zwischen den infizierten STAT3 KO und den infizierten WT Mäusen konnten keine Unterschiede in Verhalten oder Aussehen beobachtet werden. Bei den Kontrolltieren traten keine Veränderungen auf.

5.1.2 Körpergewicht

Zur Charakterisierung der Versuchstiere und zur Beschreibung der Auswirkungen der CVB3-Infektion sowie des STAT3 *Knockouts* wurden die Werte für Körper- und Herzgewicht der Mäuse erhoben. Zuerst wurden Körper- und Herzgewicht isoliert betrachtet, anschließend der Herzquotient (Herzgewicht geteilt durch Körpergewicht) bestimmt.

Der Kruskal-Wallis-Test ergab für das Körpergewicht, dass die Wertegruppen aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammten, so dass Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt werden konnten. Wie in Abbildung 5.1 erkennbar, zeigten die infizierten WT Mäuse ein signifikant niedrigeres Körpergewicht im Vergleich zu den nicht infizierten WT Mäusen ($23,4 \pm 1,1$ g versus $29,1 \pm 1,6$ g, $p < 0,05$). Eine Gewichtsabnahme trat ebenfalls bei den infizierten STAT3 KO Mäusen im Vergleich zu den nicht infizierten STAT3 KO Mäusen auf ($20,4 \pm 1,5$ g versus $28,3 \pm 0,2$ g, $p < 0,05$). Bemerkenswert ist, dass ein größerer Unterschied zwischen den infizierten und gesunden STAT3 KO Mäusen als zwischen den infizierten und gesunden WT Mäusen besteht. Zwischen den infizierten STAT3 KO Tieren und den infizierten WT Tieren konnte jedoch kein signifikanter Körpergewichtsunterschied festgestellt werden.

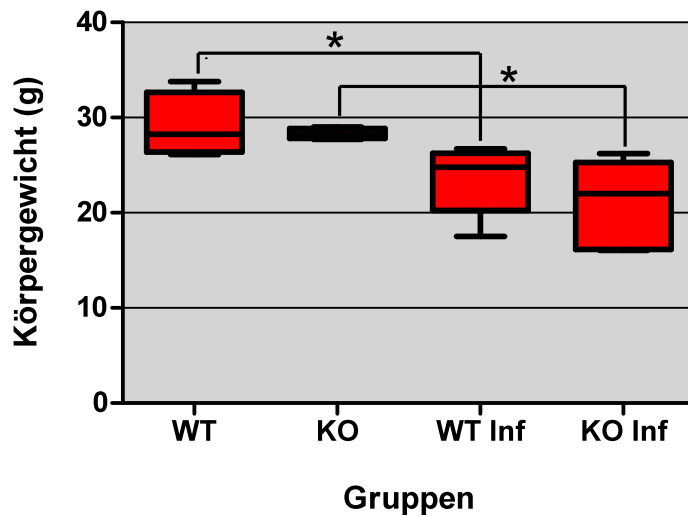


Abbildung 5.1: Darstellung des Körpergewichts der Versuchstiere am 28. Tag p.i. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Wertegruppen sind mit * markiert.

5.1.3 Herzgewicht und Herzquotient

Im Gegensatz zum Körpergewicht unterschieden sich die vier verschiedenen Gruppen weder im Herzgewicht noch im Herzquotienten signifikant. Das Herzgewicht der infizierten Tiere nahm im Vergleich zu den nicht infizierten Tieren ab (siehe Tabelle 5.1), bei Einzelvergleichen mit dem Mann-Whitney-U-Test konnten aber keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. In Tabelle 5.1 wird auch deutlich, dass die Herzquotienten keine wesentlichen Differenzen in den vier verschiedenen Gruppen aufwiesen, so dass der H-Test keine Signifikanzen ergab.

	WT	STAT3 KO	WT Inf	STAT3 KO Inf
Herzgewicht	145 ± 20 mg	115 ± 6 mg	95 ± 4 mg	93 ± 8 mg
Herzquotient	0,0049 ± 0,0006	0,0040 ± 0,0002	0,0047 ± 0,0001	0,0043 ± 0,0001

Tabelle 5.1: Herzgewicht und Herzquotient in den verschiedenen Versuchsgruppen

5.1.4 Viruslast

Um die CVB3-Infektion der Versuchstiere nachzuweisen, wurde die Viruslast im Herzen mittels *Realtime*-PCR bestimmt. Wie in Abbildung 5.2 erkennbar, konnte bei keinem der Kontrolltiere aus dem Myokard CVB3-Genom amplifiziert werden, während in den

infizierten Gruppen bei den meisten Mäusen eine Viruslast ermittelt wurde. Demzufolge unterschieden sich die vier verschiedenen Wertegruppen auch in der statistischen Prüfung mit dem H-Test ($p < 0,05$). Die Durchführung der Einzelvergleiche ergab keine signifikanten Unterschiede in der Viruslast der Gruppe WT Inf ($16,9 \pm 11,7$ CVB3-Kopien) versus STAT3 KO Inf ($14,0 \pm 4,7$ CVB3-Kopien). Es ist jedoch bemerkenswert, dass in der Gruppe WT Inf insgesamt bei vier von neun Mäusen (entspricht 44%) und in der Gruppe STAT3 KO Inf nur bei einer von sieben Mäusen (entspricht 14%) das CVB3-Genom unter der Nachweisgrenze lag.

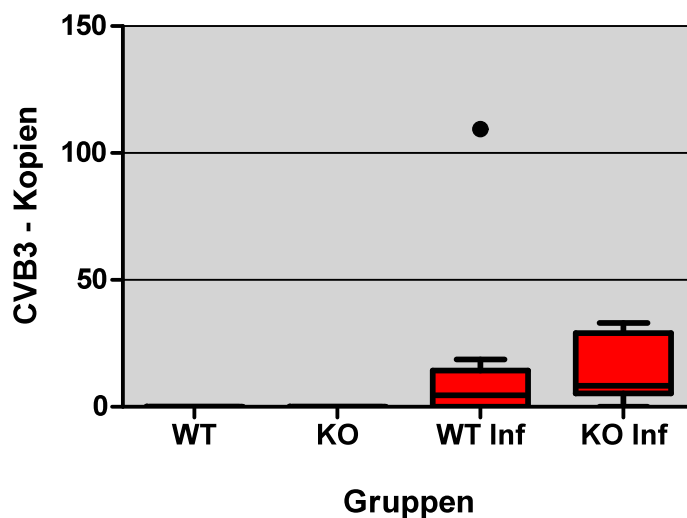


Abbildung 5.2: Darstellung der Viruslast in Form von CVB3-Kopien 28 Tage p.i. Ausreißer sind mit • markiert.

5.1.5 Mortalität

Alle infizierten Versuchstiere überlebten die akute und subakute Phase der Myokarditis nach der CVB3-Infektion und konnten in der chronischen Phase am 28. Tag p.i. hämodynamisch untersucht werden. Anschließend wurden die Herzen molekularbiologisch, zymographisch und immunhistochemisch analysiert.

5.2 Hämodynamik

Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei den hämodynamischen Messungen der Kontrolltiere konnten die Parameter der systolischen und diastolischen Funktion nur bei drei Tieren der Gruppe WT und zwei Tieren der Gruppe STAT3 KO bestimmt werden. Aus diesem Grund beschränkt sich die statistische Auswertung auf den Vergleich der

Gruppe WT Inf mit der Gruppe STAT3 KO Inf. In den Grafiken werden alle vier Gruppen abgebildet, um visuell darzustellen, dass größere Unterschiede weder zwischen den Kontrollgruppen noch zwischen der Gruppe WT Inf und den Kontrollgruppen vorlagen.

5.2.1 Parameter der systolischen Funktion

Als Parameter der systolischen Funktion wurden die Herzfrequenz, der linksventrikuläre endsystolische Druck, der maximale linksventrikuläre Druck, die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit, das linksventrikuläre endsystolische Volumen, das Schlagvolumen, das Herzminutenvolumen und die Ejektionsfraktion bestimmt.

Bei der Herzfrequenz war kein bedeutender Unterschied zwischen den infizierten WT Mäusen ($368,8 \pm 25,0$ Schläge pro Minute) und den infizierten STAT3 KO Mäusen ($357,5 \pm 40,9$ Schläge pro Minute) zu beobachten, der H -Test nach Kruskal und Wallis war nicht signifikant.

Im Gegensatz zu der Herzfrequenz war der linksventrikuläre endsystolische Druck in der Gruppe STAT3 KO Inf deutlich reduziert im Vergleich zu der Gruppe WT Inf ($83,5 \pm 8,4$ mmHg versus $111,5 \pm 4,1$ mmHg), wobei nach dem Mann-Whitney-U-Test ein p-Wert $< 0,05$ berechnet werden konnte (siehe Abbildung 5.3).

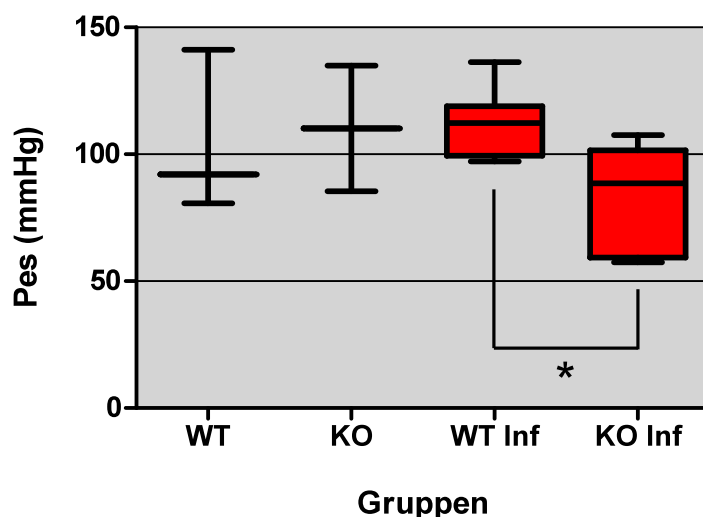


Abbildung 5.3: Darstellung des linksventrikulären endsystolischen Drucks (Pes), signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Ebenso wurde eine signifikante Reduktion des maximalen linksventrikulären Drucks bei der Gruppe STAT3 KO Inf im Vergleich zu der Gruppe WT Inf beobachtet

($95,6 \pm 8,4$ mmHg versus $118,9 \pm 3,8$ mmHg). Wie in Abbildung 5.4 erkennbar, waren auch hier die Unterschiede statistisch signifikant ($p < 0,05$).

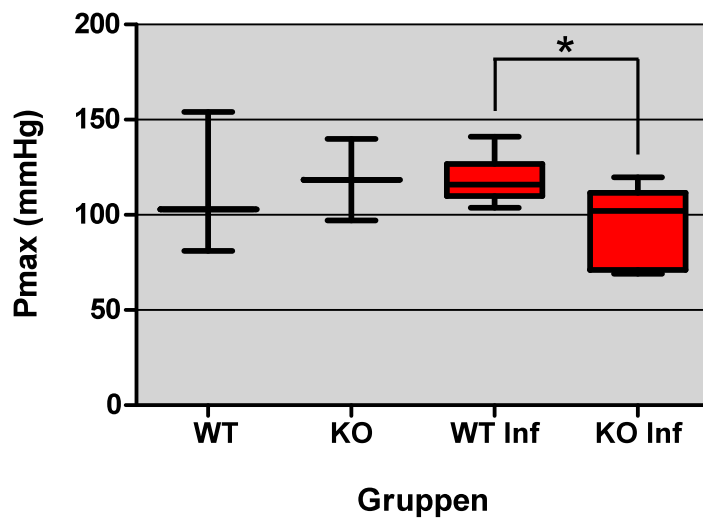


Abbildung 5.4: Darstellung des maximalen linksventrikulären Drucks (Pmax), signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Die beiden Versuchsgruppen wiesen in der maximalen Druckerhöhungsgeschwindigkeit des linken Ventrikels jedoch keine größeren Unterschiede auf (5112 ± 938 mmHg/s in der Gruppe STAT3 KO Inf versus 5888 ± 490 mmHg/s in der Gruppe WT Inf), der H-Test war dementsprechend nicht signifikant.

Das linksventrikuläre endsystolische Volumen war hingegen bei den infizierten STAT3 KO Mäusen im Vergleich zu den infizierten WT Mäusen deutlich erhöht ($41,1 \pm 3,5$ μ l versus $28,9 \pm 3,3$ μ l) und der Kruskal-Wallis-Test ergab einen Wert von $p < 0,05$ (siehe Abbildung 5.5).

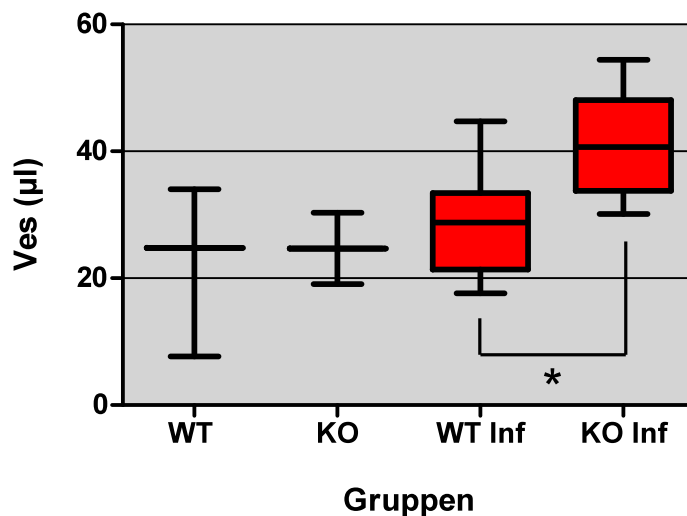


Abbildung 5.5: Darstellung des linksventrikulären endsystolischen Volumens (Ves), signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Bei dem Schlagvolumen, dem Herzminutenvolumen und der Ejektionsfraktion waren keine statistischen Unterschiede mit dem Mann-Whitney-U-Test nachweisbar, jedoch eindeutig Tendenzen erkennbar, dass die Werte der infizierten STAT3 KO Tiere im Vergleich zu denen der infizierten WT Tiere niedriger waren und somit eine schlechtere linksventrikuläre systolische Funktion bei den infizierten STAT3 KO Mäusen zu beobachten war. Das Schlagvolumen betrug im Mittelwert $30,3 \pm 1,7 \mu\text{l}$ in der Gruppe WT Inf versus $24,0 \pm 1,8 \mu\text{l}$ in der Gruppe STAT3 KO Inf, das Herzminutenvolumen $10,0 \pm 1,0 \text{ ml/min}$ (WT Inf) versus $8,1 \pm 0,9 \text{ ml/min}$ (STAT3 KO Inf) und die Ejektionsfraktion $48,1 \pm 2,8 \%$ (WT Inf) versus $42,6 \pm 2,6 \%$ (STAT3 KO Inf).

5.2.2 Parameter der diastolischen Funktion

Als Parameter der diastolischen Herzfunktion wurden der linksventrikuläre enddiastolische Druck, der minimale linksventrikuläre Druck, die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit des linken Ventrikels und das linksventrikuläre enddiastolische Volumen bestimmt.

Die infizierten WT Mäuse wiesen im Vergleich zu den infizierten STAT3 KO Mäusen keine Unterschiede im linksventrikulären enddiastolischen Druck auf ($13,4 \pm 1,2 \text{ mmHg}$ in der Gruppe WT Inf versus $12,7 \pm 1,9 \text{ mmHg}$ in der Gruppe STAT3 KO Inf), der H-Test ergab keine Signifikanzen.

Auch im minimalen linksventrikulären Druck war kein bedeutender Unterschied zwischen den infizierten WT Mäusen ($13,4 \pm 1,2$ mmHg) und den infizierten STAT3 KO Mäusen ($12,7 \pm 1,9$ mmHg) zu erkennen, der H-Test nach Kruskal und Wallis war dementsprechend nicht signifikant.

Wie in Abbildung 5.6 erkennbar, war die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit des linken Ventrikels jedoch bei den infizierten STAT3 KO Mäusen im Vergleich zu den infizierten WT Mäusen deutlich geringer (-3876 ± 422 mmHg/s versus -5324 ± 423 mmHg/s) und der Kruskal-Wallis-Test ergab einen Wert von $p < 0,05$.

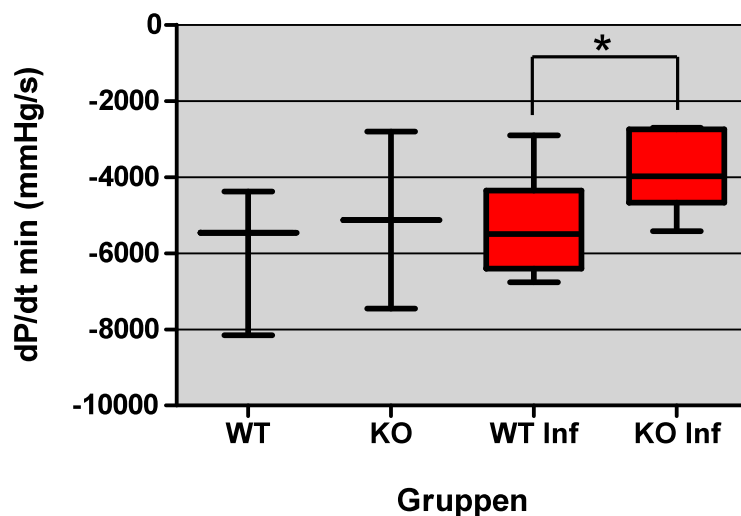


Abbildung 5.6: Darstellung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min), signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Des Weiteren wurde eine signifikante Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Volumens bei der Gruppe STAT3 KO Inf im Vergleich zu der Gruppe WT Inf beobachtet ($71,0 \pm 3,8$ μ l versus $53,5 \pm 5,5$ μ l). In Abbildung 5.7 wird deutlich, dass auch hier die Unterschiede statistisch signifikant waren ($p < 0,05$).

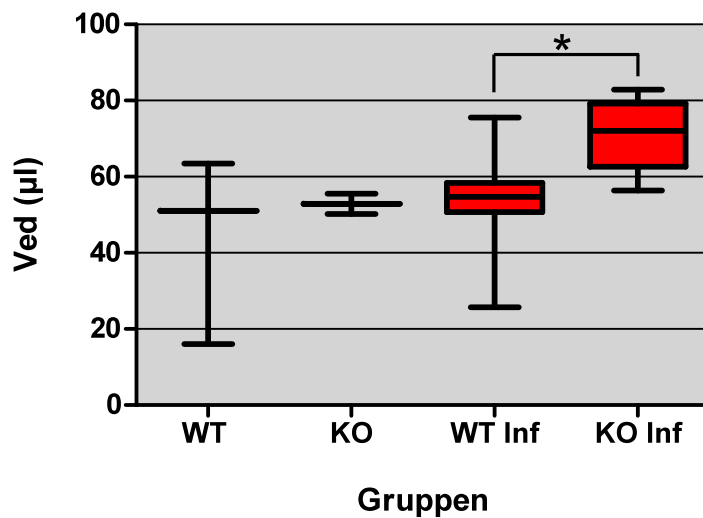


Abbildung 5.7: Darstellung des linksventrikulären enddiastolischen Volumens (Ved), signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

5.3 STAT3 Knockout

Der STAT3 *Knockout* konnte mittels PCR erfolgreich nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.8). Die STAT3-Banden sind in den WT Gruppen deutlich zu erkennen, während in den STAT3 KO Gruppen nur schwache bzw. keine Signale zu sehen sind.

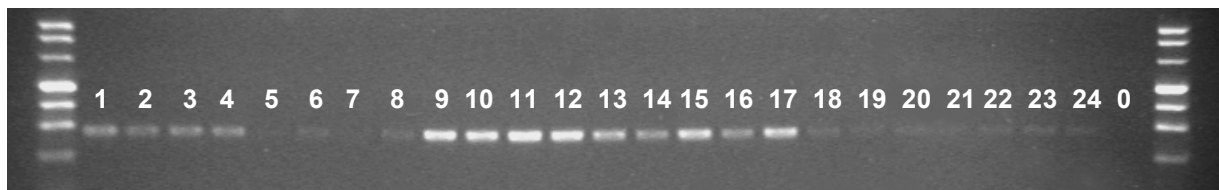


Abbildung 5.8: Darstellung der STAT3 PCR in Agarosegel. Spur 1–4: WT, 5–8: STAT3 KO, 9–17: WT Inf, 18–24: STAT3 KO Inf, 0: Negativkontrolle, rechter und linker Außenrand: kbp-Marker.

Abbildung 5.9 veranschaulicht, dass in der Gruppe WT Inf ($0,663 \pm 0,042$) gegenüber der Gruppe STAT3 KO Inf ($0,088 \pm 0,014$) eine signifikant höhere mRNA-Expression von STAT3 vorlag ($p < 0,001$). Die Unterschiede in den Gruppen WT ($0,472 \pm 0,044$) versus STAT3 KO ($0,078 \pm 0,015$) waren jedoch nur ohne Bonferroni-Korrektur signifikant ($p = 0,0286$ ohne Korrektur). Ähnlich sieht der statistische Vergleich der Gruppen WT versus WT Inf aus ($p = 0,0336$ ohne Korrektur), wobei die Tendenz der höheren STAT3 Expression in der Gruppe WT Inf gut erkennbar war. Zwischen den Gruppen STAT3 KO und STAT3 KO Inf waren keine Unterschiede zu beobachten.

Vergleicht man die Gruppen WT und WT Inf mit den Gruppen STAT3 KO und STAT3 KO Inf, so wird deutlich, dass in den STAT3 KO Tieren eine signifikant niedrigere Genexpression von STAT3 vorlag ($0,604 \pm 0,040$ vs $0,084 \pm 0,010$, $p < 0,0001$).

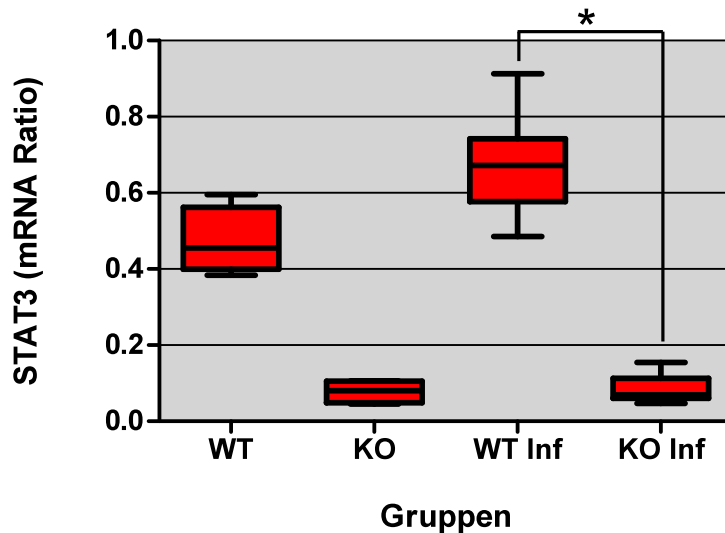


Abbildung 5.9: Darstellung der STAT3 mRNA Ratio (STAT3 / 18S rRNA), signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

5.4 Zytokine

5.4.1 Proinflammatorische Zytokine

Zur Charakterisierung der Entzündungsmediatoren in der chronischen Myokarditis wurde die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α und INF- γ untersucht. Der H-Test nach Kruskal und Wallis ergab weder für IL-1 β noch für IL-6 oder TNF- α Signifikanzen, so dass keine Einzelvergleiche durchgeführt wurden (siehe Tabelle 5.2).

Genexpression	WT	STAT3 KO	WT Inf	STAT3 KO Inf
IL-1 β	$1,57 \times 10^{-6}$ $\pm 9,75 \times 10^{-7}$	$8,50 \times 10^{-7}$ $\pm 1,66 \times 10^{-7}$	$2,03 \times 10^{-6}$ $\pm 3,85 \times 10^{-7}$	$1,17 \times 10^{-6}$ $\pm 3,09 \times 10^{-7}$
IL-6	$4,26 \times 10^{-8}$ $\pm 1,37 \times 10^{-8}$	$5,47 \times 10^{-8}$ $\pm 1,30 \times 10^{-8}$	$4,86 \times 10^{-8}$ $\pm 1,37 \times 10^{-8}$	$5,95 \times 10^{-8}$ $\pm 1,37 \times 10^{-8}$
TNF- α	$1,24 \times 10^{-6}$ $\pm 3,08 \times 10^{-7}$	$1,05 \times 10^{-6}$ $\pm 2,37 \times 10^{-7}$	$2,00 \times 10^{-6}$ $\pm 2,23 \times 10^{-7}$	$1,49 \times 10^{-6}$ $\pm 3,10 \times 10^{-7}$

Tabelle 5.2: Genexpression von IL-1 β , IL-6 und TNF- α

Im Gegensatz dazu ergab der Kruskal-Wallis-Test für IFN- γ , dass die vier Versuchsgruppen aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten stammten. Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich ein signifikanter Anstieg der IFN- γ Expression in der Gruppe WT Inf gegenüber der Gruppe WT ($3,39 \times 10^{-9} \pm 8,63 \times 10^{-10}$ vs $3,31 \times 10^{-8} \pm 7,16 \times 10^{-9}$, $p < 0,01$). Andere Einzelvergleiche ergaben keine signifikanten Unterschiede (STAT3 KO: $1,52 \times 10^{-8} \pm 8,86 \times 10^{-9}$, STAT3 KO Inf: $2,61 \times 10^{-8} \pm 9,22 \times 10^{-9}$), jedoch fiel eine hohe Streubreite der Werte in den verschiedenen Gruppen auf (siehe Abbildung 5.10).

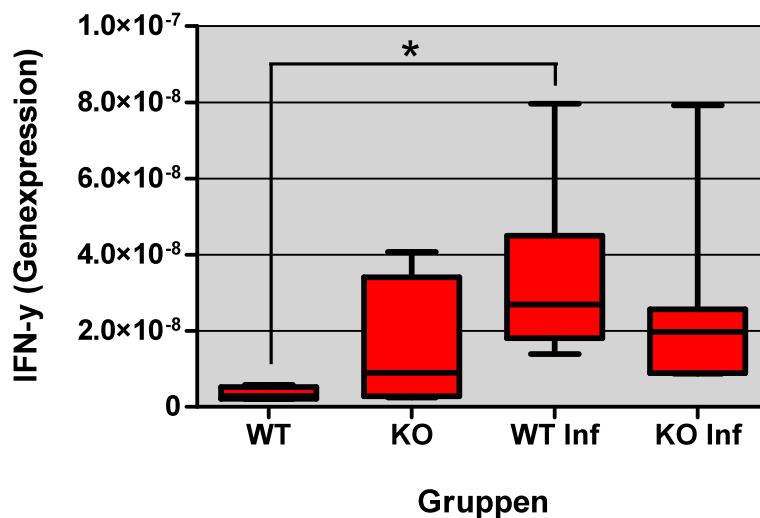


Abbildung 5.10: Darstellung der IFN- γ Genexpression, signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

5.4.2 Antiinflammatorische Zytokine

Als antiinflammatorische Zytokine wurden IL-10 und TGF- β untersucht. Weder für die mRNA-Expression von IL-10 noch von TGF- β ergab der Kruskal-Wallis-Test Signifikanzen, so dass keine Einzelvergleiche durchgeführt wurden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5.3 dargestellt.

Genexpression	WT	STAT3 KO	WT Inf	STAT3 KO Inf
IL-10	$1,02 \times 10^{-8} \pm 2,12 \times 10^{-9}$	$6,87 \times 10^{-9} \pm 2,21 \times 10^{-9}$	$1,21 \times 10^{-8} \pm 4,22 \times 10^{-9}$	$7,39 \times 10^{-9} \pm 1,49 \times 10^{-9}$
TGF- β	$5,04 \times 10^{-5} \pm 5,05 \times 10^{-6}$	$5,20 \times 10^{-5} \pm 9,47 \times 10^{-6}$	$5,92 \times 10^{-5} \pm 9,46 \times 10^{-6}$	$4,05 \times 10^{-5} \pm 3,71 \times 10^{-6}$

Tabelle 5.3: Genexpression von IL-10 und TGF- β

5.5 Zelladhäsionsmoleküle

5.5.1 ICAM

Die zytokininduzierte Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM und VCAM vermittelt die Migration von Immunzellen in das Myokard. Bei der mikroskopischen Ansicht der immunhistochemischen Färbung von ICAM waren deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen erkennbar. Die Gewebestruktur der nicht infizierten Tiere erschien intakt und homogen, während in den Schnitten der infizierten Tiere aufgelockertes Muskelgewebe mit erhöhtem Anteil an signalmarkiertem Gewebe (*Area Fraction* = prozentuale Signalfäche pro Quadratmillimeter Gewebsfläche) zu erkennen war, vor allem in der Gruppe STAT3 KO Inf. Exemplarisch werden in der Abbildung 5.11 aus jeder Versuchgruppe Bildausschnitte gezeigt.

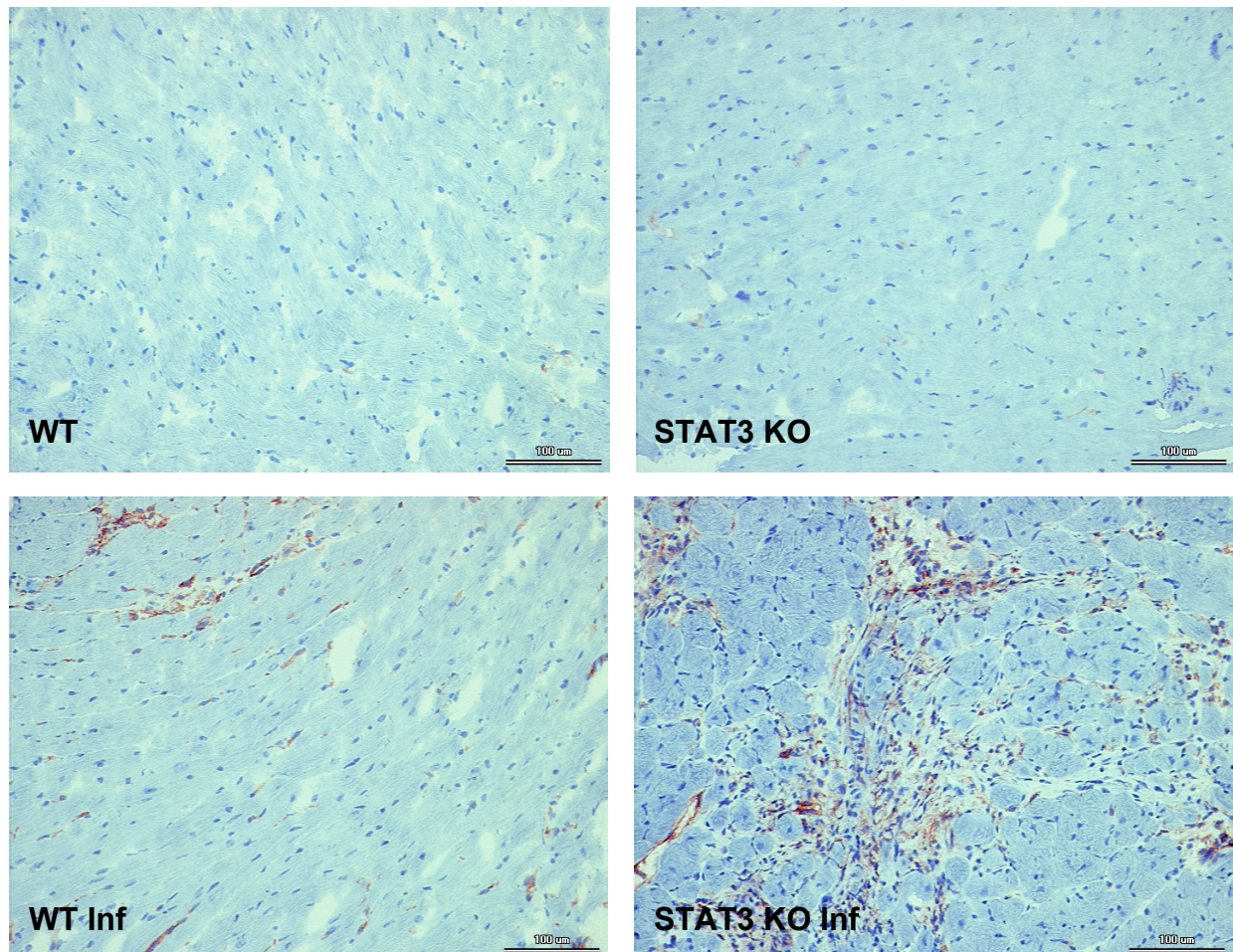


Abbildung 5.11: Immunhistochemische Färbung von ICAM. Exemplarische Bilder aus den vier verschiedenen Gruppen, Vergrößerung 200fach.

Wie in Abbildung 5.12 erkennbar, waren die Unterschiede zwischen den Gruppen STAT3 KO vs STAT3 KO Inf (*Area Fraction* $0,00058 \pm 0,00022$ vs $0,00331 \pm 0,00064$) und den Gruppen WT Inf ($0,00114 \pm 0,00029$) vs STAT3 KO Inf statistisch signifikant ($p < 0,05$; WT $0,00074 \pm 0,00024$).

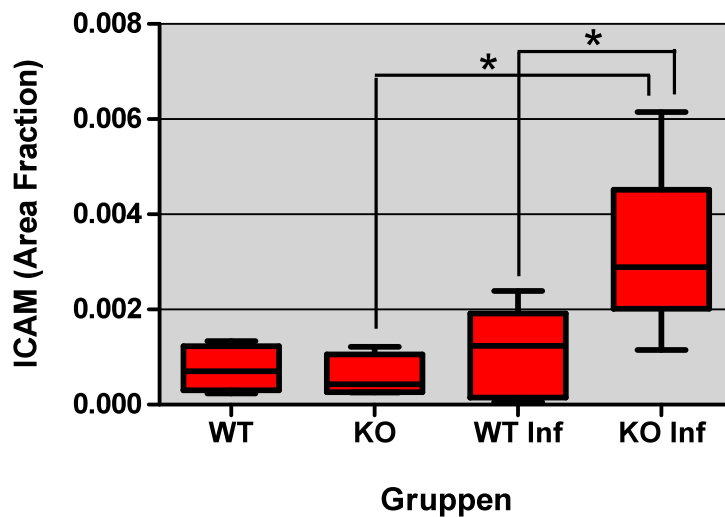


Abbildung 5.12: Darstellung der *Area Fraction* von ICAM, signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

5.5.2 VCAM

Entsprechend der immunhistochemischen Färbung von ICAM zeigte die Färbung von VCAM deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, wie in Abbildung 5.13 exemplarisch dargestellt wird. Abbildung 5.14 veranschaulicht, dass aufgrund der hohen Streubreite der Werte sich jedoch nur zwischen den Gruppen WT Inf und STAT3 KO Inf ein nach dem Mann-Whiney-U-Test statistisch signifikanter Wert von $p < 0,05$ ergab (*Area Fraction* WT $0,00056 \pm 0,00007$, STAT3 KO $0,00082 \pm 0,00036$, WT Inf $0,00077 \pm 0,00028$, STAT3 KO Inf $0,00193 \pm 0,00035$).

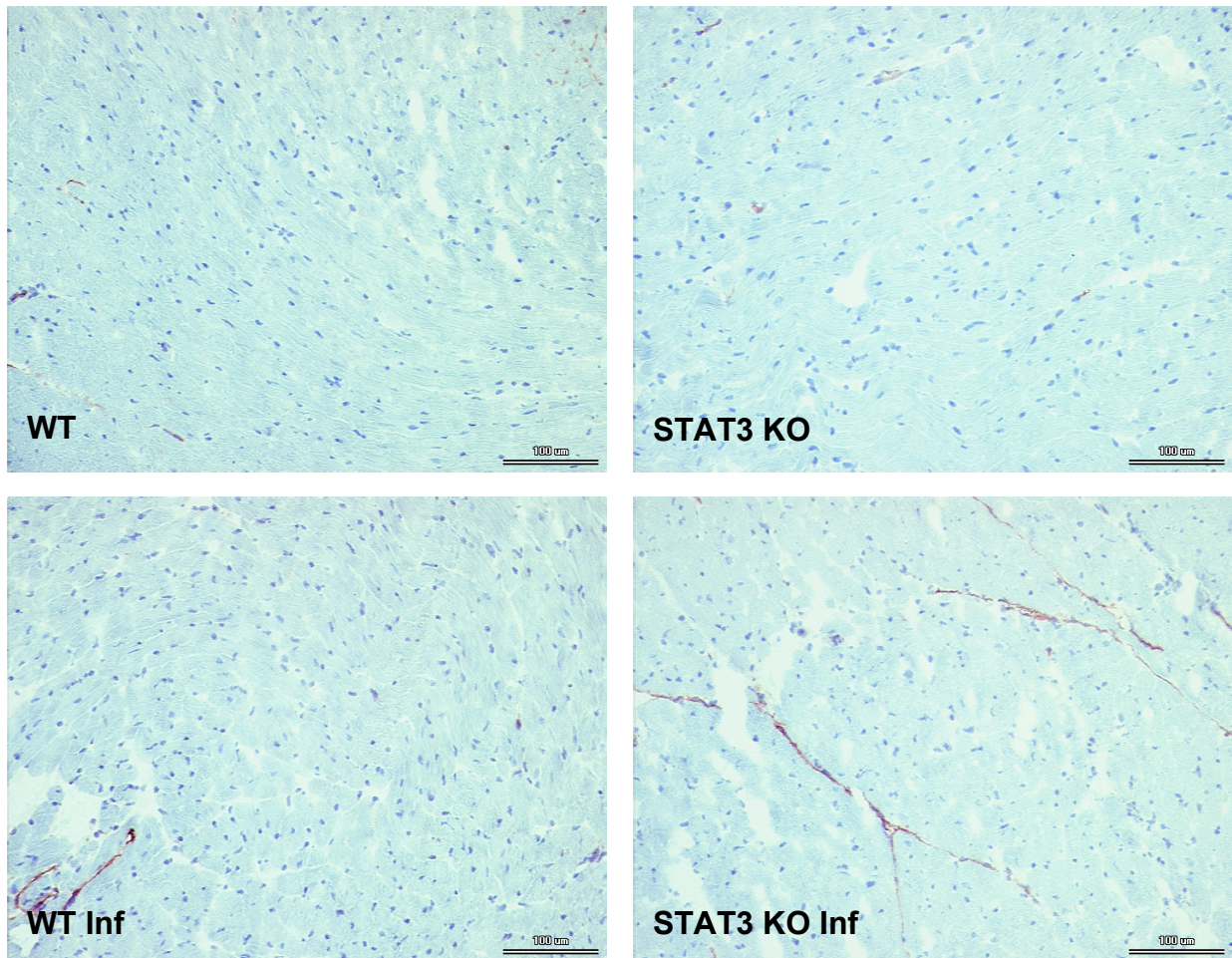


Abbildung 5.13: Immunhistochemische Färbung von VCAM. Exemplarische Bilder aus den vier verschiedenen Gruppen, Vergrößerung 200fach.

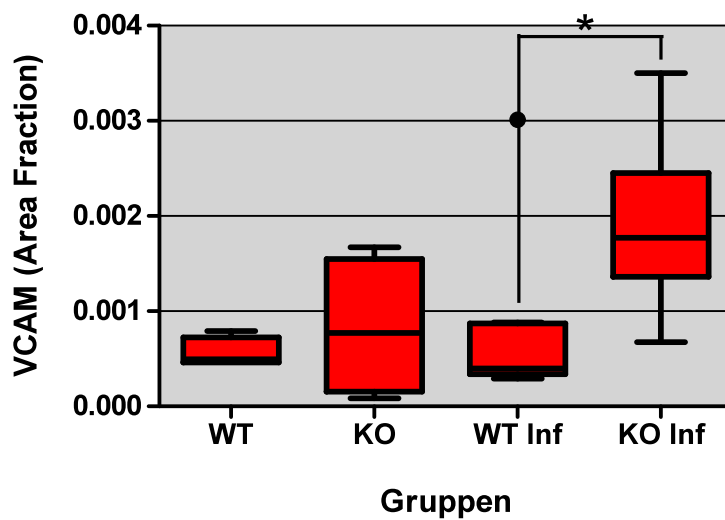


Abbildung 5.14: Darstellung der Area Fraction von VCAM, signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet, Ausreißer mit •.

5.6 Infiltration mit Entzündungszellen

5.6.1 Makrophagen

Die mikroskopische Betrachtung der immunhistochemischen Färbung von Mac3 zeigte in den infizierten Versuchsgruppen Infiltrate mit aufgelockertem, inhomogenem Myokardgewebe und Mac3 positiven Zellen. Die Struktur des Muskelgewebes der gesunden Versuchstiere hingegen war homogen und intakt, wie in Abbildung 5.15 deutlich wird.

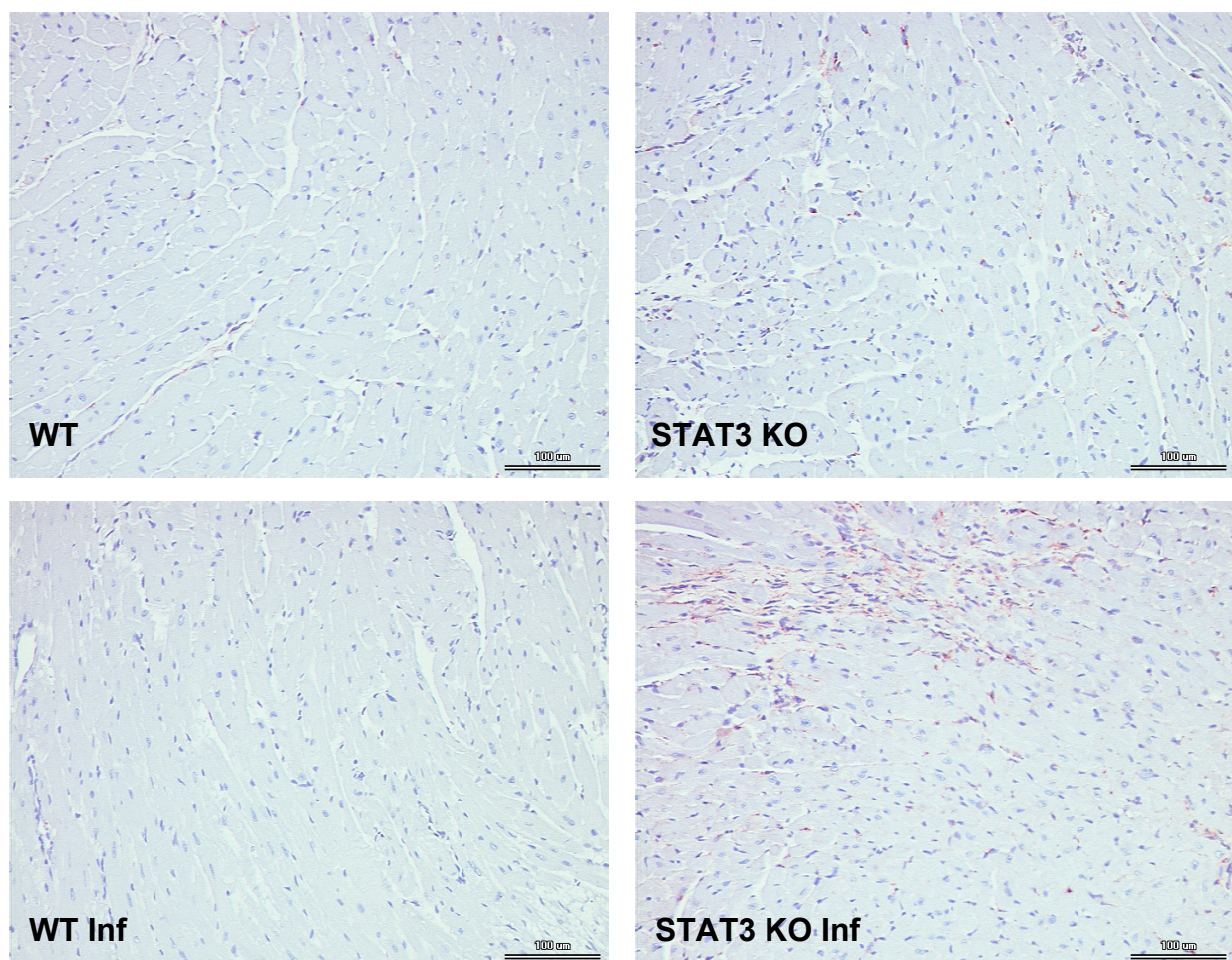


Abbildung 5.15: Immunhistochemische Färbung von Makrophagen. Exemplarische Bilder aus den vier verschiedenen Gruppen, Vergrößerung 200fach.

Während sich die Anzahl der Makrophagen pro Gewebsfläche in den Gruppen WT und STAT3 KO kaum unterschied (WT $10,9 \pm 3,8$ Zellen/mm², STAT3 KO $16,8 \pm 4,0$ Zellen/mm²), stieg die Zellzahl in den Gruppen WT Inf und STAT3 KO Inf

statistisch signifikant an (WT Inf $35,0 \pm 6,1$ Zellen/mm², STAT3 KO Inf $110,6 \pm 24,2$ Zellen/mm²; WT vs WT Inf: $p < 0,05$, STAT3 KO vs STAT3 KO Inf: $p < 0,05$). Wie in Abbildung 5.16 zu erkennen, war die Anzahl der Makrophagen in der Gruppe STAT3 KO Inf mit Abstand am höchsten und somit signifikant höher als in der Gruppe WT Inf (STAT3 KO Inf vs WT Inf: $p < 0,01$).

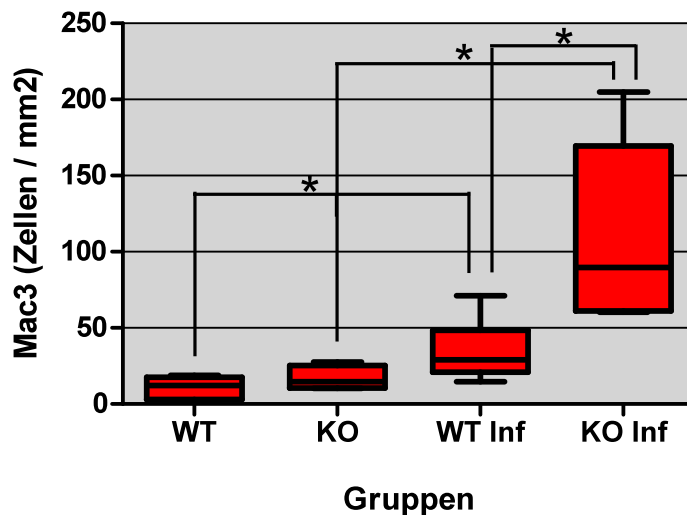


Abbildung 5.16: Darstellung der Mac3⁺ Zellen pro mm² Myokardgewebe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.6.2 CD3⁺ T-Lymphozyten

Die Infiltration des Myokards mit CD3⁺ T-Lymphozyten war in den infizierten Tiergruppen (WT Inf $6,3 \pm 1,3$ Zellen/mm², STAT3 KO Inf $11,8 \pm 1,4$ Zellen/mm²) höher als in den nicht infizierten Gruppen (WT $2,6 \pm 1,5$ Zellen/mm², STAT3 KO $2,5 \pm 0,4$ Zellen/mm²). Wie in Abbildung 5.17 exemplarisch dargestellt, zeigte sich ähnlich wie bei der Infiltration mit Makrophagen eine größere Anzahl an CD3⁺ T-Lymphozyten in der Gruppe STAT3 KO Inf im Vergleich zu der Gruppe WT Inf. Dieser Unterschied war jedoch nur ohne Bonferroni-Korrektur statistisch signifikant ($p = 0,0496$ ohne Korrektur). Abbildung 5.18 veranschaulicht, dass während die größere Zahl an CD3⁺ T-Lymphozyten in der Gruppe WT Inf im Vergleich zur Gruppe WT nur als Tendenz erkennbar war, sich in der Gruppe STAT3 KO Inf im Vergleich zur Gruppe STAT3 KO ein signifikanter Anstieg der CD3⁺ T-Lymphozyten zeigte ($p < 0,05$).

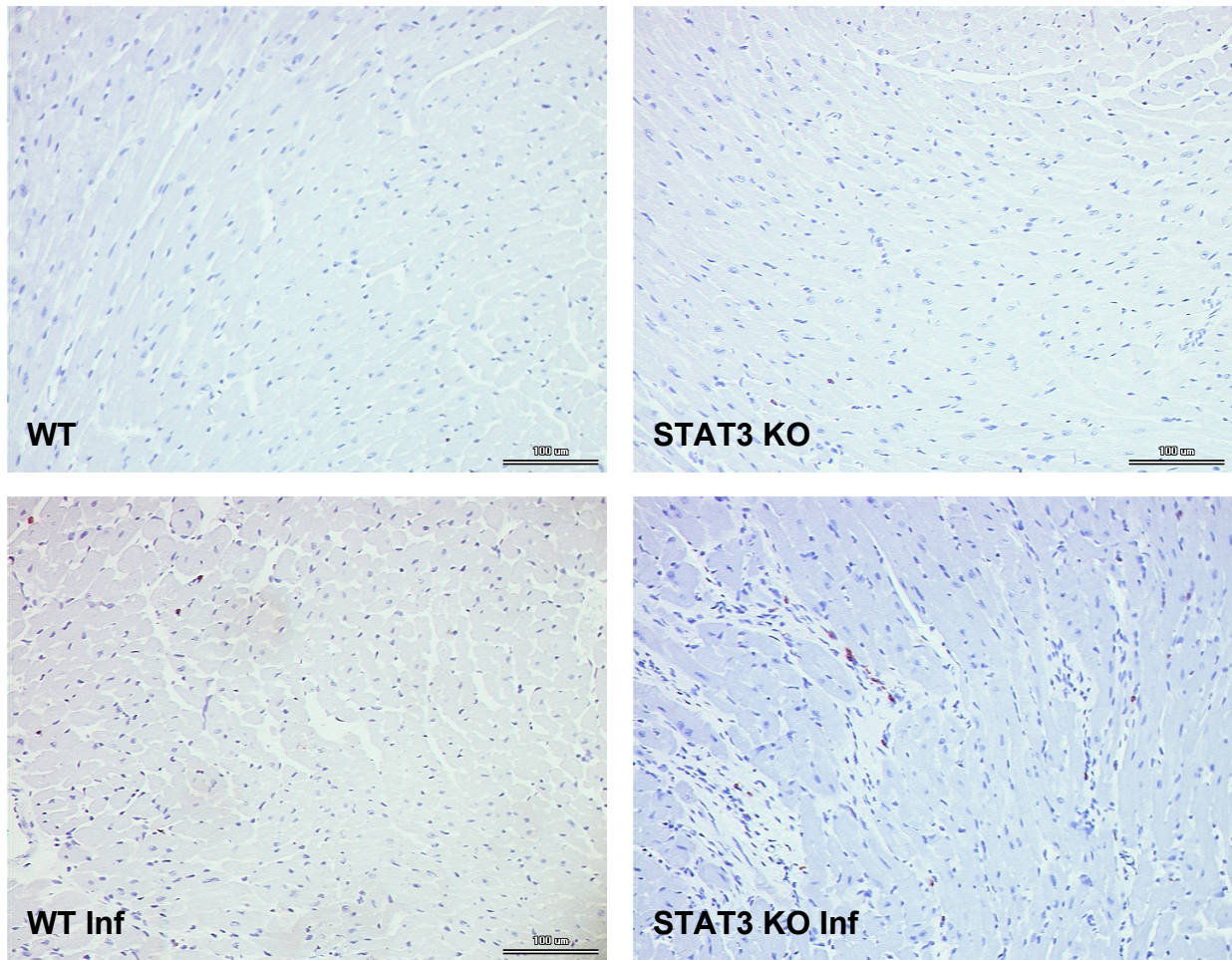


Abbildung 5.17: Immunhistochemische Färbung von CD3⁺ Lymphozyten. Exemplarische Bilder aus den vier verschiedenen Gruppen, Vergrößerung 200fach.

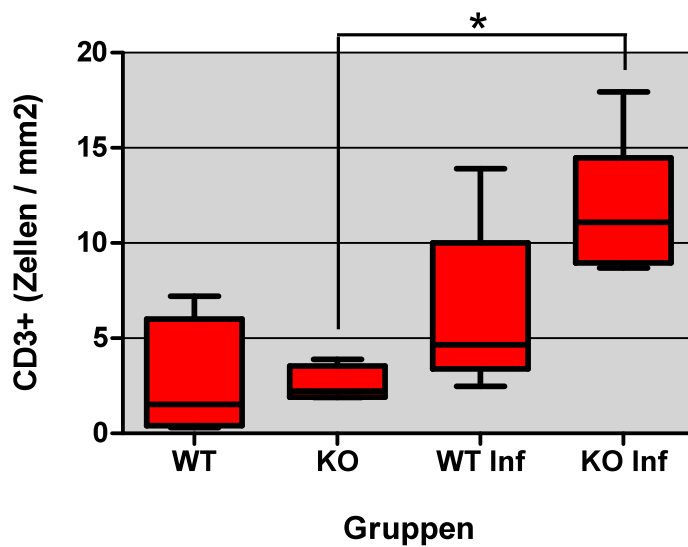


Abbildung 5.18: Darstellung der CD3⁺ Zellen pro mm² Myokardgewebe. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind mit * gekennzeichnet.

5.7 Apoptose

5.7.1 Bax und Bcl-2

Zur Charakterisierung der Apoptose wurde die mRNA-Expression von Bax und Bcl-2 untersucht. Der H-Test nach Kruskal und Wallis ergab für keinen der beiden Apoptoseparameter einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen, Tabelle 5.4 präsentiert die ermittelten Werte.

Genexpression	WT	STAT3 KO	WT Inf	STAT3 KO Inf
Bax	$2,99 \times 10^{-5}$ $\pm 1,14 \times 10^{-5}$	$2,06 \times 10^{-5}$ $\pm 3,16 \times 10^{-6}$	$2,00 \times 10^{-5}$ $\pm 9,40 \times 10^{-7}$	$1,80 \times 10^{-5}$ $\pm 1,65 \times 10^{-6}$
Bcl-2	$2,68 \times 10^{-5}$ $\pm 1,25 \times 10^{-5}$	$2,15 \times 10^{-5}$ $\pm 7,36 \times 10^{-6}$	$2,02 \times 10^{-5}$ $\pm 1,79 \times 10^{-6}$	$1,41 \times 10^{-5}$ $\pm 1,54 \times 10^{-6}$

Tabelle 5.4: Genexpression von Bax und Bcl-2

5.8 Matrixkomponenten

5.8.1 Kollagen I

Zur Charakterisierung der Fibrosierung des Myokards wurden die Matrixkomponenten Kollagen I und Kollagen III betrachtet. In der mRNA-Expression von Kollagen I unterschieden sich die Gruppen WT ($0,00409 \pm 0,00017$), STAT3 KO ($0,00409 \pm 0,00055$), WT Inf ($0,00323 \pm 0,00039$) und STAT3 KO Inf ($0,00353 \pm 0,00115$) nicht statistisch signifikant voneinander (H-Test n.s.).

Abbildung 5.19 veranschaulicht, dass andere Ergebnisse in der immunhistochemischen Färbung von Kollagen I vorlagen. Hier wurde der höhere Kollagengehalt in der Gruppe STAT3 KO Inf im Vergleich zur Gruppe WT Inf deutlich (*Area Fraction* WT Inf $0,00787 \pm 0,00192$, STAT3 KO Inf $0,02749 \pm 0,00878$), der H-Test und der Mann-Whitney-Test waren signifikant ($p < 0,01$). Während zwischen den Gruppen WT und STAT3 KO keine wesentlichen Unterschiede vorlagen (*Area Fraction* WT $0,00668 \pm 0,00150$, STAT3 KO $0,00572 \pm 0,00189$), unterschieden sich die Tiere der Gruppe STAT3 KO von denen der Gruppe STAT3 KO Inf im Kollagengehalt statistisch signifikant ($p < 0,05$, siehe Abbildung 5.20).

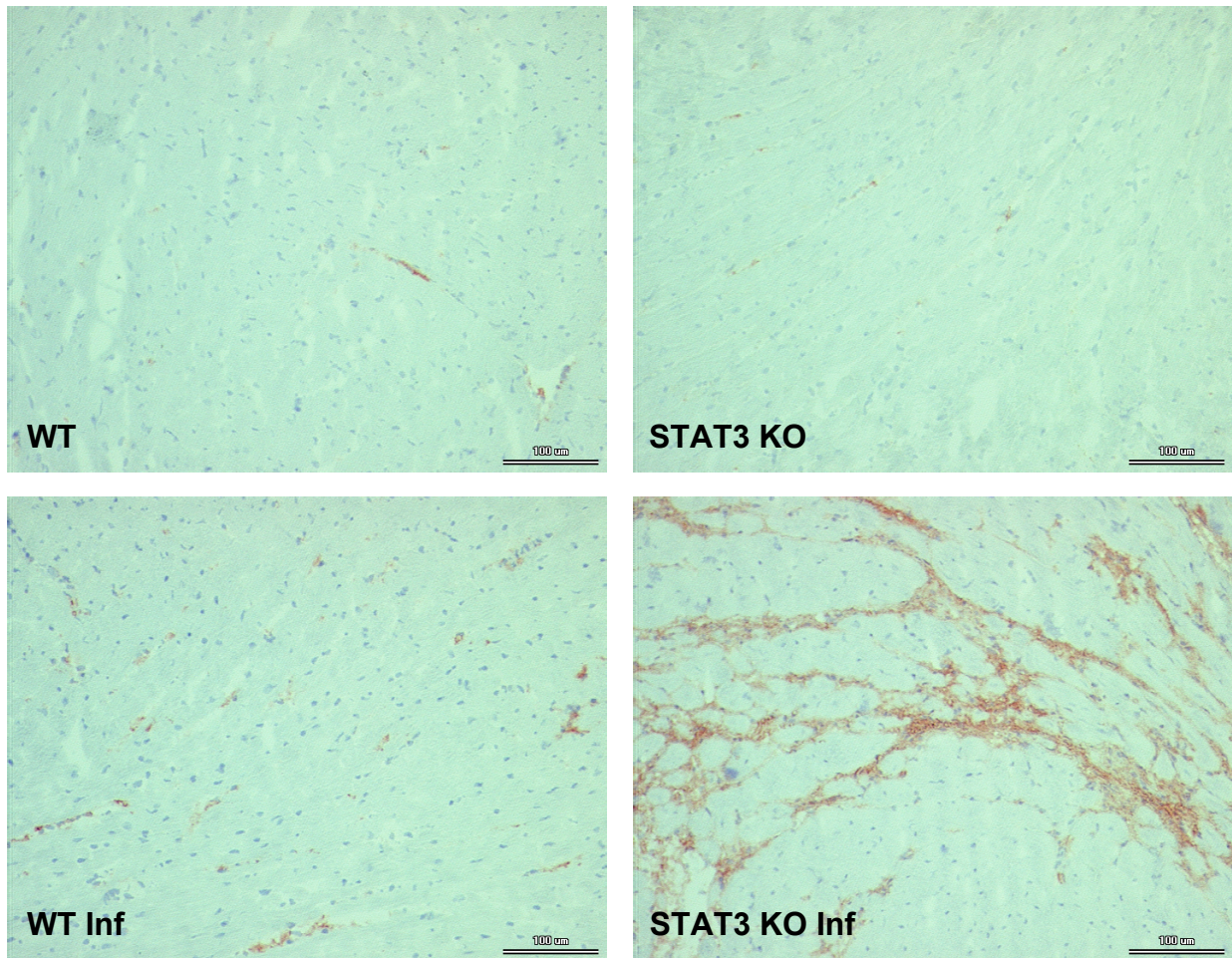


Abbildung 5.19: Immunhistochemische Färbung von Kollagen I. Exemplarische Bilder aus den vier verschiedenen Gruppen, Vergrößerung 200fach.

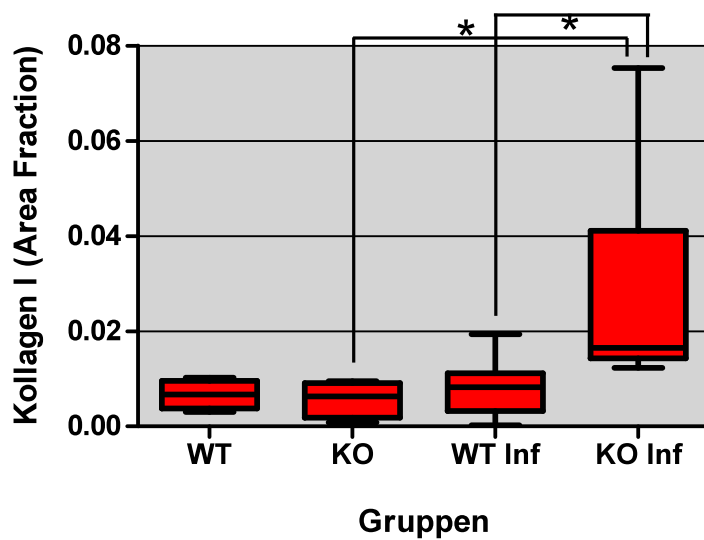


Abbildung 5.20: Darstellung der *Area Fraction* von Kollagen I, signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

5.8.2 Kollagen III

Im Gegensatz zu der immunhistochemischen Färbung von Kollagen I waren bei Kollagen III keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen erkennbar (siehe Tabelle 5.5). Der H-Test nach Kruskal und Wallis ergab keine Signifikanzen, weder für die Genexpression noch für die *Area Fraction* von Kollagen III.

	WT	STAT3 KO	WT Inf	STAT3 KO Inf
Genexpression Kollagen III	0,0044 ± 0,0003	0,0044 ± 0,0006	0,0029 ± 0,0004	0,0038 ± 0,0014
Area Fraction Kollagen III	0,0221 ± 0,0062	0,0199 ± 0,0050	0,0208 ± 0,0071	0,0353 ± 0,0110

Tabelle 5.5: Genexpression und *Area Fraction* von Kollagen III

5.8.3 Ratio Kollagen I / Kollagen III

In der Ratio Kollagen I / Kollagen III ergaben sich für die mRNA-Expression ebenfalls keine Signifikanzen nach dem H-Test. In der *Area Fraction* hingegen ist eine deutliche Tendenz für eine erhöhte *Area Fraction* in der Gruppe STAT3 KO Inf im Vergleich zu den anderen Gruppen zu beobachten, nach dem H-Test waren die Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant (siehe Tabelle 5.6).

	WT	STAT3 KO	WT Inf	STAT3 KO Inf
Genexpression Kollagen I / III	0,93 ± 0,06	0,92 ± 0,04	1,18 ± 0,13	1,08 ± 0,16
Area Fraction Kollagen I / III	0,36 ± 0,12	0,30 ± 0,10	0,83 ± 0,34	2,08 ± 1,00

Tabelle 5.6: Genexpression und *Area Fraction* der Ratio Kollagen I / Kollagen III

5.9 Matrixmetalloproteinasen (MMPs)

5.9.1 MMP-2

Das dynamische Gleichgewicht zwischen Synthese und Degradation der extrazellulären Matrix wird wesentlich durch die Matrixmetalloproteinasen und deren Gegenspieler, die *Tissue inhibitors of Metalloproteinases*, charakterisiert.

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression von MMP-2 waren keine relevanten Unterschiede in den verschiedenen Gruppen zu finden (WT $0,00154 \pm 0,00012$, STAT3 KO $0,00132 \pm 0,00012$, WT Inf $0,00162 \pm 0,00023$, STAT3 KO Inf $0,00177 \pm 0,00048$). Auch in der Aktivität von MMP-2, die zymographisch geprüft wurde, konnten keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen WT (7396 ± 2155), STAT3 KO (15929 ± 3143), WT Inf (14395 ± 3602) und STAT3 KO Inf (16648 ± 3167) festgestellt werden (siehe Abbildung 5.21). Zwar waren Tendenzen zu einer höheren Expression und Aktivität in der Gruppe STAT3 KO Inf zu erkennen, der H-Test nach Kruskal und Wallis ergab jedoch keine Signifikanzen.

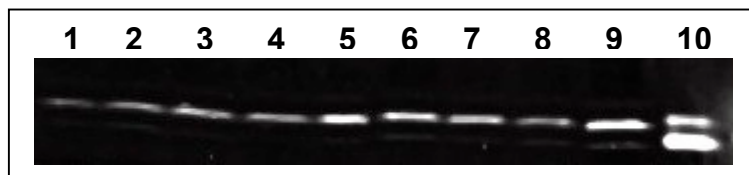


Abbildung 5.21: Exemplarische Darstellung der Zymographie von MMP-2; Spur 1: WT, Spur 2: STAT3 KO, Spur 3-5: WT Inf, Spur 6-8: STAT3 KO Inf, Spur 9: Kontrollprobe, Spur 10: Positivkontrolle.

Der höhere MMP-2-Anteil in der Gruppe STAT3 KO Inf wurde jedoch in der immunhistochemischen Darstellung deutlich. Während sich die Wertegruppen WT ($1,80 \times 10^{-5} \pm 7,16 \times 10^{-6}$), STAT3 KO ($1,83 \times 10^{-5} \pm 7,98 \times 10^{-6}$) und WT Inf ($2,70 \times 10^{-5} \pm 4,80 \times 10^{-6}$) in der *Area Fraction* von MMP-2 kaum unterschieden, war diese in der Gruppe STAT3 KO Inf ($1,89 \times 10^{-4} \pm 6,54 \times 10^{-5}$) entscheidend erhöht: Im Vergleich der Gruppe STAT3 KO Inf mit der Gruppe WT Inf und der Gruppe STAT3 KO lagen in beiden Fällen statistische Signifikanzen nach dem Mann-Whitney-U-Test vor ($p < 0,05$, siehe Abbildung 5.22).

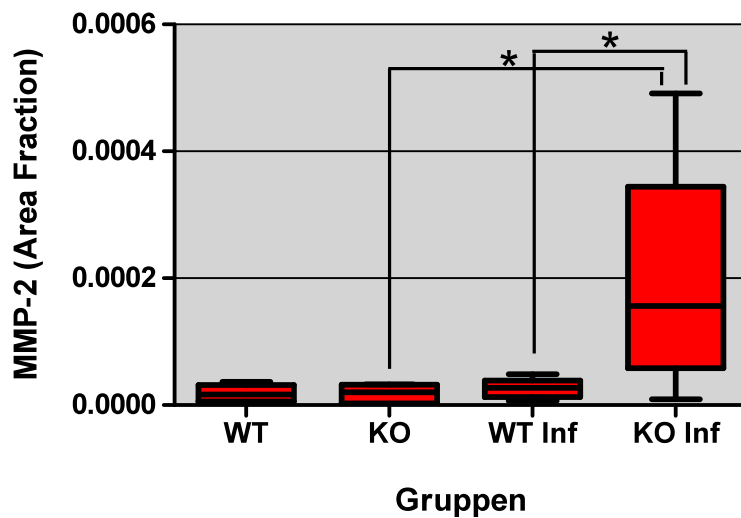


Abbildung 5.22: Darstellung der *Area Fraction* von MMP-2, signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

5.9.2 MMP-3, MMP-8, MMP-9 und MMP-12 (MT1-MMP)

In der mRNA-Expression von MMP-3, MMP-8, MMP-9 und MMP-12 (MT1-MMP) zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Tabelle 5.7 präsentiert die Ergebnisse für die Genexpression.

Genexpression	WT	STAT3 KO	WT Inf	STAT3 KO Inf
MMP-3	$9,32 \times 10^{-5}$ $\pm 1,92 \times 10^{-5}$	$7,12 \times 10^{-5}$ $\pm 1,40 \times 10^{-5}$	$1,07 \times 10^{-4}$ $\pm 2,42 \times 10^{-5}$	$1,097 \times 10^{-4}$ $\pm 3,06 \times 10^{-5}$
MMP-8	$2,56 \times 10^{-8}$ $\pm 8,59 \times 10^{-9}$	$2,85 \times 10^{-8}$ $\pm 2,95 \times 10^{-9}$	$2,44 \times 10^{-8}$ $\pm 4,45 \times 10^{-9}$	$2,72 \times 10^{-8}$ $\pm 3,92 \times 10^{-9}$
MMP-9	$1,86 \times 10^{-7}$ $\pm 4,28 \times 10^{-8}$	$1,79 \times 10^{-7}$ $\pm 1,69 \times 10^{-8}$	$2,92 \times 10^{-7}$ $\pm 2,24 \times 10^{-8}$	$2,30 \times 10^{-7}$ $\pm 2,43 \times 10^{-8}$
MMP-12	$1,28 \times 10^{-5}$ $\pm 4,09 \times 10^{-6}$	$2,43 \times 10^{-5}$ $\pm 1,05 \times 10^{-5}$	$1,57 \times 10^{-5}$ $\pm 4,60 \times 10^{-6}$	$4,09 \times 10^{-5}$ $\pm 7,52 \times 10^{-6}$

Tabelle 5.7: Genexpression von MMP-3, MMP-8, MMP-9 und MMP-12

Vergleichbare Ergebnisse lieferte die immunhistochemische Färbung von MMP-9, in der sich die vier Wertegruppen nur geringfügig unterschieden: *Area Fraction* WT $0,12 \pm 0,05$, STAT3 KO $0,14 \pm 0,05$, WT Inf $0,11 \pm 0,01$, STAT3 KO Inf $0,13 \pm 0,01$.

5.9.3 MMP-13

Deutliche Unterschiede waren hingegen in der Genexpression von MMP-13 zu erkennen (siehe Abbildung 5.23). Während die Versuchsgruppen WT ($4,95 \times 10^{-7} \pm 7,01 \times 10^{-8}$), STAT3 KO ($6,59 \times 10^{-7} \pm 1,19 \times 10^{-7}$) und WT Inf ($5,41 \times 10^{-7} \pm 1,13 \times 10^{-7}$) sich nur wenig unterschieden, war die Genexpression in der Gruppe STAT3 KO Inf ($2,50 \times 10^{-7} \pm 4,75 \times 10^{-8}$) im Vergleich zur Gruppe STAT3 KO statistisch signifikant geringer (STAT3 KO Inf vs STAT3 KO: $p < 0,05$).

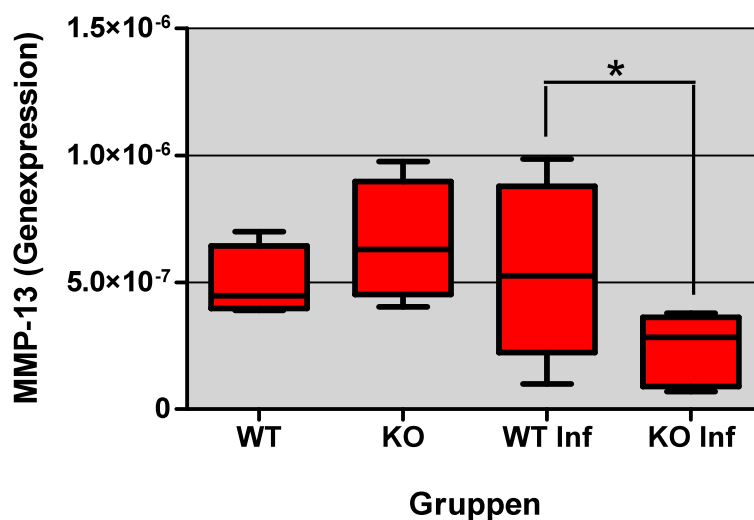


Abbildung 5.23: Darstellung der Genexpression von MMP-13, signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

5.10 Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)

5.10.1 TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4

Zur Charakterisierung der *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* als Antagonisten der Matrixmetalloproteinasen wurden TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 genauer untersucht. Die mRNA-Expression von TIMP-1 war in der Gruppe STAT3 KO Inf höher als in den anderen Versuchsgruppen (siehe Tabelle 5.8). Dieser Unterschied war jedoch nur als Tendenz erkennbar und erreichte nicht die Kriterien der statistischen Signifikanz (WT Inf

vs STAT3 KO Inf $p = 0,0549$ ohne Bonferroni-Korrektur). Wie der Tabelle 5.8 zu entnehmen ist, waren in der mRNA-Expression von TIMP-2 und TIMP-4 im Gegensatz zu TIMP-1 keine Unterschiede in den unterschiedlichen Versuchsgruppen erkennbar, der H-Test nach Kruskal und Wallis ergab keine Signifikanzen.

Genexpression	WT	STAT3 KO	WT Inf	STAT3 KO Inf
TIMP-1	0,00005 ± 0,00001	0,00011 ± 0,00003	0,00013 ± 0,00004	0,00024 ± 0,00005
TIMP-2	0,00192 ± 0,00007	0,00194 ± 0,00010	0,00181 ± 0,00014	0,00228 ± 0,000203
TIMP-4	0,00146 ± 0,00021	0,00136 ± 0,00036	0,00150 ± 0,0003	0,00139 ± 0,00032

Tabelle 5.8: Genexpression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4

6 Diskussion

Trotz zahlreicher Studien lässt sich die genaue Pathogenese der Myokarditis nur unzureichend erklären. Eine kausale Therapie der Virusmyokarditis konnte bislang nicht etabliert werden, da nicht hinreichend geklärt ist, welche Faktoren die chronische Inflammationsreaktion im Myokard und die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie beeinflussen. Hier ist eine genetische Komponente naheliegend. Die kardioprotektive Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT3 konnte in unterschiedlichen experimentellen Studien nachgewiesen werden. Untersuchungen zu der Bedeutung von STAT3 in der chronischen Myokarditis liegen jedoch bislang nicht vor. Es ist nicht bekannt, inwieweit die Beeinflussung des JAK/STAT Signalwegs einen kardioprotektiven Effekt in der chronischen Myokarditis ausübt. Aus diesem Grund wurden in unserer Studie Mäuse mit einem kardiomyozytenspezifischen *Knockout* generiert und mit Coxsackievirus B3 infiziert. Besondere Aufmerksamkeit galt der Inflammation, der Apoptose, dem Remodeling und der Hämodynamik im Rahmen der chronischen Myokarditis. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext des aktuellen Wissensstands betrachtet und diskutiert.

6.1 Krankheitsverlauf und Viruslast

Der Krankheitsverlauf der viralen Myokarditis ist von verschiedenen Parametern abhängig. Während die Virusinfektion bei einigen Mausstämmen innerhalb der ersten vier Tage zu einer fulminanten Myokarditis mit Todesfolge führt,⁵³ verläuft bei anderen Stämmen die akute Myokarditis milder und resultiert in einer subakuten Phase mit einer starken Inflammationsreaktion vor allem zwischen dem vierten und 14. Tag.⁶³ Außerdem beeinflussen das Alter¹⁵⁹ und Geschlecht⁵⁵ der Tiere sowie die Menge und der Stamm des verwendeten Coxsackievirus¹⁶⁰ entscheidend die Symptome und Folgen der Infektion, so dass absolute Vergleiche von Krankheitsverläufen und Mortalitätsraten nicht sinnvoll erscheinen und von vielen Autoren nicht angegeben werden.

STAT3 hat einen bedeutenden Einfluss auf die Mortalität von Versuchstieren. Während ein universeller *Knockout* zum intrauterinen Versterben führt,¹³¹ verursacht der kardiomyozytenspezifische *Knockout* erste spontane Symptome der Herzinsuffizienz im Alter von sechs Monaten.¹⁴³ Hilfiker et al. konnten zeigen, dass die Sterberate von

STAT3 KO Tieren nach einem experimentellen Myokardinfarkt höher war als in der Kontrollgruppe, ohne Belastung jedoch erst ab dem Alter von neun Monaten eine höhere Mortalität bei STAT3 KO Tieren auftrat.¹³⁶

In unserer Studie überlebten alle Tiere, sowohl der infizierten Gruppen als auch der Kontrollgruppen, so dass die Mortalität 0 % betrug und kein Unterschied zwischen der Gruppe WT Inf und der Gruppe STAT3 KO Inf zu beobachten war. Die Mäuse der infizierten Gruppen waren bei der Infektion 42–49 Tage alt. Die Tiere aller Gruppen wurden anschließend 28 Tage lang, entsprechend bis zu einem Alter von 70–79 Tagen, beobachtet. Dass zu diesem Zeitpunkt noch kein Unterschied in der Mortalität der STAT3 KO Tiere im Vergleich zu den WT Tieren vorlag, stimmt mit den Ergebnissen von Hilfiker et al. überein, die eine erhöhte Mortalität erst Monate nach einem experimentellen Myokardinfarkt beobachteten.¹³⁶ Nach der CVB3-Infektion konnten bei den Mäusen jedoch deutliche Veränderungen in Verhalten und Aussehen beobachtet werden, wohingegen die WT und STAT3 KO Kontrolltiere keinerlei Auffälligkeiten zeigten. Der Krankheitsverlauf erreichte in der subakuten Phase der Myokarditis seinen Höhepunkt, in der chronischen Phase ab dem 15. Tag p.i. kam es zu einer spontanen Besserung. Zwischen den STAT3 KO und den WT Mäusen konnten keine Unterschiede beobachtet werden, so dass in diesem Alter bei den STAT3 KO Tieren nicht von einer Verschlechterung des Gesundheitszustands ohne Belastung auszugehen ist. Ob es jedoch zu einer klinisch größeren Beeinträchtigung der infizierten STAT3 KO Tiere im Vergleich zu den infizierten WT Tieren kam, ist durch Beobachtung von Verhalten und Aussehen und Bestimmung der Mortalität nicht genau festzustellen.

Das Körpergewicht stellt einen weiteren Parameter zur Beurteilung des Gesundheitszustands der Tiere dar. In der viralen Myokarditis kommt es zu einem verminderten Fress- und Bewegungsdrang der Mäuse, so dass eine Gewichtsabnahme als Ausdruck der Infektion zu beobachten ist, was in zahlreichen Studien beschrieben wird.^{161, 162, 163} In unserer Studie zeigten die infizierten WT Mäuse ein signifikant niedrigeres Körpergewicht im Vergleich zu den nicht infizierten WT Mäusen, eine Gewichtsabnahme trat ebenfalls bei den infizierten STAT3 KO Mäusen im Vergleich zu den nicht infizierten STAT3 KO Mäusen auf, so dass unsere Ergebnisse mit der aktuellen Studienlage übereinstimmen. Interessanterweise besteht ein größerer Unterschied zwischen den infizierten STAT3 KO Mäusen und den gesunden STAT3 KO Mäusen als zwischen den infizierten WT Mäusen und den gesunden WT Mäusen.

Demnach ist davon auszugehen, dass in der viralen Myokarditis die infizierten STAT3 KO Tiere einen schwereren Krankheitsverlauf als die infizierten WT Tiere hatten. Auch beim Menschen wird neben einer Gewichtserhöhung durch Ödeme in der chronischen Herzinsuffizienz eine kardiale Kachexie beschrieben.¹⁶⁴

Im Gegensatz zum Körpergewicht liegen zur Veränderung des Herzgewichts in der viralen Myokarditis uneinheitliche Daten vor. Während die meisten Autoren einen Anstieg des Herzgewichts beschreiben,^{161, 165} gibt es auch Mausmodelle der viralen Myokarditis, in denen eine Gewichtsabnahme des Herzens beobachtet wird.¹⁶⁶ Der STAT3 *Knockout* führt im Myokard zu einer vermehrten Fibrosierung und konsekutiven Dilatation der Ventrikel.¹³⁶ In unserer Studie unterschieden sich die vier verschiedenen Gruppen in der chronischen Myokarditis jedoch weder bezüglich des Herzgewichts noch des Herzquotienten signifikant. Somit scheint der STAT3 *Knockout* in diesem Lebensalter noch keinen Einfluss auf das Herzgewicht zu haben. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Hilfiker et al. überein, die Veränderungen der extrazellulären Matrix erst ab dem Alter von drei bis vier Monaten feststellen.¹³⁶ Auch die CVB3-Infektion scheint sich zu diesem Zeitpunkt der chronischen Myokarditis (28 Tage p.i.) nicht mehr bzw. noch nicht im Herzgewicht widerzuspiegeln. Es wäre interessant, zu einem späteren Zeitpunkt der chronischen Myokarditis die Auswirkungen von STAT3 auf das Herzgewicht zu betrachten.

Die Persistenz des viralen Genoms spielt in der chronischen Phase der Myokarditis eine entscheidende Rolle für die Progression der Herzinsuffizienz.¹⁶⁷ Kühl et al. zeigten, dass nach Elimination des Entero- oder Adenovirus unter Interferon-Therapie eine Verbesserung der kardialen Funktion bei Patienten mit inflammatorischer Kardiomyopathie eintrat.¹⁶⁸ In unserer Studie konnte bei keinem der Kontrolltiere (WT und STAT3 KO) das CVB3-Genom nachgewiesen werden, während in den infizierten Gruppen (WT Inf und STAT3 KO Inf) bei den meisten Mäusen eine Viruslast ermittelt wurde. Die Viruslast ist allerdings in beiden Gruppen sehr niedrig (16,9 CVB3-Kopien in der Gruppe WT Inf und 14,0 CVB3-Kopien in der Gruppe STAT3 KO Inf). Die fast vollständig erfolgte Viruselimination 28 Tage p.i. stimmt mit den Ergebnissen von Leipner et al. überein, die in CVB3-infizierten Balb/c und C57BL/6 Mäusen ab dem 21. Tag p.i. keine Viruslast mehr bestimmen konnten.¹⁶⁹ Eine niedrige bis nicht nachweisbare Viruslast charakterisiert auch die chronische Phase der humanen Virusmyokarditis.¹⁷⁰ In unserer Studie ist es jedoch bemerkenswert, dass in der Gruppe

WT Inf insgesamt vier von neun Mäusen (entspricht 44 %) und in der Gruppe STAT3 KO Inf nur eine von sieben Mäusen (entspricht 14 %) das CVB3-Genom unter die Nachweisgrenze senken konnten. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Studie von Yajima et al. überein, in der nachgewiesen werden konnte, dass STAT3 in der angeborenen Immunantwort unabhängig von Interferon eine große Rolle zur Bekämpfung der Coxsackievirusinfektion im Herzen spielt.¹⁵⁶ Hier wird die entscheidende Bedeutung von STAT3 in der frühen Phase der Viruselimination deutlich. Jedoch spielen auch andere STAT Proteine wie STAT1 und STAT2 eine bedeutende Rolle in der Immunreaktion auf virale Agenzien.^{142, 171} In der chronischen Myokarditis sind Viruspersistenz und Autoimmunreaktion ausschlaggebend für die fortbestehende Inflammation des Myokards.

6.2 Chronische Inflammationsreaktion und Apoptose

Die inflammatorische Kardiomyopathie ist definiert durch den molekularbiologischen Nachweis einer Virusinfektion des Myokards und/oder durch den histologischen bzw. immunhistologischen Nachweis einer Entzündungsreaktion.¹⁸ Die Inflammationsreaktion geht mit erhöhten Plasmaspiegeln und einer erhöhten myokardialen Expression von Zytokinen einher.^{172, 173} Im Tiermodell kommt es in der subakuten Phase der Myokarditis zu einer Infiltration des Herzmuskels mit Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten sowie zu deren Ausschüttung von immunmodulierenden Zytokinen. Die chronische Phase der murinen Virusmyokarditis ist durch eine deutlich geringere Entzündungsreaktion als die akute und subakute Phase charakterisiert.^{63, 169} Shioi et al. konnten jedoch eine persistierende Expression von IFN- γ , IL-1 β , IL-2 und TNF- α bis zu 80 Tage nach der Infektion mit Enzephalomyokarditis-Viren nachweisen.⁴¹ Auch in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Rutschow et al. zeigte sich eine fortbestehende Inflammationsreaktion mit einer erhöhten Expression von IFN- γ , IL-1 β , IL-6 und IL-10 auch 28 Tage nach der Infektion mit CVB3. Im Vergleich zu den Tagen vier und sieben p.i. war die Entzündungsreaktion jedoch um einiges geringer.¹⁷⁴ Ebenfalls liegt eine Änderung im Zytokinprofil im Vergleich zur akuten Myokarditis vor. Glück et al. konnten in einem Modell der chronischen Myokarditis mit NMRI Mäusen keine Expression von IL-6, jedoch eine persistierende Expression von TGF- β , IL-1 β , IL-10 und TNF- α in niedriger Konzentration nachweisen.¹⁷⁵ Leipner et al. hingegen beobachteten bei

immunkompetenten Balb/c und C57BL/6 Mäusen ein Ausheilen der Myokarditis ohne Nachweis einer chronischen Inflammationsreaktion.¹⁶⁹

In unserer Studie wurden zur Charakterisierung der Entzündungsmediatoren die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α und INF- γ sowie die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β untersucht. Entsprechend der Studie von Leipner et al. waren keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen den infizierten und nicht infizierten Tieren in der chronischen Phase der Myokarditis (28 Tage p.i.) nachweisbar.¹⁶⁹ Auch STAT3 hatte keinen großen Einfluss auf die Zytokinexpression, die Gruppen WT Inf und STAT3 KO Inf unterschieden sich darin nur geringfügig. In anderen Studien hingegen ging das Fehlen von STAT3 mit einer erhöhten myokardialen Zytokinexpression einher. Das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) führte in Kardiomyozyten zu einer Aktivierung von STAT3 und einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF- α .¹⁷⁶ Jacoby et al. konnten zeigen, dass in STAT3 KO Tieren nach Gabe von LPS eine Hochregulation von TNF- α , eine erhöhte Infiltration mit Inflammationszellen und eine erhöhte Apoptose vorlagen.¹⁴³ Interessanterweise konnten Wang et al. nach einem STAT3 *Knockout* in Endothelzellen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede mehr in myokardialer Inflammation nach Ischämie/Reperfusion nachweisen.¹⁷⁷ In unserer Studie war jedoch nur in der Genexpression von INF- γ ein signifikanter Anstieg in den infizierten WT Mäusen im Vergleich zu den nicht infizierten WT Mäusen erkennbar. Diese Hochregulation von INF- γ in der chronischen Myokarditis war in den infizierten STAT3 KO Tieren nicht zu beobachten. Da INF- γ von entscheidender Bedeutung für die Viruselimination und somit für die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie ist,^{168, 178} könnte dies in Zusammenhang mit einer effektiveren Viruselimination bei den infizierten WT Mäusen stehen. Dieser Effekt konnte zum Teil in unserer Studie nachvollzogen werden (44 % Viruselimination in der Gruppe WT Inf versus 14 % in der Gruppe STAT3 KO Inf).

Des Weiteren haben wir die Zelladhäsionsmoleküle ICAM und VCAM genauer betrachtet. Die Expression wird durch Zytokine induziert und ermöglicht verschiedenen Inflammationszellen, durch das Gefäßendothel ins Myokard zu wandern. Zudem wird den Zelladhäsionsmolekülen eine Rolle bei der Signaltransduktion im Rahmen von proinflammatorischen Signalkaskaden und beim Recruitment von Inflammationszellen zugeschrieben.⁵⁹ Wir konnten einen signifikant erhöhten Gehalt von ICAM und VCAM

im Myokard der infizierten STAT3 KO Mäusen nachweisen. Unterschiedliche Studien zeigen, dass Patienten sowohl in der akuten Myokarditis als auch in der inflammatorischen Kardiomyopathie eine erhöhte Expression von ICAM und VCAM aufweisen.^{60, 179} In verschiedenen Tiermodellen war die Expression von ICAM und VCAM in der akuten Myokarditis erhöht nachweisbar.^{180, 181} In unserem Tiermodell der chronischen Myokarditis hingegen waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen WT, STAT3 KO und WT Inf erkennbar. Daten über einen Zusammenhang von STAT3 und der Expression von Zelladhäsionsmolekülen liegen uns bislang nicht vor. Die erhöhte Expression von ICAM und VCAM im Myokard der infizierten STAT3 KO Mäuse, die in unserer Studie beobachtet wurde, lässt jedoch auf einen Einfluss von STAT3 auf die Zelladhäsionsmoleküle schließen. Somit scheint das Fehlen von STAT3 das Fortbestehen der Inflammationsreaktion und die Einwanderung von Immunzellen in der chronischen Myokarditis zu begünstigen. Die Serumspiegel von ICAM und VCAM sind bei arteriosklerotischen Erkrankungen ein prognostischer Marker.¹⁸² Da eine hohe Korrelation zwischen der ICAM-Expression im Myokard und dem löslichen ICAM-Rezeptor im Serum besteht, könnte durch eine einfache Blutentnahme die Diagnose eines inflammatorischen Prozesses im Herzmuskel gestellt werden.¹⁸³ Ein therapeutischer Ansatz mit Antagonisten gegen VCAM und ICAM zur Minderung der Inflammationsreaktion und Autoimmunität wäre denkbar.¹⁸⁴ Dafür sind weitere Studien zum genauen Funktionsmechanismus der Adhäsionsmoleküle sowie zu den Auswirkungen ihrer Inhibition auf den gesamten Organismus unverzichtbar.

Zur Charakterisierung der Infiltration mit Entzündungszellen wurden CD3⁺ T-Lymphozyten und Makrophagen genauer betrachtet. Hier zeigte sich eine signifikant erhöhte zelluläre Infiltration im Myokard der infizierten Mäuse. Die Anzahl der Immunzellen war jedoch im Vergleich zu der Infiltration im akuten Stadium⁵⁶ als gering einzustufen. Das entspricht den Ergebnissen verschiedener Tierstudien, die in der chronischen Myokarditis deutlich weniger Immunzellen als in der akuten bzw. subakuten Phase nachweisen konnten.^{30, 49} Ähnliche Entzündungsverläufe liegen beim Menschen vor und spiegeln sich in den Diagnostikkriterien der inflammatorischen Kardiomyopathie wider. Hier ist die intramyokardiale Entzündungsreaktion u.a. durch den Nachweis von > 2,0 CD3⁺/CD2⁺ Lymphozyten pro *High Power Field* entsprechend > 7 T-Lymphozyten pro mm² definiert.¹⁸ Pauschinger et al. konnten nachweisen, dass die Veränderung des Kollagengehalts in der dilatativen Kardiomyopathie mit einer

erhöhten Infiltration von CD3⁺ T-Lymphozyten einhergeht.⁸³ STAT3 scheint einen bedeutenden Einfluss auf die myokardiale Persistenz der Immunzellen in der chronischen Phase auszuüben. Die Anzahl der Makrophagen war in den infizierten STAT3 KO Tieren im Vergleich zu den infizierten WT Tieren signifikant erhöht. Während die Anzahl der Lymphozyten in den infizierten WT Mäusen sich nicht statistisch von den gesunden WT Mäusen unterschied, stieg die Anzahl in den infizierten STAT3 KO Tieren im Vergleich zu den gesunden STAT3 KO Tieren signifikant an. Die erhöhte Infiltration mit Inflammationszellen bei Fehlen von STAT3 macht die kardioprotektive Rolle von STAT3 in der chronischen Myokarditis deutlich. Erstaunlich ist, dass in unserer Studie die erhöhte Anzahl von Makrophagen und CD3⁺ T-Lymphozyten nicht mit einer veränderten Zytokinproduktion einherging. Die Zytokine werden jedoch nicht nur durch eingewanderte Inflammationszellen, sondern auch durch ortsständige Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert.⁵⁶ Möglicherweise beeinflusst STAT3 auch die Expression von anderen Zytokinen wie z.B. IL-17, die ebenfalls eine bedeutende Rolle in der chronischen Phase der Myokarditis spielen könnten.¹⁸⁵

Neben der Inflammationsreaktion spielt die Apoptose sowohl in der humanen als auch in der murinen Myokarditis eine entscheidende Rolle.^{38, 39} Die Apoptose ist für zahlreiche Prozesse wie Embryonalentwicklung, Immunantwort und Gewebshomöostase von großer Bedeutung und kann im Rahmen einer Infektion durch zytotoxische T-Zellen ausgelöst werden. In der CVB3-induzierten Myokarditis kommt es durch Interaktion des Kapsidproteins V2 mit dem pro-apoptotischen Protein *siva* zur Apoptose der infizierten Zelle.³⁸ STAT3 besitzt sowohl pro- als auch antiapoptotische Eigenschaften. Während die antiapoptotische Wirkung vor allem in der Onkogenese beschrieben wird, ist die proapoptotische Wirkung für die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen wichtig.¹⁸⁶ Im Herzen sind die antiapoptotischen Eigenschaften von kardioprotektiver Bedeutung. Jacoby et al. zeigten in einem Tiermodell mit kardiomyozytenspezifischem *Knockout* von STAT3, dass es durch die Gabe des proinflammatorischen Moleküls LPS zu deutlich mehr Apoptose als in WT Tieren kam.¹⁴³ Ähnliche Ergebnisse erlangten Hilfiker et al. in einem STAT3 KO Modell mit kardialer Ischämie und Reperfusion.¹³⁶ Auch Hirota et al. beobachteten eine deutlich erhöhte Apoptose unter biomechanischer Belastung bei ventrikelspezifischem *Knockout* des Glykoproteinrezeptors gp130.¹⁴⁶ Zudem konnten Barry et al. nachweisen, dass eine Überexpression von STAT3 einen Schutz vor Apoptose durch oxidativen

Stress darstellte.¹⁸⁷ Die antiapoptotischen Eigenschaften sind zum Teil durch die vermehrte Expression des antiapoptotischen Bcl-2 und die verminderte Expression des proapoptotischen Bax bedingt.¹⁵² Aus diesem Grund wurde in unserer Studie die Expression von Bax und Bcl-2 im Myokard genauer betrachtet. Jedoch waren in der chronischen Myokarditis keine Unterschiede nachzuweisen, weder zwischen den gesunden und infizierten Tieren noch zwischen den WT und den STAT3 KO Mäusen. Dieses Ergebnis entspricht Untersuchungen von Cheung et al., deren Arbeitsgruppe in der chronischen Phase der CVB3-induzierten Myokarditis eine fast vollständige Fibrosierung im Bereich des zuvor untergegangenen Gewebes beobachtete.¹⁸⁸ Zudem konnten Hilfiker et al. 24 Stunden nach einer Ischämie/Reperfusion keine verminderte Expression von Bcl-2 trotz erhöhtem Apoptosenachweis beobachten und schließen daraus, dass endogenes STAT3 nicht für die Expression von Bcl-2 notwendig ist.¹³⁶ Auch unser Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass STAT3 auf die untersuchten Apoptoseregulatoren zu diesem Zeitpunkt der chronischen Inflammationsreaktion keine entscheidende Wirkung hat. Andere pro- und antiapoptotische Gene wie NF-kappaB könnten von größerer Bedeutung für die kardioprotektive Wirkung von STAT3 in der chronischen Myokarditis sein.¹⁸⁶ Möglicherweise spielen hier auch andere STAT Proteine wie STAT1 für die Apoptose eine bedeutendere Rolle.^{189, 190}

6.3 Myokardiales Remodeling der extrazellulären Matrix

Die quantitative und qualitative Umgestaltung des Herzmuskels ist ein physiologischer Prozess und für die kardiale Funktion von großer Bedeutung.¹⁰⁹ Hierbei spielt die Balance im MMP/TIMP System, die von verschiedenen Neurohormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen beeinflusst wird, eine entscheidende Rolle.¹¹⁰ Kollagenasen wie MMP-1, MMP-8 und MMP-13 spalten die Tripelhelix der Kollagenfibrillen in Gelatinefragmente, die durch Gelatinasen wie MMP-2 und MMP-9 weiter verdaut werden.^{99, 100} Die Degradation der extrazellulären Matrix stellt die klassische Funktion der Matrixmetalloproteinasen dar. Neuere Studien ergeben viele weitere Aufgaben der MMPs: Erleichterung der Zellmigration von Inflammationszellen, Aktivierung von Zytokinen und Chemokinen sowie intrazelluläre Spaltung von Strukturproteinen wie Aktin und Myosin.^{98, 191} In der akuten Myokarditis wurde in verschiedenen tierexperimentellen und klinischen Studien eine Veränderung der MMP/TIMP Ratio zugunsten von MMP beobachtet.^{110, 76} Diese Hochregulation der

MMPs wurde vor allem mit der erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF- α in Zusammenhang gebracht.^{192, 193} Verschiedene tierexperimentelle Modelle zeigen, dass der Umbau der extrazellulären Matrix und die Progression einer Herzinsuffizienz durch den Einsatz von spezifischen MMP-Inhibitoren verhindert werden können.^{121, 122} Auch in der humanen dilatativen Kardiomyopathie wurde die Dysbalance in der myokardialen MMP/TIMP Expression mit einem Übergewicht an MMPs lange Zeit für die fortschreitende kardiale Fibrosierung und Funktionseinschränkung verantwortlich gemacht.^{123, 194} In der chronischen Phase der Myokarditis ist jedoch die Expression der proinflammatorischen Zytokine und der MMPs im Vergleich zum akuten Stadium deutlich geringer.¹⁸⁸ Zudem zeigen neuere Studien, dass sich die fortschreitende Degradation, Neusynthese und Umstrukturierung des Kollagennetzwerks in der chronischen Myokarditis nicht allein durch ein Überwiegen der MMPs im Vergleich zu den TIMPs erklären lassen. Vielmehr sind komplexe Regulationsmechanismen der verschiedenen MMPs und TIMPs für das fortschreitende myokardiale Remodeling mit einer zunehmenden Fibrosierung ausschlaggebend.⁹⁸

In unserer Studie waren keine Unterschiede in der Genexpression von MMP-2 in den Gruppen WT, STAT3 KO, WT Inf und STAT3 KO Inf zu finden. Der höhere MMP-2-Anteil in der Gruppe STAT3 KO Inf wurde jedoch in der immunhistochemischen Darstellung deutlich. Auch in der zymographischen Bestimmung der Aktivität von MMP-2 waren Tendenzen zu einer höheren Aktivität in der Gruppe STAT3 KO Inf zu erkennen. In der Genexpression von MMP-3, MMP-8, MMP-9 und MMP-12 zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Vergleichbare Ergebnisse lieferte die immunhistochemische Färbung von MMP-9, in der sich die vier Wertegruppen nur geringfügig unterschieden. Die Genexpression von MMP-13 war jedoch in der Gruppe STAT3 KO Inf im Vergleich zur Gruppe STAT3 KO statistisch signifikant geringer, während die Genexpression von TIMP-1 in der Gruppe STAT3 KO Inf tendenziell höher als in den anderen Versuchsgruppen war. Im Gegensatz zu TIMP-1 waren in der Genexpression von TIMP-2 und TIMP-4 keine Unterschiede in den unterschiedlichen Versuchsgruppen erkennbar.

Die unveränderte Expression verschiedener MMPs und TIMPs in der chronischen Myokarditis wird auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Cheung et al. konnten im Myokard von ABY Mäusen 30 Tage nach der CVB3-Infektion keine erhöhte

Expression und keine erhöhte Aktivität von MMP-2 und MMP-9 mehr nachweisen. Ebenfalls war in dieser Studie kein veränderter Proteingehalt von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 in der chronischen Phase der Myokarditis zu erkennen, wohingegen eine konstant hohe Expression von MMP-12 beobachtet wurde.¹⁸⁸ Rutschow et al. konnten in Balb/c Mäusen jedoch eine persistierend hohe Expression und Aktivität von MMP-2 in der chronischen Phase der Myokarditis nachweisen. Im Gegensatz zu unserer Studie war eine geringere Expression von TIMP-1 in der chronischen Myokarditis zu sehen.¹⁷⁴ Neben der Myokarditis ist der Einfluss von STAT3 auf die Homöostase der extrazellulären Matrix in unserer Studie von Bedeutung. Bei Fehlen von STAT3 im Herzen kommt es zu einer vermehrten Expression von TIMP-1 mit antiangiogenetischer und profibrotischer Wirkung,¹²⁶ die mit einer Ventrikeldilatation und Kontaktilitätsminderung einhergeht.¹³⁶ Eine Veränderung in der Genexpression von MMP-2 und MMP-9 konnten Hilfiker et al. nach einem kardiomyozytenspezifischen *Knockout* von STAT3 jedoch ebenfalls nicht nachweisen.¹³⁶ Der Einfluss von STAT3 auf die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix ist aber nicht von der Wirkung auf ein einzelnes Gen, sondern von dem Zusammenspiel verschiedener Faktoren abhängig. In der chronischen Myokarditis könnte außerdem die Veränderung im Zytokinprofil für eine Suppression verschiedener MMPs und eine erhöhte Fibrosierung des Myokards verantwortlich sein.^{98, 175}

Exzessive Kollagenproduktion führt zur Ummauerung der Kardiomyozyten und somit zu einer Minderung der Kontraktilität des Herzens.⁸⁸ Die dilatative Kardiomyopathie ist durch eine Zunahme des Kollagengehalts im Myokard charakterisiert.^{109, 93, 123} Pauschinger et al. konnten in der humanen dilatativen Kardiomyopathie zudem eine Änderung des Quotienten aus Kollagen I und III zugunsten von Kollagen I nachweisen.⁸³ Da Kollagen I eine erhöhte Steifigkeit und Kollagen III eine erhöhte Elastizität des Gewebes bedingen,^{83, 87} hat der vermehrte Gehalt an Kollagen I im Herzen eine verminderte *Compliance* (Dehnbarkeit) und eine kardiale Funktionseinschränkung zur Folge.⁸³ Rutschow et al. konnten in einem Tiermodell der chronischen Myokarditis ebenfalls eine Hochregulation von Kollagen I, eine Änderung der Kollagen I / Kollagen III Ratio und eine Zunahme des gesamten Kollagengehalts im Myokard nachweisen.¹⁷⁴ Andere Tiermodelle der viralen Myokarditis zeigten hingegen keine Änderung in der Genexpression oder der Proteinmenge von Kollagen, sondern

eine Zunahme des löslichen Kollagens im Rahmen einer erhöhten posttranslationalen Degradation.^{110, 193}

Im Gegensatz zu der Arbeit von Rutschow et al.¹⁷⁴ waren in unserer Studie keine Unterschiede in der Genexpression oder der Proteinmenge von Kollagen I und Kollagen III in den infizierten WT Mäusen im Vergleich zu den gesunden WT Mäusen zu beobachten. Auch wurde zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen anders als in der Studie von Pauschinger et al. kein Unterschied in der Kollagen I / Kollagen III Ratio nachgewiesen.⁸³ Jedoch zeigt sich ein signifikant erhöhter Gehalt an Kollagen I im Myokard der infizierten STAT3 KO Tiere. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen von Hilfiker et al., deren Arbeitsgruppe zwei Wochen nach einem experimentellem Myokardinfarkt eine erhöhte Fibrosierung und schlechtere kardiale Funktion nachweisen konnte.¹³⁶ Jacoby et al. beobachteten eine Zunahme des myokardialen Kollagengehalts bei STAT3 KO Mäusen nach Gabe des kardiotoxischen Chemotherapeutikums Doxorubicin.¹⁴³ Somit scheint das Fehlen von STAT3 in der chronischen Myokarditis ebenso wie im Myokardinfarkt und nach oxidativem Stress (Doxorubicin) die Dilatation der Ventrikel und das Voranschreiten der Herzinsuffizienz zu begünstigen. Hier liegt die Schlussfolgerung nahe, dass das pathologische Remodeling bei STAT3 KO Tieren durch die erhöhte Inflammationsreaktion des Myokards bedingt sein könnte.¹⁴³ Spontane Veränderungen im Kollagengehalt wurden bei den gesunden STAT3 KO Tieren in unserer Studie jedoch nicht beobachtet. Auch dieses Ergebnis stimmt mit der aktuellen Literatur überein, in der ab dem Alter von drei bis vier Monaten höchstens eine milde Erhöhung der myokardialen Kollagenexpression und erst ab dem Alter von sechs Monaten eine milde bis deutliche Fibrosierung des Herzmuskels beschrieben werden.^{136, 143} Hier wird der positive Einfluss von STAT3 auf das myokardiale Remodeling sowohl im gesunden Herzen als auch in der chronischen Myokarditis deutlich. Inwieweit sich diese kardioprotektive Wirkung von STAT3 auch in der linksventrikulären Funktion widerspiegelt, wird im folgenden Kapitel diskutiert.

6.4 Hämodynamische Veränderungen

Die chronische Inflammationsreaktion und das pathologische Remodeling des Myokards sind ausschlaggebend für die Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie. Hämodynamisch ist die dilatative Kardiomyopathie durch eine systolische Funktionsstörung mit einer eingeschränkten Ejektionsfraktion charakterisiert.²⁶

Zusätzlich kann durch eine inkomplette Relaxation und vermehrte Steifigkeit des Myokards eine diastolische Dysfunktion auftreten.¹² Hauptzielort von kardiotropen Viren ist die linke Herzkammer,¹⁹⁵ so dass in unserer Studie die hämodynamischen Messungen im linken Ventrikel durchgeführt wurden.

In der inflammatorischen Kardiomyopathie mit beginnender Herzinsuffizienz besteht die Möglichkeit, die fehlende Herzkraft durch Sympathikusaktivierung zu kompensieren. Versagen jedoch die Kompensationsmechanismen, kommt es zu einer Abnahme der Nachlast und somit auch des linksventrikulären systolischen Drucks. Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz weisen eine deutlich geringere Proteinexpression und Phosphorylierung von STAT3 auf.¹⁴⁷ Obwohl der Plasmaspiegel von IL-6 bei terminaler Herzinsuffizienz erhöht ist und somit als Marker für Mortalität gilt,^{148, 149} sind die myokardiale Expression von IL-6 und dadurch auch die Aktivierung des JAK/STAT Signalweges reduziert.¹⁴⁷ Das Fehlen von STAT3 im Herzen begünstigt auch in Tiermodellen das Entstehen einer Herzinsuffizienz. Jacoby et al. beobachteten eine signifikante Einschränkung der systolischen Funktion ab dem Alter von 200 Tagen in STAT3 KO Mäusen.¹⁴³ Nach proximalem Aortenbanding konnten Hirota et al. jedoch bereits im Alter von zwei Monaten bei Tieren mit einem ventrikelspezifischen *Knockout* des Glykoproteinrezeptors gp130 ein Herzversagen auslösen.¹⁴⁶ Dieser Effekt kann in unserer Studie nachvollzogen werden. Es kam zu einer Abnahme des linksventrikulären endsystolischen Drucks und des maximalen linksventrikulären Drucks in den infizierten STAT3 KO Tieren. Pinkert et al. beobachteten ebenfalls eine Abnahme des linksventrikulären Drucks in der akuten Myokarditis und konnten durch prophylaktische und therapeutische Gabe eines löslichen Virusrezeptors der kardialen Funktionseinschränkung entgegenwirken.¹⁹⁶ Auswirkungen auf die diastolischen Druckverhältnisse waren in unserer Studie nicht erkennbar. Die infizierten STAT3 KO Mäuse wiesen keine Unterschiede im linksventrikulären enddiastolischen Druck oder im minimalen linksventrikulären Druck auf. Somit scheint der Einfluss von STAT3 auf die systolischen Druckveränderungen in der chronischen Phase der Myokarditis eine größere Rolle zu spielen. Diastolische Druckerhöhungen, die durch fokale Nekrose der Myofibrillen und die Entwicklung eines interstitiellen Ödems bedingt sein können,⁴¹ sind für die akute Phase der Myokarditis charakteristisch.¹⁷⁴

Die inflammatorische Kardiomyopathie imponiert meist als dilatative Kardiomyopathie, in der es zu einer Zunahme der Ventrikel- und Vorhofdurchmesser kommt.

Infolgedessen sind bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie die linksventrikulären Volumina systolisch und diastolisch erhöht.¹⁹⁷ Die Volumenbelastung lässt sich auch im Tiermodell in der chronischen Phase der CVB3-induzierten Myokarditis nachvollziehen.¹⁷⁴ STAT3 hat einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der dilatativen Kardiomyopathie. Die Arbeitsgruppen von Hilfiker und Jacoby konnten bei STAT3 KO Tieren ab dem Alter von sechs Monaten eine Zunahme der Ventrikeldurchmesser beobachten.^{136, 143} Im experimentellen Myokardinfarkt traten diese Veränderungen bei STAT3 KO Mäusen jedoch schon früher auf.¹³⁶ Diese Beobachtungen stimmen mit unseren Ergebnissen überein. In der chronischen Myokarditis waren das linksventrikuläre endsystolische Volumen und das linksventrikuläre enddiastolische Volumen in den STAT3 KO Tieren im Vergleich zu den WT Tieren signifikant erhöht. Hier spiegeln sich die Folgen des zuvor beschriebenen pathologischen Remodelings mit einer zunehmenden Fibrosierung des Myokards hämodynamisch wider. Somit scheint bei einem Fehlen von STAT3 unter Belastung der pathologische Umbauprozess des Herzmuskels bereits in einem jüngeren Alter der Versuchstiere zu einer Einschränkung der linksventrikulären Funktion zu führen.

Als Maß für die Kontraktilität wurde die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit des linken Ventrikels gemessen. In der Literatur ist sowohl in der Myokarditis als auch bei einem Fehlen des JAK/STAT Signalwegs eine geringere Kontraktilität beschrieben.^{136, 143, 196} In unserer Studie waren jedoch keine Unterschiede in den verschiedenen Versuchsgruppen erkennbar, die Kontraktilität des linken Ventrikels war in dieser Phase der chronischen Myokarditis wieder bzw. noch erhalten. Jedoch war eine verminderte diastolische Relaxationsfähigkeit in Form einer Abnahme der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit bei den infizierten STAT3 KO Mäusen zu beobachten. Die verminderte *Compliance* des Herzmuskels kann durch den erhöhten Kollagengehalt in der chronischen Myokarditis bedingt sein und veranschaulicht die Bedeutung von STAT3 für die diastolische Funktion des Herzens.

Bei der beginnenden Herzinsuffizienz kann die systolische Dysfunktion durch Steigerung der Herzfrequenz teilweise oder vollständig kompensiert werden. In der Myokarditis ist jedoch eine Schädigung des Reizleitungssystems durch Coxsackieviren möglich.¹⁹⁸ In unserer Studie haben weder die chronische Myokarditis noch der STAT3 *Knockout* einen signifikanten Einfluss auf die Herzfrequenz. Hilfiker et al. konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Herzfrequenz bei STAT3 KO Tieren ausmachen.¹³⁶

Am deutlichsten ist die Leistung des linken Ventrikels durch das Schlagvolumen und die Ejektionsfraktion charakterisiert. Rihal et al. konnten nachweisen, dass die Ejektionsfraktion eine bedeutende prognostische Relevanz für die Mortalität in der dilatativen Kardiomyopathie besitzt.¹⁹⁹ Das Herzminutenvolumen entspricht dem Schlagvolumen multipliziert mit der Herzfrequenz und steht somit in direkter Abhängigkeit von diesen Parametern. Das Schlagvolumen und die Ejektionsfraktion verändern sich in Folge einer Volumen- oder Druckbelastung und einer dadurch bedingten niedrigeren Kontraktilität und/oder *Compliance*. In unserer Studie waren keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisbar, aber deutlich die Tendenzen erkennbar, dass Schlagvolumen, Ejektionsfraktion und Herzminutenvolumen bei den STAT3 KO Mäusen in der chronischen Myokarditis vermindert waren. Diese Abnahme der linksventrikulären Leistung weist auf eine beginnende Herzinsuffizienz in der chronischen Myokarditis hin und ist bei STAT3 KO Tieren in verschiedenen Belastungssituationen beschrieben.^{136, 143, 200}

Die erhöhte Inflammationsreaktion und das erhöhte myokardiale Remodeling bei Fehlen von STAT3 in der chronischen Myokarditis spiegeln sich somit hämodynamisch in einer signifikanten Zunahme der endsystolischen und enddiastolischen Volumina und der linksventrikulären Wandspannung sowie einer signifikant verminderten Compliance wider. Hier wird die entscheidende Rolle von STAT3 für die Aufrechterhaltung der linksventrikulären Funktion in der chronischen Myokarditis deutlich. Abbildung 6.1 stellt schematisch die Auswirkungen des STAT3 *Knockouts* auf Inflammationsreaktion, myokardiales Remodeling und Hämodynamik in der chronischen Myokarditis dar.

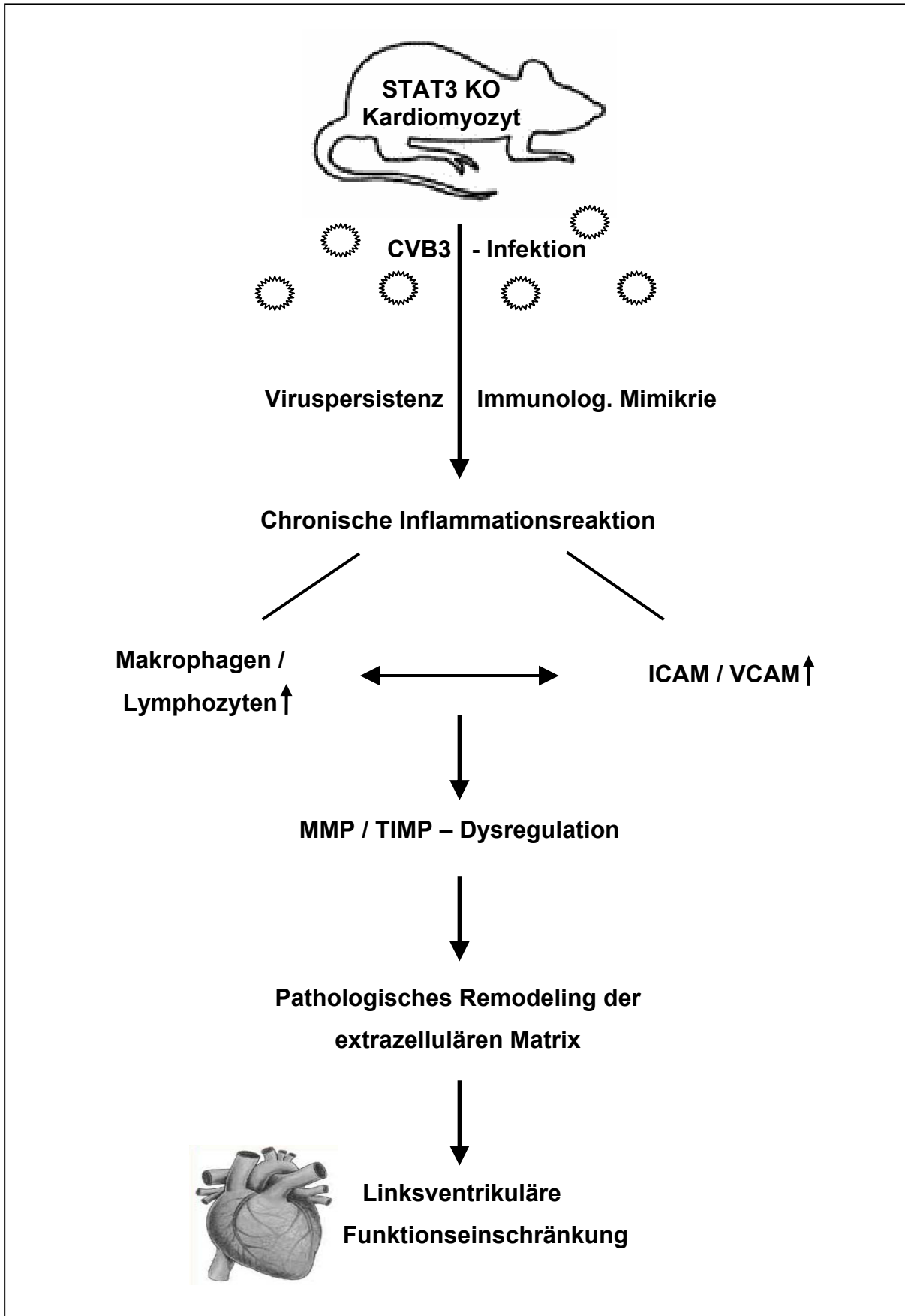


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Folgen des STAT3 KO in der chronischen Myokarditis

6.5 Perspektive STAT3 und Myokarditis

In unserem Mausmodell der CVB3-induzierten chronischen Myokarditis sind der kardioprotektive Einfluss von STAT3 auf die Inflamationsreaktion, das myokardiale Remodeling der extrazellulären Matrix und die linksventrikuläre Funktion deutlich erkennbar. Auch wenn große Ähnlichkeiten der chronischen murinen Myokarditis zu den pathologischen Veränderungen des Herzens bei Patienten mit Myokarditis vorliegen,⁶³ kann der Krankheitsverlauf im Tiermodell nicht mit der humanen Myokarditis gleichgesetzt werden. Des Weiteren war in unserer Studie die Fallzahl, insbesondere in den Kontrollgruppen, relativ gering, so dass bei einigen der untersuchten Parameter nur Tendenzen und keine statistisch signifikanten Veränderungen beobachtet werden konnten. Geringere Unterschiede zwischen den infizierten WT und den infizierten STAT3 KO Mäusen könnten auch durch die Beschränkung des *Knockouts* auf die Kardiomyozyten bedingt sein. Im Herzen befindet sich eine große Zahl an Endothelzellen, die an der Immunantwort durch Produktion von Zytokinen beteiligt sind.²⁰¹ Wang et al. konnten zeigen, dass ein *Knockout* von STAT3 in Endothelzellen mit einer schlechteren linksventrikulären Funktion nach myokardialer Ischämie einherging.¹⁷⁷ Bemerkenswert ist, dass keine Unterschiede mehr zu beobachten waren zwischen männlichen und weiblichen Tieren, da letztere normalerweise eine bessere Erholung nach einem Myokardinfarkt zeigen.^{202, 203} Des Weiteren findet die JAK/STAT Signaltransduktion zur Regulation der Hypertrophie auch in Satellitenzellen statt.²⁰⁴ STAT3 scheint demnach nicht nur in Kardiomyozyten, sondern auch in verschiedenen Zelltypen des Herzens eine wichtige Rolle zu spielen. Insofern könnte bei einem kardiomyozytenspezifischen *Knockout* eine kompensatorische Hochregulation von STAT3 in anderen Zellen des Myokards erfolgen. Jedoch konnten Wang et al. beobachten, dass ein STAT3 *Knockout* in Endothelzellen durch direkte Interaktionen zwischen den Zellen zu einer verminderten STAT3 Aktivierung in Kardiomyozyten führte.¹⁷⁷ Auch in unserer Studie konnte eine signifikant niedrigere Genexpression von STAT3 in den KO Tieren im Vergleich zu den WT Tieren ermittelt werden, obwohl hier das linksventrikuläre Myokard und somit auch herzeigene Zellen anderer Entität (Endothelzellen, Satellitenzellen, Myofibroblasten und eingewanderte Inflamationszellen etc.) betrachtet wurden. Zudem führt die systemische Deletion von STAT3 im Mausmodell zu einer Wachstumsstörung des Herzens mit einem

embryonalen Versterben der Tiere, so dass ein Tiermodell mit einem kompletten *Knockout* nicht realisierbar ist.¹³¹

Zahlreiche Studien wurden der Identifizierung des JAK/STAT Signalwegs gewidmet. Nichtsdestotrotz ist ein großer Teil der Regulationsmechanismen und Zielgene von STAT3 noch nicht eindeutig bestimmt.¹³⁷ Neben den in unserer Studie untersuchten Parametern ist STAT3 an der Regulation vieler weiterer Gene beteiligt. Aus diesem Grund ist es denkbar, dass nicht untersuchte Marker der Inflammation, Apoptose und des myokardialen Remodelings in der chronischen Myokarditis ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen.¹⁸⁵ Des Weiteren betrachtet unsere Studie vor allem die Genexpression und den Proteingehalt im myokardialen Gewebe. Neben der Transkription von Zielgenen ist jedoch auch die posttranslationale Modifizierung von Proteinen und somit die Beeinflussung von deren Aktivität für die kardioprotektive Wirkung des JAK/STAT Signalwegs von Bedeutung.²⁰⁰ Für folgende Studien wäre demnach die Betrachtung weiterer Zielgene von STAT3 und deren Proteinexpression und -aktivität von großem Interesse. Zudem könnte die Untersuchung der Tiere zu einem späteren Zeitpunkt der Inflammationsreaktion wichtige Informationen über den Verlauf der chronischen Myokarditis bei Fehlen von STAT3 liefern.

Langfristig könnte die Beeinflussung des JAK/STAT Signalwegs einen therapeutischen Ansatz für die Myokarditis darstellen. Die konstante Aktivierung von STAT3 ist jedoch mit einer malignen Zelltransformation und der Onkogenese verschiedener Tumoren assoziiert. Aberrante STAT3 Aktivierung führt zu einem unkontrollierten Wachstum und Überleben von Tumorzellen durch Hochregulation von angiogenetischen und antiapoptotischen Genen wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *Bcl-xL*.²⁰⁵ Durch die Inhibition von STAT3 konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine vermehrte Apoptose und geringere Proliferation von Tumorzellen induziert werden.^{206, 207} Auch die kardioprotektive Wirkung von STAT3 ist von einer Balance im JAK/STAT Regulationssystem abhängig. Nicht nur bei fehlender bzw. ungenügender Expression von STAT3 sondern auch bei einer unkontrollierten Aktivität kommt es zu einem pathologischen Remodeling im Herzen mit einer konsekutiven kardialen Dysfunktion.¹⁵¹ Hilfiker et al. konnten in einer neueren Studie zeigen, dass die kontinuierliche Aktivierung von STAT3 über den Glykoproteinrezeptor gp130 durch hohe IL-6-Spiegel im subakuten Myokardinfarkt eine größere Inflammationsreaktion, ein pathologisches Remodeling, eine Begünstigung der Herzinsuffizienz und eine höhere Mortalität zur

Folge hatte.²⁰⁸ Demnach ist eine kontrollierte Regulation der Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 im Herzen von großer Bedeutung. Aus diesem Grund sollte sowohl bei Ansätzen für zukünftige Therapien kardialer Erkrankungen als auch bei der Entwicklung von Tumorthérapien eine Balance im JAK/STAT Signalweg berücksichtigt werden. Weitere Studien sind zum genauen Verständnis der kardioprotektiven Mechanismen von STAT3 und zur möglichen therapeutischen Beeinflussung des JAK/STAT Signalwegs erforderlich.

7 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist von großer Bedeutung für die Zytoprotektion und Hypertrophie von Kardiomyozyten. STAT3 wird über den JAK/STAT Signalweg durch IL-6-ähnliche Proteine aktiviert und reguliert die Genexpression von Proteinen, die an der Steuerung von Angiogenese, Inflammation, Apoptose und dem Umbau der extrazellulären Matrix im Herzen beteiligt sind. In dieser Arbeit wurde der Einfluss eines kardiomyozytenspezifischen *Knockouts* von STAT3 auf die chronische Phase der Coxsackievirus B3- induzierten Myokarditis untersucht.

Dazu wurden sieben Mäuse mit einem kardiomyozytenspezifischen STAT3 *Knockout* und neun Wildtyp Mäuse des CB6FI-Stammes im Alter von sechs bis sieben Wochen intraperitoneal mit 5×10^7 PFU Coxsackievirus B3 (*Nancy Strain*) infiziert. Als Kontrollgruppen dienten vier Wildtyp und vier STAT3 *Knockout* Tiere. In der chronischen Phase der Myokarditis 28 Tage *post infectionem* wurden die Mäuse hämodynamischen Messungen unterzogen und geopfert. Die myokardiale Genexpression der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β und IFN- γ , der Apoptoseregulatoren Bax und Bcl-2, der Matrixkomponenten Kollagen I und III, der Matrixmetalloproteinasen MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-12 und MMP-13 und der *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 wurde mithilfe der *Realtime*-PCR bestimmt. Immunhistochemisch wurden die Zelladhäsionsmoleküle ICAM und VCAM, die Infiltration von Makrophagen und CD3⁺ Lymphozyten, die Matrixkomponente Kollagen I und die Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen. Die Aktivität von MMP-2 wurde zymographisch gemessen.

Die Ergebnisse zeigten eine deutlich erhöhte Zahl an Zelladhäsionsmolekülen und Inflammationszellen in den STAT3 *Knockout* Tieren. Diese Entzündungsreaktion ging jedoch nicht mit einer veränderten Apoptose oder erhöhten Expression von Zytokinen einher. Im Sinne eines pathologischen myokardialen Remodelings waren Kollagen I und MMP-2 im Myokard der STAT3 *Knockout* Mäuse erhöht, MMP-13 hingegen vermindert und die TIMPs unverändert. Die chronische Inflammationsreaktion und das pathologische Remodeling spiegelten sich hämodynamisch in einer linksventrikulären Funktionseinschränkung wider. STAT3 besitzt demnach bedeutende kardioprotektive Eigenschaften in der chronischen Myokarditis.

8 Literaturverzeichnis

1. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006;113(14):1807-1816.
2. Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2005;111(7):887-893.
3. McCarthy RE, 3rd, Boehmer JP, Hruban RH, et al. Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis. *N Engl J Med*. 2000;342(10):690-695.
4. Freedman SB, Haladyn JK, Floh A, et al. Pediatric myocarditis: emergency department clinical findings and diagnostic evaluation. *Pediatrics*. 2007;120(6):1278-1285.
5. Amabile N, Fraisse A, Bouvenot J, et al. Outcome of acute fulminant myocarditis in children. *Heart*. 2006;92(9):1269-1273.
6. Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. *Heart*. 2006;92(3):316-320.
7. Doolan A, Langlois N, Semsarian C. Causes of sudden cardiac death in young Australians. *Med J Aust*. 2004;180(3):110-112.
8. Liu PP, Schultheiss HP. Libby: Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. *Saunders Elsevier*. 2008;8th edition:1739-1791.
9. D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, et al. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart*. 2001;85(5):499-504.
10. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, et al. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(3):466-472.
11. Matsumori A. Hepatitis C virus infection and cardiomyopathies. *Circ Res*. 2005;96(2):144-147.

12. Tschope C, Bock CT, Kasner M, et al. High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. *Circulation*. 2005;111(7):879-886.
13. Blauwet LA, Cooper LT. Myocarditis. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010;52(4):274-288.
14. Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. *Hum Pathol*. 1987;18(6):619-624.
15. Shanes JG, Ghali J, Billingham ME, et al. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation*. 1987;75(2):401-405.
16. Hauck AJ, Kearney DL, Edwards WD. Evaluation of postmortem endomyocardial biopsy specimens from 38 patients with lymphocytic myocarditis: implications for role of sampling error. *Mayo Clin Proc*. 1989;64(10):1235-1245.
17. Baughman KL. Diagnosis of myocarditis: death of Dallas criteria. *Circulation*. 2006;113(4):593-595.
18. Richardson P, McKenna W, Bristow M, 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):841-842.
19. Cooper LT, Jr. Myocarditis. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1526-1538.
20. Friedrich MG, Sechtem U, Schulz-Menger J, et al. Cardiovascular magnetic resonance in myocarditis: A JACC White Paper. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(17):1475-1487.
21. Magnani JW, Danik HJ, Dec GW, Jr., et al. Survival in biopsy-proven myocarditis: a long-term retrospective analysis of the histopathologic, clinical, and hemodynamic predictors. *Am Heart J*. 2006;151(2):463-470.
22. Torre-Amione G, Anker SD, Bourge RC, et al. Results of a non-specific immunomodulation therapy in chronic heart failure (ACCLAIM trial): a placebo-controlled randomised trial. *Lancet*. 2008;371(9608):228-236.
23. Staudt A, Hummel A, Ruppert J, et al. Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy: 6-month results from a randomized study. *Am Heart J*. 2006;152(4):712 e711-716.
24. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J*. 1980;44(6):672-673.

25. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2008;29(2):270-276.
26. Elliott P. Cardiomyopathy. Diagnosis and management of dilated cardiomyopathy. *Heart.* 2000;84(1):106-112.
27. Andersson B, Caidahl K, Waagstein F. Idiopathic dilated cardiomyopathy among Swedish patients with congestive heart failure. *Eur Heart J.* 1995;16(1):53-60.
28. Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med.* 2000;343(19):1388-1398.
29. Kearney MT, Cotton JM, Richardson PJ, et al. Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy: mechanisms, manifestations, and management. *Postgrad Med J.* 2001;77(903):4-10.
30. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation.* 1999;99(8):1091-1100.
31. Mason JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res.* 2003;60(1):5-10.
32. Hahn H, Klein P. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. *Springer.* 2009;5th edition.
33. Herskowitz A, Wolfgram LJ, Rose NR, et al. Coxsackievirus B3 murine myocarditis: a pathologic spectrum of myocarditis in genetically defined inbred strains. *J Am Coll Cardiol.* 1987;9(6):1311-1319.
34. Clements G. Characteristics of viruses inducing cardiac disease. Banatvala JE, ed. *Viral infections of the heart.* London: Edward Arnold. 1993:1-22.
35. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation.* 2001;104(9):1076-1082.
36. Leslie K, Blay R, Haisch C, et al. Clinical and experimental aspects of viral myocarditis. *Clin Microbiol Rev.* 1989;2(2):191-203.
37. Wessely R. Coxsackieviral replication and pathogenicity: lessons from gene modified animal models. *Med Microbiol Immunol.* 2004;193(2-3):71-74.
38. Henke A, Launhardt H, Klement K, et al. Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J Virol.* 2000;74(9):4284-4290.

39. Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ, et al. Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy. *Nat Med*. 1999;5(3):320-326.
40. Xiong D, Yajima T, Lim BK, et al. Inducible cardiac-restricted expression of enteroviral protease 2A is sufficient to induce dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2007;115(1):94-102.
41. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation*. 1996;94(11):2930-2937.
42. Matsumori A. Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cardiomyopathy--role of viruses, cytokines, and nitric oxide. *Jpn Circ J*. 1997;61(4):275-291.
43. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol*. 1998;274(3 Pt 2):R577-595.
44. Rose NR, Hill SL. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996;80(3 Pt 2):S92-99.
45. Lee JK, Zaidi SH, Liu P, et al. A serine elastase inhibitor reduces inflammation and fibrosis and preserves cardiac function after experimentally-induced murine myocarditis. *Nat Med*. 1998;4(12):1383-1391.
46. Xiong D, Lee GH, Badorff C, et al. Dystrophin deficiency markedly increases enterovirus-induced cardiomyopathy: a genetic predisposition to viral heart disease. *Nat Med*. 2002;8(8):872-877.
47. Godeny EK, Gauntt CJ. Murine natural killer cells limit coxsackievirus B3 replication. *J Immunol*. 1987;139(3):913-918.
48. Godeny EK, Gauntt CJ. Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis. *J Immunol*. 1986;137(5):1695-1702.
49. Lodge PA, Herzum M, Olszewski J, et al. Coxsackievirus B-3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms. *Am J Pathol*. 1987;128(3):455-463.
50. Kishimoto C, Kuribayashi K, Masuda T, et al. Immunologic behavior of lymphocytes in experimental viral myocarditis: significance of T lymphocytes in the severity of myocarditis and silent myocarditis in BALB/c-nu/nu mice. *Circulation*. 1985;71(6):1247-1254.
51. Woodruff JF, Woodruff JJ. Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of coxsackie virus B3 heart disease. *J Immunol*. 1974;113(6):1726-1734.

52. Kishimoto C, Abelmann WH. Monoclonal antibody therapy for prevention of acute coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Circulation*. 1989;79(6):1300-1308.
53. Henke A, Huber S, Stelzner A, et al. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol*. 1995;69(11):6720-6728.
54. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136(7):2348-2357.
55. Huber SA, Pfaeffle B. Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus group B type 3. *J Virol*. 1994;68(8):5126-5132.
56. Seko Y, Takahashi N, Yagita H, et al. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus b3. *J Pathol*. 1997;183(1):105-108.
57. Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A, et al. Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *J Am Coll Cardiol*. 1986;7(4):868-872.
58. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990;346(6283):425-434.
59. Etienne-Manneville S, Chaverot N, Strosberg AD, et al. ICAM-1-coupled signaling pathways in astrocytes converge to cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation and TNF-alpha secretion. *J Immunol*. 1999;163(2):668-674.
60. Ino T, Kishiro M, Okubo M, et al. Late persistent expressions of ICAM-1 and VCAM-1 on myocardial tissue in children with lymphocytic myocarditis. *Cardiovasc Res*. 1997;34(2):323-328.
61. Vallbracht KB, Schwimmbeck PL, Seeberg B, et al. Endothelial dysfunction of peripheral arteries in patients with immunohistologically confirmed myocardial inflammation correlates with endothelial expression of human leukocyte antigens and adhesion molecules in myocardial biopsies. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(3):515-520.
62. Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, et al. The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4140-4145.
63. Matsumori A, Kawai C. An animal model of congestive (dilated) cardiomyopathy: dilatation and hypertrophy of the heart in the chronic stage in DBA/2 mice with

- myocarditis caused by encephalomyocarditis virus. *Circulation*. 1982;66(2):355-360.
64. Klingel K, Hohenadl C, Canu A, et al. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(1):314-318.
65. Cronin ME, Love LA, Miller FW, et al. The natural history of encephalomyocarditis virus-induced myositis and myocarditis in mice. Viral persistence demonstrated by in situ hybridization. *J Exp Med*. 1988;168(5):1639-1648.
66. Wee L, Liu P, Penn L, et al. Persistence of viral genome into late stages of murine myocarditis detected by polymerase chain reaction. *Circulation*. 1992;86(5):1605-1614.
67. Kandolf R, Sauter M, Aepinus C, et al. Mechanisms and consequences of enterovirus persistence in cardiac myocytes and cells of the immune system. *Virus Res*. 1999;62(2):149-158.
68. Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, et al. From infection to autoimmunity. *J Autoimmun*. 2001;16(3):175-186.
69. Damian RT. Molecular Mimicry in Biological Adaptation. *Science*. 1965;147(3660):824.
70. Neu N, Rose NR, Beisel KW, et al. Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice. *J Immunol*. 1987;139(11):3630-3636.
71. Smith SC, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell-mediated disease. *J Immunol*. 1991;147(7):2141-2147.
72. Schultheiss HP, Noutsias M, Kuhl U, et al. [Cardiomyopathies. I: classification of cardiomyopathies--dilated cardiomyopathy]. *Internist (Berl)*. 2005;46(11):1245-1256; quiz 1257.
73. Dorner A, Kallwellis-Opara A, Pauschinger M, et al. Cardiac autoantibodies in viral myocarditis. *Heart Fail Clin*. 2005;1(3):333-343.
74. Rose NR. Viral damage or 'molecular mimicry'-placing the blame in myocarditis. *Nat Med*. 2000;6(6):631-632.
75. Neu N, Craig SW, Rose NR, et al. Coxsackievirus induced myocarditis in mice: cardiac myosin autoantibodies do not cross-react with the virus. *Clin Exp Immunol*. 1987;69(3):566-574.

76. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res.* 2000;46(2):214-224.
77. Thomas CV, Coker ML, Zellner JL, et al. Increased matrix metalloproteinase activity and selective upregulation in LV myocardium from patients with end-stage dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1998;97(17):1708-1715.
78. Borg TK, Caulfield JB. The collagen matrix of the heart. *Fed Proc.* 1981;40(7):2037-2041.
79. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, et al. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26(3):279-292.
80. Aplin AE, Howe AK, Juliano RL. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(6):737-744.
81. Hamacher S, Matern S, Roeb E. [Extracellular matrix -- from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2004;129(38):1976-1980.
82. Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1995;376(6):345-355.
83. Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, et al. Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation.* 1999;99(21):2750-2756.
84. Wilson EM, Spinale FG. Myocardial remodelling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. *Ann Med.* 2001;33(9):623-634.
85. Wilson EM, Gunasinghe HR, Coker ML, et al. Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure. *J Card Fail.* 2002;8(6):390-398.
86. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 1989;13(7):1637-1652.
87. Lapiere CM, Nussgens B, Pierard GE. Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect Tissue Res.* 1977;5(1):21-29.
88. Eghbali M. Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res Cardiol.* 1992;87 Suppl 2:183-189.

89. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:403-434.
90. Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res.* 2000;86(12):1259-1265.
91. Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, 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):483-490.
92. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Li J, et al. [Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]. *Herz.* 2002;27(7):677-682.
93. Pauschinger M, Doerner A, Remppis A, et al. Differential myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation. *Cardiovasc Res.* 1998;37(1):123-129.
94. He CS, Wilhelm SM, Pentland AP, et al. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(8):2632-2636.
95. Bishop JE, Lindahl G. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res.* 1999;42(1):27-44.
96. Murphy G, Allan JA, Willenbrock F, et al. The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity. *J Biol Chem.* 1992;267(14):9612-9618.
97. Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, et al. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature.* 1997;389(6646):77-81.
98. Westermann D, Savvatis K, Schultheiss HP, et al. Immunomodulation and matrix metalloproteinases in viral myocarditis. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(3):468-473.
99. Murphy G, Nguyen Q, Cockett MI, et al. Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem.* 1994;269(9):6632-6636.
100. Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, et al. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem.* 1996;271(3):1544-1550.
101. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem.* 1992;267(6):3581-3584.

102. Spinale FG, Coker ML, Krombach SR, et al. Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure : effects on left ventricular dimensions and function. *Circ Res*. 1999;85(4):364-376.
103. Fedak PW, Verma S, Weisel RD, et al. Cardiac remodeling and failure From molecules to man (Part II). *Cardiovasc Pathol*. 2005;14(2):49-60.
104. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*. 1994;370(6490):555-557.
105. Chakraborti S, Mandal M, Das S, et al. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003;253(1-2):269-285.
106. Nguyen Q, Willenbrock F, Cockett MI, et al. Different domain interactions are involved in the binding of tissue inhibitors of metalloproteinases to stromelysin-1 and gelatinase A. *Biochemistry*. 1994;33(8):2089-2095.
107. Li YY, Feldman AM, Sun Y, et al. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in the failing human heart. *Circulation*. 1998;98(17):1728-1734.
108. Liu YE, Wang M, Greene J, et al. Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *J Biol Chem*. 1997;272(33):20479-20483.
109. Bishop JE, Greenbaum R, Gibson DG, et al. Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol*. 1990;22(10):1157-1165.
110. Pauschinger M, Chandrasekharan K, Schultheiss HP. Myocardial remodeling in viral heart disease: possible interactions between inflammatory mediators and MMP-TIMP system. *Heart Fail Rev*. 2004;9(1):21-31.
111. Brenner DA, O'Hara M, Angel P, et al. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*. 1989;337(6208):661-663.
112. Delany AM, Brinckerhoff CE. Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethasone in cultured human fibroblasts. *J Cell Biochem*. 1992;50(4):400-410.
113. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovasc Res*. 1999;42(1):162-172.

114. Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, et al. The dynamic interaction between matrix metalloproteinase activity and adverse myocardial remodeling. *Heart Fail Rev.* 2004;9(1):33-42.
115. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res.* 1997;81(4):627-635.
116. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, et al. Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha. *J Leukoc Biol.* 1995;57(5):774-777.
117. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, et al. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol.* 1987;105(3):1039-1045.
118. Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, et al. Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(10):4577-4581.
119. Duivenvoorden WC, Hirte HW, Singh G. Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 1999;17(1):27-34.
120. Edwards DR, Leco KJ, Beaudry PP, et al. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Exp Gerontol.* 1996;31(1-2):207-223.
121. Chancey AL, Brower GL, Peterson JT, et al. Effects of matrix metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload. *Circulation.* 2002;105(16):1983-1988.
122. Li YY, Kadokami T, Wang P, et al. MMP inhibition modulates TNF-alpha transgenic mouse phenotype early in the development of heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(3):H983-989.
123. Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, et al. Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol.* 1996;148(5):1639-1648.
124. Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, et al. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):604-613.

125. Li YY, Feng Y, McTiernan CF, et al. Downregulation of matrix metalloproteinases and reduction in collagen damage in the failing human heart after support with left ventricular assist devices. *Circulation*. 2001;104(10):1147-1152.
126. Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Drexler H. Many good reasons to have STAT3 in the heart. *Pharmacol Ther*. 2005;107(1):131-137.
127. Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science*. 2002;296(5573):1653-1655.
128. Kaplan MH, Daniel C, Schindler U, et al. Stat proteins control lymphocyte proliferation by regulating p27Kip1 expression. *Mol Cell Biol*. 1998;18(4):1996-2003.
129. Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer and activator of transcription. *Curr Opin Oncol*. 1999;11(6):490-496.
130. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest*. 2002;109(9):1143-1148.
131. Takeda K, Noguchi K, Shi W, et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(8):3801-3804.
132. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, et al. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998;334 (Pt 2):297-314.
133. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002;285(1-2):1-24.
134. Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock*. 2002;17(2):83-90.
135. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374(Pt 1):1-20.
136. Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, 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):187-195.
137. Snyder M, Huang XY, Zhang JJ. Identification of novel direct Stat3 target genes for control of growth and differentiation. *J Biol Chem*. 2008;283(7):3791-3798.

138. Kunisada K, Tone E, Fujio Y, et al. Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes. *Circulation*. 1998;98(4):346-352.
139. Kunisada K, Negoro S, Tone E, 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):315-319.
140. Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Survival pathways in hypertrophy and heart failure: the gp130-STAT axis. *Basic Res Cardiol*. 2007;102(5):393-411.
141. Dumler I, Kopmann A, Wagner K, et al. Urokinase induces activation and formation of Stat4 and Stat1-Stat2 complexes in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1999;274(34):24059-24065.
142. Zurney J, Howard KE, Sherry B. Basal expression levels of IFNAR and Jak-STAT components are determinants of cell-type-specific differences in cardiac antiviral responses. *J Virol*. 2007;81(24):13668-13680.
143. Jacoby JJ, Kalinowski A, Liu MG, 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):12929-12934.
144. Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Kaminska A, et al. Regulation of proangiogenic factor CCN1 in cardiac muscle: impact of ischemia, pressure overload, and neurohumoral activation. *Circulation*. 2004;109(18):2227-2233.
145. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. 1999;341(17):1276-1283.
146. Hirota H, Chen J, Betz UA, et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell*. 1999;97(2):189-198.
147. Podewski EK, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, 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):798-802.
148. Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, et al. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(2):391-398.

149. Rattazzi M, Puato M, Faggin E, et al. C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders? *J Hypertens.* 2003;21(10):1787-1803.
150. Yasukawa H, Hoshijima M, Gu Y, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 is a biomechanical stress-inducible gene that suppresses gp130-mediated cardiac myocyte hypertrophy and survival pathways. *J Clin Invest.* 2001;108(10):1459-1467.
151. Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *Br J Pharmacol.* 2008;153 Suppl 1:S414-427.
152. Negoro S, Kunisada K, Tone E, et al. Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2000;47(4):797-805.
153. El-Adawi H, Deng L, Tramontano A, et al. The functional role of the JAK-STAT pathway in post-infarction remodeling. *Cardiovasc Res.* 2003;57(1):129-138.
154. Wang M, Markel T, Crisostomo P, et al. Deficiency of TNFR1 protects myocardium through SOCS3 and IL-6 but not p38 MAPK or IL-1beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(4):H1694-1699.
155. Yasukawa H, Yajima T, Duplain H, et al. The suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) is a novel therapeutic target for enterovirus-induced cardiac injury. *J Clin Invest.* 2003;111(4):469-478.
156. Yajima T, Yasukawa H, Jeon ES, et al. Innate defense mechanism against virus infection within the cardiac myocyte requiring gp130-STAT3 signaling. *Circulation.* 2006;114(22):2364-2373.
157. Tanaka T, Kanda T, McManus BM, et al. Overexpression of interleukin-6 aggravates viral myocarditis: impaired increase in tumor necrosis factor-alpha. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(9):1627-1635.
158. Agah R, Frenkel PA, French BA, et al. Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. *J Clin Invest.* 1997;100(1):169-179.
159. Gay RT, Belisle S, Beck MA, 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):13825-13830.

160. Joo CH, Hong HN, Kim EO, 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):135-140.
161. Nakamura H, Yamamoto T, Yamamura T, et al. Repetitive coxsackievirus infection induces cardiac dilatation in post-myocarditic mice. *Jpn Circ J*. 1999;63(10):794-802.
162. Kim EO, Joo CH, Ye JS, et al. Quantitative analysis of viral RNA in the murine heart and pancreas with different concentration of coxsackievirus B3. *Intervirology*. 2006;49(4):192-199.
163. Wang YX, da Cunha V, Vincelette J, et al. Antiviral and myocyte protective effects of murine interferon-beta and α 2 in coxsackievirus B3-induced myocarditis and epicarditis in Balb/c mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1):H69-76.
164. Anker SD, Coats AJ. Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest*. 1999;115(3):836-847.
165. Woodruff JF. Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol*. 1980;101(2):425-484.
166. Li J, Leschka S, Rutschow S, et al. Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine myocarditis. *Eur J Pharmacol*. 2007;554(1):60-68.
167. Kuhl U, Pauschinger M, Seeberg B, et al. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation*. 2005;112(13):1965-1970.
168. Kuhl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, et al. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2003;107(22):2793-2798.
169. Leipner C, Grun K, Schneider I, 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):141-147.
170. Andreoletti L, Leveque N, Boulagnon C, et al. Viral causes of human myocarditis. *Arch Cardiovasc Dis*. 2009;102(6-7):559-568.
171. Ruppert V, Meyer T, Pankuweit S, et al. Activation of STAT1 transcription factor precedes up-regulation of coxsackievirus-adenovirus receptor during viral myocarditis. *Cardiovasc Pathol*. 2008;17(2):81-92.

172. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, et al. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J*. 1994;72(6):561-566.
173. Satoh M, Tamura G, Segawa I, et al. Expression of cytokine genes and presence of enteroviral genomic RNA in endomyocardial biopsy tissues of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Virchows Arch*. 1996;427(5):503-509.
174. Rutschow S, Leschka S, Westermann D, et al. Left ventricular enlargement in coxsackievirus-B3 induced chronic myocarditis--ongoing inflammation and an imbalance of the matrix degrading system. *Eur J Pharmacol*. 2010;630(1-3):145-151.
175. Gluck B, Schmidtke M, Merkle I, et al. Persistent expression of cytokines in the chronic stage of CVB3-induced myocarditis in NMRI mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(9):1615-1626.
176. Cowan DB, Poutias DN, Del Nido PJ, et al. CD14-independent activation of cardiomyocyte signal transduction by bacterial endotoxin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(2):H619-629.
177. Wang M, Zhang W, Crisostomo P, et al. Sex differences in endothelial STAT3 mediate sex differences in myocardial inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(3):E872-877.
178. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA, et al. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart. *Am J Pathol*. 2004;165(6):1883-1894.
179. Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss HP, et al. Cytotoxic perforin+ and TIA-1+ infiltrates are associated with cell adhesion molecule expression in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2003;5(4):469-479.
180. Seko Y, Matsuda H, Kato K, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1327-1336.
181. van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*. 1996;74(1):13-33.
182. Schmidt C, Hulthe J, Fagerberg B. Baseline ICAM-1 and VCAM-1 are increased in initially healthy middle-aged men who develop cardiovascular disease during 6.6 years of follow-up. *Angiology*. 2009;60(1):108-114.

183. Noutsias M, Hohmann C, Pauschinger M, et al. sICAM-1 correlates with myocardial ICAM-1 expression in dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2003;91(2-3):153-161.
184. Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, et al. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev.* 2002;22(2):146-167.
185. Valaperti A, Marty RR, Kania G, et al. CD11b+ monocytes abrogate Th17 CD4+ T cell-mediated experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol.* 2008;180(4):2686-2695.
186. Battle TE, Frank DA. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med.* 2002;2(4):381-392.
187. Barry SP, Townsend PA, McCormick J, et al. STAT3 deletion sensitizes cells to oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;385(3):324-329.
188. Cheung C, Luo H, Yanagawa B, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis. *Cardiovasc Pathol.* 2006;15(2):63-74.
189. Stephanou A, Brar BK, Knight RA, et al. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ.* 2000;7(3):329-330.
190. Townsend PA, Scarabelli TM, Davidson SM, et al. STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279(7):5811-5820.
191. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:211-242.
192. Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, et al. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation.* 2001;104(7):826-831.
193. Li J, Schwimbeck PL, Tschöpe C, et al. Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction. *Cardiovasc Res.* 2002;56(2):235-247.
194. Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, et al. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation.* 2000;102(16):1944-1949.
195. Hashimoto I. Myocarditis in mice infected with Coxsackie virus B3. *Br J Exp Pathol.* 1986;67(5):737-745.

196. Pinkert S, Westermann D, Wang X, et al. Prevention of cardiac dysfunction in acute coxsackievirus B3 cardiomyopathy by inducible expression of a soluble coxsackievirus-adenovirus receptor. *Circulation*. 2009;120(23):2358-2366.
197. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18(12):1440-1463.
198. Terasaki F, James TN, Nakayama Y, et al. Ultrastructural alterations of the conduction system in mice exhibiting sinus arrest or heart block during Coxsackievirus B3 acute myocarditis. *Am Heart J*. 1992;123(2):439-452.
199. Rihal CS, Nishimura RA, Hatle LK, et al. Systolic and diastolic dysfunction in patients with clinical diagnosis of dilated cardiomyopathy. Relation to symptoms and prognosis. *Circulation*. 1994;90(6):2772-2779.
200. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, et al. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol Ther*. 2008;120(2):172-185.
201. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*. 1990;50(4):537-544.
202. Tunstall-Pedoe H, Morrison C, Woodward M, et al. Sex differences in myocardial infarction and coronary deaths in the Scottish MONICA population of Glasgow 1985 to 1991. Presentation, diagnosis, treatment, and 28-day case fatality of 3991 events in men and 1551 events in women. *Circulation*. 1996;93(11):1981-1992.
203. Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science*. 2005;308(5728):1583-1587.
204. Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, et al. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab*. 2008;7(1):33-44.
205. Turkson J. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert Opin Ther Targets*. 2004;8(5):409-422.
206. Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, et al. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):4138-4143.

-
- 207.** Xi S, Gooding WE, Grandis JR. In vivo antitumor efficacy of STAT3 blockade using a transcription factor decoy approach: implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2005;24(6):970-979.
- 208.** Hilfiker-Kleiner D, Shukla P, Klein G, et al. Continuous glycoprotein-130-mediated signal transducer and activator of transcription-3 activation promotes inflammation, left ventricular rupture, and adverse outcome in subacute myocardial infarction. *Circulation*. 2010;122(2):145-155.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der JAK/STAT Signalübertragung	16
Abbildung 3.1: Exemplarische Darstellung der <i>Realtime</i> -PCR	29
Abbildung 3.2: Darstellung der indirekten Methode	34
Abbildung 3.3: Darstellung der ABC-Methode	35
Abbildung 3.4: Darstellung der EnVision™-Methode	35
Abbildung 5.1: Darstellung des Körpergewichts der Versuchstiere	49
Abbildung 5.2: Darstellung der Viruslast	50
Abbildung 5.3: Darstellung des linksventrikulären endsystolischen Drucks	51
Abbildung 5.4: Darstellung des maximalen linksventrikulären Drucks	52
Abbildung 5.5: Darstellung des linksventrikulären endsystolischen Volumens	53
Abbildung 5.6: Darstellung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit	54
Abbildung 5.7: Darstellung des linksventrikulären enddiastolischen Volumens	55
Abbildung 5.8: Darstellung der STAT3 PCR	55
Abbildung 5.9: Darstellung der STAT3 mRNA Ratio (STAT3 / 18S rRNA)	56
Abbildung 5.10: Darstellung der IFN- γ Genexpression	57
Abbildung 5.11: Immunhistochemische Färbung von ICAM	58
Abbildung 5.12: Darstellung der <i>Area Fraction</i> von ICAM	59
Abbildung 5.13: Immunhistochemische Färbung von VCAM	60
Abbildung 5.14: Darstellung der <i>Area Fraction</i> von VCAM	60
Abbildung 5.15: Immunhistochemische Färbung von Makrophagen	61
Abbildung 5.16: Darstellung der Mac3 ⁺ Zellen pro mm ² Myokardgewebe	62
Abbildung 5.17: Immunhistochemische Färbung von CD3 ⁺ Lymphozyten	63
Abbildung 5.18: Darstellung der CD3 ⁺ Zellen pro mm ² Myokardgewebe	63
Abbildung 5.19: Immunhistochemische Färbung von Kollagen I	65
Abbildung 5.20: Darstellung der <i>Area Fraction</i> von Kollagen I	65
Abbildung 5.21: Exemplarische Darstellung der Zymographie von MMP-2	67
Abbildung 5.22: Darstellung der <i>Area Fraction</i> von MMP-2	68
Abbildung 5.23: Darstellung der Genexpression von MMP-13	69
Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Folgen des STAT3 KO	85

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere	21
Tabelle 3.2: Reaktionsschritte der Polymerase-Kettenreaktion.....	25
Tabelle 3.3: TaqMan®-Programm	28
Tabelle 3.4: Sequenzen / Bestellnummern der eingesetzten Primer	31
Tabelle 3.5: Charakterisierung der Antikörper	39
Tabelle 4.1: Hersteller und Bezeichnung der Arbeitsgeräte	43
Tabelle 4.2: Hersteller und Bezeichnung der Verbrauchsmaterialien	44
Tabelle 4.3: Hersteller und Bezeichnung der Reagenzien	47
Tabelle 4.4: Hersteller und Erklärung der Software.....	47
Tabelle 5.1: Herzgewicht und Herzquotient in den verschiedenen Versuchsgruppen ..	49
Tabelle 5.2: Genexpression von IL-1 β , IL-6 und TNF- α	56
Tabelle 5.3: Genexpression von IL-10 und TGF- β	57
Tabelle 5.4: Genexpression von Bax und Bcl-2	64
Tabelle 5.5: Genexpression und <i>Area Fraction</i> von Kollagen III	66
Tabelle 5.6: Genexpression und <i>Area Fraction</i> der Ratio Kollagen I / Kollagen III	66
Tabelle 5.7: Genexpression von MMP-3, MMP-8, MMP-9 und MMP-12	68
Tabelle 5.8: Genexpression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4	70

9.3 Abkürzungsverzeichnis

α MHC	<i>α-Myosin Heavy Chain</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
CAR	<i>Coxsackie-Adenoviral Receptor</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CT	<i>Threshold Cycle</i>
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CVB3	Coxsackie B3
DAF	<i>Decay Accelerating Factor</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dP/dt min	maximale Druckabfallsgeschwindigkeit
EMMPRIN	<i>Extracellular MMP Inducer Protein</i>
FCS	Fetales Kälberserum
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKDT	Institut Kardiale Diagnostik und Therapie
IL	Interleukin
Inf	infiziert
iNOS	induzierbare NO-Synthase
JAK	Janus-Kinase
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MMP	Matrixmetalloproteinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MT-MMP	membrangebundene Matrixmetalloproteinase

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
n.s.	nicht signifikant
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pes	linksventrikulärer endsystolischer Druck
PFU	<i>Plaque-Forming Units</i>
p.i.	<i>post infectionem</i>
PIAS	<i>Protein Inhibitors of Activated STATs</i>
Pmax	maximaler linksventrikulärer Druck
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SOCS	<i>Suppressors of Cytokine Signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
unverd.	unverdünnt
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
Vdg.	Verdünnung
Ved	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Ves	linksventrikuläres endsystolisches Volumen
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp

9.4 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Katharina Marggraf, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT3 in der chronischen 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.“

18.05.2011

Unterschrift

9.5 Lebenslauf

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

9.6 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heinz-Peter Schultheiss und meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Matthias Pauschinger, für die freundliche Überlassung des Themas und die herausragenden Forschungsmöglichkeiten.

Ganz besonders danke ich dem gesamten Team im Labor, insbesondere Frau Kerstin Puhl, Frau Franziska Bleis und Herrn Georg Zingler für ihre große Unterstützung bei den praktischen Aufgaben. Für zahlreiche kompetente Ratschläge zu den theoretischen Recherchen und Überlegungen möchte ich mich bei Frau Dr. Angela Kallwellis-Opara, Frau Dr. Olga Lettau, Frau Dr. Diana Lindler und Herrn Dr. Sebastian Jäger bedanken. Mein spezieller Dank geht an Herrn Prof. Dr. Carsten Tschöpe und seine Arbeitsgruppe für die Durchführung der hämodynamischen Messungen.

Besonders möchte ich meinem Doktorandenkollegen, Herrn Dr. Moritz Hilbrandt, und meinem Betreuer, Herrn Dr. Dirk Westermann, danken, die durch ihre motivierenden Ratschläge und konstruktiven Korrekturen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Herrn Sven Tešanović - ohne ihre ständige Unterstützung und liebevollen Ermutigungen wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen!