

## **1. Einleitung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Zytokinen auf die Veränderungen der kollagenen Strukturen der extrazellulären Matrix (EZM) bei experimenteller akuter Virusmyokarditis an Coxsackievirus B3-infizierten BALB/c Mäusen untersucht, da diese ein dem Menschen vergleichbares Krankheitsbild zeigen<sup>1,2</sup>. Des Weiteren wurde die Bedeutung einer Interleukin-4-Behandlung und deren Einfluss auf die Immunpathogenese bei dieser Krankheit analysiert.

### **1.1 Akute Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie**

Der Begriff „Myokarditis“ wurde 1837 von Sobernheim<sup>3</sup> eingeführt und das Krankheitsbild erstmalig 1812 von Corvisart<sup>4</sup> beschrieben. Myokarditis bezeichnet eine entzündliche Erkrankung des Myokards, die in Verbindung mit kardialer Dysfunktion nach Kriterien der World Health Organisation (WHO) und der International Society and Federation of Cardiology (ISFC) 1995 als inflammatorische Kardiomyopathie definiert wurde. Demnach ist die Myokarditis eine entzündliche Erkrankung des Myokards, die durch etablierte histologische, immunologische und immunhistologische Kriterien diagnostiziert wird, durch idiopathische, autoimmune und infektiöse Agenzien ausgelöst wird und in der Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie involviert ist<sup>5</sup>. Verschiedene infektiöse Agenzien können eine Myokarditis verursachen, doch sind Viren, insbesondere Coxsackieviren der Gruppe B, am häufigsten mit dieser Erkrankung assoziiert<sup>6,7</sup>.

Die dilatative Kardiomyopathie wurde 1995 von der WHO definiert als Dilatation mit gestörter Kontraktilität des linken oder beider Ventrikel, hervorgerufen durch virale, immunologische oder toxische Agenzien, idiopathische Faktoren oder genetische Prädisposition.

In den letzten zwei Jahrzehnten kam es zu bedeutenden Fortschritten in der Aufklärung der Pathogenese der Myokarditis durch die Einführung der endomyokardialen Biopsie zur in-vivo-Diagnostik<sup>8</sup>, durch die Standardisierung der histologischen Diagnostik durch die Dallas-

Kriterien<sup>9,10</sup> und das bessere Verständnis der kardiotropen Viren durch Studien der Myokarditis im Mausmodell<sup>11</sup>.

Virale Myokarditiden verlaufen beim Menschen klinisch meist inapparent und heilen in den meisten Fällen mit geringer Narbenbildung ohne klinische Relevanz aus. Symptomatische Formen reichen von fieberhaften Infekten mit folgenloser Wiederherstellung, über ventrikuläre Arrhythmien bis zum plötzlichen Herztod bei fulminanter Myokarditis. Bei einem Teil der Patienten kommt es zu langfristig chronisch progredienten kardialen Dysfunktionen mit Ausweitung der Herzhöhlen. Die dilatative Kardiomyopathie präsentiert sich meist mit progressivem Herzversagen, Arrhythmien und Thromboembolien, dabei ist der plötzliche Herztod in allen Stadien der Krankheit häufig.

1964 wurde erstmalig ein Zusammenhang zwischen akuter viraler Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie postuliert, ein endgültiger Beweis liegt bis heute nicht vor. Im Tiermodell konnte eine progressive ventrikuläre Dilatation und Dysfunktion bei chronischer, viraler Myokarditis nachgewiesen werden<sup>12</sup>. Beim Menschen jedoch konnte eine Entwicklung einer akuten Myokarditis in eine dilatative Kardiomyopathie je nach Studie nur in 14%<sup>13</sup> - 52%<sup>14</sup> der Fälle sicher festgestellt werden.

## 1.2 Coxsackieviren

Enterovirales Genom konnte bei der Untersuchung endomyokardialer Biopsien<sup>15</sup> von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie je nach Studie in 0-76% der Fälle nachgewiesen werden<sup>16,17,18,19</sup>. Es scheint jedoch, dass die Inzidenz von viraler Myokarditis bei dilatativer Kardiomyopathie zwischen 10 – 20 % liegt<sup>20</sup>.

Coxsackieviren<sup>21</sup>, als Mitglieder der Gruppe der Enteroviren aus der Familie der Picornaviren, speziell die der Gruppe B3, werden als häufiger Erreger der Virusmyokarditis angesehen. Als unbehüllte RNA-Viren mit einem Durchmesser von etwa 30 nm besitzen die Coxsackieviren ein Virion aus einer zentralen, etwa 7500 bp langen, einzelsträngigen RNA positiver Polarität (enteroviraler Plusstrang) und einem ikosaederförmigen Capsid. Der enterovirale Plusstrang besteht aus einer nicht-kodierenden Region am 5'-Ende und einer kodierenden Region am 3'-Ende, gefolgt von einer Poly-Adenosin-Sequenz. Das Viruskapsid besteht aus den vier Proteinen VP1 – VP4, wobei VP1 – VP3 die Ausbildung der Virusgestalt

bestimmen und VP4 zur Stabilisation des Kapsids und der Interaktion zwischen Kapsid und Virusgenom dient<sup>22,23</sup>. Dem VP1-Protein wird eine wichtige Rolle bei der Ankopplung des Virus an die Zielzelle zugeschrieben, die über den Coxsackie-Adenoviral-Rezeptor (CAR)<sup>24</sup> erfolgt und zur Endozytose des Virus führt. Nach dem Uncoating und der Überführung des enteroviralen Plusstranges kommt es zur Virusproteinsynthese und RNA-Replikation.

Coxsackieviren werden aufgrund ihres unterschiedlichen Organotropismus sowie der damit verbundenen Gewebeschädigung in der Babymaus in die Untergruppen A und B unterteilt<sup>25</sup>. Viren der Untergruppe A mit 24 Serotypen erzeugen bei der Babymaus eine diffuse Myositis. Die Untergruppe B mit 6 Typen erzeugt dagegen eine herdförmige Myositis, daneben auch noch zahlreiche andere Organläsionen, wie Enzephalomyelitis, nekrotisierende Fettgewebsentzündungen, Pankreatitis, Endokarditis und Myokarditis. Der natürliche Wirt ist nur der Mensch, experimentell sind jedoch auch Mäuse<sup>28,50</sup>, Hamster<sup>26,27</sup>, Ratten und Schimpansen<sup>21</sup> infizierbar.

Die Infektion beim Menschen erfolgt entweder fäkal-oral oder als Tröpfcheninfektion. Eintrittspforte der Coxsackie-Viren sind der Nasenrachenraum und der Dünndarm, wo es zur lokalen Vermehrung mit anschließender Generalisierung und sekundärer Ansiedlung in den Zielorganen (Muskeln, Meningen, Pankreas, Herz und Haut) kommt. Nach einer Inkubationsperiode von einem Tag bis zu 3 Wochen werden sehr vielfältige Krankheitsbilder hervorgerufen, die vom leichten fieberhaften Infekt bis zu schweren zentralnervösen und kardialen Erkrankungen reichen.

### **1.3 Vorstellungen zur Pathogenese der Myokarditis**

Bei der experimentellen viralen Myokarditis in Mäusen lassen sich prinzipiell zwei verschiedene Pathomechanismen unterscheiden, zum einen die direkte virale und zum anderen die immunvermittelte Schädigung des Herzgewebes. Dabei bewirken Viren hauptsächlich die Schädigungen in den ersten Tagen post infectionem (p.i.), während später die Auswirkungen der Aktivierung des Immunsystems verantwortlich sind.

### 1.3.1 Verlauf der experimentellen viralen Myokarditis im Mausmodell

Nach Kawai et al.<sup>28</sup> lassen sich im Mausmodell drei verschiedene Phasen im Verlauf der viralen Myokarditis unterscheiden: die akute Phase (0.-3. Tag p.i.), die subakute Phase (4.-14. Tag p.i.) und die chronische Phase (>15. Tag p.i.).

Im Mausmodell zeigte sich in der akuten Phase (Tag 0.-3. p.i.) der Virusmyokarditis eine virusinduzierte Zytotoxizität in Abwesenheit von Entzündungszellen mit fokalen Nekrosen der Myofibrillen<sup>1</sup>. Parallel dazu stieg die mRNA Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  innerhalb der ersten drei Tage<sup>29,30</sup>. Ab dem dritten Tag sind vereinzelt zelluläre Infiltrate nachweisbar.

Demnach können Myokardschädigungen in der Frühphase der viralen Myokarditis nur direkt viral durch das Abtöten infizierter Zellen im Rahmen des intrazellulären Vermehrungszyklus bedingt sein<sup>21</sup>. Auch in *in-vitro* Untersuchungen an isolierten Herzmuskelzellen konnte gezeigt werden, dass es durch CVB3-Infektion zum Zelluntergang kommt<sup>31</sup>.

In der subakuten Phase der Myokarditis (Tag 4-14 p.i.) zeigte sich eine Infiltration des Myokards hauptsächlich mit T-Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten und vereinzelt nachweisbaren B-Lymphozyten und Plasmazellen. Die Lymphozytenpopulation besteht dabei vor allem aus Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, bei denen zu Beginn die NK-Zellen, und später die CD8<sup>+</sup>-Zellen dominieren.

Aktivierte NK-Zellen werden als protektiv gegen die virale Infektion angesehen, da sie die Virusreplikation limitieren<sup>32,33,34</sup>. Zwar können sie durch die Freisetzung von Perforin Kardiomyozyten abtöten<sup>35</sup>, jedoch bezieht sich die Schädigung ausschließlich auf virusinfizierte Zellen<sup>34</sup>. So zeigte sich in Mausstämmen mit verminderter NK-Zellen-Antwort ein Anstieg des Virustiter und der Schwere der Krankheit<sup>36</sup>.

Besonders Zytokine beeinflussen in Art und Umfang ihrer Expression und Ausschüttung die Entwicklung der Myokarditis. Zytokine haben multiple überlappende Funktionen zur Aktivierung von Zellen oder Induktion anderer Zytokine mit einer zum Teil deutlichen Redundanz der Effekte und sowohl positiven als auch negativen Effekten auf die Zellen des Myokards. So verstärken IL-1 und IL-2 den Verlauf der Krankheit<sup>37</sup>, während die Rezeptorblockade von IL-1 und IL-2 die Entwicklung einer Myokarditis verhindern<sup>38</sup>, und

durch die Behandlung mit TNF- $\alpha$  oder IL-1 können myokarditisresistente Mausstämme eine Myokarditis entwickeln<sup>39</sup>. Weiterhin kontrollieren Zytokine Autoimmunmechanismen und können die Immunantwort der T-Helferzell-Population in Richtung T<sub>H1</sub>- oder T<sub>H2</sub>-Antwort verschieben<sup>40,41</sup> (siehe 1.3.2).

Die mRNA-Expression verschiedener Zytokine zu verschiedenen Zeitpunkten in den ersten 14 Tagen nach CVB3-Infektion in C3H/He-Mäusen wurde mittels PCR von Seko et al<sup>42</sup> untersucht. Es wurde eine erhöhte Expression von den proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  bis zum 7. Tag p.i. beobachtet, indizierend dass diese durch herzständige Fibroblasten, Kardiomyozyten und Endothelzellen produziert wurden und die erhöhte Expression durch die Infektion zumindest teilweise induziert war. Die inflammatorischen Zytokine IL-2, IL-4 und IL-10 wurden erst in Verbindung mit einer massiven Zellinfiltration<sup>43,44</sup> nach dem 5. oder 7. Tag p.i. vermehrt exprimiert, gleichzeitig mit einer deutlich steigenden Expression von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Nicht sicher geklärt ist, ob die Expression durch eine viralbedingte Induktion oder durch die gesteigerte Zellzahl im Myokard bedingt ist<sup>42,45</sup>.

Weiterhin beeinflussen Zytokine die Expression von Matrixmetalloproteinasen und deren spezifischen Inhibitoren und kontrollieren damit indirekt die Zusammensetzung und die Funktionalität der extrazellulären Matrix (siehe 1.4).

Virustiter erreichen am vierten Tag p.i. (bei Behandlung von BALB/c Mäusen mit EMCV) ihr Maximum<sup>46</sup>, jedoch sind zu diesem Zeitpunkt noch keine neutralisierenden Antikörper nachweisbar. Neutralisierende Antikörpertiter steigen zum 8.–10. Tag und erreichen Maximalwerte am 14. Tag p.i., und bereits am 20. Tag p.i. ist ein Virusnachweis nicht mehr möglich<sup>46</sup>. Die Viruselimination geschieht nicht nur durch neutralisierende Antikörper, sondern auch durch infiltrierende mononukleäre Zellen<sup>47,48,36</sup>.

Somit ist etwa ab dem 10. Tag p.i. keine direkte Schädigung des Myokards durch das Virus mehr zu erwarten, da NK-Zellen, neutralisierende Antikörper und infiltrierende Makrophagen zur Beseitigung kardiotroper Viren geführt haben. Andererseits korrelieren die schwersten pathologischen Veränderungen im Myokard mit dem Einsetzen des T-Zell-Infiltrates zwischen dem 7. und 14. Tag p.i.<sup>49</sup>.

Verschiedene Studien zeigten, dass für die Ausbildung einer Myokarditis eine T-Zell-Antwort essentiell ist. So bildet sich die Krankheit in Lymphozyten-supprimierten Mausstämmen, in genetisch veränderten T-Lymphozyten-defizienten Mausstämmen und in Mausstämmen, die

mit anti-T-Zell-Antikörpern behandelt wurden, nicht vollständig aus, und die Überlebensraten waren gegenüber Mausstämmen mit intakten Immunsystemen besser<sup>50,51,52,53</sup>. Dabei war der Virustiter durch T-Lymphozyten-Suppression nicht beeinflusst, und somit scheint die Viruselimination vorwiegend durch die B-Zell-vermittelte humorale Immunität und unabhängig von der T-Zell-Funktion vermittelt zu sein.

T-Lymphozyten scheinen also verantwortlich für die fortschreitende myokardiale Schädigung nach Elimination der Viren zu sein. Sie erkennen virale Antigene auf infizierten Myozyten, die ihnen an MHC-Klasse-I-Proteinen präsentiert werden; woraufhin zytotoxische T-Zellen diese Zellen lysieren können<sup>54,55</sup>, und sie sind weiterhin mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des zellulären Infiltrates<sup>56</sup>.

In der chronischen Phase der viralen Myokarditis ab dem 15. Tag p.i. sind der Virusnachweis und der Nachweis von Viruskapsidproteinen nicht mehr möglich, jedoch lässt sich mittels in-situ-Hybridisierung virale RNA in EMCV-infizierten Mäusen noch drei Wochen p.i. im Myokard und noch vier Wochen p.i. im Gehirn nachweisen<sup>57</sup>. Mittels PCR konnte in verschiedenen Arbeitsgruppen im Mausmodell persistierende virale RNA zwischen 42 und 90 Tage p.i. nachgewiesen werden<sup>58,59</sup>. Die persistierende virale RNA gilt als potentieller Promotor einer fortbestehenden Gewebeeinfiltration des Myokards durch T-Lymphozyten in der chronischen Phase der Myokarditis, was daran belegt wurde, dass drei verschiedene immunkompetente Mausstämme, in denen enterovirale RNA persistiert, eine chronische Myokarditis entwickeln, während DBA/1-Mäuse, die virale RNA früh eliminieren, nicht zur Chronifizierung neigen<sup>60</sup>. Eine Viruspersistenz ist jedoch nicht obligat mit der Entwicklung einer chronischen Myokarditis verknüpft<sup>61</sup>, und somit scheint die Art der Immunantwort auf das Virus von entscheidender Bedeutung zu sein.

Tiermodelle wurden entwickelt um Autoimmunreaktionen bei der Myokarditis zu untersuchen. Dabei führte die Injektion von kardialem Myosin zur Ausbildung einer Myokarditis ohne Virusbeteiligung<sup>62,63</sup>, wobei die isolierten Autoantikörper Kreuzreaktionen mit dem CVB3-Kapsidproteinen (Myosin und CVB3-Kapsidproteine zeigen ca. 40% Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz<sup>64</sup>) zeigten und bei Injektion kardiale Läsionen hervorriefen<sup>65</sup>.

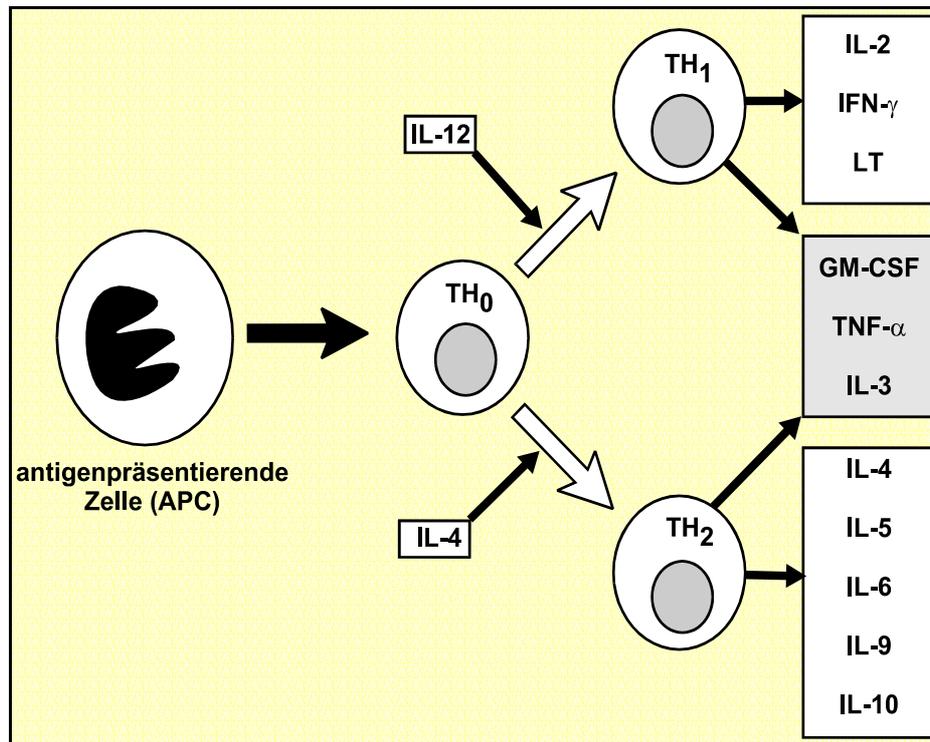
Autoreaktive T-Lymphozyten reagieren ebenfalls mit kardialen antigenen Strukturen nichtinfizierter Kardiomyozyten<sup>66,67</sup>, wobei wiederum kardiales Myosin als häufigstes

Autoantigen gesehen wird<sup>68,69</sup>. Daneben könnten auch Makrophagen beteiligt sein, die nach Abbau lysierter Kardiomyozyten die Bestandteile an der Oberfläche präsentieren und auf diesem Wege Autoimmunität induzieren könnten.

Es können also sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität an dem Fortschreiten kardialer Läsionen in der chronischen Phase beteiligt sein.

### **1.3.2 Rolle der T-Lymphozyten in der Immunpathogenese**

Bei inflammatorischen Läsionen wie der Virusmyokarditis reagiert das Immunsystem mit Interaktionen zwischen B- und T-Lymphozyten, Makrophagen und anderen Effektorzellen. Studien mit murinen und kürzlich auch mit menschlichen<sup>70</sup> CD4<sup>+</sup> T-Helferzell-Populationen ergaben, dass es verschiedene Subpopulationen gibt T<sub>HP</sub>-, T<sub>H0</sub>-, T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zellen. Die T<sub>H1</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zellen entwickeln sich aus naiven T<sub>H0</sub>-Zellen, die sich wiederum aus den Vorläuferzellen T<sub>HP</sub> differenzieren. Als Unterscheidungsmerkmale der T-Helferzell-Populationen sind bislang noch keine spezifischen Zelloberflächenmarker etabliert<sup>71</sup>, und so lassen sie sich nur aufgrund ihrer Zytokinexpressionsmuster und somit ihrer spezifischen biologischen Funktion unterscheiden<sup>72,73</sup>. T<sub>H1</sub> Zellen sezernieren IFN- $\gamma$ , LT (Lymphotoxin) und IL-2 und sind verbunden mit einer verstärkten zellulären Immunreaktion durch Aktivierung proinflammatorischer Mechanismen. T<sub>H2</sub>-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-10 und induzieren die humorale Immunantwort sowie die Downregulation lokaler Entzündungen<sup>74</sup>. Beide T-Zell-Linien produzieren TNF- $\alpha$ , IL-3, IL-13 und GM-CSF (siehe Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Polarisation der Zytokinproduktion durch T-Helferzellen nach Antigenkontakt

Die Differenzierung von  $T_{H0}$ -Zellen in  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen wird durch die Zytokinproduktion von antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen) reguliert<sup>75</sup> und wird beeinflusst durch das Antigen selbst sowie die genetische Prädisposition. IL-4 bewirkt eine Differenzierung von  $T_{H0}$ -Zellen in  $T_{H2}$ -Zellen, was unter anderem zur Produktion von IL-4 und IL-10 führt, wobei IL-4 positiv rückkoppelt und eine weitere Differenzierung von  $T_{H0}$ -Zellen in  $T_{H2}$ -Zellen bewirkt, während IL-10 die  $T_{H1}$ -Antwort hemmt. IL-12 führt zur Differenzierung von  $T_{H0}$ -Zellen in  $T_{H1}$ -Zellen und somit auch zur Produktion von  $INF-\gamma$  und IL-2, die beide zur positiven Rückkopplung führen, und  $INF-\gamma$  hemmt weiterhin die  $T_{H2}$ -Antwort.

Zytokine im Allgemeinen übernehmen eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung homeostatischer Mechanismen im Organismus, können diese jedoch auch entscheidend stören. Viele aktuelle Studien fokussieren in therapeutischen Ansätzen auf die Beeinflussung der T-Zellen-Antwort<sup>76</sup>, jedoch werden einige der für  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ -Zellen typischen Zytokine auch von anderen Zellen wie  $CD8^+$ -T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, B-Zellen,

dendritischen Zellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Mastzellen sezerniert<sup>77,78</sup>.

Im Tiermodell konnte sowohl für eine dominante T<sub>H1</sub>- als auch für die T<sub>H2</sub>-Antwort eine Verbesserung oder Verschlechterung einer experimentellen Myokarditis gezeigt werden.

Bei Ratten konnten Lewis et al.<sup>79</sup> zeigen, dass durch Überführung von T-Lymphozyten aus Tieren mit Myosin-induzierter Myokarditis in naive Ratten eine Myokarditis ausgelöst werden konnte, die durch zusätzliche Behandlung mit IL-12 Gabe stärker ausgeprägt war.

Seko et al.<sup>42</sup> konnte bei CVB3 induzierter experimenteller akuter Myokarditis im Mausmodell zeigen, dass T<sub>H1</sub>-abhängige Zytokine wie IL-2 und IFN- $\gamma$  stärker exprimiert werden als die T<sub>H2</sub>-abhängigen IL-4, IL-5 und IL-10, und somit die Immunantwort in der frühen Phase der Infektion überwiegend vom T<sub>H1</sub>-Typ ist. Weiterhin wurden geschlechtsspezifische Unterschiede im Ausprägungsgrad der Myokarditis bei BALB/c- und B1.Tg.E $\alpha$ -Mäusen beschrieben<sup>80,81</sup>. Männliche Tiere zeigen vorwiegend eine T<sub>H1</sub>-Antwort kombiniert mit stärkeren Myokardschäden im Vergleich zu den weiblichen Versuchstieren, bei denen die T<sub>H2</sub>-Antwort dominiert.

Bei der Applikation von Antikörpern gegen die Korezeptoren der Antigenpräsentierung B7-1 und B7-2 der T<sub>H1</sub>-Zellen in A/J-Mäusen<sup>82</sup> und murinen Kardiomyozytenkulturen<sup>83</sup> konnte eine Besserung der chronischen Myokarditis bei Überwiegen von T<sub>H2</sub>-Zellen festgestellt werden.

Eine deutliche Reduktion der CVB3-Myokarditis in A/J- und BALB/c-Mäusen wurde von Afanasyeva et al.<sup>84</sup> durch die Behandlung mit anti-IL-4-Antikörpern erreicht, so dass die Schädigung eher T<sub>H2</sub>-vermittelt war. Des Weiteren wurde kürzlich in IL-12-defizienten BALB/c-Mäusen gezeigt, dass die Zytokine der T<sub>H1</sub>-Zellen nicht alle konkordant wirken, wobei IL-12 die myokarditischen Läsionen verstärkte und IFN- $\gamma$  sie limitiert<sup>85</sup>. Hingegen zeigten Shioi et al.<sup>86</sup> reduzierte myokardiale Läsionen und gesenkte Mortalität in IL-12-behandelten Mäusen mit EMCV-induzierter Myokarditis.

Während in der Mehrheit der Modelle eine T<sub>H1</sub>-Antwort ein Promotor kardialer Schädigungen bei der Myokarditis ist, und die T<sub>H2</sub>-Antwort hingegen eher protektiv wirkt, scheint in einigen Mausstämmen ein reziproker Effekt durch die T<sub>H</sub>-Subtypen zu bestehen.

## 1.4 Die extrazelluläre Matrix

### 1.4.1 Remodeling der myokardialen extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein komplexes Netzwerk aus Glykoproteinen wie Laminin und Fibronectin, verschiedenen Proteoglykanen und Glucosaminoglykanen und vor allem Kollagenen<sup>87</sup>. Die EZM ist neben dem kontraktilen Apparat eine wesentliche Determinante für die Dehnbarkeit und die Elastizität des Myokards und damit der systolischen und diastolischen Funktion des Herzens. Weiterhin dient die EZM als Substrat für Zelladhäsionen und kann durch Bindung an Integrinrezeptoren die zellulären Funktionen von Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Immunzellen beeinflussen<sup>88</sup>. Bei verschiedenen Erkrankungen des Herzmuskels kommt es zu einer Veränderung der extrazellulären Matrix (EZM)<sup>89,90,91,92,93</sup>. Diese Modifikation vollzieht sich durch ein komplexes Zusammenwirken von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen, deren Regulation nur sehr unvollständig charakterisiert ist.

Die größten Anteile am Gesamtkollagengehalt des Herzens stellen das Kollagen Typ I mit 85% und das Kollagen Typ III mit 11%<sup>94,95</sup>. Kollagen Typ I bildet dicke, parallel angeordnete Fibrillen und wird dominierend in Geweben mit großer mechanischer Beanspruchung exprimiert. Das Kollagen vom Typ III bildet hingegen feine fibrilläre Netzwerke aus und wird besonders in Geweben mit elastischen Funktionen nachgewiesen. Somit scheint das Verhältnis dieser beiden Kollagene für die kardiale Funktion von entscheidender Bedeutung zu sein. Veränderungen des Proteingehalts und Änderungen der mRNA Expression von Kol I und Kol III wurden in verschiedenen Studien untersucht, um die Pathomechanismen von myokardialem Remodeling bei dilatativer Kardiomyopathie und akuter Myokarditis zu analysieren<sup>96,97,98,99</sup>. Dabei fokussierten die klassischen Paradigmen, die zur Erklärung der Entwicklung eines progressiven Remodelings herangezogen wurden, auf Mechanismen, die für einen vermehrten Gehalt an kollagenen Komponenten im Myokard verantwortlich gemacht wurden. Dabei konnte jedoch nicht erklärt werden, warum es trotz erhöhtem Kollagengehalt nicht zu einem steiferen Herzmuskel mit verminderter Compliance kommt, sondern zu einer Dilatation des Herzens. Kürzlich wurden erhöhte Enzymkonzentrationen im Myokard des dilatierten Herzens nachgewiesen, die für den Abbau der EZM verantwortlich sind.

Der Abbau von Komponenten der EZM wird kontrolliert von einer Vielzahl von Proteinasen und deren Inhibitoren. Matrixmetalloproteinasen (MMPs) werden als die wichtigsten Faktoren für die Matrixdegradation *in vivo* angesehen<sup>100</sup>, die in ihrer aktivierten Form von der Gruppe der „tissue inhibitor of metalloproteinases“ (TIMPs)<sup>101,102</sup> inhibiert werden. Zu den potenten MMP-produzierenden Zellen gehören Fibroblasten, Kardiomyozyten, Endothelzellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie viele Tumorzellen<sup>103</sup>.

Zurzeit sind 19 Mitglieder der MMP-Familie bekannt, die alle an der Degradierung von Kollagenen beteiligt sind. So degradieren MMP-1 und MMP-8 (Kollagenasen) die Tripelhelix der Kollagenfibrillen in Gelatinfragmente<sup>104</sup>, die von Gelatinasen wie MMP-2 und MMP-9 weiter abgebaut werden<sup>105</sup>. Stromelysine (MMP-3, MMP-7, MMP-10) haben ein weites Spektrum beim Abbau extrazellulärer Substrate und degradieren sowohl Kollagene<sup>106</sup> als auch Gelatin, Fibronectin, Laminin und Proteoglykane<sup>107</sup>.

Neueste Studien belegten, dass pathologisches, myokardiales Remodeling durch veränderte MMP- und TIMP-Expression hervorgerufen werden kann<sup>108,109</sup> und durch pharmakologische MMP-Inhibition abgeschwächt wird<sup>110,111,112</sup>.

### 1.4.2 Regulation des myokardialen Remodeling

Sowohl die Expression von EZM-Komponenten als auch deren Abbau durch MMPs wird durch Zytokine reguliert. Dies geschieht durch diverse Interaktionen, deren Mechanismen noch nicht detailliert bekannt sind.

Ein entscheidendes Zytokin in der Stimulation der Expression von extrazellulären Matrixbestandteilen ist TGF- $\beta_1$ . TGF- $\beta_1$  erhöht sowohl den Proteingehalt als auch die mRNA Expression von Kollagen Typ I und Typ III und weiterer Matrixkomponenten wie Fibronectin oder Elastin<sup>113,114,115</sup>. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta_1$  die Sekretion von MMPs reduziert und die Sekretion von MMP-Inhibitoren (TIMPs) steigert und somit auch den enzymatischen Abbau der EZM verringert<sup>116,117</sup>.

Ein weiteres wichtiges Zytokin für regulatorische Prozesse der EZM ist TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  wird von einer großen Anzahl von Zellen produziert, darunter NK-, B- und T-Lymphozyten und unter bestimmten Bedingungen auch von Kardiomyozyten<sup>118</sup>. Die Expression wird unter anderem induziert durch Virusinfektion, IL-1, IL-2 oder INF- $\gamma$ , und es wird in der aktivierten

Form durch MMP-ähnliche Enzyme abgebaut<sup>119</sup>. Im Tierversuch mit Ratten führte die Infusion von TNF- $\alpha$  zu einer Abnahme des myokardialen Kollagengehalts<sup>120</sup>. Auch in *in vitro*-Studien mit kardialen und dermalen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowohl zu einer reduzierten Kollagensynthese<sup>121,122</sup> als auch zu einer verstärkten Expression von MMPs führten<sup>123,124</sup>. Zudem wurde von zwei weiteren Arbeitsgruppen beschrieben, dass TNF- $\alpha$  wiederum selbst durch MMPs aktiviert werden kann und diese Aktivierung durch Gabe von MMP-Inhibitoren gehemmt und durch weitere Zugabe von Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysinen wieder mobilisiert werden konnte<sup>125,126</sup>.

Am Herzen zeigt TNF- $\alpha$  einen negativen inotropen Effekt auf die Kontraktilität und wird bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz erhöht nachgewiesen<sup>127</sup>, was somit zumindest teilweise auf die modulatorischen Effekte von TNF- $\alpha$  auf die EZM zurückzuführen ist.

IFN- $\gamma$  wird von T-Lymphozyten und NK-Zellen produziert, besitzt besonders antivirale und immunmodulatorische Eigenschaften, ist jedoch ebenfalls wesentlich an der Regulation von Bestandteilen der EZM beteiligt. Verschiedene Studien belegten anhand von Untersuchungen an kultivierten kardialen<sup>128</sup>, pulmonalen<sup>129</sup> und dermalen Fibroblasten<sup>130</sup>, dass INF- $\gamma$  ebenfalls zu einer Abnahme der Expression der kollagenen Bestandteile der EZM führt und gleichzeitig den Abbau durch MMPs induziert<sup>131,132</sup>.

## 1.5 Einfluss von IL-4 auf die Immunpathogenese

Interleukin-4 induziert die Differenzierung von T<sub>H0</sub>-Zellen in T<sub>H2</sub>-Zellen<sup>133</sup> und somit eine überwiegend humorale Immunantwort (siehe Kap.1.3.2) verbunden mit einer Abschwächung der zellulären Immunantwort und somit der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine.

Ein weiterer Effekt von IL-4 ist die Aktivierung von NK-Zellen<sup>134</sup>. Die Hauptaufgabe von NK-Zellen ist die Abtötung von Tumorzellen und virusinfizierter Zellen sowie die Regulation von Immunantworten. Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wird durch inflammatorische Zytokine wie IL-2 und INF- $\gamma$  verstärkt. Sie selbst produzieren IL-1, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  und fördern somit die Aktivierung weiterer am Endzündungsprozess beteiligter Immunzellen. IL-4 aktiviert zwar die NK-Zellen, inhibiert aber direkt die Produktion von TNF- $\alpha$  in NK-Zellen und Makrophagen, jedoch nicht von IL-1 und INF- $\gamma$ <sup>135</sup>. Für die Expression von INF- $\gamma$  besteht

bei der Behandlung mit IL-4 ein gegensinniger Effekt, die Aktivierung der NK-Zellen führt zu einer verstärkten Expression, hingegen führt die Aktivierung der T<sub>H1</sub>-Antwort zur Hemmung der INF- $\gamma$ -Expression durch Suppression des Zytokinexpressionsmusters der T<sub>H2</sub>-Antwort. Sowohl für die Expression von TNF- $\alpha$  als auch die Expression von INF- $\gamma$  gilt, dass dem modulatorischen Effekt der T-Zell-Antwort ein größeres Gewicht beizumessen ist, da T-Zellen am 10. Tag der CB3V-Infektion gegenüber den NK-Zellen dominieren<sup>28</sup>.

## 1.6 Häodynamische Messungen im Mausmodell

Bei der Diagnosestellung und der Überwachung des Verlaufs kardialer Erkrankungen gehören Untersuchungen zu häodynamischen Veränderungen zur Standarddiagnostik.

Im Tiermodell sind vornehmlich elektrophysiologische Untersuchungen zur akuten CVB3-Myokarditis durchgeführt worden<sup>136,137</sup>, häodynamische Untersuchungen hingegen nur vereinzelt<sup>138,140</sup>. Herzum et al.<sup>138</sup> fanden in EMCV-infizierten DBA/2-Mäusen eine direkte Korrelation zwischen zellulärem Infiltrat und kardialer Dysfunktion, dabei zeigte sich eine verschlechterte Herzfunktion ab dem 5. Tag p.i., die zum Zeitpunkt maximaler, zellulärer Infiltration am 7.–10. Tag p.i. die schlechtesten Werte erreichte.

Watanabe et al.<sup>139</sup> zeigten, dass die Art der Immunantwort auf die Infektion einen deutlichen Einfluss auf die häodynamische Funktion des Herzens hat. Dabei wurde durch Gentransfer von IL-10 in Lewis Ratten mit Autoimmunmyokarditis die Herzfunktion deutlich verbessert.

Dass die Virusinfektion nicht zwingend für die kardiale Dysfunktion notwendig ist, zeigt eine Untersuchung bei Übertragung einer Myokarditis durch Transfer peripherer Blutleukozyten aus Patienten mit viraler Myokarditis auf immuninkompetente SCID-Mäuse, die dabei kardiale Funktionsstörungen aufzeigten<sup>140</sup>.

Letztlich wurde die Rolle der Matrixdegradation durch Gendeletion von TIMP-1 demonstriert, wobei es zu einer fulminanten Verschlechterung der Herzfunktion bei viraler Myokarditis kam<sup>141</sup>.

## 1.7 Problemstellung

Die Untersuchung der viralen Myokarditis beim Menschen ist mit erheblichen Problemen verbunden, da die hohe Inzidenz von einer häufig nicht vorhandenen oder unspezifischen Klinik begleitet wird und somit die Erhebung ausreichend statistisch gesicherter Daten nur schwierig zu gewährleisten ist. Weiterhin sind verschiedene pathologische Mechanismen der Myokarditis, und dabei vor allem die Mechanismen des extrazellulären Remodeling, trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet bislang nicht ausreichend geklärt.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, am Tiermodell mit CVB3 - infizierten BALB/c Mäusen folgende Fragen zu klären:

- Zu welchen Veränderungen in der mRNA-Expression und des kardialen Proteingehaltes der kollagenen, extrazellulären Matrixkomponenten kommt es bei einer CVB3-Myokarditis bei BALB/c-Mäusen? Stehen eventuelle Veränderungen im Einklang mit Veränderungen der kardialen Funktion?
- Wie verändert sich die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$ ? Stehen eventuelle Veränderungen im Einklang mit Veränderungen der EZM?
- Lässt sich durch Behandlung mit IL-4 die Immunantwort modellieren?
- Bewirkt eine eventuelle Verschiebung der T-Zell-Antwort in Richtung T<sub>H2</sub> eine Verbesserung der akuten viralen Myokarditis und Veränderungen in der Struktur der EZM?