

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Kardiologie und Pulmologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*“Die Bedeutung des TIR-domain-containing adaptor protein inducing  
Interferon- $\beta$  (TRIF) bei der viralen Myokarditis im murinen Modell”*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Peter Moritz Becher  
aus Köln

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Tschöpe  
2. Prof. Dr. med. habil. C. Stamm  
3. Prof. Dr. med. U. Laufs

Datum der Promotion: 24. Februar 2012

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Myokarditis . . . . .	1
1.1.1 Definition und historischer Hintergrund . . . . .	1
1.1.2 Epidemiologie . . . . .	2
1.1.3 Ätiologie . . . . .	2
1.1.4 Pathophysiologie . . . . .	3
1.1.5 Klinisches Erscheinungsbild und prognostische Beurteilung . . . . .	4
1.2 Myokarditis im Tiermodell . . . . .	5
1.2.1 Pathogenese der experimentellen viralen Myokarditis . . . . .	5
1.2.2 Akute Phase der experimentellen viralen Myokarditis . . . . .	5
1.2.3 Subakute und chronische Phase der experimentellen viralen Myokarditis . . . . .	6
1.3 Immunsystem . . . . .	8
1.3.1 Spezifisches Immunsystem bei der viralen Myokarditis . . . . .	8
1.3.2 Angeborenes Immunsystem bei der viralen Myokarditis . . . . .	9
1.4 Toll-like Rezeptoren (TLR) . . . . .	11
1.4.1 Toll-like Rezeptoren bei der viralen Myokarditis . . . . .	11
1.4.2 Erkennung von "Pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs) durch Toll-like Rezeptoren . . . . .	13
1.4.3 Toll-like Rezeptor Signaltransduktion . . . . .	14
1.5 Interferone und ihre Funktion bei der viralen Myokarditis . . . . .	18
1.6 Extrazelluläre Matrix und kardiale Umbauprozesse ("Remodeling") bei der viralen Myokarditis . . . . .	20
<b>2 Fragestellung der Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1 Studiendesign . . . . .	23
3.2 Mäusestämme . . . . .	25
3.3 Versuchstierhaltung . . . . .	25
3.4 Infektion durch Coxsackievirus B3 (CVB3) . . . . .	26
3.5 Charakterisierung der hämodynamischen Funktion . . . . .	26
3.5.1 Narkotisierung . . . . .	26
3.5.2 Intubation und Ventilation . . . . .	26
3.5.3 Aufnahme von linksventrikulären Druck- und Volumenkurven mittels Konduktanzkatheterverfahren . . . . .	26
3.5.4 Theoretischer Hintergrund der Konduktanz-Messtechnik . . . . .	28

3.5.5	Protokoll zur Charakterisierung der hämodynamischen Funktion . . . . .	29
3.5.6	Parameter zur Bestimmung der globalen Herzfunktion . . . . .	30
3.5.7	Parameter zur Bestimmung der systolischen Funktion . . . . .	32
3.5.8	Parameter zur Bestimmung der diastolischen Funktion . . . . .	32
3.6	Mortalitätsstudie . . . . .	33
3.7	Molekularbiologische Methoden . . . . .	34
3.7.1	RNA-Extraktion . . . . .	34
3.7.2	Reverse Transkription . . . . .	35
3.7.3	“Real Time”-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), TaqMan <sup>®</sup> -PCR . . . . .	36
3.7.4	Bestimmung der Viruslast . . . . .	38
3.7.5	Plaque Assay zur Konzentrationsbestimmung des Coxsackievirus B3 (CVB3) . . . . .	40
3.8	Immunhistochemie . . . . .	42
3.8.1	Generierung von Gefrierschnitten . . . . .	42
3.8.2	Theoretischer Hintergrund der immunhistochemischen Färbungen . . . . .	42
3.8.3	Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) . . . . .	42
3.8.4	EnVision <sup>®</sup> -Detektionsmethode . . . . .	45
3.8.5	Indirekte Methode . . . . .	47
3.8.6	“DeadEnd Colorimetric TUNEL”-System . . . . .	48
3.8.7	Verfahren der farbkodierten und digitalen Bildanalyse . . . . .	49
3.9	Zymographie . . . . .	51
3.9.1	Proteinextraktion . . . . .	51
3.9.2	Konzentrationsbestimmung der Proteine . . . . .	52
3.10	Polyacrylamid (SDS-PAGE)-Gelelektrophorese . . . . .	52
3.11	Statistische Auswertung . . . . .	54
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
4.1	Hämodynamische Funktion . . . . .	63
4.2	Körper- und Herzgewichte . . . . .	65
4.3	Mortalitätsstudie . . . . .	66
4.4	Hämalaun-Färbung und Klassifikation der viralen Myokarditis . . . . .	66
4.5	Kardiale Immunzellinfiltration . . . . .	71
4.6	Kardiale Zytokinexpression . . . . .	71
4.7	Kardiale Zelladhäsionsprozesse . . . . .	73
4.8	Kardiale Viruslast und Funktion des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR) . . . . .	73
4.9	Kardiale Apoptose . . . . .	76
4.10	Kardiale Umbauprozesse (“Remodeling”) . . . . .	76
4.11	Interferon- $\beta$ vermittelte Immunantwort und Mortalitätsstudie . . . . .	79
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
5.1	Hämodynamische Funktion . . . . .	83

5.1.1	Parameter unter Basalbedingungen . . . . .	84
5.1.2	Parameter der globalen Funktion . . . . .	84
5.1.3	Parameter der systolischen Funktion . . . . .	85
5.1.4	Parameter der diastolischen Funktion . . . . .	85
5.2	Körper- und Herzgewichte . . . . .	87
5.3	Kardiale Inflammation . . . . .	87
5.3.1	Immunzellinfiltration . . . . .	87
5.3.2	Zytokinexpression . . . . .	88
5.3.3	Regulation von Zelladhäsionsmolekülen . . . . .	89
5.4	Kardiale Apoptose . . . . .	90
5.5	Kardiale Viruslast und Funktion des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR)	91
5.6	Kardiale Umbauprozesse ("Remodeling") . . . . .	92
5.7	Mortalität . . . . .	93
5.8	Methodenkritik . . . . .	94
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>98</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>113</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>115</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>116</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>117</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>118</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>119</b>
	<b>Wissenschaftliche Auszeichnungen</b>	<b>121</b>
	<b>Wissenschaftliche Vorträge und Präsentationen</b>	<b>122</b>

# Abkürzungsverzeichnis

$dP/dt_{max}$	Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit
$dP/dt_{min}$	Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit
APC	“Antigen presenting Cell”
BCA	Bicinchonininsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CD	“Cluster of Differentiation”
cDNA	“complementary” Desoxyribonukleinsäure
CO	“Cardiac output”, Herzzeitvolumen
CVB3	Coxsackievirus B3
DAF	“Decay Accelerating Factor”
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang- DNA
dsRNA	Doppelstrang- RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDPVR	“End-diastolic pressure-volume relationship definition”
EF	Ejektionsfraktion
EMCV	Enzephalomyokarditisvirus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESPVR	“End-systolic pressure-volume relationship definition”
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAM	Fluorescein
HR	Herzfrequenz
HRP	“Horse raddish” Peroxidase
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ICAM	“Intercellular Adhesion Molecule”
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B	I $\kappa$ - Kinase beta
IKK	I $\kappa$ - Kinase
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
IP-10	“IFN-inducible protein 10”
IRAK	Interleukin Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	“Interferon regulatory factor”

JAK	“Janus tyrosine kinase”
ku	“kilo units”
LLR	Leucin-reiche Region
LPS	Lipopolysacharid
LV	Linker Ventrikel
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEDV	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESP	Linksventrikulärer endsystolischer Druck
LVESV	Linksventrikuläres endsystolisches Volumen
MCP	“Monocyte Chemotactic Protein”
MHC	“Major Histocompatibility Complex”
min	Minuten
MIP	“Macrophage Inflammatory Protein”
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrixmetallproteinasen
MMTV	Murin mammlärer Tumor Virus
ml	Milliliter
mRNA	“messenger” RNA
MyD88	“Myeloid differentiation factor 88”
NF- $\kappa$ B	“Nuclear transcription factor kappa B”
NK	“Natural Killer”
nm	Nanometer
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthetase
P	Druck
PAMP	“Pathogen-associated molecular patterns”
p.f.u.	“Plaque forming units”
PBS	“Phosphat Buffered Solution”
PRR	“Pathogen recognition receptor”
RANTES	“Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted”
RIPA-Puffer	“Radio Immuno Precipitation Assay”-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Drehungen pro Minute
RSV	“Respiratory syncytial virus”
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	“Real-time” (Echtzeit)-Polymerasen-Kettenreaktion
SDF	“Stromal cell-Derived Factor”
SDS-PAGE	“Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”
Sek	Sekunden
ssRNA	Einzelstrang-Ribonukleinsäure



Stat	“Signal transducers and activators of transcription”
SV	Schlagvolumen
t	Zeit
Tau	Zeitkonstante des Druckabfalls im linken Ventrikel
TBK	“TANK-binding Kinase”
TBS	“Tris Buffers Saline”
TGF	“Tumor Growth Factor”
TIMP	“Tissue Inhibitor of Metalloproteinases”
TIR	Toll-Interleukin-Rezeptor
TIRAP	“Toll-IL-1- receptor domain-containing adaptor protein”
TLR	“Toll-like” Rezeptoren
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF	“TNF receptor-associated factor”
TRAM	“TRIF-related adaptor molecule”
TRIF	“Toll-IL-1-Rezeptor domain-containing adapter inducing interferon-beta”
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyk	Tyrosinkinase
V	Volumen
VCAM	“Vascular Cell Adhesion Molecule”
VP	Virales Protein
vs.	versus
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

# 1 Einleitung

## 1.1 Myokarditis

### 1.1.1 Definition und historischer Hintergrund

Bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts fand die Erkrankungsbezeichnung Myokarditis Eingang in die medizinische Literatur [1]. Hierbei diente der Begriff vornehmlich der medizinischen Charakterisierung von Herzerkrankungen, welche nicht mit Herzklappenveränderungen einhergingen. Auf einen Zusammenhang zwischen einem Infektionsereignis und einer chronischen Herzerkrankung wies als erster der renommierte französische Mediziner (Internist) Baron Jean-Nicolas Corvisart des Marets (\* 15. Februar 1755 in Dricourt, Département Ardennes; † 18. September 1821 in Courbevoie – Hauts-de-Seine) im Jahre 1806 hin [2]. Er lieferte – soweit bekannt – die erste Beschreibung einer entzündlichen Herzerkrankung in Verbindung mit einer progredienten kardialen Dysfunktion.

In den folgenden Jahrzehnten kam es zu bedeutenden Fortschritten in der Entwicklung pathogenetischer Mechanismen zur Aufklärung des Krankheitsbildes der Myokarditis. Ab Mitte der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde eine Standardisierung der histologischen Diagnostikverfahren mittels der Dallas-Kriterien [3] und der Einführung der endomyokardialen Biopsie zur *in vivo*-Diagnostik etabliert. Neue medizinische Erkenntnisse in Bezug auf das Verständnis immunologischer Prozessen des menschlichen Körpers und auch die Durchführung von tierexperimentellen Studien zur Erforschung der Myokarditis trugen maßgeblich zum Anteil am heutigen Forschungs-, Diagnostik- und Therapiestand bei [4-5]. Folgt man den klassischen histopathologischen Dallas-Kriterien, so müssen zur Sicherstellung der Diagnose Myokarditis in einer Myokardbiopsie inflammatorische Zellen begleitet von nekrotischen Kardiomyozyten auf demselben mikroskopisch histologischen Präparateschnitt nachgewiesen werden [6].

Der stete Fortschritt molekulargenetischer und immunbiologischer Methoden, aber auch die Entdeckung unbekannter Erkrankungsentitäten und neuartiger Diagnoseverfahren machten eine fortwährende Aktualisierung des anzulegenden Klassifikationssystems erforderlich [7]. Die letzte Aktualisierung der Klassifikation der Kardiomyopathie wurde im Jahre 2006 durch die "American Heart Association" vorgestellt [6]. Als Myokarditis wird hiernach die Inflammation des kardialen Gewebes durch Exposition entweder durch exogene Antigene wie z.B. Viren, Bakterien, Parasiten und Medikamente oder endogene Trigger, wie z.B. Autoantikörper gegen körpereigene Antigene, definiert [8].

Nach aktueller Definition des Weltverbandes für Herzerkrankungen "World Heart Federation" wird die aktive Myokarditis quantitativ durch eine Infiltration von  $> 14$  Lymphozyten  $\pm$  Makrophagen pro  $\text{mm}^2$  und gleichzeitige Zellnekrose und Ödem charakterisiert [9].

### 1.1.2 Epidemiologie

Die Berechnung einer präzisen Epidemiologie der Erkrankung Myokarditis stellt sich nach wie vor nicht zuletzt deshalb als äußerst schwierig dar, weil aufgrund der variablen und teils asymptomatischen klinischen Verläufe der Erkrankung eine relativ hohe Dunkelziffer vermutet werden muss [6]. Gerade wegen der subklinischen Krankheitsverläufe kann die Bestimmung der Inzidenz und Prävalenz nur defizitär ausfallen. Die Gesamtinzidenz für die Entstehung einer Myokarditis viraler Genese wird generell auf drei bis sechs Prozent geschätzt [10].

Nach aktuellen Erkenntnissen beläuft sich die Inzidenz der Erkrankung in den USA auf acht bis zehn Personen bezogen auf 100.000 Mitglieder der dortigen Bevölkerung [11]. Die Prävalenz der Erkrankung Myokarditis ließ sich bei Obduzierten mit ein bis fünf Prozent feststellen [12]. Saphier und andere konnten bei ein bis neun Prozent der Obduzierten in routinemäßig durchgeführten Obduktionen myokardiale Entzündungsprozesse verifizieren [13-15].

In einer Studie, deren Gegenstand die Ergebnisse pathologischer Untersuchungen an jungen, an einem plötzlichen Herztod verstorbenen Erwachsenen waren, wurde eine Inzidenz der Erkrankung von 8,6% nachgewiesen [11].

### 1.1.3 Ätiologie

Die Entstehung myokardialer Entzündungsprozesse lässt sich auf eine Vielzahl potentieller Verursachungsquellen zurückführen. Die häufigste Ursache für die Genese einer Myokarditis sind virale Erreger. Als besonders häufig sind insoweit die Coxsackieviren der Gruppe B (CVB) und weitere Gattungen der Enteroviren, die Adenoviren [16], das Parvovirus B19 [17], das Hepatitis-C-Virus [18], das humane Immundefizienz-Virus (HIV) [19] und das Influenzavirus [20] auszumachen.

Die Coxsackieviren sind als Unterklassifizierung der Picornaviren der Gattung der Enteroviren zuzuordnen. Sie werden in zwei Gruppen unterteilt [21]. In der Gruppe A sind bis heute 24, in der Untergruppe B sechs verschiedenartige Serotypen identifiziert worden [22]. Vom biologischen Aufbau her handelt es sich bei dem Coxsackievirus um ein ikosaedrisches Kapsid mit einem Durchmesser von 30nm. Es umschließt das Genom des ansonsten hüllenlosen Virus. Das Genom des Coxsackievirus wird durch einzelsträngige Ribonukleinsäure (ssRNA) mit einem Pulsstrang in einer Größe von 7,5 Kilobasen gebildet. Das Genom kodiert hierbei das "Kapsid precursor protein V0", die Proteasen 2A und 3C und eine RNA-abhängige RNA-Polymerase [23-24]. "Natürlicher Wirt" des Virus ist der Mensch [22]; doch ist auch ein Befall von Tieren möglich. Die Übertragung des Coxsackievirus erfolgt fäkal-oral bzw. durch Tröpfcheninfektion [22]. Bei Mäusen, die Gegenstand der vorliegenden Studie waren, ließ sich wie beim Menschen nach einer Coxsackievirus-Infektion ein stringent simultaner Krankheitsverlauf feststellen [25]. Legt man an die Virenklassen als Auslöser für die Entstehung einer viralen Myokarditis einen geographischen Maßstab an, so ergeben sich unterschiedliche Prävalenzen. Enteroviren stellen besonders in Nordamerika den häufigsten Erreger der Myokarditis dar, während etwa in Westeuropa das Parvovirus-B19 [17] und in Japan

das Hepatitis-C-Virus eine erhöhte Relevanz für die Pathogenese der Myokarditis besitzt [18,26]. Was den durch Vireneinfluss gefährdeten Personenkreis angeht, so treten bei Neugeborenen und Kindern vor allem die Coxsackieviren als Verursacher einer Myokarditis auf [27].

#### 1.1.4 Pathophysiologie

Der Viruseintritt des Coxsackievirus erfolgt zumeist in der Ausdehnung des Magen-Darm-Trakts. Die primär infizierten Organsysteme sind die Lymphknoten, die Milz und im weiteren Verlauf das Pankreas.

Bereits zwei Stunden nach Viruseintritt lässt sich das Virus an diesen Stellen detektieren [28]. Von dort aus entwickeln sich die weiteren Replikationsvorgänge des Virus. Über das vorhandene Blut- und Lymphsystem vollzieht sich sodann die Verteilung der Virusinfektion in die sekundären Zielorgane wie Leber, Gehirn und Herz.

Die frühesten Replikationsprozesse des Virus sind in den sekundär lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten inmitten der Zellpopulationen der Makrophagen, der B-Lymphozyten und T-Lymphozyten zu identifizieren. Dies spricht dafür, in den genannten Immunzellpopulationen relevante Viruswirte in den infizierten Endorganen anzusehen [29]. Die primäre Bindung des CVB3 erfolgt an den Komplementfaktor C3 der zu infizierenden Zelle. Infolge der biologischen Interaktionen zwischen Virus und Wirtszelle kommt es zu einer Viruspersistenz in den Lymphknoten. In den Lymphknoten selbst werden die B-Lymphozyten infiziert; über sie wird die Virusinfektion zur weiteren Verbreitung in den Organismus hineingetragen [30]. Bei der Infektion anderer Organsysteme wie dem Herzen macht sich das CVB3 zur Infiltration in die Zielzelle die Funktion einer Rezeptorbindung bzw. die Bindung an einen Rezeptorkomplex zu Nutze. Bei diesem Infiltrationsprozess der Infektion durch CVB3 fällt dem Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) eine entscheidende Rolle zu [30]. Weiterhin bedient sich das CVB3 zur Infektion des Korezeptors "Decay Accelerating Factor" (DAF), mit dem es unter Einbeziehung des CAR zu einer Rezeptorkomplexbildung kommt.

Der CAR ist in der Zonula occludens zwischen endothelialen und epithelialen Zellen lokalisiert. Der CAR entstammt der Familie der Immunglobuline (Ig). Er verfügt zugleich über Eigenschaften von Zelladhäsionsmolekülen [29]. Erhöhte Verteilungsfrequenzen des CAR in Bereichen außerhalb der Zonulae occludentes werden unter anderem über die Expression der Zytokine wie Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) relevant moduliert [31].

Im menschlichen Organismus wird der CAR im Herzen, im Gehirn, in der Prostata, in der Leber und im Magen-Darm-Trakt exprimiert [32]. In einer weiteren Studie untersuchten Shi et al. die Rolle des CAR bei der viralen Myokarditis. Sie konnten zeigen, dass die Eliminierung des CAR in adulten Herzen im transgenen Mausmodell in der Lage ist, den Viruseintritt effizient zu blockieren und relevant in die Pathogenese der viralen Myokarditis einschließlich der kontraktilen Dysfunktion involviert ist [31].

Durch die Bindung des CVB3 an CAR kommt es zum Eintritt von Virus-RNA in die Zielzelle. Dort finden Transkriptionsprozesse des Virus statt, die alsdann die Generierung von Proteinen des

infektiösen Virus auslösen.

Im Speziellen werden hierbei vier strukturelle Proteine des Kapsids (VP1-4), virale Proteasen und Polymerasen synthetisiert [33]. Im Herzen kommt es durch CVB3 unter Initialisierung des CAR zur Infektion der dort angesiedelten Kardiomyozyten. Das Virus kann in der akuten virämischen Phase der Infektion zu einer direkten Schädigung der Kardiomyozyten führen. Bei diesem Schädigungsprozess des Herzens werden Zellproteine wie Dystrophin und andere relevante Transkriptionsfaktoren durch virale Proteasen regradiert und destruiert. Des Weiteren unterbindet das infiltrierte Virus die natürlichen Synthesemechanismen der Wirtszelle und repliziert sich darin. Anschließend initiiert das Virus Prozesse der Zelllysierung oder die Induktion der Zellapoptose in der Zielzelle. Letztlich kommt es zur erneuten Freisetzung des Virus aus der Zelle und zur erneuten Infektion benachbarter Zellen [27].

### **1.1.5 Klinisches Erscheinungsbild und prognostische Beurteilung**

Die klinische Präsentation der viralen Myokarditis unterliegt breiter Varianz und stellt einen der Hauptgründe für den plötzlichen Herztod junger Erwachsener unterhalb eines Lebensalters von 40 Jahren dar [34].

Das klinische Erscheinungsbild reicht von febrilen Erkrankungsformen bis hin zur akuten Herzinsuffizienz mit hochsymptomatischer linksventrikulärer (LV) Dysfunktion. Die klinische Präsentation lässt erkennen, dass die Erkrankung auch andere Patientengruppen erfasst. Unter der akuten Form der Myokarditis mit gleichzeitiger Multiorgandysfunktion leiden wesentlich häufiger Neugeborene und Heranwachsende. Ein milderer Krankheitsverlauf der Myokarditis wird beim erwachsenen Patienten festgestellt [35]. Im Verlauf einer spontanen Viruseliminierung beim erwachsenen Patienten, der lediglich unter einer geringgradigen kardialen Dysfunktion leidet, kommt es in der Regel zur vollständigen Remission der Myokarditis und deren Symptomatik [36]. Die Patientengruppe, die unter einem schwerwiegenden Krankheitsverlauf der akuten Myokarditis und einer linksventrikulären Dysfunktion leiden, weisen eine deutlich schlechtere Prognose für den weiteren Krankheitsverlauf auf. Patientengruppen, die unter einem schwerwiegenden Krankheitsverlauf leiden, lassen zu einem Drittel die Genese einer chronischen Herzinsuffizienz erkennen oder weisen eine erhöhte Herztransplantations- und Sterberate auf [37].

Myokarditis und inflammatorische Kardiomyopathie werden folgendermaßen klassifiziert [27,38]:

- Fulminante Myokarditis, mit linksventrikulärer Dysfunktion und Herzinsuffizienz innerhalb von 2-3 Wochen nach einer viralen Infektion.
- Subakute Myokarditis, mit mäßig eingeschränkter linksventrikulärer Funktion und unspezifischen Symptomen.
- Chronisch-aktive Myokarditis, mit mäßig eingeschränkter LV-Funktion und unspezifischen Symptomen. Endomyokardiale Biopsie zeigt eine andauernde Inflammation, myokardialen Schaden und aktive Bildung von Narbengewebe.
- Chronisch-persistierende Myokarditis, mit normaler LV-Funktion und atypischen Symptomen. In der Biopsie lässt sich eine persistierende Inflammation nachweisen.

## 1.2 Myokarditis im Tiermodell

Eine Reihe tierexperimenteller Studien, insbesondere murine Modelle, führten zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der viralen Myokarditis. Diesbezüglich wurde vor allem die CVB3-induzierte Myokarditis untersucht.

Mit der vorliegenden Studie soll insbesondere die Entwicklung der Myokarditis anhand eines experimentellen Tierversuchs einer näheren Untersuchung hinsichtlich der Bedeutung von "TIR-domain-containing Adapter inducing interferon- $\beta$  (TRIF) und seiner Signalwege und Mediatoren unterzogen werden.

### 1.2.1 Pathogenese der experimentellen viralen Myokarditis

Die Pathogenese der experimentellen Myokarditis im hier verfolgten und analysierten Mausmodell vollzieht sich grundsätzlich in drei Phasen:

1. Akute Phase der viralen Myokarditis (0. – 3. Tag *post infectionem*)
2. Subakute Phase der viralen Myokarditis (4. – 14. Tag *post infectionem*)
3. Chronische Phase der viralen Myokarditis (ab dem 15. Tag *post infectionem*)

### 1.2.2 Akute Phase der experimentellen viralen Myokarditis

Nach gesicherter Erkenntnis finden sich bereits innerhalb der ersten 72 Stunden nach intraperitonealer Infektion unter Einsatz kardiotropher Viren, hier CVB3, histologische Veränderungen in Gestalt einzelner nekrotischer Kardiomyozyten in Abwesenheit eines zellulären Infiltrats [34,39-40]. Ferner sind bereits ab dem 3. Tag *post infectionem* ein erhöhter Gehalt von mRNA-Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL6, IL-1 $\beta$  und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [41-42] sowie ein

erhöhtes Vorkommen Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen nachzuweisen [43-44]. Dies unterstützt die Annahme, dass Schädigungen des myokardialen Gewebes in der akuten Phase der Krankheitsgenese entscheidend auf virale Prozesse zurückzuführen sind [45-47].

Weiterhin konnte mit diesem experimentellen Tiermodell belegt werden, dass Enteroviren bezüglich ihres Replikationszyklus bereits infizierte Zellen in die Apoptose überführen [48]. Über *in vitro* Untersuchungen an isolierten humanen Herzmuskelzellen wurden nach CVB3-Infektion Zelluntergänge nachgewiesen. Hierbei wurde eine direkte Pathogenität durch enterovirale Proteine festgestellt [49].

### 1.2.3 Subakute und chronische Phase der experimentellen viralen Myokarditis

In der subakuten Phase der experimentellen Myokarditis wird vornehmlich die Genese eines entzündlichen Infiltrats im infizierten Herzmuskelgewebe beobachtet [49]. Das Infiltrat setzt sich überwiegend aus Natürlichen Killerzellen, "Cluster of differentiation" (CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) zusammen.

Zu Beginn der subakuten Phase überwiegt die Anzahl der NK-Zellen, wobei sich im weiteren Verlauf der Erkrankung eine Erhöhung im Gehalt von CD8<sup>+</sup>-Zellen nachweisen lässt. Plasmazellen und B-Lymphozyten sind in dieser Entwicklungsphase nur vereinzelt auszumachen [49].

Eine gewichtige Bedeutung scheint in der Pathogenese der Myokarditis der Art und Weise der Aktivierung und Produktion inflammatorischer Zytokine zuzukommen. Seko und andere haben die mRNA-Expression von verschiedenartigen Zytokinen 14 Tage nach CVB3-Infektion in sogenannten C3H/HE-Mäusen beobachtet und beschrieben. Hierbei wurde im Speziellen eine erhöhte Expression inflammatorischer Zytokine IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  bis zum siebten Tag *post infectionem* festgestellt. Hieraus folgerten Seko et al., dass die erwähnten pro-inflammatorischen Zytokine von kardialen Fibroblasten, Endothelzellen und Kardiomyozyten produziert werden [50]. Im Weiteren wurde eine signifikant erhöhte Sezernierung inflammatorischer Zytokine wie IL-2, IL-4 und IL-10 in der akuten Phase nach der Infektion registriert. Ebenso wurden erhöhte Expressionen von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  nach dem 5. Tag, sowie am 14. Tag *post infectionem* nachgewiesen. Es erscheint indessen nicht ausgeschlossen, dass diese gesteigerte Expression der inflammatorischen Zytokine ihren Ursprung in einer erhöhten myokardialen Zellanzahl oder in einer viralen Stimulation hatte [40,51].

Andere Untersuchungen haben bewiesen, dass eine erhöhte Expression der Interleukine IL-1 und IL-2 zu einer Exazerbation der viralen Myokarditis führen kann [52]. Mit Hilfe einer biologischen Blockade dieser Interleukine konnte Genese und Fortschreiten einer Myokarditis eingeschränkt bzw. die Mortalität durch die Myokarditis verringert werden [53-54]. Ferner konnte durch Studien nachgewiesen werden, dass IL-6 unter anderem ein relevanter Modulator der Aktivierung von Makrophagen ist. Weiterhin wurde ein protektiver Einfluss von IL-6 in der Akutphase der Myokarditis festgestellt [55]. Die Substitution mit zusätzlichem IL-6 in der Akutphase führte zu einer signifikanten Reduktion infiltrativer Immunzellen, der myokardialen Gewebenekrose, der Viruslast im Herzmuskel und der Mortalität nach viraler Infektion [55,56]. Anhaltende Substitution

in der subakuten und chronischen Phase der experimentellen Myokarditis durch IL-6 führte zu einer gesteigerten Virämie und zur Progression der myokardialen Schädigung [57]. Ebenso konnte eine Modulation der hämodynamischen Funktion durch die verschiedenartige Expression von Zytokinen gezeigt werden.

Die Expression der inflammatorischen Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 wirkt durch die Stimulierung der Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS) indirekt negativ-inotrop [58]. Überdies wurde durch vasokonstriktive Effekte des Endothels mittels der Blockade von "Tumor growth factor" (TGF- $\beta$ ) eine Verbesserung der diastolischen Herzfunktion erzielt [59-60].

Die Bedeutung der Zytokinexpression in der Pathogenese der viralen Myokarditis muss differenziert beleuchtet werden. Die Zytokine bergen vielfältige biologische Funktionsmöglichkeiten in sich, die durch die Expression anderer Chemokine und Zytokine zusätzliche, verschiedenartige Modulationen erfahren können [49]. Weiterhin wirkt sich die Expression inflammatorischer Zytokine bei der Regulation der extrazellulären Matrix (EZM) und der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren spezifischer Inhibitoren nachhaltig aus [61].

Bezüglich der Viruslast in der experimentellen Myokarditis ist festzustellen, dass die Viruslast bis hin zum vierten Tag nach Virusinfektion ihren Höhepunkt erreicht [62]. Zudem kommt es zum Anstieg von Virusantikörpern bis zum achten bis zehnten Tag *post infectionem*. Der Höhepunkt der viralen Antikörperproduktion ist um den 14. Tag nach Infektion zu verzeichnen. Hierbei korreliert der ansteigende Antikörpertiter mit der Eliminierung des Virus im Herzmuskelgewebe [34,62-63]. Während der chronischen Phase der experimentellen Myokarditis werden 90 Tage nach Virusinfektion bei DBA/2-Mäusen neben einer Dilatation des linken Ventrikels eine erhöhte linksventrikuläre Hypertrophie sowie verstärkte fibrotische Umbauprozesse im infizierten Herzmuskelgewebe beobachtet. Diese Auswirkungen waren jedoch nicht mehr mit einem erhöhten Vorkommen inflammatorischer Infiltrate im Herzmuskelgewebe assoziiert. Die beschriebenen inflammatorisch bedingten Veränderungen gingen nicht mit der Expression von IL-1 einher und kommen den myokardialen Schädigungen von Patienten nahe, welche unter einer dilatativen Kardiomyopathie leiden [64-65]. Noch nicht gänzlich gesichert ist, ob am Prozess der unspezifischen Immunreaktion auch Makrophagen durch den Abbau lysierter Kardiomyozyten und durch ihre Funktion der Antigenpräsentierung relevant beteiligt sind. Unterstellt man dies jedoch, so sind zelluläre und auch humorale Kompartimente der Immunantwort in der Genese kardialer Schädigungen in der chronifizierten Phase der Myokarditis involviert [66].

Durch eine Gabe von IL-1 und TNF- $\alpha$  konnte eine Chronifizierung der experimentellen Myokarditis induziert werden [66].

Von Bedeutung ist auch die Persistenz des Virus in seinen Auswirkungen in extrakardialen Organen wie Pankreas, Leber und Milz sowie hinsichtlich der Exazerbation dieser myokardialen Erkrankung [67-69]. Im Übrigen kann eine weiterführende oder periodische Sezernierung chronisch infizierter infiltrativer Immunzellen zu einer Persistenz der Virusinfektion im Herzmuskelgewebe führen [70].



## 1.3 Immunsystem

Zur Abwehr pathogener Krankheitserreger wie Parasiten, Bakterien, Viren, Pilzen und andersartigen schädlichen Stoffen oder pathologisch veränderter körpereigener Zellen stellt der menschliche Organismus ein Immunsystem zur Verfügung. Die tragende Funktion des Immunsystems liegt in der Verteidigung des Organismus gegenüber Krankheitserregern.

Zur Erkennung und zur gezielten Elimination von Krankheitserregern setzt das Immunsystem unspezifische und spezifische Abwehrmaßnahmen ein. Die unspezifische Antwort des Immunsystems ist dem angeborenen Immunsystem zuzuordnen. Die spezifische Antwort des Immunsystems hingegen ist dem erworbenen, adaptiven Immunsystem zugehörig. Das angeborene Immunsystem einerseits und das erworbene Immunsystem andererseits stehen in engem interaktivem Zusammenhang und bedingen sich gegenseitig. Entscheidend durch die Interaktion verschiedener Rezeptorengattungen, Induktion von Zytokinen und die Aktivierung humoraler Faktoren wird mittels des angeborenen und des adaptiven Immunsystems eine komplexe Immunantwort des Körpers ermöglicht [71-72] .

### 1.3.1 Spezifisches Immunsystem bei der viralen Myokarditis

Die spezifische oder adaptive Immunabwehr ging im Laufe der Phylogenese der Wirbeltiere aus dem angeborenen Immunsystem hervor. Dieses System zeichnet sich neben einem ausgeprägten Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern durch eine hohe Antikörpervielfalt, ein immunologisches Gedächtnis und die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Molekülen aus.

Dem spezifischen Immunsystem ist in Sonderheit die Funktion zugewiesen, fremdartige und pathogene spezifische Strukturen, die Antigene, zu erkennen. An diesem Erkenntnisprozess sind hoch spezifische Rezeptoren, Antikörper als humorale sowie B- und T- Lymphozyten als zelluläre Bestandteile beteiligt [73-74].

Bei B-Zellen bestehen die Rezeptoren aus membranständigen Immunglobulinen, deren Vielfalt auf der Fähigkeit zu einem hohen "Rearrangement"(Umgruppierung) beruht. Die spezifischen T-Zell-Rezeptoren der T-Zellen hingegen erkennen Antigene erst nach Prozessierung und über Präsentation mit "Major Histocompatibility Complex"(MHC)-Molekülen durch antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und B-Lymphozyten) [31,75].

Im Krankheitsverlauf der viralen Myokarditis erfolgt die Elimination des CVB3 in der Mehrzahl der Fälle durch die Produktion neutralisierender Antikörper über B-Lymphozyten. Ab dem vierten Tag *post infectionem* konnten diese Antikörper im murinen Modell detektiert werden und gewannen damit Relevanz hinsichtlich der Viruskontrolle im infizierten Organismus. Im Mausmodell der CVB3-induzierten Myokarditis von B-Lymphozyten-defizitären Mäusen weisen eben diese einen erhöhten Virustiter und das Bild der dilatativen Kardiomyopathie auf [73]. Im Krankheitsbild der

humanen Agammaglobulinämie zeigt sich bei Patienten eine chronisch persistierende Infektion nach CVB3- und Enterovireninfektion [30]. Auf der anderen Seite dienen in der akuten Phase der CVB3-induzierten Myokarditis die B-Lymphozyten als eine Art Reservoir des Virus für weitere opportunistische Infektionen anderer Zellarten im myokardialen Gewebe [76]. Die Relevanz der T-Lymphozyten in der akuten Myokarditis muss man als vielseitig und komplex einstufen. In Mausmodellen, bei denen die Versuchstiere unter Defizienz von CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-Zellen litten, zeigte sich, dass diesen Zellpopulationen in der Pathogenese der viralen Myokarditis Relevanz beigemessen werden muss und sie in den Prozess der myokardialen Schädigung nach Virusinfektion involviert. Ferner erwiesen sich die Elimination des Virus und die Viruskontrolle in Mäusen mit Thymus-Defizienz als stark beeinträchtigt [77]. Der Vollständigkeit halber ist darauf hinzuweisen, dass das Fehlen von CD4<sup>+</sup>-Zellen einen benefitären Verlauf während einer Myokarditis fördert. Das Fehlen von CD8<sup>+</sup>-Zellen hingegen führte zu einer Exazerbation der Erkrankung [78]. Eine Elimination beider Zellarten hatte einen protektiven Einfluss während der Genese der viralen Myokarditis. Diese Erkenntnis muss jedoch insofern relativiert werden, als eine hohe Varianz der Wirkungsweise der Zellen in den verschiedenartigen Mausstämmen festzustellen war [79]. Als Zwischenergebnis lässt sich hiernach festhalten, dass die spezifische zelluläre Immunantwort nach viraler Infektion auf der einen Seite protektiv sein kann und auf der anderen Seite zur Exazerbation der Myokarditis beitragen kann.

### **1.3.2 Angeborenes Immunsystem bei der viralen Myokarditis**

Das angeborene Immunsystem stellt den ältesten Teil des Immunsystems dar und nimmt die Wächterfunktion des Immunsystems wahr. Bei Erkennen selbst breiterer Spektren mikrobieller Krankheitserreger reagiert das System und wird unverzüglich zur Abwehr aktiviert.

Die Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Natürliche Killerzellen) des angeborenen Immunsystems exprimieren diverse Rezeptoren der sogenannten "Pathogen Recognition Receptors" (PRRs), zu denen auch die "Toll-like" Rezeptoren (TLR; Toll-ähnliche Rezeptoren) gehören, die charakteristische Moleküle von Pathogenen gezielt verifizieren können. Eben durch das Erkennen der viralen oder bakteriellen "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs) mittels der TLR-Familie wird die angeborene Immunantwort maßgebend induziert [80]. Die Aktivierung der TLRs initiiert über intrazelluläre Signalkaskaden die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Interferone des Typs I zur Wirtsabwehr [81]. Über diesen Prozess wird die Migration infiltrativer Immunzellen moduliert und zu den durch Inflammation betroffenen Arealen hingeleitet. Zugleich werden von einer Vielzahl verschiedenartiger Zellgattungen hämatopoetischen bzw. nicht-hämatopoetischen Ursprungs inflammatorische Zytokine exprimiert, die sowohl pro-inflammatorische (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  und Interferone) als auch anti-inflammatorische Effekte (IL-4 und IL-10) haben können.

Die wichtigste Funktion der Zytokine im hier relevanten Zusammenhang liegt in der Modulation der unspezifischen und spezifischen Immunreaktion des Organismus [82]. Die höchste Expression der Zytokine findet sich in Immunzellen, die in Abwehrprozesse involviert sind.

Die spezifische Expression der Zytokine wird unter anderem durch die Bindung an spezielle Rezeptoren reguliert. Die unterschiedlichen Aktivierungsprozesse dieser Rezeptoren führen über regulatorische Effekte der entsprechenden Gene von spezifischen Transkriptionsfaktoren zu einer verstärkten Migration von Immunzellen im Bereich der Schwerpunkte der Immunreaktion. Dies hat die Expressionserhöhung der Adhäsionsmoleküle wie "Inter-cellular adhesion molecule" (ICAM) und "Vascular-cell adhesion molecule" (VCAM) auf der Zelloberfläche von Endothelzellen zur Folge. Während der Genese einer durch CVB3-induzierten Myokarditis werden die Viruspartikel durch Toll-like Rezeptoren ausgemacht, welche erhöht auf Makrophagen (CD68<sup>+</sup>-Zellen) und "Antigen-presenting cells" (APC) exprimiert werden.

Die Induktion der Aktivierung der intrazellulären Signalwege der TLRs fördert eine erhöhte Produktion von Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , und IFN- $\gamma$  und führt zur Anlockung von Immunzellen an den Ort der Immunreaktion. Schließlich ist bezüglich der inflammatorischen Antwort des Immunsystems nicht nur die Elimination von Krankheitserregern, sondern auch die Genese der Erreger-spezifischen angeborenen Immunantwort festzustellen, die über die B- und T-Zellen vermittelt wird [27].

## 1.4 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Tabelle 1: Übersicht exogener TLR-Liganden. Um die Vielfalt der Pathogenerkennung der Rezeptoren zu verdeutlichen, werden verschiedene exogene TLR-Liganden dargestellt (in Anlehnung an Akira et al. [83]).

TLR	Exogene Liganden
TLR 1/2	Pam3Cys (synthetisches Analogon zum tripalmitoyliertem Lipopeptid), triacetylierte Lipopeptide (verschiedene Bakterien und Mykobakterien), 19kDa-Lipopeptid (Mykobakterien)
TLR 2	Lipoteichonsäure, tGPI-Mutin ( <i>T. cruzi</i> ), auseres Membranprotein A ( <i>K.pneumoniae</i> ), Lipoarabinomannan, Phosphatidylinositoldimannosid, Glykolipid LAM (Mykobakterien), Hemagglutinin (Masern), Porine ( <i>Neisseria</i> ), Phospholipomannan ( <i>C. albicans</i> ), Glucoonoxylmannan ( <i>C. neoformans</i> )
TLR 3	Doppelstrangige RNA (Viren) sowie das synthetische Analoga Poly(I:C)
TLR 4	LPS (Gram-negative Bakterien), Glucuronoxylomannan ( <i>C. neoformans</i> , Glycoinositolphospholipids (Trypanosomen)
TLR 5	Flagellin (verschiedene bewegliche Bakterien)
TLR 2/6	Diacetylierte Lipopeptide (verschiedene Bakterien und Mykobakterien), phenol-lösliches Modulin ( <i>S. epidermidis</i> ), Zymosan ( <i>S. cerevisiae</i> ), tGPIMutin ( <i>T. cruzi</i> )
TLR 7	Einzelstrangige RNA aus Viren (z. B. Influenzavirus, HIV-1), synthetische Guanosin-Analoga
TLR 8	Einzelstrangige RNA aus Viren (z. B HIV-1), synthetische Guanosin-Analoga
TLR 9	Unmethylierte CpG-DNA aus Viren
TLR 10	Bis zum heutigen Zeitpunkt kein Ligand identifiziert

### 1.4.1 Toll-like Rezeptoren bei der viralen Myokarditis

Die Gruppe der Toll-like Rezeptoren wurde Anfang der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts im Bereich der Entwicklungsbiologie bei Forschungsaktivitäten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* "eher zufällig" entdeckt. Die Namensgebung der Toll-like Rezeptoren soll aufgrund des Ausrufs "toll" der involvierten Wissenschaftler erfolgt sein, die erstmalig das für den Rezeptor kodierende Gen identifiziert hatten [84].

In den sich hierüber verhaltenden Forschungsarbeiten zeigte der Transmembranrezeptor der Klasse

I eine bemerkenswerte biologische Relevanz in der dorso-ventralen Ausrichtung von Embryonen. Zudem wurde festgestellt, dass Toll-negative embryonale Mutanten eine erhöhte Anfälligkeit gegen Pilzbefall gegeben ist. Mit Hilfe späterer Untersuchungen konnte ergänzend belegt werden, dass dem Toll-Rezeptor mittels des "Toll-Interleukin-Rezeptors" (TIR) im Prozess der Signaltransduktion der initialen Immunantwort bei inflammatorischen Infektionsereignissen eine gewichtige Bedeutung zukommen kann.

Im Jahre 1996 wurde dieser Zusammenhang durch die Erforschung der Relevanz von Toll-Rezeptoren als Bestandteil des angeborenen Immunsystems bei Immunreaktionen von Bakterien und Pilzen demaskiert [85]. Durch den methodischen Fortschritt der genetischen Immunforschung wurden strukturähnliche Rezeptorklassen im angeborenen Immunsystem des Menschen aufgefunden. Diese sogenannten homologen Rezeptorklassen [86] der Toll-Rezeptoren wurden schließlich mit der Bezeichnung "Toll-like" Rezeptoren versehen [87].

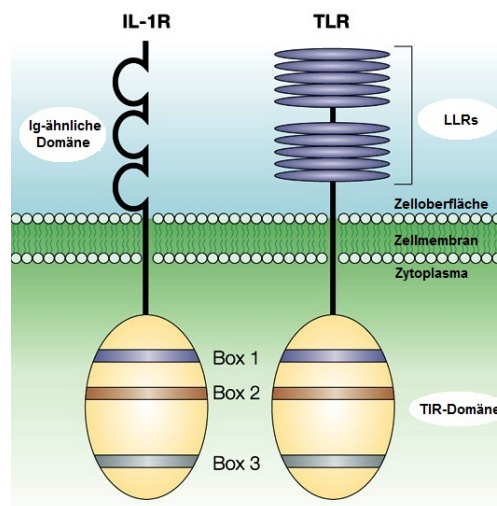


Abbildung 1: Schematische Darstellung zum strukturellen Aufbau der Toll-like Rezeptoren (in Anlehnung an Choe et al. [88]).

Weiterhin konnte durch die Erforschung des verwandten Strukturaufbaus der C-terminalen Domäne des Toll-Rezeptors und des biologischen Aufbaus des Interleukin-1 (IL-1)-Rezeptors von Vertebraten im Jahre 2003 eine relevante Interaktion zwischen Toll-like Rezeptoren und der Aktivierung des Immunsystems nachgewiesen werden [89]. Bislang sind insgesamt 12 Mitglieder der Toll-like Rezeptorfamilie in Säugern identifiziert worden (Tabelle 1) [73]. Toll-like Rezeptoren besitzen eine trimoduläre Struktur und werden dem Typ I der integralen membranösen Glykoproteine zugerechnet. Die extrazelluläre N-terminale Domäne setzt sich nach bisherigen Erkenntnissen aus 16-28 Leucin-reichen Wiederholungen (LLRs) zusammen (Abbildung 1). Jede dieser sogenannten LLRs besteht ihrerseits wiederum aus circa 20 bis 30 Aminosäuren, welche dem Grundaufbaumotiv "LxxLxLxxN" folgen [90]. Die intrazelluläre C-terminale Domäne ist auch bekannt als Toll/IL-1 Rezeptordomäne, welche eine ausgesprochen hohe Homogenität zum IL-1 Rezeptor aufweist. Diese intrazellulär lokalisierte Domäne ist zuständig für Interaktionen und

die Rekrutierung für eine Vielzahl von Adaptermolekülen, die zu einer Induktion der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führen. Die kristallähnliche Struktur einiger TLRs und ihre Ligandenkomplexe wurden in jüngster Zeit ausreichend beschrieben [91]. Ferner konnte gezeigt werden, dass eben diese Ligandenkomplexe spezielle Heterodimere wie TLR1-TLR2, TLR4-MD2 oder auch spezielle Homodimere wie TLR3-TLR3 nach dem Prozess der Assoziation mit den entsprechenden Agonisten bzw. Antagonisten bilden und im Anschluss eine perlenschnurartige Struktur ("m"-shape) schaffen [92].

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Struktur von essentieller Bedeutung für die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden ist. TLRs sind in der Lage eine Vielzahl von PAMPs wie Viren, Bakterien, Pilze und parasitäre Protozoen gezielt zu identifizieren. TLRs sind verschiedenartig auf unterschiedlichen zellulären Kompartimenten ausgebildet; sie werden auf vielen verschiedenen Geweben exprimiert (Herz, Leber, Lunge etc.), auf Immunzellen und auf Nicht-Immunzellen exprimiert. Besonders zahlreich findet man sie auf APCs und phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, Monozyten und Granulozyten [93]. Ihre Aktivierung induziert schließlich über eine intrazelluläre Signaltransduktion die Genaktivierung einer Vielzahl pro-inflammatorischer Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Chemokine [81,94]. Die Expression von TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 (nur in der Maus bekannt) wird auf Zelloberflächen beobachtet. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 weisen eine intrazelluläre Expression wie etwa in Endosomen oder im Endoplasmatischen Reticulum (ER) auf. Der Transport intrazellulär exprimierter TLRs zu intrazellulären Vesikeln erfolgt über das Transmembranprotein UNC93B1, welches selbst wiederum im ER angesiedelt ist [81,95].

#### 1.4.2 Erkennung von "Pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs) durch Toll-like Rezeptoren

Viren setzen sich aus Hüllproteinen und Nukleinsäuren (einzelnsträngig, doppelsträngig; RNA oder DNA) zusammen, die von einer Vielzahl von immanenter Rezeptoren in verschiedensten Zellkompartimenten erkannt werden.

Die Hüllproteine des "respiratory syncytial virus" (RSV) [96] und des "murin mammilären tumor virus" (MMTV) [97] werden durch den TLR4 erkannt. Im Weiteren konnte eine Induktion durch den RSV von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen signalisiert via TLR2 und TLR6 wissenschaftlich bewiesen werden. Überdies ist gesicherte Erkenntnis, dass der TLR2 und der TLR6 essentiell für Genese und Kontrolle einer RSV Infektion *in vivo* verantwortlich sind [98]. ssRNA Viren und Doppelstrang-DNA (dsDNA) Viren produzieren während ihrer Replikation Doppelstrang-RNA (dsRNA). Diese dsRNAs werden durch TLR3 und dessen intrazelluläre "Downstream Mechanismen" wahrgenommen. Das synthetische Analogon der dsRNAs, das sogenannte poly:IC, wird ebenfalls durch TLR3 identifiziert [99]. Bei ihm handelt es sich um ein immunmodulierendes Analogon der dsRNA, das häufig als Hilfssubstanz in humanen Impfstoffen verwandt wird [100-101].

### 1.4.3 Toll-like Rezeptor Signaltransduktion

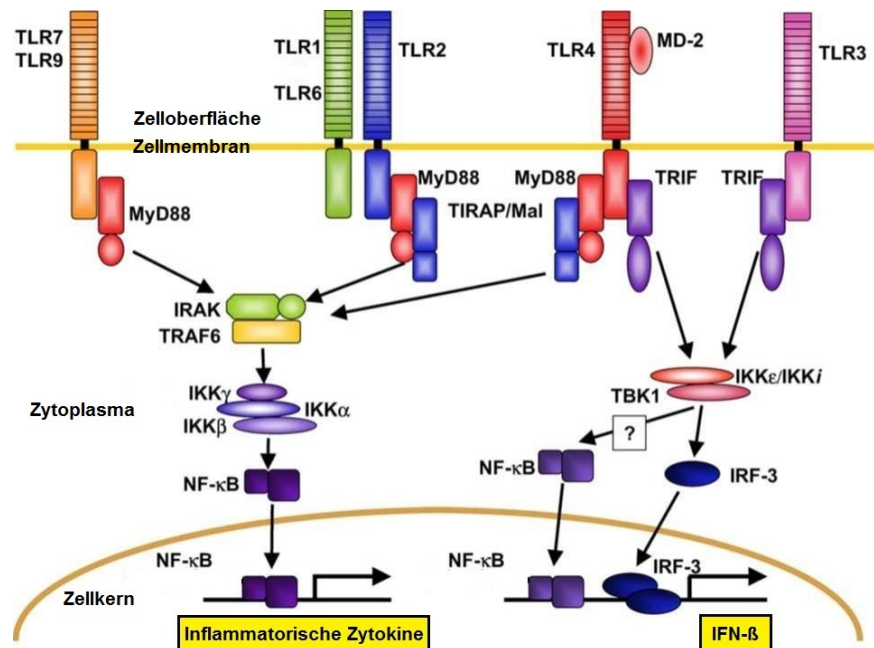


Abbildung 2: Schematische Abbildung zu "TIR domain-containing" - Adaptermolekülen und zum TLR-Signaling (in Anlehnung an Takeda et al. [102]). MyD88 stellt ein essentielles "TIR domain-containing" - Adaptermolekül der Induktion inflammatorischer Zytokine, vermittelt über alle TLRs, dar. TIRAP/Mal ist ein sekundäres "TIR domain-containing" - Adaptermolekül, das spezifisch über den MyD88-abhängigen Signalweg via TLR2 und TLR4 vermittelt wird. In den TLR4- und TLR3-vermittelten Signalkaskaden existiert der MyD88-unabhängige Signalweg, der zur Aktivierung von IRF-3 via TBK1 und IKK/IKKi führt. Das "TIR domain-containing" - Adaptermolekül TRIF signalisiert über den MyD88-unabhängigen Signalweg. MAPK = MAP-Kinasen. IFN = Interferon.

Unterschiedliche TLRs aktivieren in Abhängigkeit zu den entsprechenden Adaptermolekülen individuelle intrazelluläre Signalkaskaden (Abbildung 2). Das am häufigsten verwandte Adaptermolekül ist das "Myeloid differentiation factor 88" (MyD88), welches mit TLR2, 4, 5, 7 und 9 interagiert. MyD88 rekrutiert hierbei die Interleukin Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAKs), welche ihrerseits wiederum "TNF receptor-associated factor 6" (TRAF6) und "I $\kappa$ -Kinase" (IKK) aktivieren. Dies führt zur Phosphorylierung von "I $\kappa$ -Kinase- $\beta$ " (IkB). Die Phosphorylierung ihrerseits löst eine Aktivierung von "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer", aktivierter B-Zellen (NF- $\kappa$ B), aus und bewirkt eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 [103].

Des Weiteren führt die Induktion des MyD88-Signalweges eine Expressionserhöhung der induzierbaren Stickstoffsynthetase herbei [104], die antivirale Eigenschaften in CVB3-induzierten Infektionen besitzt [105]. Die MyD88-Signalwegaktivierung bedingt auch kostimulatorische Molekülexpressionen von CD80 und CD86, was eine Verknüpfung von CD28 auf T-Lymphozyten während der Antigenpräsentation zur Folge hat [106]. Ein weiteres Adaptermolekül ist das "Toll-IL-1 receptor domain-containing Adapter protein" (TIRAP), das durch die Aktivierung des TLR1, TLR2, TLR4 und des TLR6 angesteuert wird, nicht jedoch durch TLR5, TLR7, TLR9, IL-1 und

durch IL-18 [106]. TIRAP führt zwar ebenfalls zu einer Aktivierung pro-inflammatorischer Zytokine; eine Hochregulation kostimulatorischer Molekülexpressionen findet hier indessen nicht statt. Mit dem TRIF und dem TRIF ähnlichen Adaptermolekül finden sich zwei weitere bedeutsame Adapterproteine. TRIF verhält sich interaktiv mit TLR3 und TLR4 [107-108]. "TRIF-related Adapter molecule" (TRAM) seinerseits agiert mit TRIF, allerdings begrenzt auf die TLR4 induzierte Signalkaskade.

Der TRIF/TRAM Signalweg verläuft unabhängig von dem des MyD88 und aktiviert die potenten Interferon-Antwortfaktoren "Interferon regulatory factor 3" (IRF3) und "Interferon regulatory factor 7" (IRF7), was wiederum zu einer erhöhten Expression von Typ I Interferonen, "Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted" (RANTES) und "Interferon- $\gamma$ -inducible protein 10" (IP-10) führt (Abbildung 3) [108].

Durch eine Reihe von Studien ist belegt, dass TLRs relevant in Infektionen durch CVB3 und assoziierten Erkrankungen involviert sind. In einer weiteren, aktuellen Studie wurde gezeigt, dass MyD88<sup>-/-</sup> Mäuse eine reduzierte Expression verschiedenster Zytokine aufweisen, welche von auffälliger Relevanz bei der Immunantwort nach CVB3-Infektion sind (pro-inflammatorische Zytokine inbegriffen TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ ) [109-110].

Gezeigt wurde außerdem, dass in infizierten MyD88<sup>-/-</sup>-Mäusen eine Erhöhung der Typ I Interferone zu beobachten und gleichzeitig der Virustiter aufgrund der Interferonantwort reduziert ist [111-112]. Zudem konnten Triantafilou et al. einen minimalen Expressionsgehalt von TLR1-8 in kardialen Zellen nach CVB3-Infektion nachweisen, während nach Infektion bei von TLR7 und TLR8 insoweit eine Hochregulation festgestellt wurde [113]. Weiterhin finden in Endosomen Interaktionen zwischen der CVB3-RNA mit TLR7 und TLR8 statt, was eine Aktivierung des MyD88-Signalweges auslöst und somit in eine NF- $\kappa$ B-abhängigen Expression pro-inflammatorischer Zytokine führt. Auch konnte in diesem Zusammenhang wissenschaftlich aufgedeckt werden, dass die Infektion durch CVB3 eine Hochregulation von TLR4 bewirkt. Dies war überraschend und unerwartet, weil TLR4 nach seiner bis dahin bekannten theoretischen Konditionierung nicht durch Viren erhöht exprimiert werden können sollte [114]. Der Grund dafür, weshalb CVB3-Infektionen entgegen bisherigen Vermutungen zu einer Hochregulation von TLR4 führen, ist zwar ungeklärt, doch indizieren neuere Studien immerhin, dass IFN- $\gamma$  die Expression TLR4 und TLR3 fördert, IL-4 diese eher supprimiert [115]. Laut experimentellen Mausstudien verursachen CVB3-Infektionen in der Regel eine starke IFN- $\gamma$  Antwort [116]. Ungeachtet dessen hätte man bei Abwesenheit von Liganden des TLR4 den Eintritt einer Hochregulation von TLR4 nicht für funktional relevant gehalten.

Als mögliche Erklärung für die umschriebene, nicht erwartete Reaktion kommt entweder der Einfluss des Virus selbst oder die Beeinflussung durch andere Moleküle als fähige Liganden des TLR4 in Betracht.



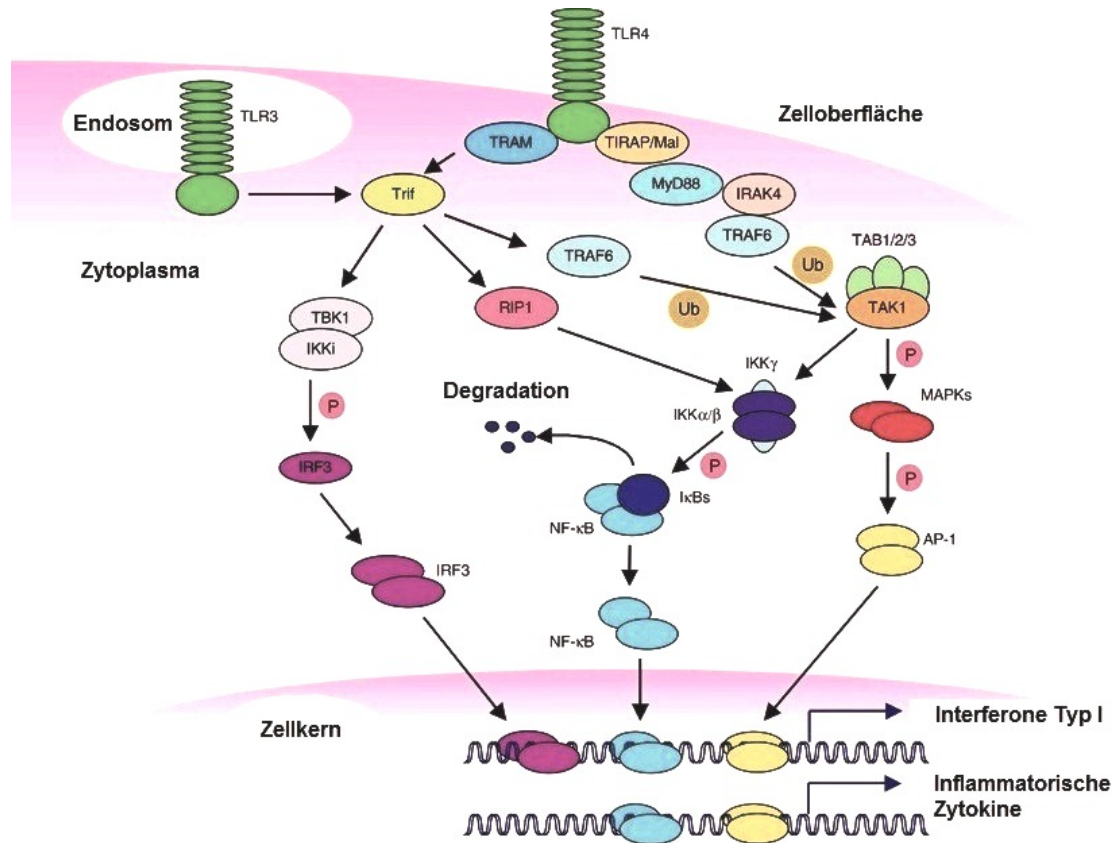


Abbildung 3: Schematische Abbildung zum TRIF-abhängigen TLR-Signaling (in Anlehnung an Kawai et al. [117]). TLR3- und TLR4-vermittelte Signalkaskaden. TLR4 aktiviert den MyD88-abhängigen und den TRIF-abhängigen Signalweg. TIRAP/Mal und TRAM bedingen die Aktivierung des MyD88- und TRIF-Signalweges. MyD88 rekrutiert hierbei IRAK4 und TRAF6 über Ligandenstimulation. TRAF6 aktiviert wiederum den TAK1/TAB1/TAB2/TAB3-Komplex über eine Ubiquitination (Ub). Der aktivierte TAK1-Komplex führt zur Aktivierung des IKK-Komplexes bestehend aus IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  und IKK- $\gamma$ , der seinerseits I $\kappa$ Bs katalysiert (P). I $\kappa$ Bs werden über den Proteasomen-Signalweg destruiert, während NF- $\kappa$ B in den Zellkern translozieren kann. TAK1 aktiviert simultan den MAP-Kinase-Signalweg, was in einer Phosphorylierung (P) und der Aktivierung der AP-1 resultiert. NF- $\kappa$ B und AP-1 kontrollieren über die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine die inflammatorische Antwort. TLR4 rekrutiert TRAM und TRIF, was mit TBK1 interagiert. TBK1 vermittelt zusammen mit IKK $l$  die Phosphorylierung des IRF3 (P). Der phosphorylierte IRF3 dimerisiert und transloziert in den Zellkern und es bindet an die DNA. TRIF wiederum interagiert mit TRAF6 und RIP1, welche die NF- $\kappa$ B Aktivierung vermitteln. Die Aktivierung von IRF3, NF- $\kappa$ B und AP-1 fördert die Induktion der Interferone des Typ I - insbesondere IFN- $\beta$ . TLR3, der sich in endosomalen Vesikeln befindet, benutzt TRIF, nicht hingegen MyD88, TIRAP/Mal und TRAM für seine Signaltransduktion. MAPK = MAP-Kinasen. IFN = Interferon. P = Phosphorylierung. AP-1 = Transskriptionsfaktor.

### MyD88-abhängiger Signalweg

Das Adaptermolekül MyD88 verfügt grundsätzlich in seinem C-terminalen Anteil über die TIR-Domäne und in seinem N-terminalen Anteil über eine biologisch-inaktive Domäne. Mit der TIR-Domäne der TLRs assoziiert MyD88. MyD88 seinerseits rekrutiert die IL-1 rezeptorassoziierte Kinase (IRAK) gegenüber den TLRs durch Interaktionen über die "toten" Domänen beider Moleküle. IRAK wiederum wird über eine Phosphorylierung aktiviert und geht sodann eine Assoziation mit dem Molekül TRAF6 ein. Dies führt erneut zur Aktivierung des MyD88-Signalweges und schließlich zur Aktivierung des Faktors NF- $\kappa$ B.

Im Rahmen einer anderen wissenschaftlichen Untersuchung ließen MyD88<sup>-/-</sup>-Mäuse keine inflammatorische Antwort zum TLR4-Liganden Lipopolysaccharid (LPS) hinsichtlich der Makrophagenproduktion als inflammatorische Mediatoren, der B-Zell-Proliferation oder des endotoxinen Schocks zu [118]. In weiteren Studien wurden keine zellulären Immunantworten bei den TLR2-Liganden Peptidoglykanen und Lipoproteinen in MyD88<sup>-/-</sup>-Mäusen verzeichnet [119-120]. Zellen der MyD88<sup>-/-</sup>-Mäuse verhielten sich ausweislich anderer Studie unbeeinflusst bezüglich einer inflammatorischen Antwort zu dem TLR9-Liganden CpG DNA und dem TLR7-Liganden Imidazoquinoline [121-123]. Schließlich ließ sich in MyD88<sup>-/-</sup> Mäusen keine Produktion einer IL-6 Immunantwort gegenüber des TLR5-Liganden Flagellin nachweisen [124].

Die vorstehend umrissenen wissenschaftlichen Erkenntnisse demonstrieren, dass sich das "TIR domain-containing Adaptermolekül MyD88" essentiell für inflammatorische Antwortprozesse – vermittelt durch die Rezeptorfamilie der TLRs – gewinnen lässt.

### MyD88-unabhängiger Signalweg

Wie vorstehend beschrieben zeigten MyD88<sup>-/-</sup>-Mäuse keine Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-12 als Antwortsignale auf die TLR-Liganden. Eine Aktivierung des Faktors NF- $\kappa$ B hinsichtlich der TLR2-, TLR7- und TLR9-Liganden konnte in MyD88<sup>-/-</sup>-Mäusen ebenfalls nicht beobachtet werden. Eine weitere Forschungsarbeit erwies die Relevanz der LPS-induzierten Signalaktivierung des MyD88-unabhängigen Signalweges. Dies wurde unter Verwendung einer Substraktionsanalyse mit extrahierter RNA nicht-stimulierter und LPS-stimulierter MyD88<sup>-/-</sup>-Makrophagen erzielt [118]. Die Studie verdeutlichte, dass IFN-induzierbare Gene wie IP-10 und Homolog des "Interferon-induced human IFI-56K gene" (GARG16) in der inflammatorischen Antwort zu LPS in MyD88<sup>-/-</sup>-Zellen induziert wurden. Ergänzende Studien stellten heraus, dass neben dem MyD88-abhängigen Signalweg auch ein MyD88-unabhängiger Signalweg im "TLR-Signaling" existiert.

Im MyD88-unabhängigen Signalweg führt eine Stimulation mittels LPS zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und dementsprechend zur Induktion von IFN- $\beta$ . IFN- $\beta$  selbst aktiviert "Signal Transducers and Activator of Transcription1" (Stat1), was wiederum eine In-

duktion verschiedenster IFN-induzierbarer Gene auslöst [125-127]. Ergänzend ließ sich bezüglich des TLR3- und TLR4-Liganden dsRNA eine Induktion der Aktivierung von NF- $\kappa$ B in MyD88<sup>-/-</sup> Zellen nachweisen [128]. Virus und Virus-verwandte dsRNA stellen potente Aktivatoren des IRF3 dar. Hierdurch wird eine Initialphase der IFN- $\beta$ -Produktion bewirkt [129-131]. Der TLR3 Ligand dsRNA aktiviert somit den MyD88-unabhängigen Signalweg, in dem IRF3 eine Schlüsselposition einnimmt. Eine Forschungsgruppe um Hiscott et al. unternahm den Versuch mit Hybrid-Screening, Moleküle zu identifizieren, die mit IRF3 interagieren. Als Ergebnis wurde eine Assoziation von IRF3 mit I $\kappa$ B Kinases (IKK) verzeichnet [132]. Maniatis et al. zeigten, dass eine Überpression "TANK-binding kinase 1" (TBK1, ist den IKKs zugehörig) und IKK $\epsilon$ /IKK $\iota$  zur Aktivierung von IRF3 und zur Induktion von IFN- $\beta$  führt [133].

Schließlich wird TBK1 und IKK $\epsilon$ /IKK $\iota$  eine gewichtige Relevanz als kritische Regulatoren der IRF3-Aktivierung, führend zur IFN- $\beta$  Induktion durch eine Immunantwort eines TLR3-Liganden, zuerkannt.

## 1.5 Interferone und ihre Funktion bei der viralen Myokarditis

### Interferone des Typ I und ihre Funktion in der viralen Myokarditis

Die Interaktionen von dsRNA rufen Induktionen von Interferonen des Typ I über TLR-abhängige und unabhängige intrazelluläre Mechanismen hervor [134]. TLR4 induziert die Aktivierung des Faktors IRF3, der seinerseits am Promoter des Interferon- $\beta$  eine Bindung eingeht und dementsprechend eine forcierte Expression dieses Gens reguliert.

Die Induktion der Signalkaskade initiiert über die Aktivierung von TLR3, 4, 7 und 9 den Faktor IRF7, der eine Bindung zum Promoter von IFN- $\gamma$  herstellt. Ergebnis ist die Produktion des Zytokins IFN- $\beta$ . Insgesamt sind bislang acht Klassen von Interferonen des Typ I identifiziert worden [135-136]. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um folgende Interferone des Typ I, die in allen Lebewesen exprimiert werden: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\xi$ , IFN- $\kappa$  und IFN- $\omega$  [136]. Mit Ausnahme des IFN- $\omega$  nutzen alle Typ I Interferone die zellulären Rezeptoren IFN- $\alpha$ R1 und IFN- $\alpha$  R2c und aktivieren auf die Weise eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege. Die am detailliertesten erforschten intrazellulären Signalwege der Interferonantwort sind der "Janus tyrosine kinase 1" (JAK1)-Signalweg, assoziiert mit der intrazellulären IFN- $\alpha$ R1 Domäne, der "tyrosine kinase 2" (Tyk2)-Signalweg, assoziiert mit der intrazellulären IFN- $\alpha$ R2 Domäne, sowie der Stat1- und "Signal transducers and activators of transcription 2" (Stat2)-Signalweg, die maßgebend durch IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  aktiviert werden. Ein additiver antiviraler Effekt des IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  wird durch die Expression von "NO synthase2" (NOS2) beschrieben [137]. Diese Stickstoffsynthetase 2 bildet wegen ihrer hemmenden Eigenschaften bezüglich der viralen RNA und Proteinsynthese einen relevanten Abwehrmechanismus bei der CVB3-Infektion aus [138-140]. Weiterhin besitzen die Interferone des Typ I direkte antivirale Modulationsmöglichkeiten und erfüllen immunomodulatorische Funktionen wie die Hochregulation der Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I und

der Klasse II, die Hemmung des Zellzyklus, die Stimulation der Aktivität der NK-Zellen und der T-Lymphozyten, die Induktion pro-apoptotischer Faktoren sowie die Inhibition anti-apoptotischer Funktionen.

Eine beträchtliche Anzahl verschiedenartiger Zellarten besitzt die Fähigkeit, Interferone des Typ I zu produzieren. Im Speziellen findet der dominante Teil der IFN-Produktion bei viralen Infektionen in plasmazytoiden dendritischen Zellen statt [141-142]. Weiterführend ist belegt, dass Interferone des Typ I verantwortlich für die Reifung der dendritischen Zellen und die Migration von dendritischen Zellen in T-Zell-reiche Areale in der Milz sind [142].

Die Induktion der Aktivierung von Interferonen stellt einen der wichtigsten antiviralen Mechanismus zur viralen Immunabwehr dar. Diese antiviral wirksamen Interferone werden vor allem von bereits infizierten Immunzellen exprimiert und ausgeschüttet. Sie wirken auf diese Weise parakrin und autokrin [143]; ihre Wirkungsweise wird deshalb hinsichtlich der Wirt-Protektion und des Überlebens des infizierten Organismus nicht unkritisch bewertet.

Eine fehlende oder mangelhafte Interferonantwort *post infectionem* bewirkt zudem eine gesteigerte Viruslast im Organismus und einer Beeinträchtigung der Funktion des Herzens [144]. Gesichert ist auch, dass die antivirale Wirkweise der Interferone nach Versuchen der Zellkultur zu signifikanter Inhibierung der CVB3-Replikation führt [145]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Gabe von exogenen IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  einen relevanten Benefit auf den Krankheitsverlauf in der CVB3-induzierten Myokarditis bei Mäusen mit sich bringt [145].

Zytokine stellen wichtige Mediatoren für eine suffiziente Immunantwort dar, können jedoch auch durch eine überschießende inflammatorische Antwort in der CVB3-Myokarditis einen negativen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Myokarditis nehmen. Unter der additiven Gabe von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in der experimentellen CVB3-Myokarditis kam es nämlich zu einer erhöhten Inflammation im Myokard und gesteigerten nekrotischen Veränderungen im Herzmuskel kommen, was geradezu zwingend mit einer schlechteren Prognose der Krankheitsentwicklung einhergeht [54]. Eine gesteigerte Expression von Zytokinen kann fernerhin eine kardiale Hypertrophie induzieren [146-147].

Durch *in vitro* Modelluntersuchungen anderer Autoren konnte eine kardiodepressive Wirkung der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-2 und IL-6 auf isolierte Papillarmuskeln aufgezeigt werden. Dies legt den Schluss nahe, dass Zytokine direkten Einfluss auf das myokardiale Gewebe und dessen Kontraktilität ausüben [58].

## 1.6 Extrazelluläre Matrix und kardiale Umbauprozesse (“Remodeling”) bei der viralen Myokarditis

Mit dem Begriff der Extrazellulären Matrix (EZM) beschreibt man den extrazellulären, kardialen Raum, der die Kardiomyozyten und weitere im Myokard vorkommende Zellen umschließt. Aufgrund dessen ist die EZM ein bedeutsames Strukturelement im gesunden Aufbau des Herzmuskels und dessen Funktion.

Pathologische Veränderungen oder anderweitige Schädigungen des Aufbaus der kardialen EZM werden mit dem Begriff des “Remodelings” umschrieben [148]. Die Kontraktion der einzelnen Fasern während der Funktion des Myokards wird maßgebend durch Matrixproteine vermittelt. Die Matrixproteine bestehen im Wesentlichen aus Kollagenfasern. Daneben setzt sich die kardiale EZM aus der Basalmembran, elastischen Fasern, Glykoaminoglykanen und Proteoglykanen zusammen.

In aktuellen Studien wurde gezeigt, dass das Remodeling des Herzens als gewichtiger, relevanter Prognosefaktor hinsichtlich der Funktionsweise der linksventrikulären Pumpfunktion nach Gewebeschädigung zu berücksichtigen ist. Schließlich haben sich Moleküle wie Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine als bioaktive Substanzen und Modulatoren der EZM herausgestellt [149].

Während der akuten viralen Myokarditis trägt der Prozess des Remodelings zum Abbau der EZM und der Migration infiltrativer Immunzellen in das Myokard bei. Im frühen Stadium der Myokarditis kann insoweit von einem eher qualitativen und weniger einem quantitativen Umbau der Kollagenfasern gesprochen werden. Die Konzentration des Gesamtkollagens bleibt unverändert. Es ändert sich lediglich die Anzahl der Kollagen-Querverbindungen, angegeben durch Reduktion des unlöslichen/löslichen Kollagen-Ratios [150].

Durch diese Umbauprozesse wird der Eintritt infiltrativer Immunzellen in Gewebe deutlich gefördert. Die Prozesse werden durch die indirekte Wirkung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren induziert, die sich entweder im myokardialen Interstitium befinden oder während der Inflammation der Zellen ausgeschüttet werden. Was die Lokalisierung der Zytokine und Signalmoleküle angeht, so kann jedenfalls deren Anbindung am Heparansulphat heute als gesichert angesehen werden. Von dort aus werden von Proteasen wie unter anderem den MMPs, durch Spaltung aktiviert und freigesetzt. Als Beispiel hierfür sei die Aktivierung von TNF- $\alpha$  im myokardialen Interstitium angeführt [151]. Die Störung der EZM-Architektur kann sich unter Umständen nachteilig, nämlich in progredienten Dilatation und Dysfunktion des linken Ventrikels auswirken, was in der Folge zu einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) führen kann. Es gibt ernstzunehmende wissenschaftliche Hinweise, die es gerechtfertigt erscheinen lassen, die virale Myokarditis aufgrund von Viruspersistenz mit der Entwicklung einer DCM in einen relevanten Zusammenhang zu bringen [152]. Die MMPs können ihrerseits ebenfalls zu einer Dilatation des Herzens beitragen.

Das Immunsystem selbst kann eine negative Wirkung auf die Herzfunktion durch die vermehr-

te Vernichtung von Kardiomyozyten und die Aktivierung des MMP-Systems mit EZM-Abbau ausüben [153].

Kontraktile Dysfunktionen des Herzens wurden in der späteren Phase des Verlaufs der Myokarditis bei einer erheblichen Anzahl von Patienten auch infolge der Produktion von Autoantikörpern und der Entwicklung einer Autoimmunität beobachtet [154-155].

## 2 Fragestellung der Arbeit

Die hier vorliegende Studie befasst sich gezielt mit dem Einfluss des Adaptermoleküls TRIF auf die Entwicklung der CVB3-induzierten Myokarditis im Mausmodell.

Toll-like Rezeptoren sind bedeutsame Kompartimente des angeborenen Immunsystems und bei viralen Erkennungsprozessen und der Aktivierung der Interferone des Typ I relevant bei der Immunantwort beteiligt. Ausgehend von dem Umstand, dass Interferonen nach gesicherter wissenschaftlicher Erkenntnis eine gewichtige Relevanz in der viralen Myokarditis zukommt, haben wir es unternommen, die Rolle von TRIF in der CVB3-induzierten Myokarditis im experimentellen Tiermodell mittels eines TRIF “knockout”-Mausmodells näher zu untersuchen. Aus dem Bemühen um möglichst erschöpfende Antworten sind wir dabei den folgenden Fragestellungen vertiefend nachgegangen:

- Führt eine TRIF-Defizienz zu einer Änderung des kardialen Phänotypes und des klinischen Verlaufs nach CVB3-Infektion?
- Ist dies gegebenenfalls mit unterschiedlich ausgeprägten kardialen Umbauprozessen (“Remodeling“) assoziiert?
- Hat das Adaptermolekül TRIF einen Einfluss auf die myokardiale CVB3-Kontrolle?
- Kommt es unter einer TRIF-Defizienz zu Dysregulationsereignissen der EZM während einer CVB3-induzierten Myokarditis?
- Beeinflusst das Adaptermolekül TRIF die kardiale Inflammation nach CVB3-Infektion?
- Welche Bedeutung besitzt das Adaptermolekül TRIF bei der kardialen IFN- $\beta$  Antwort während der CVB3-induzierten Myokarditis?

## 3 Material und Methoden

Im folgenden Teil der Studie sollen die verwendeten Materialien und Methoden in ihrer Gesamtheit hinsichtlich der Relevanz von TRIF bei CVB3-induzierten Myokarditis im murinen Tiermodell dargestellt werden.

Zu Beginn werden hierbei das ausgewählte Studiendesign und die Virusinfektion mittels CVB3 in dieser tierexperimentellen Studie aufgezeigt. In der Folge werden die verwendete Narkotisierung und Beatmung sowie die vollzogenen operativen Eingriffe beschrieben; insbesondere wird in diesem Zusammenhang die Evaluierung der linksventrikulären Pumpfunktion mittels Konduktanzkatheterisierung der Versuchstiere nebst theoretischem Hintergrund beleuchtet. Im Anschluss hieran werden die verschiedenen molekularbiologischen Analyseverfahren und deren Durchführungen dargestellt.

Im Speziellen werden die Gewinnung von RNA und das Prozedere zur Durchführung der TaqMan<sup>®</sup>-PCR beschrieben. Des Weiteren werden die Bestimmung der Viruslast nach CVB3-Infektion und die Bestimmung der CVB3-Konzentration im Herzgewebe aufgezeigt. Ferner werden die Generierung von Gefrierschnitten hinsichtlich der immunhistologischen Analysen sowie die unterschiedlichen immunhistologischen Anfärbetechniken und die TUNEL-Methode erläutert. Überdies werden die Auswertung, die Modi und die Theorie der digitalen Bildanalyse dargestellt.

Hieran schließen sich die Beschreibungen der Methodik und der Durchführung der hier verwendeten zymographischen Analyseverfahren und deren Auswertung an. Zum Abschluss werden die in der Studie angewendeten statistischen Analyseverfahren präsentiert.

### 3.1 Studiendesign

Um die Bedeutung von TRIF im Krankheitsbild der durch CVB3-induzierten Myokarditis charakterisieren zu können, wurden im Experiment männliche TRIF “knock out” Mäuse verwendet, welchen das Gen für TRIF molekulargenetisch deletiert wurde. Durch die Verhinderung der Expression dieses Gens wird die Möglichkeit geschaffen, die Bedeutung für krankheitsspezifische Genprodukte im eingangs beschriebenen Krankheitsbild bestmöglich zu simulieren.

Es wurden 6 Wochen alte C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (WT) ( $n = 60$ ) und TRIF “knockout” Mäuse (TRIF<sup>-/-</sup>) ( $n = 83$ ) mit einem genetischen Hintergrund von C57BL/6 Mäusen aus der Züchtung des Max-Planck-Instituts für Immunologie (Freiburg, Deutschland) für die Experimente der Studie herangezogen (Tabelle 2). Mutierte und homozygot für die zerstörten TRIF Allele Mäuse wurden nach der mendelschen Ratio geboren und wuchsen gesund in spezifisch pathogenfreier Zuchtumgebung auf. WT-Mäuse und TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit CVB3 (“Nancy strain”), wie nachstehend beschrieben, infiziert. Den dazugehörigen Kontrolltieren wurde Kochsalzlösung anstelle von CVB3 in identischen Volumina appliziert. WT-Mäuse (WT-CVB3) ( $n = 52$ ) und



TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse (TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3) (n = 75) wurden am Zeitpunkt Tag 0 mittels einer intraperitonealen (i.p.) Injektion mit CVB3 ("Nancy strain") infiziert. Mit Kochsalz behandelte WT-Mäuse (n = 8) und TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse (n = 8) dienten hierbei als gesunde Kontrolltiere. Die verwendeten Mäuse wurden zu den Zeitpunkten 12, 24, 48, 72 Stunden (n = 6 pro Versuchstiergruppe) und sieben Tage (n = 8 pro Versuchstiergruppe) nach CVB3-Infektion einer Euthanasie zugeführt. Das entsprechende Herzgewebe wurde für immunhistologische und molekularbiologischen Analysen präpariert. Sieben Tage nach CVB3-Infektion wurde vor der Euthanisierung der Mäuse die linksventrikuläre Pumpfunktion mittels Konduktanzkathetertechnik evaluiert.

In der Mortalitätsstudie wurden infizierte WT Mäuse (WT-CVB3) (n = 20) und infizierte TRIF<sup>-/-</sup> Mäuse (TRIF<sup>-/-</sup> CVB3) (n = 11) über einen Beobachtungszeitraum von 70 Tagen observiert. Überdies wurden die TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse (n = 20) einer Behandlung mit murinen Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) (Bayer-Schering<sup>®</sup>, 100 kilo units [ku], intraperitoneale Injektionen) jeden zweiten bis Tag 14 nach CVB3-Infektion unterzogen.

Dieser Zeitrahmen der IFN- $\beta$  Substitutionsbehandlung wurde gewählt, weil die virämische Phase in diesem Tiermodell am Tag 14 endet. Weiterhin wurden TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse (n = 6) mit murinen IFN- $\beta$  (Bayer-Schering<sup>®</sup>, 100 kilo units [ku], intraperitoneale Injektionen am Tag 2, 4 und 6 nach CVB3-Infektion) über einen Zeitraum von sieben Tagen nach CVB3-Infektion behandelt. Anschließend wurde das Herzgewebe für immunhistologische und molekularbiologische Analysen gemäß den infizierten WT-Mäuse und TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen präpariert.

Die Experimentatoren folgten den Richtlinien des US Nationalinstituts für Gesundheit, USA – "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", publiziert durch die US National Institutes of Health (NIH Publikationsnr.: 85-23, überarbeitet 1985). Die Experimente der vorliegenden Studie (Antragsnummer: G 0277) wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin genehmigt.

Tabelle 2: Das Gruppendesign der verwendeten Tiere der Studie.

Tierstamm	Bezeichnung	Anzahl
Wildtyp Kontrollen	WT	8
TRIF <sup>-/-</sup> Kontrollen	TRIF <sup>-/-</sup>	8
Wildtyp CVB3 infiziert	WT-CVB3	52
TRIF <sup>-/-</sup> CVB3 infiziert	TRIF <sup>-/-</sup> CVB3	75

### 3.2 Mausstämme

TRIF “knockout” Mäuse und die WT-(C57BL/6) Mäuse wurden dankenswerterweise aus der Züchtung des Max-Planck-Institut für Immunologie (Freiburg, Deutschland) für die Experimente dieser Studie zur Verfügung gestellt.

Um diese “knockout” Mausstämme erzeugen zu können, wurden die entsprechenden Gene (hier der Genabschnitt für TRIF) isoliert. Ein spezifischer Vektor mit einer nicht-funktionierenden Sequenz des gewünschten Gens, jedoch mit homologen 3'- und 5'-Enden hinsichtlich des Gens, wurde konstruiert. Eben dieser wurde anschließend in embryonale Stammzellen von Mäusen transferiert. Hier wurde er aufgrund seiner homologen Enden in die Stelle des gewünschten Gens durch Rekombination und durch das sogenannte “crossing over” in die DNA der Zellen aufgenommen. Somit entstehen embryonale Stammzellen, welche das geänderte nicht-funktionierende Gen tragen.

Meistens werden in den Vektor zwei Gensequenz zur Kontrolle des Vorganges integriert: das Gen für eine Neomycin-Resistenz (neoR) und das Thymidin-Kinase-Gen (HSV-tk). Durch Neomycin-Resistenz und Gancyclovir-Empfindlichkeit werden die Zellen mit der korrekten nicht-funktionierenden Gensequenz getrennt; die übrigen Zellen sterben während dieses Vorganges ab. Die lebend erhaltenen Zellen werden in 3,5 Tage alte Maus-Blastozysten injiziert und letztere werden in pseudoschwangere Mäuse implantiert. Durch dieses Prozedere werden spezifische Mäuse-Chimären hergestellt, die mit normalen Mäusen des Wildtyps gekreuzt werden um heterozygote Mäuse zu erzeugen. Letztere werden miteinander gekreuzt, und es entstehen homozygote Tiere bei denen das gewünschte Gen “gelöscht” ist.

### 3.3 Versuchstierhaltung

Die Haltung aller in die Studie einbezogenen männlichen Versuchstiere wurde in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) – Campus Benjamin Franklin – der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die Tiere befanden sich während des gesamten Versuchszeitraums in einem Tierstall der Sicherheitsstufe S2. Die betreffenden Räume wurden unter Überdruck gehalten und durften ausschließlich nach gründlicher Händedesinfektion mit Schutzkleidung, Handschuhen, Kopfhaube und Mundschutz von hierzu befugten Personen betreten werden. Die Mäuse wurden auf staubfreiem Weichholzgranulat in Makrolon-Käfigen vom Typ II gehalten. Die Raumtemperatur wurde konstant bei 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten. Die Versuchsräume wurden in einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Turnus belichtet.

Die Fütterung der Mäuse erfolgte *ad libitum* mit Altromin 1324 Alleinfutter (Altromin GmbH, Lage) und Leitungswasser. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde zweimal täglich durch das Pflegepersonal und die Experimentatoren sowie durch die monatlichen veterinärmedizinischen Kontrollen überwacht.

### 3.4 Infektion durch Coxsackievirus B3 (CVB3)

In dem der Studie zu Grunde liegenden murinen Tierversuchsmodell wurde das Modell der CVB3-induzierten Myokarditis verwendet. Hierbei handelt es sich um ein wissenschaftlich gesichertes und weit verbreitetes Tierversuchsmodell. Die Funktionsweise und Wirkung im Krankheitsbild der CVB3-induzierten Myokarditis wurde bei unterschiedlichen Mausstämmen in mehreren Studien im Detail beschrieben. Von jedem einzelnen Tierstamm wurden je 20 Tiere im Alter von acht Wochen mit dem Coxsackievirus B3 (CVB3, "Nancy strain"; ATCC VR-30) infiziert.

Die Viren wurden auf "HeLa"-Zellen ("HeLa"-Zellen stellen gebräuchliche, humane Zelllinien für biochemische und gentechnische Untersuchungen dar) gezüchtet und bei einer konstanten Temperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zum Zeitpunkt der Verwendung gelagert.  $5 \times 10^5$  Plaque Forming Units (p.f.u.) wurden in 0,2ml Phosphat-Puffer-Lösung (PBS) gelöst und einmalig intraperitoneal jedem zu infizierenden Versuchstier appliziert. Bei den nicht infizierten Tieren wurden stattdessen einmalig 0,2ml  $1 \times$  PBS intraperitoneal injiziert.

### 3.5 Charakterisierung der hämodynamischen Funktion

#### 3.5.1 Narkotisierung

Als Narkotikum wurde das Barbiturat Thiopental (Glaxo-Smith) mit einer Dosis von  $125\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht verwendet und durch eine einmalige intraperitoneale Injektion verabreicht. Die Narkosetiefe wurde durch Induktion eines Schmerzreizes überprüft. Bei Bedarf wurde die Dosis des Narkotikums um 10% der Anfangsdosis erhöht.

#### 3.5.2 Intubation und Ventilation

Zur Durchführung der Intubation wurden alle Mäuse in Rückenlage auf einer Operationsplattform fixiert, die Häse in Überstreckungsposition gebracht. Nach manuellem Anheben der Zunge wurde unter visueller Kontrolle ein flexibler Tubus aus Kunststoff behutsam und unter Sicht in die Trachea vorgeschoben und korrekt für die maschinelle Beatmung positioniert.

Als Parameter für eine erfolgreiche Intubation zur Beurteilung einer konstanten und respiratorabhängigen Hub- und Senkbewegung des Thorax galt die optische Feststellungsprüfung. Die Kontrolle der korrekten Intubation und Ventilation wurde in Permanenz durchgeführt. Die Ventilation erfolgte mechanisch mittels einer Beatmungsmaschine (Mini-Vent, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA) durch Raumluft und einem Atemzugvolumen von  $6,5\text{ml}/\text{kg}$  Körpergewicht bei einer Beatmungsfrequenz von 200/min.

#### 3.5.3 Aufnahme von linksventrikulären Druck- und Volumenkurven mittels Konduktanzkatheterverfahren

Sieben Tage nach der Infektion durch CVB3 wurde bei allen in die Studie eingeschlossenen Tieren eine Druck-Volumen-Konduktanzkathetermessung unter Narkose durchgeführt. Bei dieser Unter-

suchung werden die gemessene Druck- und Volumendatensätze des linken Ventrikels erfasst. Auf der Grundlage der hiermit gewonnenen Erkenntnisse werden die Druck- und Volumendiagramme des linken Ventrikels in Echtzeit mathematisch ermittelt und das entsprechende Arbeitsdiagramm des Herzens, ebenfalls in Echtzeit, errechnet (Abbildung 4). Bei der angewandten Methode werden sowohl volumenabhängige als auch volumenunabhängige Parameter erhoben, welche die linksventrikuläre Pumpfunktion ergänzend beschreiben.

Zur Durchführung der für die Studie relevanten Experimente wurde ein 1.2 French Katheter verwendet, der gleichzeitig Druck und Volumen im linken Ventrikel bestimmt (Scisense Inc., Ontario, Canada). Der Katheter wurde an ein Druck-Volumen-Amplifier-System (MPVS 300/400, Millar Instruments, Houston, USA) angeschlossen. Die Daten wurden mit dem Softwareprogramm "IOX", 1.8.9 (Emka Technologies, Falls Church, USA) erhoben und anschließend mit dem Programm "Circlab 2004" (Paul Steendijk, GTX Medical Software, Belgium) ausgewertet. Alle Aufzeichnungssysteme und Software-Programme wurden mit Hilfe eines PC gewonnen, der mit einem "Windows XP" - Betriebssystem (Microsoft Corporation, USA) ausgestattet war.

Die linksventrikuläre Pumpfunktion des Herzens wurde mittels der Methode des "offenen Thorax" ("open chest") evaluiert. Hierzu wurde ein durchgehender Hautschnitt von der *Regio hypochondriaca dexter* über die *Regio epigastrica* zur *Regio hypochondriaca sinister* in der Transversalebene bei der Maus durchgeführt. Im Anschluss wurde das Diaphragma transversal vorsichtig durchtrennt und das schlagende Herz durch stumpfe manuelle Präparation vom Perikard gelöst. Sodann wurde der Apex des Herzens in der Ebene des linksventrikulären Ausflusstraktes mit einer 26G Nadel punktiert und schnellstmöglich der Real-time Konduktanzkatheter durch die Punktionsstelle in den linken Ventrikel eingebracht. Die Positionierung des Konduktanzkatheters wurde permanent durch visuelle Kontrolle der in Echtzeit aufgezeichneten Druck-Volumen-Kurven überwacht und – falls erforderlich – optimiert. Mögliche Blutungen wurden strikt vermieden und bei Bedarf durch sofortige Koagulation gestillt.

Im weiteren Verlauf der linksventrikulären Evaluierung wurde ein Hautschnitt von der distalen *Regio sternocleidomastoidea dexter* zum *Trigonum clavipectorale dexter* in der Transversalebene vorgenommen. Die *Vena jugularis dextra* wurde durch stumpfe Präparation dargestellt und durch eine Punktion mit einer 26G Nadel an ein geschlossenes Infusionssystem angeschlossen. Das Infusionssystem bestand aus einer 26G Nadel, welche über einen Polyethylen-Schlauch mit einer Hamilton-Präzisionsspritze, mit einem Gesamtvolumen von 150 $\mu$ l, konnektiert wurde. Das Infusionssystem wurde vor der Venenpunktion mit 10%-iger Kochsalzlösung luftfrei gefüllt.

### 3.5.4 Theoretischer Hintergrund der Konduktanz-Messtechnik

Als Konduktanz bezeichnet man den Kehrwert des elektrischen Widerstandes  $R$ .

Der Widerstand und somit auch die Konduktanz ist vom Volumen eines Körpers abhängig, der von einem elektrischen Strom durchflossen wird. Mit Hilfe des Konduktanzkatheters wird eine Messung der Konduktanz des Blutes realisiert, um linksventrikuläre Volumina zu berechnen.

Im Speziellen besteht der Konduktanzkatheter aus einem Drucksensor und vier Elektroden. Hierbei sind jeweils zwei Elektroden oberhalb respektive unterhalb des Drucksensors platziert. Von den äußeren Elektroden wird ein elektrisches Feld mit konstantem Strom generiert; die innen gelegenen Elektroden hingegen messen die entstandene elektrische Potentialdifferenz.

Da sich während des Herzzyklus das linksventrikuläre Volumen physiologisch modifiziert, ändern sich zwangsläufig auch der Widerstand und dementsprechend auch die Konduktanz des Blutes. Von den erhobenen Daten lässt sich die Konduktanz des Blutes als Funktion der Zeit ( $t$ ) berechnen, welche sich proportional zur Blutmenge und damit auch zum linksventrikulären Volumen verhält. Das Volumen  $V(t)$  im linken Ventrikel wird zu jedem Zeitpunkt durch die folgende Formel beschrieben:

$$V(t) = \left(\frac{1}{a}\right) \times \frac{L^2}{\sigma} \times G(t) - V(c)$$

$a$  ist eine dimensionslose Konstante,  $L$  der Abstand zwischen den Elektroden,  $\sigma$  die Leitfähigkeit des Blutes,  $G(t)$  die gemessene gesamte Konduktanz zu jedem Zeitpunkt und  $V(c)$  ein Korrekturvolumen aufgrund der parallelen Konduktanz.

Das elektrische Feld, das vom Konduktanz-Katheter generiert wird, wird nicht nur vom Blut, sondern auch von den verschiedenen benachbarten Geweben geleitet. Die gemessene Konduktanz stellt sich als eine Gesamt-Konduktanz aus Blut und Gewebe dar (z.B. Gewebe des linken Ventrikels, des rechten Ventrikels, des Lungengewebes, des Fettgewebes, etc). Auf diese Weise wird das berechnete Volumen rein rechnerisch überdimensional vergrößert dargestellt. Um das Blutvolumen selbst und demzufolge das korrekte Volumen des linken Ventrikels berechnen zu können, wird das kalkulativ berechnete Volumen durch Substraktion des  $V(c)$  korrigiert, welches mathematisch durch die Parallelkonduktanz entsteht.  $V(c)$  wird durch folgende Formel berechnet:

$$V(c) = \left(\frac{1}{a}\right) \times \frac{L^2}{\sigma} \times G(p)$$

$G(p)$  ist die Konduktanz der umliegenden Gewebe (parallele Konduktanz). Zur Bestimmung der  $G(p)$  werden in der Regel zwei Methoden benutzt:

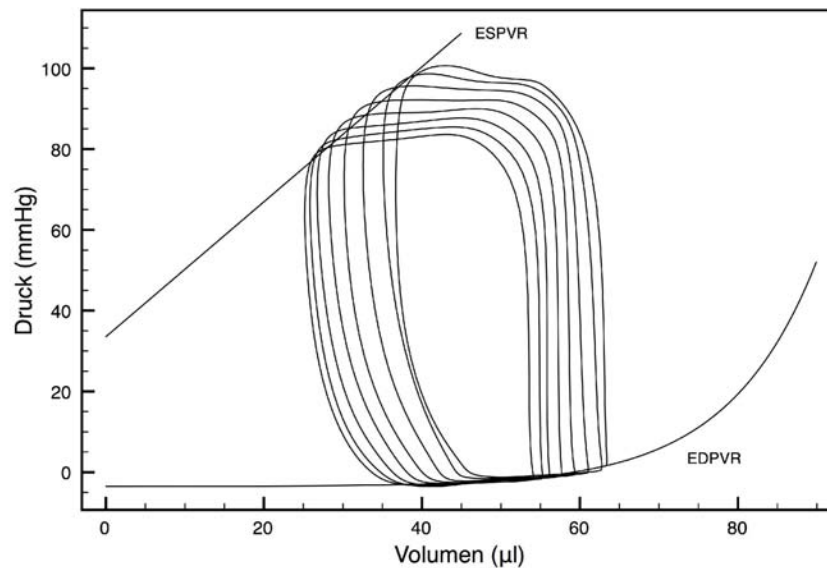


Abbildung 4: Druck- und Volumenkurven einer gesunden Maus in Echtzeit.

- Methode I stützt sich auf das Absaugen des Blutes aus dem linken Ventrikel. In diesem Fall fließt der Strom lediglich durch das umliegende Gewebe, und die gemessene Konduktanz entspricht der parallelen Konduktanz.
- Methode II favorisiert die passagere Veränderung der Konduktanz. Damit wird es möglich die parallele Konduktanz und das  $V(c)$  zu berechnen. Die Modulation der Konduktanz wird durch Injektion 10%-iger Kochsalzlösung in den linken Ventrikel erreicht. Das end-systolische Volumen ( $LVESV$ ) wird als Funktion des end-diastolischen ( $LVEDV$ ) während der Konduktanzänderung eingezeichnet. Durch Regression der Punkte entsteht eine lineare Funktion. Der Schnittpunkt dieser Linie mit der "Identitätslinie" (die Linie wo  $LVESV = LVEDV = 0$  beschreibt alle möglichen Werte von  $V(c)$ ) ist die gesuchte  $V(c)$ .

In der vorliegenden Studie haben wir uns für die Anwendung der Methode II entschieden. Um die Konduktanz des Blutes methodengerecht zu modulieren, wurden circa  $10\mu\text{l}$  einer 10%-igen Kochsalzlösung als Bolus in die *Vena jugularis dextra* des jeweiligen Versuchstieres injiziert (Abbildung 6).

### 3.5.5 Protokoll zur Charakterisierung der hämodynamischen Funktion

#### Evaluierung der Basispumpfunktion des linken Ventrikels ("Steady State")

Aufnahme der Druck-Volumen-Kurven im Zustand der Apnoe für einen Zeitraum von circa fünf Sekunden. Insgesamt wurden drei Wiederholungen dieses Ablaufs durchgeführt.

**Bestimmung der parallelen Konduktanz (“SAL”)**

Aufnahme der Druck-Volumen-Kurven während einer gleichzeitigen 10 $\mu$ l-Bolus-Injektion von einer Kochsalzlösung (10%) über das geschlossene Infusionssystem und im Zustand der Apnoe für einen Zeitraum von circa fünf Sekunden. Insgesamt wurden drei Wiederholungen dieses Ablaufs durchgeführt.

**Okklusion des Gefäßes Vena cava inferior (“VCO”)**

Aufnahme der Druck-Volumen-Kurven während der totalen Okklusion der *Vena cava inferior* mittels einer Gefäßklemme und im Zustand der Apnoe für einen Zeitraum von circa fünf Sekunden. Insgesamt wurden drei Wiederholungen dieses Ablaufs durchgeführt.

Um Artefakte, die durch die Atmung des Versuchstieres bedingt sind, zu minimieren, wurden alle erhobenen Aufzeichnungen der Druck-Volumen-Kurven im kurzzeitigen Status des Apnoes erfasst. Alle gemessenen Daten wurden als Mittelwert aus jeweils drei gewonnenen Messungen berechnet.

Die durch die Messung gewonnenen Parameter, welche die Leistungsfähigkeit des Herzens beschreiben, sind durch die Vor- und Nachlast bedingt. Um verschiedene Parameter, die unabhängig von Vor- und Nachlast zu beschreiben sind, wurde eine totale Okklusion der *Vena cava inferior* durch eine Gefäßklemme für circa fünf Sekunden herbeigeführt. Auf diese Weise konnte erreicht werden, dass das Herz von der physiologischen Vorlast kurzzeitig artifiziell befreit wurde (Abbildung 5). Hierbei wurden die verschiedenen linksventrikulären Füllungsvolumina bestimmt.

Die linksventrikuläre Pumpfunktion wurde auf der Basis der oben aufgeführten Parameter und Daten in Form der systolischen und diastolischen Leistung des Herzens evaluiert.

**3.5.6 Parameter zur Bestimmung der globalen Herzfunktion****Herzfrequenz (HF)**

Sie wird in Schlägen/min angegeben.

**End-systolisches LV-Volumen (LVESV)**

Das Volumen im linken Ventrikel am Endpunkt der Systole; es wird in  $\mu$ l angegeben.

**End-diastolisches LV-Volumen (LVEDV)**

Das Volumen im linken Ventrikel am Endpunkt der Diastole beschreibt die end-diastolische Differenzierung des Herzens. Gemeinsam mit dem end-diastolischen LV-Druck (LVEDP) werden die Volumina zur Berechnung der end-diastolischen Druck-Volumen Beziehung herangezogen.

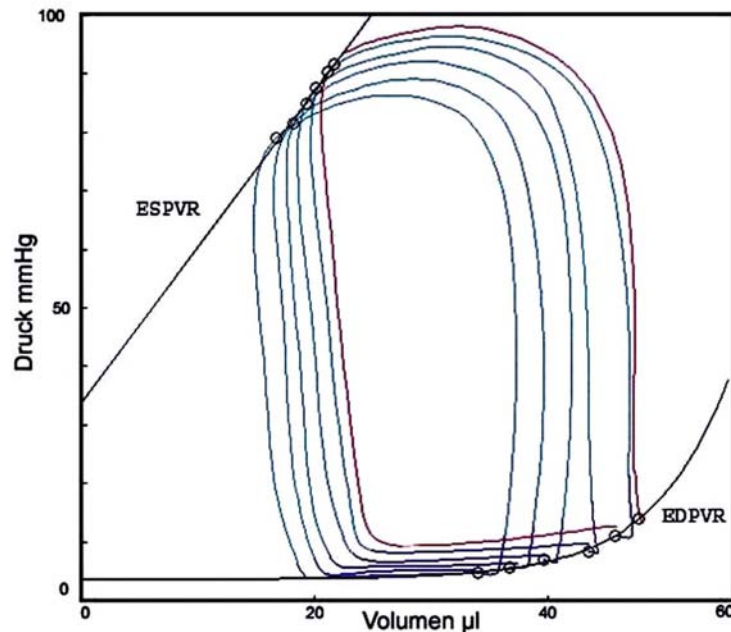


Abbildung 5: Druck-Volumen-Kurven einer Maus während der Vorlastreduktion; eingezeichnete Verlaufslinie des ESPVR und EDPVR (“end-systolic pressure-volume relationship definition” und “end-diastolic pressure-volume relationship definition”).

### Schlagvolumen (SV)

Das Schlagvolumen beschreibt das Blutvolumen, welches während der Kontraktion des linken Ventrikels in die Aorta ausgeworfen wird.

Berechnung: Subtraktion des endsystolischen (LVESV) vom end-diastolischen (LVEDV) Volumen.

$$SV = LVEDV - LVESV$$

Es wird in  $\mu\text{l}$  angegeben.

### Ejektionsfraktion (EF)

Im Wege der Division des Schlagvolumens durch das end-diastolische Volumen wird der prozentuale Anteil des Auswurfvolumens vom end-diastolischen Volumen ermittelt und in Prozent festgehalten:

$$EF = \frac{LVEDV - LVESV}{LVEDV} \times 10$$

### Herzeitvolumen (“Cardiac Output”, CO)

Berechnet sich durch Multiplikation des Schlagvolumens und der Herzfrequenz. Der Wert gibt das Blutvolumen an, welches vom linken Ventrikel in jeder Minute in die Aorta ausgeworfen wird. Es wird in  $\mu\text{l}/\text{min}$  angegeben.



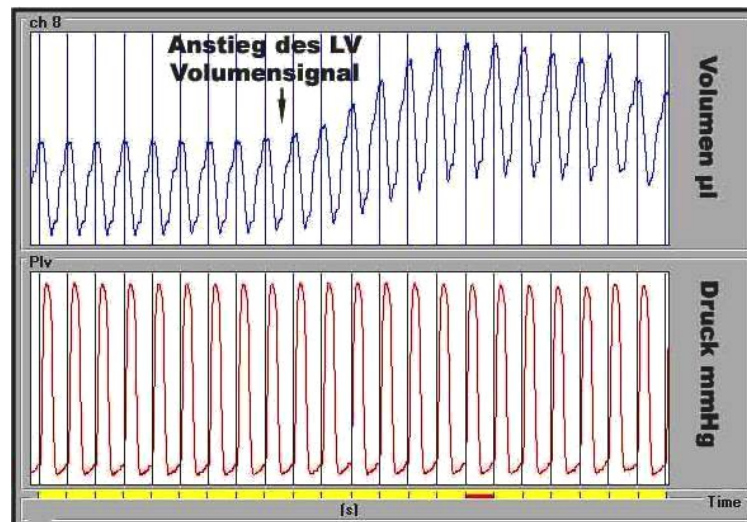


Abbildung 6: Erhöhung des Konduktanzsignals bei Bolusgabe ( $10\mu\text{l}$ ) von 10%-iger Kochsalz-Lösung.

### 3.5.7 Parameter zur Bestimmung der systolischen Funktion

#### Maximaler linksventrikulärer Druck ( $LVP_{max}$ )

Der maximale Druck, welcher vom linken Ventrikel generiert wird. Er stellt ein aussagekräftiges Maß der systolischen Funktion des LV dar. Er wird in mmHg angegeben.

#### End-systolischer linksventrikulärer Druck (LVESP)

Der Druck im linken Ventrikel am Endpunkt der Systole stellt ein aussagekräftiges Maß der systolischen Funktion des linken Ventrikels dar. Der Druck entspricht dem Wert des end-systolischen arteriellen Druck. Er wird in mmHg angegeben.

#### Maximale LV-Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ )

Stellt einen validen Parameter der systolischen Funktion und insbesondere der Kontraktilität des linken Ventrikels dar. Sie wird mathematisch aus der ersten Ableitung der linksventrikulären Druckkurve errechnet und beschreibt die maximale Geschwindigkeit, mit der der Druck im LV ansteigt. Sie wird in mmHg/s angegeben.

### 3.5.8 Parameter zur Bestimmung der diastolischen Funktion

#### Maximale LV-Druckabfallgeschwindigkeit ( $dP/dt_{min}$ )

Die maximale Geschwindigkeit des Druckabfalls während der isovolumetrischen Relaxation ist ein wissenschaftlich verifiziertes Maß der frühen LV-Relaxation des linken Ventrikels. Sie wird in mmHg/min angegeben.

**Tau ( $\tau$ )**

Der Druckabfall im linken Ventrikel während der isovolämischen Herzaktion wird nach dem Zeitpunkt der  $dP/dt_{min}$  bis zum Öffnen der Mitralklappe durch die exponentielle Funktion dargestellt:

$$P = P_0 \times e^{-\frac{t}{\tau}} + P_\infty$$

Hierbei entspricht:  $P$  = LV-Druck,  $P_0$  = LV-Druck bei  $dP/dt_{min}$ ,  $t$  = Zeit nach  $dP/dt_{min}$ ,  $\tau$  = Tau, Zeitkonstante des LV-Druckabfalls,  $P_\infty$  = Asymptote des LV-Drucks, wenn  $V = 0$  im linken Ventrikel.

Tau stellt einen gängigen Parameter der frühen LV-Relaxation dar. Je größer sich der Wert von Tau darstellt, desto länger ist die Relaxation des LV und dem folgend die diastolische Funktion des LV gestört. Der Wert wird in ms angegeben.

**End-diastolischer LV-Druck (LVEDP)**

Er wird am Endpunkt der Diastole im linken Ventrikel gemessen. Sein Anstieg weist auf eine gestörte diastolische Funktion und gestörte Füllungsverhältnisse des LV hin. Er stellt in der klinischen Praxis einen substanzialen Wert für die Herzfunktion dar. Er wird in mmHg angegeben.

**3.6 Mortalitätsstudie**

Um den Einfluß von TRIF im Krankheitsbild der viralen Myokarditis und die Relevanz in Bezug auf das Überleben der Tiere untersuchen zu können, wurden zwei durch CVB3 infizierte Tiergruppen bestehend aus WT-Mäusen (WT-CVB3) ( $n = 20$ ) und TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen (TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3) ( $n = 11$ ) gebildet und über einen Zeitraum von 70 Tagen täglich observiert.

In einer weiteren Versuchstiergruppe wurden TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 ( $n = 20$ ) mit murinen IFN- $\beta$  (Bayer-Schering<sup>®</sup>, 100 kilo [ku] i.p.; jeden zweiten Tag bis zum 14. Tag) behandelt und ebenfalls über einen Zeitraum von 70 Tagen täglich observiert. Die Auswahl des Zeitpunktes für die IFN- $\beta$  Behandlung wurde aufgrund der virämischen Phase getroffen. In dem verwendeten Tiermodell endet eben diese am Tag 14 *post infectionem*. Der genaue Todeszeitpunkt jedes verstorbenen Tieres wurde sorgfältig festgehalten.

Die Experimentatoren folgten den Richtlinien des US Nationalinstituts für Gesundheit, USA – "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", publiziert durch die US National Institutes of Health (NIH Publikationsnr.: 85-23, überarbeitet 1985).

## 3.7 Molekularbiologische Methoden

### 3.7.1 RNA-Extraktion

Die in dieser Studie durchgeführte RNA-Isolation wurde mittels des Trizol<sup>®</sup>-Reagenz der Firma Invitrogen realisiert. Die anschließende Aufreinigung der isolierten RNA wurde mit Hilfe des mit einem RNeasy<sup>®</sup> Mini-Kit und einem DNA-Verdauaset der Firma Qiagen vorgenommen. Hierbei wurden die firmeneigenen Arbeitsprotokolle allenfalls geringfügig modifiziert.

#### Prozedere zur Durchführung der RNA-Extraktion

Zu Beginn erfolgte eine einheitliche Homogenisierung der bei -80 °C gelagerten histologischen Proben mittels des Trizol<sup>®</sup>-Reagenzes. Hierzu wurden die Proben in 400 µl Trizol<sup>®</sup>-Reagenz gegeben und anschließend mit einem Pellet Pestle einheitlich homogenisiert. Im Weiteren wurden die Proben jeweils erneut mit 400 µl Trizol<sup>®</sup>-Reagenz versetzt und über einen Zeitraum von fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann erfolgte eine Zugabe von 160 µl Chloroform je Probe mit anschließender Zentrifugation für eine Zeit von 15 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C und einer Beschleunigung von 12.000g.

Im Anschluss an die durchgeführte Zentrifugation konnten drei voneinander abzugrenzende Flüssigkeitsphasen verifiziert werden. Die Phase, die obenauf lag und im Vergleich zu den anderen Phasen durchsichtig erschien, war reich an RNA, wurde abpipettiert und in ein gesondertes Eppendorfggefäß überführt. Um eine Ausfällung der RNA erreichen zu können, wurden der bereits gewonnenen Oberphase 400 µl 100%-iges Isopropanol zugeführt und für einen Zeitraum von zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die gewünschte Pelletierung der RNA wurde durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C bei einer Beschleunigung von 12.000g erzielt.

Der hierbei entstandene Überstand wurde beseitigt und das gewonnene RNA-Pellet mittels einer Pipettierung in 100 µl-RNase-freiem Wasser resuspendiert. Danach wurden die bereits gelöste RNA bei den Arbeitsschritten der Aufreinigung und des DNA-Verdau mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Mini-Kits aufbereitet. Diesbezüglich wurde die RNA mit einem 350 µl RLT-Puffer versetzt, welcher sich aus 100 µl eines 1%-igen 2-Mercapto-Ethanol und aus 250 µl absolutem Ethanol zusammensetzte.

Das so entstandene Konglomerat wurde auf eine RNeasy Mini-Spin Säule aufgetragen und hieran für eine Dauer von 15 Sekunden bei Raumtemperatur und 10.000rpm zentrifugiert. Durch diesen Arbeitsschritt wurde die RNA an die Säule gebunden. Die in dem jeweiligen Tube verbliebene Flüssigkeit wurde verworfen. Die Säule wurde nun mittels 350 µl des Waschpuffers RW1 und einer anschließenden Zentrifugation von 15 Sekunden bei Raumtemperatur und 10.000rpm einem weiteren Reinigungsvorgang unterzogen. Zur Herbeiführung des DNA-Verdau wurde das "RNase-Free DNase-Set" von Qiagen verwendet. Für jede einzelne Probe wurde ein Gemisch,

bestehend aus 10 $\mu$ l DNase und 70 $\mu$ l RDD-Puffer, auf die entsprechenden Säulen aufgebracht und für eine Zeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels 350 $\mu$ l des Waschpuffers RW1 und einer anschließenden Zentrifugation von 15 Sekunden bei Raumtemperatur und 10.000rpm wurden die Säulen einem nochmaligen Reinigungsvorgang unterzogen. Im Anschluss daran wurden 500 $\mu$ l eines RPE-Puffers aufgetragen und so für eine Zeit von zwei Minuten bei Raumtemperatur und 10.000rpm zentrifugiert.

Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Trocknung der Säule vollzogen. Zu diesem Zweck wurde der verbliebene Puffer im Reaktionsgefäß verworfen, und die Säule wurde wiederum für eine Zeit von einer Minute bei Raumtemperatur und 10.000rpm zentrifugiert. Schließlich wurde die Eruierung der RNA jeweils mit 50 $\mu$ l und anschließend mit 30 $\mu$ l RNase-freiem Wasser mit bei einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation von einer einminütigen Dauer bei Raumtemperatur und 13.200rpm durchgeführt.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in den Proben wurde je Probe 1 $\mu$ l der Lösung unter Verwendung der photometrischen Messung mittels des Nanodrops-Analysegerätes (Thermo Scientific-PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) und dem Software-Programm Nanodrop-1000 v3.1.2. verwendet. Zur Beurteilung der Qualität der hierbei isolierten RNA wurde die Ratio A260 zu A280 betrachtet. Basierend auf dieser Methode wurden sämtliche Proben mit den Werten von 1,8 bis 2,0 für qualitativ gut befunden.

### 3.7.2 Reverse Transkription

Um eine Umschreibung der isolierten mRNA in komplementäre DNA (cDNA) erzielen zu können, wurde ein "High Capacity Kit" der Firma Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland, benutzt. Dafür wurde 1 $\mu$ g RNA auf 50 $\mu$ l RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die mRNA wurde 10 Minuten lang bei 70 °C im PCR-Cycler denaturiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation der Proben wurden 50 $\mu$ l Mastermix<sup>®</sup> hinzugegeben. Der Mastermix bestand aus 10 $\mu$ l 10x RT-Puffer, 4 $\mu$ l 25x dNTP-Mix, 10 $\mu$ l 10x Random-Primer, 5 $\mu$ l Multiscribe RT (50U/ $\mu$ l) und 21 $\mu$ l RNase-freiem Wasser. Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte in einem PCR-Cycler nach dem folgenden Programm:

10 min	Raumtemperatur
2 Stunden	37 °C
$\infty$	4 °C

### 3.7.3 “Real Time”-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR), TaqMan<sup>®</sup>-PCR

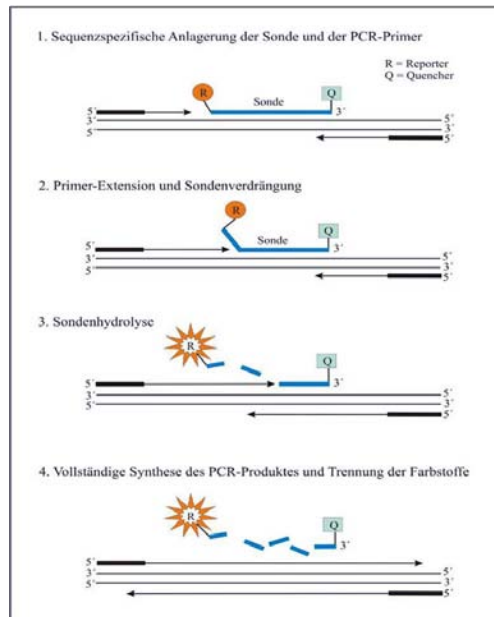


Abbildung 7: Einfluss der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase auf eine fluorene Sonde während der Extensionsphase einer TaqMan<sup>®</sup>-PCR.

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um ein biologisches Verfahren, mit welchem eine DNA-Vervielfältigung *in vitro* erreicht werden kann. Dabei findet ein Enzym, die sogenannte DNA-Polymerase, Verwendung.

Im Speziellen bildet die DNA-Polymerase das Polymer Desoxyribonukleinsäure (DNA), als Monomere dienen Desoxyribonukleotide, im Detail Desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTPs). Die DNA-Polymerase nutzt hierbei einen bereits vorhandenen DNA-Einzelstrang als Matrize zur Synthesisierung eines neuartigen und komplementären Stranges. Die genaue Nukleotid-Abfolge wird also maßgebend von der Matrize vorgegeben. Der Erhalt der DNA-Sequenz ist entscheidend für die Fähigkeit der DNA-Polymerase, die in der DNA codierte Erbinformation zu kopieren. Das korrekte Kopieren der Matrize gelingt durch komplementäre Basenpaarung der eingebauten Nukleotidbasen mit den Basen der DNA-Matrize, welche durch Wasserstoffbrücken vermittelt werden. Die Synthese des neuen DNA-Stranges erstreckt sich vom 5'- bis zum 3'-Ende (Abbildung 7).

Chemisch betrachtet findet dabei ein nukleophiler Angriff der endständigen 3'-Hydroxylgruppe des DNA-Stranges auf das  $\alpha$ -Phosphat des dNTPs statt, wobei Pyrophosphat freigesetzt wird. Dieser Schritt wird von der Polymerase katalysiert. Im Gegensatz zu RNA-Polymerasen kann die Synthese des komplementären DNA-Stranges bei DNA-Polymerasen nur erfolgen, wenn der Polymerase ein freies 3'-Hydroxylende zur Verfügung steht. An dieses wird dann das erste Nukleotid angehängt. Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nutzt man insoweit einen ca. 15-20 Nukleotide langen DNA-Einzelstrang (“Primer”), der als Startpunkt der Reaktion dient.

Es ist möglich, RNA-Sequenzen zuerst in cDNA umzuschreiben und diese DNA sodann mittels PCR zu vervielfältigen. Die Prozedur nennt sich Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) und ist eine der am häufigsten angewandten Methode, um RNA-Mengen eines Gewebes zu bestimmen. Durch Bestimmung der mRNA-Mengen eines Gewebes kann man die Expression dieses Gens indirekt untersuchen. Eine Alternative zur klassischen PCR, die lediglich eine quantitative Bestimmung der gewonnenen DNA erlaubt, ist die "Real-Time-PCR" oder TaqMan<sup>®</sup>-PCR. Die Quantifizierung nach TaqMan<sup>®</sup>-PCR wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines bestimmten Schrittes jedes PCR-Zyklus erfasst werden. Bei der TaqMan<sup>®</sup>-PCR bindet eine Sonde zwischen den "forward" (vorwärts) und "reverse" (rückwärts) Primern auf 5'-Ende fluoreszenzmarkiertes mit dem FAM-Reporter-Farbstoff Oligonukleotid. Die Aktivität des Reporters wird von einem am 3'-Ende liegenden "Quencher" unterdrückt. In der vorliegenden Studie war der "Quencher" mit dem TAMRA-Quencher-Farbstoff markiert. Bei der Neustrangsynthese entfernt die Ampli-Taq-DNA-Polymerase den Reporter mit ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität, und der fluoreszierende Farbstoff wird freigesetzt. Die Fluoreszenz wird über eine Xenon-Blitzlampe angeregt und, sobald sie einen Schwellenwert überschritten hat, vom Cycler gemessen und verhält sich direkt proportional zur DNA Matrize-Menge im Testansatz.

In unserer Studie wurde die Expression von verschiedenen Genen mittels "Real-Time"-TaqMan<sup>®</sup>-PCR bestimmt. Zu diesem Zweck erfolgte die RNA-Isolierung vom Herzgewebe, die anschließend in cDNA umgeschrieben wurde.

### **Verwendete "Primer" und Prozedere zur Durchführung der TagMan<sup>®</sup>-PCR**

Die TaqMan<sup>®</sup>-PCR wurde unter Verwendung des Kits der Firma "Applied Biosystems", Darmstadt, Deutschland, durchgeführt. In die Vertiefungen einer 96- "well" Platte wurden jeweils 11,5 $\mu$ l Premix, welches aus 6,25 $\mu$ l TaqMan universal PCR-MasterMix (2x), 0,625 $\mu$ l TaqMan "Gene Expression Assay" (20 x) und 3,625 $\mu$ l Nuklease-freiem Wasser bestand, sowie 1,5 $\mu$ l entsprechender cDNA pipettiert. Jede cDNA-Probe wurde in jeweils zwei Vertiefungen zur Doppelbestimmung der Expression pipettiert. Alle verwendeten Primer wurden mit dem Farbstoff FAM markiert.

Folgendes Prozedere wurde zur Amplifizierung der Proben mit dem 7900HT "Fast Real-Time" PCR System verwendet, wobei die Schritte 2 und 3 zyklisch 40fach wiederholt wurden:

- Denaturierung und Aktivierung der Amplifizierungs-Taq DNA-Polymerase über einen Zeitraum von 10 Minuten bei einer Temperatur von 95 °C
- Denaturierung über einen Zeitraum von 15 Sekunden bei einer Temperatur von 95 °C  
"Annealing" (Härtung) und
- Elongation über einen Zeitraum von 60 Sekunden bei einer Temperatur von 60 °C

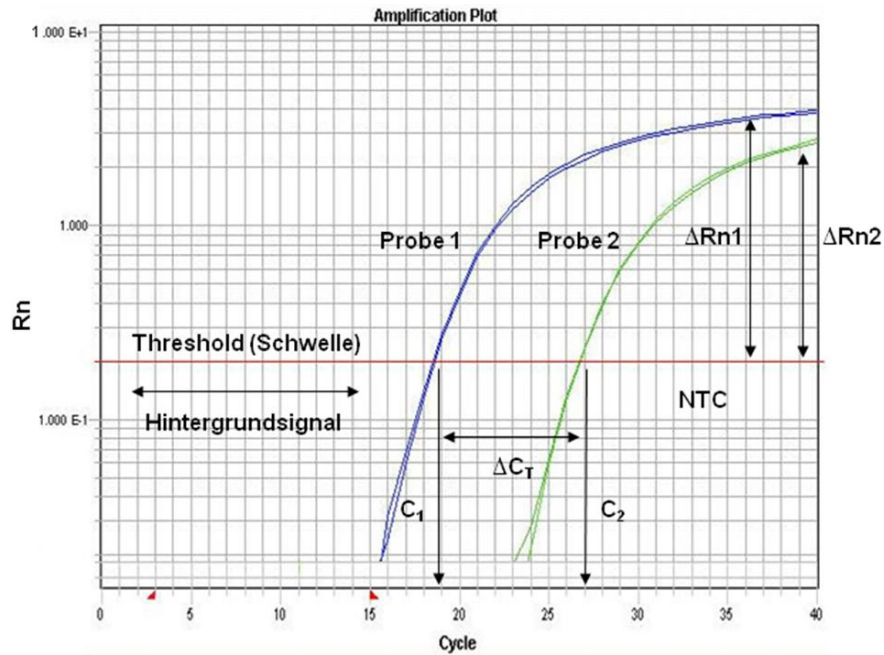


Abbildung 8: Relatives Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes ( $R_n$ ) in der Abhängigkeit zu den TaqMan<sup>®</sup>-PCR-Zyklen ("Cycle", Zyklus); Bestimmung der Genexpression durch Berechnung der  $\Delta C_T$ .

Die so gewonnenen Ergebnisse der einzelnen Primer wurden mit Werten der endogenen Kontrolle eukariotischer 18S RNA relativierend verglichen. Die relative Quantifizierung der erhobenen Daten erfolgte mittels des SDS 2.2.2-Programms (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Dabei wurden die  $C_T$ -Werte (die "Threshold-Cycle" weist die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein linearer Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird) für die endogene Referenz (18S) sowie die Zielsequenz ermittelt. In jeder Doppelbestimmung wurde ein Mittelwert von beiden  $C_T$ -Werten berechnet (Abbildung 8, Tabelle 3).

Zum Abschluss wurden die Zielgenwerte normalisiert, indem sie durch die  $C_T$ -Werte des bestimmten Zielgens nach der Subtraktion durch die  $C_T$ -Werte des 18S-Gens errechnet wurden ( $\Delta C_T$ -Wert):

$$\Delta C_T(Z) - C_T(18S)$$

Anschließend wurden die Expressionswerte ( $E_Z$ ) des bestimmten Zielgens nach der folgenden Formel berechnet:

$$E_Z = 2^{-\Delta C_T}$$

### 3.7.4 Bestimmung der Viruslast

Um eine suffiziente Aussage über die Viruslast der infizierten Tiere treffen zu können, wurde mittels der Methode TaqMan<sup>®</sup>-PCR die Virusreplikation im Herzmuskelgewebe der Tiere bestimmt. Zur Detektion von cDNA des CVB3-Virus, welche im Vorfeld der reversen Transkription generiert wurde, wurde jeweils ein spezifischer "forward"- und ein "reverse"-Primer verwendet

Tabelle 3: Verwendete Primer der Genexpressionsuntersuchungen unter Verwendung der TaqMan<sup>®</sup>-PCR.

Gen	Gen- "Assay-ID"
TNF- $\alpha$	Mm00443258.m1
IL-1 $\beta$	Mm00434228.m1
IL-10	Mm00439616.m1
IL-18	Mm01170964.m1
IFN- $\beta$	Mm00439552.s1
Kollagen I	Mm00483888.m1
Kollagen III	Mm00802331.m1

(Tabelle 4). Ein standardisiertes Plasmid diente bei der genauen Quantifizierung der Anzahl der RNA-Kopienzahl des CVB3-Virus im Herzmuskelgewebe als Kontrollsubstanz. Das standardisierte Plasmid besitzt eine Produktionsrate der Kopienzahl von  $1 \times 10^5$  CVB3 cDNA Kopien. Um die exakte Anzahl der CVB3 Kopien bestimmen zu können, wurde in diesem Verfahren eine FAM markierte TaqMan-Sonde benutzt. Die Anzahl der TaqMan-Zyklen entsprach dem Zyklenprogramm zur Bestimmung der vorangegangenen Genexpressionsnachweise durch TaqMan<sup>®</sup>-PCR.



Tabelle 4: Primer, Sonde und Vorbereitung des Gemisches zur Bestimmung der Anzahl von CVB3-RNA-Kopien mittels TaqMan<sup>®</sup>-PCR. Konzentration, Volumen, ABI (Applied Biosystems, Darmstadt DE und TIB-Molbiol, Berlin DE).

Ansatz	Konzentration	Volumen in $\mu$ l	Sequenz	Bezugsquelle
Universeller PCR-Master Mix	1x60ng/ $\mu$ l	12,5		ABI
“Forward”-Primer	180ng/ $\mu$ l	1	CCCTgAATgCggCTAATCC	TIB-Molbiol
“Reverse”-Primer	5,0pM	1	ATTgTCACCATAA gCAgCCA	TIB-Molbiol
MGB-TaqMan Sonde		1,0	5'-TgC AgC ggA ACC g	ABI
Aqua dest.		5,5		ABI
Standard		4,0		ABI
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>25,0</b>		

### 3.7.5 Plaque Assay zur Konzentrationsbestimmung des Coxsackievirus B3 (CVB3)

Um die Anzahl der infektiösen Viruspartikel in einer Probe zu ermitteln, wurde die jeweilige Probe auf HeLa-Zellen mittels Plaque-Assay austitriert. Dafür wurden am Vortag HeLa-Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag einen konfluenten Monolayer gebildet haben (24 Well-Platte =  $2,5 \times 10^5$  Zellen/Well; 6 Well-Platte =  $1 \times 10^6$  Zellen/Well; Abbildung 9).

Am nächsten Tag wurde von der zu bestimmenden Virusprobe eine logarithmische Verdünnungsreihe mit Serum freiem Medium hergestellt (Abbildung 10). Nachdem das Medium von den konfluenten HeLa-Zellen abgesaugt wurde, erfolgte die Inokulation von 300 $\mu$ l (24-Well-Platte) bzw. 1ml (6-Well-Platte) Virusverdünnung für 30 min bei 37 °C im Brutschrank (HRV14 bei 33 °C). Bereits vor der Inokulation des Virus wurde der Agar-“Overlay”, bestehend aus zwei Lösungen,



Abbildung 9: Zeitlicher Ablauf der zu bestimmenden Virusprobe mittels des Plaque Assay mit Serum freiem Medium über einen Zeitraum von 4 Tagen.

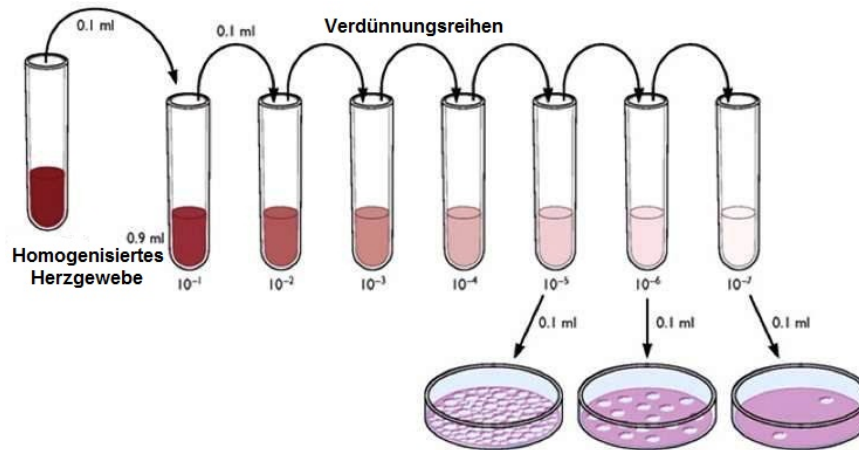


Abbildung 10: Schematische Darstellung zur Durchführung der Verdünnungsreihen am zweiten Tag der Versuchsreihe des Plaque Assay.

vorbereitet. In Lösung A wurde 0,32g Agar mit 10ml A. dest. gemischt und anschließend in einem Topf mit Wasser über einen Bunsenbrenner für 15 min gekocht bis sich der gesamte Agar aufgelöst hatte. Für Lösung B wurden 30ml "Eagle-Overlay" mit 4ml FKS vermischt und im Wasserbad auf 41,5 °C erwärmt. Nach 15-minütigem Kochen der Lösung A, wurde die Lösung B zur Lösung A hinzugegeben, gut durchmischt und im Wasserbad bei 41,5 °C mindestens 30 min temperiert.

Nach 30-minütiger Inokulation der Virusverdünnungen, wurde diese vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 500µl (24 Well-Platte) bzw. 2ml (6 Well-Platte) Agar- "Overlay" überschichtet. Nach Erkalten und Verfestigung des "Overlay" wurden die Zellen je nach Coxsackievirus-Serotyp für 1 – 3 Tage inkubiert (Brutschrank bei 37 °C – HRV14 bei 33 °C), anschließend die Plaques angefärbt und ausgezählt. Zum Anfärben wurde 0,02g Neutralrot in 50ml PBS gelöst, filtriert und jeweils 500µl (24- Well-Platte) bzw. 2ml (6-Well-Platte) auf den Agar-"Overlay" pipetiert. Nach einer weiteren Inkubation bei 37 °C im Brutschrank für 2,5 bis 4 h wurde die Färbelösung abgesaugt, ohne den Agar zu beschädigen, und anschließend die Plaques ausgezählt.

Wenn ein Gewebestück als Ausgangsmaterial für ein Plaque Assay vorhanden war, wurde dieses in 2ml serumfreiem Medium aufgenommen, mit Hilfe eines Häckslers zerkleinert und dreimal eingefroren und aufgetaut. Anschließend wurden die zerkleinerten Gewebestückchen bei 5.000rpm für 3 min abzentrifugiert und der Überstand für das Plaque Assay verdünnt. Die Anzahl der infektiösen Viruspartikel wird in "plaque forming units" (p.f.u.) angegeben und - wie folgt - bestimmt:

$$\frac{\text{Plaques}}{\text{Inokulationsvolumen[ml]}} \times \text{Virusverdünnung} = \text{p.f.u./ml}$$

## 3.8 Immunhistochemie

### 3.8.1 Generierung von Gefrierschnitten

Unter Verwendung des Kryostaten (Microm, Lobal Medical Instrumentation, Minnesota, USA) wurden die gewonnenen Gewebeproben des Herzens, welche zuvor nativ bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konserviert worden waren, auf der Schnellgefriereinheit in Tissue-Tek O.C.T. (Sakura, Zoeterwoude, NL) eingebettet, und es wurden fünf  $\mu\text{m}$  dicke und Gefrierschnitte hergestellt.

Der hierfür verwendete Kryostat besteht aus einem Rotationsmikrotom, welches über eine Objekt- ( $-11^{\circ}\text{C}$ ) und einer Messerkühlung ( $-21^{\circ}\text{C}$ ) verfügt. Die Schnitte wurden anschließend auf Super-Frost-Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden vorab für fünf Minuten in 10%-iges Poly-L-Lysin eingetaucht, um die Haftung der Gewebeproben auf der Glasoberfläche des Objektträgers zu erhöhen.

Die Schnitte wurden in serieller Schnittweise aufgetragen, sodass sich auf einem Objektträger Gewebe unterschiedlicher Schnittebenen des Herzmuskels befand. Durch Eintauchen in eiskaltes Aceton für die Dauer von zehn Minuten wurden die Schnitte fixiert. Die Glasträger wurden hiernach entweder sofort weiterverwendet oder alternativ bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.8.2 Theoretischer Hintergrund der immunhistochemischen Färbungen

Das Prinzip immunhistochemischer Färbungen beruht auf der Grundlage der Antigen-Antikörper-Reaktion bzw. der Detektierung histologischer Antigene auf Gefrier- und Paraffinschnitten und anderen Zellmarkern. Die Methodik der hier verwendeten immunhistologischen Färbungen basiert auf der Bindung eines Antikörpers zu dem dazugehörigen Zielantigen im Herzgewebe (Tabelle 5). Überdies ergibt sich eine Bindung des Antikörpers durch einen zweiten enzymatischen Antikörper. Anschließend wird der histologische Nachweis des zweiten Antikörpers durch dessen entsprechendes Substrat erbracht. Die unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungen werden aufgrund der Herkunft des ersten Antikörpers mittels verschiedener Methoden ausgeführt. In dieser Arbeit bedienen wir uns der ABC-, der EnVision<sup>®</sup>- und der indirekten Methode.

### 3.8.3 Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode)

Diese Methode wurde in den 80er Jahren durch Hsu [156] in Japan und Fritzl [157] maßgebend vorangetrieben und ist die derzeit am häufigsten eingesetzte immunhistologische Färbemethode. Bei Zugrundelegung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode wird die Bindung eines Antikörpers an das entsprechende Zielantigen ausgelöst (Abbildung 11). Bei dem Verfahren handelt es sich um ein Immuno-Peroxidaseverfahren. Hierbei wird die starke Affinität von Avidin, bei dem es sich um ein aus Hühnereiweiß isoliertes Glykoprotein handelt, zu Biotin ausgenutzt.

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die immunhistochemische Untersuchungen des Herzgewebes. Ak=Antikörper, VDG=Verdünnung.

Primär-AK	Firma	Spezies	VDG	Sekundär-Ak	Spezies	VDG	Methode
CD3 <sup>+</sup>	Santa-Cruz	Goat	1:75	ABC-Kit	Rabbit	1:250	ABC
CD4 <sup>+</sup>	Pharmingen	Rat	1:50	Dako EO 468	Rabbit	1:200	ABC
CD68 <sup>+</sup>	Pharmingen	Rat	1:500	Dako EO 468	Rabbit	1:200	ABC
CD80 <sup>+</sup>	Pharmingen	Hamster	1:50	Dianova	Goat	1:100	ABC
Kollagen I	Chemicon	Rabbit	1:500	EnVision	—	unverd.	EnVision
Kollagen III	Calbiochem	Rabbit	1:200	EnVision	—	unverd.	EnVision
MMP2	Chemicon	Rabbit	1:75	EnVision	—	unverd.	EnVision
MMP9	Chemicon	Rabbit	1:200	EnVision	—	unverd.	EnVision
VCAM	Pharmingen	Rat	1:50	Dako EO 468	Rabbit	1:200	ABC
ICAM	Pharmingen	Hamster	1:50	Dianova	Goat	1:100	Indirekt

Eben diese biochemische Bindung verfügt über eine der höchsten biologischen Bindungskonstanten. Sie ist 1.000.000mal höher als die physiologische Antikörper-Antigen-Affinität und besitzt daher einen nahezu irreversiblen Charakter. Nach Bindung des Primärantikörpers an das entsprechende Antigen bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper an das F<sub>c</sub>-Fragment des Primärantikörpers.

Durch eine anschließende Zugabe von HRP entsteht eine Enzym-Substrat-Reaktion, die den gewünschten Farbnachweis erbringt. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Die bei Anwendung dieser Methode verwendeten Sekundärantikörper wurden jeweils mit mehreren Biotinmolekülen konjugiert. Dadurch kam es zur Bildung von Avidin-Biotin-Komplexen von makromolekularem Ausmaß.

Da auch das Zielgewebe Avidin und Biotin enthält, musste im ersten Schritt der Färbung das endogene Avidin mit Hilfe eines Blocking-Kits geblockt werden. So war garantiert, dass nur die spezifischen, biotinylierten Antikörper einen Ansatzpunkt für den Avidin-Biotin-Komplex bildeten und damit eine hohe Spezifität für das exogen zugeführte Avidin erreicht werden konnte. Der Nachweis erfolgte wiederum mittels des Substrates Carbazol.

### Prozedere zur Durchführung der ABC-Methode

Alle für die Färbungen verwendeten Objektträger wurden für eine Zeit von fünf Minuten in eine Küvette – gefüllt mit PBS – inkubiert, um die histologischen Herzschnitte auf den Objektträgern an das Puffermilieu anpassen zu können.

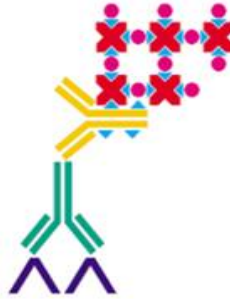


Abbildung 11: Bei der ABC-(oder SABC-) Methode reagiert der Avidin- (oder Streptavidin-) Biotin-Enzymkomplex mit dem biotinylierten Sekundärantikörper.

Die jeweiligen Färbefelder der Herzschnitte auf den Objektträgern wurden mit einem Glasdiamantschliff umrandet, um dem Verlust der entsprechenden Antikörper aus dem vorgesehenen Färbefeld entgegenzuwirken. Die Wirkung der gewebeeigene Peroxidase der histologischen Präparate wurde mit einer 0,075%-igen Wasserstoffperoxid-Lösung in PBS umgesetzt. Anschließend wurden die Objektträger samt histologischen Schnitten einem fünf Minuten andauernden Spülvorgang in TBS unterzogen, um sie vom vorher aufgebrauchten Wasserstoffperoxid zu reinigen. Um elektrostatischen Ladungspotentialen zwischen den unterschiedlichen Proteinen zuvorzukommen und unspezifische Anfärbungen zu verhindern, wurden alle Herzmuskelschnitte in 1 x TBS, Normalserum und vier Tropfen Avidin pro verwendetem Lösungsmilliliter über eine Zeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l pro Färbefeld der zu verwendenden Antikörper hinzugegeben. Ferner wurden die Objektträger samt den Gewebeschnitten über eine Dauer von 60 Minuten wiederum bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde der erste Antikörper in Normalserum mit TBS und vier Tropfen Biotin pro ml gelöst. Daraufhin erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang von jeweils fünf Minuten in PBS. In Anschluss hieran wurde der zweite Antikörper in verdünnter Form, Verdünnung des zweiten biotinylierten Antikörpers in TBS und Normalserum, zugeführt.

Um eine entsprechend suffiziente Bindung des zweiten an den ersten Antikörper gewährleisten zu können, wurden die Gewebeschnitte für einen Zeitraum von 60 Minuten inkubiert. Sodann folgte ein erneuter Arbeitsschritt von zwei Waschvorgängen über die Dauer von jeweils fünf Minuten in TBS und danach die Hinzugabe des ABC-Komplexes. Hinzu kam eine erneute Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Hierauf folgten wiederum zwei Waschvorgänge von jeweils fünf Minuten in TBS. Im Anschluss hieran wurde die gewebeeigene Peroxidase des ABC-Komplexes unter Hinzugabe des Substrats umgesetzt und dadurch visuell sichtbar gemacht. Das Substrat Carbazol wurde folgendermaßen angesetzt:

Ein Messzylinder wurde mit 15ml 0,2 molaren Essigsäure, 35ml 0,2 molaren Natriumacetat und 150ml destillierten Wasser befüllt und mit 50mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), welchem 10ml N,N-Dimethylformamid beigegeben wurde, versetzt.

Danach wurden der beschriebenen Lösung 100 $\mu$ l einer 30% Wasserstoffperoxid-Lösung zugeführt, und im Anschluss wurde die Küvette für eine Zeitspanne von 12 Minuten in Dunkelheit auf einer Schüttelplatte inkubiert. In der Folge wurden wiederum zwei Waschvorgänge von jeweils fünf Minuten in TBS vorgenommen. Die Objektträger wurden durch kurzzeitiges Eintauchen in Hämalun nach Mayer gegengefärbt. Letztlich wurden alle Objektträger mit den angefärbten Herzmuskelschnitten mit Glyceringelatine konservierend eingedeckt und mit Deckgläsern ausgestattet.

Es wurde auch hier eine Negativkontrolle der Färbung durchgeführt. Bei den jeweiligen beiden negativen Färbefeldern pro Anfärbung wurde anstelle des ersten Antikörpers eine Pufferlösung verwendet und somit eine Kreuzreaktion des zweiten Antikörpers gegen unspezifische Antigene im Gewebe ausgeschlossen. Außerdem wurde zur Kontrolle der Blockierung der endogenen Peroxidase statt des ersten und zweiten dazugegebenen Antikörpers eine Pufferlösung benutzt. Die Lagerung aller verwendeten Gewebeschnitte erfolgte bei Raumtemperatur in den dafür vorgesehenen Präparatekästen.

#### **3.8.4 EnVision<sup>®</sup>-Detektionsmethode**

Die EnVision<sup>®</sup>-Methode stellt ein hochempfindliches Detektionsverfahren dar, welches für ein breites Spektrum von Antikörpern anwendbar ist. Das Verfahren stützt sich entscheidend auf die Heranziehung eines sowohl Enzym- als auch Antikörper markierten Polymerkonjugats, dessen biologische Struktur aus einem Polysaccharid besteht (Abbildung 12). Auch der Nachweis dieses Antikörpers erfolgt anhand eines Substrates. Die immunhistochemischen Färbungen wurden in der hier vorliegenden Arbeit zum Nachweis der Infiltration von inflammatorischen Zellen und Veränderungen der extrazellulären Matrix des Myokards herangezogen. Hierbei wurden im Speziellen die Immunzellmigration von CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD68<sup>+</sup>- und CD80<sup>+</sup>-Zellen im Herzgewebe untersucht. Zudem wurde das Herzgewebe auf Kollagen I, III, MMP2 und MMP9 immunhistochemisch überprüft, um eine Aussage über die Beschaffenheit der extrazellulären Matrix des entnommenen Herzgewebes treffen zu können. Hinzukommend wurde das Ausmaß apoptotischer Zellen durch die Bestimmung von DNA-Fragmentierungen im Herzgewebe anhand der TUNEL-Methode ermittelt.

#### **Prozedere zur Durchführung der EnVision<sup>®</sup>-Methode**

Alle für die Färbungen verwendeten Objektträger wurden für die Dauer von fünf Minuten in einer Küvette – gefüllt mit PBS – inkubiert, um die histologischen Herzschnitte auf den Objektträgern an das Puffermilieu anpassen zu können.

Die jeweiligen Färbefelder der Herzschnitte auf den Objektträgern wurden auch hier mit einem Glasdiamantschliff umrandet, um dem Verlust der entsprechenden Antikörper aus dem

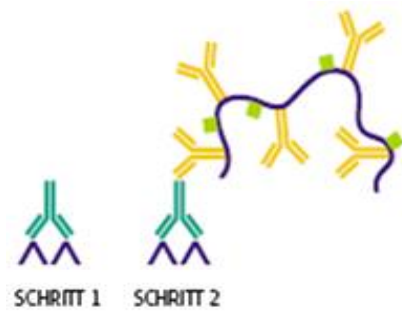


Abbildung 12: Bei der 2-Schritt Envision-Methode folgt dem Primärantikörper (Schritt 1) ein Dextranpolymer (Schritt 2), das durchschnittlich 10 Moleküle Sekundärantikörper und 70 Enzymmoleküle enthält (Peroxidase-Blockierungsschritte und Waschschrte nicht dargestellt).

vorgesehenen Färbefeld zu begegnen. Die Wirkung der gewebeeigene Peroxidase der histologischen Präparate wurde mit einer 0,075%-igen Wasserstoffperoxid-Lösung in TBS unterbunden. Anschließend wurden die Objektträger samt histologischen Schnitten einem fünf Minuten andauernden Spülvorgang in PBS unterzogen, um diese vom vorher aufgebrauchten Wasserstoffperoxid zu reinigen. Im Folgenden wurde diese Prozedur wiederholt, und der verdünnte Antikörper wurde auf die Färbefelder aufgebracht.

Im weiteren Verlauf des Färbevorgangs wurden die histologischen Schnitte für eine Zeit von 60 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschvorgänge von jeweils fünf Minuten in PBS. Überdies wurde der zweite zu verwendenden Antikörper auf die entsprechenden Färbefelder aufgebracht. Hierauf erfolgte eine weitere Inkubation der behandelten Objektträger in der feuchten Kammer über einen Zeitraum von 30 Minuten. Anschließend folgten wiederum zwei Waschvorgänge von jeweils fünf Minuten. Hieran schloß sich der eigentliche Färbungsvorgang durch Carbazol an. Dabei wurden in einem Messzylinder 15ml einer 0,2 molaren Essigsäure und 35ml eines 0,2 molaren Natriumacetats mit 150ml destillierten Wasser aufgefüllt.

Weiterhin wurde diese Lösung zu 50mg mit 10ml N,N-Dimethylformamid versetztem 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) zugeführt. Alsdann wurden 100 $\mu$ l Wasserstoffperoxid der Küvette mit den Objektträgern hinzugegeben. Anschließend wurde die Küvette auf einer Schüttelplatte für eine Dauer von 12 Minuten in Dunkelheit geschüttelt. Die Objektträger wurden hiernach erneut zweifach einem Waschvorgang für jeweils 5 Minuten unterzogen und durch kurzzeitiges Einsenken in Hämalaun gegengefärbt. Darüber hinaus erfolgte die Blaufärbung der Zellkerne unter kaltem, etwa 15°C, fließendem Leitungswasser. Des Weiteren wurden alle Objektträger mit den angefärbten Herzmuskelschnitten mit Glyceringelatine konservierend eingedeckt und mit Deckgläsern ausgestattet. Auch hier wurde eine Negativkontrolle der Färbung durchgeführt. Bei den jeweiligen beiden negativen Färbefeldern pro Anfärbung wurde anstelle des ersten Antikörpers eine Pufferlösung verwendet und somit eine Kreuzreaktion des ersten Antikörpers gegen spezifische Antigene im Gewebe ausgeschlossen. Außerdem wurde zur Kontrolle der Blockierung der endogenen Peroxidase statt des ersten und zweiten dazugegebenen Antikörpers eine Pufferlösung

benutzt. Die Lagerung aller verwendeten Gewebeschnitte erfolgte bei Raumtemperatur in den dafür vorgesehenen Präparatekästen.

### 3.8.5 Indirekte Methode

Bei der indirekten Nachweismethode wird ein Primärantikörper auf das zu untersuchende histologische Präparat aufgebracht. Im zweiten Schritt des Verfahrens wird ein weiterer Antikörper aufgebracht, welcher sich gegen den ersten Antikörper richtet. Dieser zweite Antikörper ist ein enzymmarkierter Sekundärantikörper, der den Primär-Antikörper bindet und die erwünschte Farbentstehung mit einer Enzym-Substrat-Reaktion bedingt (Abbildung 13). In unserer Studie wurde Carbazol als Substrat der Peroxidase des zweiten enzymatischen Antikörpers verwendet.



Abbildung 13: 2-Schritt indirekte Methode. Ein enzymatischer Sekundärantikörper reagiert mit einem unkonjugierten Primärantikörper, der an ein Gewebeantigen gebunden ist.

### Prozedere zur Durchführung der indirekten Methode

Alle für die Färbungen verwendeten Objektträger wurden für eine Zeit von fünf Minuten in einer Küvette, gefüllt mit PBS, inkubiert, um die histologischen Herzschnitte auf den Objektträgern an das Puffermilieu anpassen zu können. Die jeweiligen Färbefelder der Herzschnitte auf den Objektträgern wurden mit einem Glasdiamantschliff umrandet, um einen Verlust der entsprechenden Antikörper aus dem vorgesehenen Färbefeld zu verhindern. Die Wirkung der gewebeeigene Peroxidase der histologischen Präparate wurde mit einer 0,075%-igen Wasserstoffperoxid-Lösung in PBS umgesetzt. Anschließend wurden die Objektträger samt den histologischen Schnitten einem fünf Minuten andauernden Spülvorgang in TBS unterzogen, um sie von dem zuvor aufgetragenen Wasserstoffperoxid zu reinigen. Um elektrostatischen Ladungspotentialen zwischen den unterschiedlichen Proteinen zuvorzukommen und unspezifische Anfärbungen zu verhindern, wurden alle Herzmuskelschnitte in 1 x TBS, Normalserum und vier Tropfen Avidin pro verwendetem Lösungsmilliliter über eine Zeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 100  $\mu$ l pro Färbefeld der verwendeten Antikörper beigegeben. Des Weiteren wurden die Objektträger samt der Gewebeschnitte über eine Dauer von 60 Minuten wiederum bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde der erste Antikörper mit 1 x PBS und 10%-igen FKS verdünnt.

Daraufhin erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang von jeweils fünf Minuten in PBS. In Anschluss hieran wurde eine Verdünnung des zweiten biotinylierten Antikörpers mit PBS und 10%-



igen FKS herbeigeführt. Um eine entsprechend suffiziente Bindung des zweiten an den ersten Antikörper gewährleisten zu können, wurden die Gewebeschnitte für einen Zeitraum von 60 Minuten inkubiert. Hierauf folgten wiederum zwei Waschvorgänge von jeweils fünf Minuten in TBS. Im Anschluss wurde die gewebeeigene Peroxidase des zweiten verwendeten Antikörpers unter Hinzugabe von Carbazol demarkiert und visuell sichtbar gemacht.

Nachfolgend wurde ein Messzylinder mit 15ml 0,2 molaren Essigsäure, 35ml 0,2 molaren Natriumacetat und 150ml destillierten Wasser befüllt und mit 50mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), welchem 10ml N,N-Dimethylformamid beigegeben wurde, versetzt. Hiernach wurden der beschriebenen Lösung 100 $\mu$ l einer 30%-igen Wasserstoffperoxid-Lösung zugeführt und im Anschluss die Küvette für eine Zeitspanne von 12 Minuten in Dunkelheit auf einer Schüttelplatte durchgeschüttelt. Danach wurden wiederum zwei Waschvorgänge von jeweils fünf Minuten in PBS vorgenommen. Die Objektträger wurden sodann durch kurzzeitiges Eintauchen in Hämalaun gefärbt. Letztlich wurden alle Objektträger mit den angefärbten Herzmuskelschnitten mit Glyceringelatine konservierend eingedeckt und mit Deckgläsern ausgestattet.

Es wurde auch hier eine Negativkontrolle der Färbung durchgeführt. Bei den jeweils zwei negativen Färbefeldern pro Anfärbung wurde anstelle des ersten Antikörpers eine Pufferlösung verwendet und somit eine Kreuzreaktion des ersten Antikörpers gegen spezifische Antigene im Gewebe ausgeschlossen. Außerdem wurde zur Kontrolle der Blockierung der endogenen Peroxidase statt des ersten und zweiten hinzugefügten Antikörpers eine Pufferlösung benutzt. Die Lagerung aller verwendeten Gewebeschnitte erfolgte bei Raumtemperatur in den dafür vorgesehenen Präparatekästen.

### **3.8.6 “DeadEnd Colorimetric TUNEL”-System**

Mit Verwendung der DeadEnd Colorimetric TUNEL System Nachweismethode (Promega Corporation, Mannheim, Deutschland) wird der Nachweis von fragmentierter DNA in apoptotischen Zellen erbracht. Bei dem hier verwendeten histochemischen Nachweisverfahren werden biotinylierte Nucleotidverbindungen mit Hilfe der Deoxynucleotidyl-Transferase (rTdT) an das 3' Ende der jeweiligen DNA-Fragmente in apoptotischen Zellen angehängt. Im nachfolgenden Nachweis-schritt durch Streptavidin (Streptavidin HRP), welches mit der sogenannten “Horse Raddish” Peroxidase verbunden wurde, zum Nachweis eingefasst. Durch die Beifügung von Carbazol konnte Streptavidin HRP visuell wahrnehmbar gemacht werden.

#### **Prozedere zur Durchführung der “DeadEnd Colorimetric TUNEL”-System-Methode**

Die hier verwendete DeadEnd Colorimetric TUNEL Prüfung wurde nach dem – nur geringfügig modifizierten – Arbeitsprotokoll und mit dem Kit der Firma Promega ausgeführt. Um den Gewebeschnitten das gewünschte Puffermilieu vermitteln zu können, wurden die Proben für eine Zeit

von 30 Minuten in PBS Lösung gegeben und nachfolgend unter der Verwendung einer 10%-ig gepufferten Formalinlösung fixiert.

Durch die Hinzugabe von Formalin entstanden stabilisierende Methylenbrückenbindungen. Zur Demaskierung der Antigene auf den Gewebeschnitten wurden alle verwendeten Glasobjektträger mit einer Proteinase-K, welche zuvor in K-Puffer gelöst und bis zu einem Verhältnis von 1:500 verdünnt worden waren, versetzt. Durch diesen Arbeitsschritt wurden die durch Formalin blockierten Bindungsstellen für Antigen-Antikörper-Bindungen wieder vakant. Anschließend wurden zwei Waschvorgänge von jeweils fünf Minuten in PBS vorgenommen. Danach wurden alle histologischen Präparate wiederum mit Formalin fixiert. Um den konkreten Nachweis von Zellen, die sich in der Apoptose befinden, erbringen zu können, wurden die Gewebeschnitte in Lösung, bestehend aus einem Equilibrationspuffer, biotinyliertem Nucleotid Lösung (1:10) und dem rTdT Enzymzusatz (1:10), für eine Dauer von 60 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde unter Verwendung einer 1:10 durch destilliertes Wasser verdünnten Stopplösung und einer weiteren Inkubationsphase für 15 Minuten bei 37 °C beendet. Ferner wurde die Funktion der gewebeeigenen Peroxidase mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert, und unerwünscht unspezifische Anfärbereaktionen durch Carbazol wurden unterbunden. Dies wurde ermöglicht durch vorangehende Behandlung des Gewebes mit einer Wasserstoffperoxidlösung für eine Dauer von fünf Minuten.

Im weiteren Verlauf erfolgte die Bindungsreaktion mit Streptavidin HRP über einen Zeitraum von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Zwischen allen vollzogenen Färbeschritten wurden jeweils zwei Waschvorgänge von jeweils fünf Minuten in PBS durchgeführt. Die Umsetzung des Substrats Carbazol wurde mittels HRP erreicht. Wie auch bei den oben bereits erwähnten Färbeprozeduren wurde eine Gegenfärbung mittels Hämalun herbeigeführt. Auch hieran wurden die Präparate anschließend mit Glyceringelantine eingedeckt. Zum Nachweis der positiven Kontrolle wurden zwei Gewebeschnitte einer Behandlung mit einer DNase I unterzogen, welche im DNase-Puffer im Verhältnis von 1:5 verdünnt vorlagen (Qiagen, Hilden, DE). Bei diesem Nachweisverfahren kommt es zur Fragmentierung von zelleigener DNA und nachfolgend zu einer Bindungsvariante, bei der die biotinylierten Nucleotide sich nicht ausschließlich an die DNA-Fragmente apoptotischer Zellen binden. Zum Nachweis der negativen Kontrolle wurden zwei Gewebeschnitte einer Behandlung mit einem rTdT-Mix und destilliertem Wasser unterzogen.

### **3.8.7 Verfahren der farbkodierten und digitalen Bildanalyse**

Alle Gewebeschnitte wurden lichtmikroskopisch ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit analysiert und mit einem farbkodierten digitalen Bildanalyseverfahren ausgewertet. Dazu wurden von jedem Präparat 20 Gesichtsfelder in einer 200-fachen Vergrößerung ausgewertet und mittels einer Videokamera digitalisiert.

Im Anschluss hieran wurden die Bilder in einem 704 x 548 Pixel RGB Format mit einer Farbqualität von 16 bit aufgenommen. Mit diesem Auswertungsverfahren ist es möglich, die lichtmikroskopisch ausgewählten Gesichtsfelder untersucherunabhängig und exakt auszuwerten. Die digitale Bildver-

arbeitung wurde mit der Software Lucia G digital durchgeführt. Hierzu wurde jeweils ein selbst programmiertes Makro, eines für flächenhafte und eines für punkthafte Antigene, verwendet.

### Auswertung immunhistologischer Färbungen

Das Prozedere vollzieht sich insgesamt in vier Schritten:

- Digitale Erfassung sowie Schärfung und Kontrastierung des mikroskopischen Bildes in Echtzeit.
- Manuelle Selektion der Aufnahmefläche, die das Bildanalyseprogramm bei den Messungen benutzt. Dadurch wurde die Größe der gemessenen Fläche einer Messung festgelegt
- Automatische Messung sechs separater Flächen:
  - Messung der ausgewählten Messfläche.
  - Messung der Hintergrundfläche, die nicht von Muskelgewebe bedeckt wurde.
  - Messung der Flächen, die durch die Antigene angefärbt wurden.

- Die Resultate der gemessenen Gesichtsfelder eines Herzmuskelschnitts wurden aus dem Bildanalyseprogramm in ein Daten verarbeitendes Microsoft Excel Makro exportiert, das die Expression der Flächenantigene pro Herzmuskelgewebefläche nach folgender Formel berechnet:

$$E_A = \sum_{1-n}^n \frac{A_A}{A_M - A_H}$$

$n$  = Anzahl der Gesichtsfelder;  $[E_A] = mm^2/mm^2$ . Mit einem Flächenmakro wurden die Antigene von Kollagen I, III, MMP2, MMP9, VCAM und ICAM ausgewertet. Zudem wurde Konvertierungssoftware benutzt. Mit den beschriebenen technischen Hilfsmitteln konnten berechneten Expressionswerte der Antigene in eine Datentabelle übertragen werden.

- Die verwendeten Farbschwellenwerte wurden durch die Auswahl mehrerer repräsentativer Markierungspunkte innerhalb der erfassten Bilder von 20 zufällig ausgewählten immunhistochemisch gefärbten Herzmuskelschnitten bei standardisierter Beleuchtung nach Köhler festgelegt. Die daraus resultierenden Schwellenwerte, also die Minimal- und Maximalwerte, für die Farbe rot, grün und blau wurden in dem entsprechenden Bildanalyse-Makro verwendet. Die Programmierung der verwendeten Makros ermöglichte es, alle Messungen nach dem manuellen Begrenzen der gewünschten zu messenden Herzmuskelfläche automatisch ablaufen zu lassen. In Anbetracht dessen entspricht dieses Messverfahren einem halb-automatischen Modus.

Alle gewonnen mikroskopischen Bilder zur Detektierung der angefärbten Antigene wurden mit einer 200fachen Mikroskopvergrößerung gemessen.

Die Quantifizierung von Kollagen I, Kollagen III, MMP2, MMP9 sowie VCAM, ICAM wurde in Flächenfraktion angegeben ("area fraction" in %, AF). Die AF gibt hierbei den prozentualen Anteil der spezifisch angefärbten Flächen in Bezug auf die Gesamtfläche des Herzmuskelgewebes an.

Zur Quantifizierung infiltrativer Immunzellen wurde eine Auswertung in Form positiver Zellen/ $mm^2$  gewählt.

### 3.9 Zymographie

Um die Rolle von MMP2 und MMP9 in der CVB3-induzierten Myokarditis nähergehend beleuchten zu können, untersuchten wir die Proteinasen mittels der Methode der Zymographie.

Die Zymographie stellt eine direkte Nachweismethode der gelatolytische Aktivität der MMP2 und MMP9 dar. Die hier verwendete Zymographie basiert auf einer Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), wonach die durch das Gel wandernden Proteine mit negativ geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS) besetzt sind und ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine auf Polyacrylamidgele aufgetragen und in der Folge elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Proteine wurden hier vor Beginn der Elektrophorese einer Denaturierung unterzogen, jedoch geschah dies nicht unter reduzierenden Bedingungen für die Proteine. Im unmittelbaren Anschluss der Elektrophorese erfolgte eine Renaturierung der untersuchten Proteine. Im weiteren Prozedere wurden die Proben für einen Zeitraum von 18 Stunden in Enzympuffer inkubiert, welcher  $Ca^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ -haltig war, bei einer Temperatur von 37 °C. Hierbei kam es zum enzymatischen Abbau der Gelatine durch die Gelatinasen MMP2 und MMP9 in den Proben. Im anschließenden Färbeprozess stellten sich die gelatinolytischen aktiven Peptidasen als farblose Areale der Färbung dar.

#### 3.9.1 Proteinextraktion

Sämtliche für die Proteinextraktion verwendeten Herzgewebeproben wurde jeweils in 100  $\mu$ l RIPA Puffer gegeben. Die verwendete Pufferlösung setzte sich aus 250ml 1 x PBS, 5ml Nonidet P-40, 2,5g "NaDeoxycholic Acid" (Natriumdesoxycholsäure) und 2,5ml 20%-igen SDS zusammen und wurde bei 4 °C gelagert. Um proteolytischen Prozessen durch endogene Proteasen in der Lösung entgegenzuwirken, wurde vor Benutzung des Puffers eine kommerziell zu erwerbende, gebrauchsfertige, von der Firma Sigma-Aldrich, München, Deutschland hergestellte Phosphatase- und Proteinaseinmischung der Pufferlösung zugeführt. Dannach wurde das Probenmaterial auf Eis lagernd durch eine Stabhomogenisierung homogenisiert. Weiterhin wurden die Proben in einen Thermomixer für eine Zeit von 15 Minuten bei 4 °C und 660rpm gegeben. Hieran schloß sich eine Zentrifugation über eine Dauer von 15 Minuten bei 4 °C und 16.000g an. Sodann konnte der proteinreiche Überstand mittels Abpipettierens festgehalten werden. Der so gewonnenen Phase wurden 20  $\mu$ l Aliquots beigefügt, und sie wurde bei einer Temperatur von -80 °C eingelagert.

### 3.9.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Analyse zur Konzentrationsbestimmung der verwendeten Proteine wurde mit Hilfe des BCA-Protein Assay Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) auf einer Mikrotiterplatte ausgeführt. Diese Methode beruht auf dem als Biuret-Reaktion bekannten Reduktionsprozess von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  in einem alkalischen Milieu, das durch basische Aminosäuren der Proteine entsteht. Durch die Chelationen der entstandenen  $\text{Cu}^+$ -Ionen und der Bicinchonininsäure (BCA) kommt es zur Katalyse der Reaktion, was wiederum eine kolorimetrische Quantifizierung der insgesamt umgesetzten Proteinmenge erlaubt.

Vorliegend wurde der kommerziell erworbene bovine Serumalbumin-(BSA) Standard (2mg/ml) mit Aqua dest. verdünnt. Diese Verdünnung wurde in einer Verdünnungsreihe von Standardreihe von  $0\mu\text{g}/\text{ml}$  bis  $1000\mu\text{g}/\text{ml}$  als Doppelbestimmung auf die Platte angeordnet. Die verwendeten Proben wurden jeweils in einem Verhältnis von 1:50 und 1:100 durch die Hinzugabe von destilliertem Wasser verdünnt. Danach wurden jeweils  $10\mu\text{l}$  in eine Vertiefung der Platte pipettiert und  $200\mu\text{l}$  der BCA-Arbeitslösung ebenfalls in jede Vertiefung eingebracht. Die eingesetzte Lösung wurde aus erworbenen Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 50 + 1 verwendet. Es wurde jeweils eine Bestimmung mit je zwei Wiederholungsbestimmungen aller eingesetzter Proben vorgenommen. Während einer Inkubation von 30 Minuten bei  $60^\circ\text{C}$  kam es zu einer proportional zur Proteinkonzentration sich verhaltenden Umfärbung – von grün zu lila – des Probenmaterials. Schließlich wurde die probenspezifische Absorption durch photometrische Messungen bei einer verwendeten Wellenlänge von 562nm erfasst, und anhand der Absorption der Standardkurve wurde die Konzentration der Proben errechnet.

### 3.10 Polyacrylamid (SDS-PAGE)-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE-Gelelektrophorese ("sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis", Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine weitverbreitete Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, ein analytisches Verfahren zur Auftrennung von Stoffgemischen – meist Proteinen – durch die Installierung eines elektrischen Feldes. Hierbei kommt der Anzahl positiv und negativ geladener Aminosäuren der Proteine und dem vorliegenden pH-Wert der entscheidende Einfluss für die Gesamtladung des Proteins zu.

Durch die Zugabe des Tensids (Detergenz) Natriumdodecylsulfat (SDS) kommt es zu dessen Anlagerung an das zu untersuchende Protein. Die hieraus sich ergebende anionische Detergenz überdeckt die individuellen Eigenladungen der hier zu analysierenden Proteine.

Somit entsteht ein Polyanion, welches eine konstante negative Ladungsverteilung aufweist und im elektrischen Feld zur Seite der Anode wandert. Ferner wird eine vollständige Denaturierung des jeweiligen Proteins durch die Zugabe von SDS erreicht. Aufgrund dessen ist die elektrophoretische Kinetik während dieses Trennverfahrens ausschließlich durch den Porendurchmesser der dreidimensionalen Trenngelmatrix und der individuellen Molekülgröße limitiert. In dem Versuchsaufbau wurden zur Aktivitätsbestimmung der MMP-2 und MMP-9 aller Versuchsproben insgesamt zwei

kommerziell zu erwerbende 10%-ige Polyacrylamid-Gele mit einem Anteil von 0,1%-ige Gelatine der Firma Bio-Rad-Laboratories, München, Deutschland, verwendet.

### **Prozedere zur Durchführung der Zymographie**

Die Elektrophorese wurde unter Bedingungen des Eisbads und unter der Anlage einer elektrischen Spannung von 35V für eine Dauer von fünf Minuten, 50V für eine Dauer von einer Stunde und schließlich 120V für eine Dauer von zehn Minuten für die Proteine MMP-2 (72kDa) und MMP-9 (90kDa) durchgeführt.

Zu Beginn wurden dabei je 25 $\mu$ g einer Proteinprobe mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 10 $\mu$ l aufgefüllt. Im Anschluss hieran wurde diese Probe mit 2,5 $\mu$ l 5 x Proben-Puffer (1,56ml 0,5M Tris-HCL (pH 6,8), 5ml Glycerol, 1,5ml 10%-iges SDS, 1,25ml 0,1%-iges Bromphenolblau) bis zu einem Gesamtvolumen von 10ml mittels Aqua dest. aufgefüllt.

Anschließend erfolgte eine Inkubation des erzeugten Gemischs über eine Dauer von zehn Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde das Probenmaterials auf das Elektrophorese-Gel im Millieu des Elektrophoresepuffers (29g Tris-Base, 144g Glycin, 10g SDS und Aqua dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 1000ml) aufgetragen. So wurde die Auftrennung der Proteine initialisiert.

Die Gele wurden anschließend jeweils dreimal für je 20 Minuten in 1 x Renaturierungspuffer (1,25ml Triton X-100 und Aqua dest. bis zu einem Volumen von 500ml) unter leichtgradigem Schütteln inkubiert. Die Verdauung der verwendeten Gelatine wurde durch die Inkubation von jeweils zweimal für je 20 Minuten in 1 x Enzympuffer (durch Verdünnung des 10 x Puffers aus: 12,1g Tris Base, 63g Tris HCl, 117g NaCl, 20ml Brij 35, 7,4g CaCl<sub>2</sub>, 500 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 1M-Lösung und Aqua dest. bis zu einem Volumen von 1000ml) unter leichtgradigem Schütteln erreicht. Alsdann wurde eine Inkubation der Gele über eine Zeit von 18 Stunden bei 37 °C in 1 x Enzympuffer initiiert. Danach wurden die Gele über eine Dauer von drei Stunden in 0,5%-iger Coomassie-Lösung (2,5g Coomassie G250 auf 500ml Aqua. dest.) unter leichtgradigem Schütteln angefärbt. Schließlich wurden die Gele in "Destain"-Lösung (100ml Eisessig, 300ml Methanol, 600ml Aqua dest.) jeweils drei- bis fünfmal für eine Dauer von zehn Minuten entfärbt.

Dieser Vorgang wurde solange fortgeführt bis sich eine visuell erkennbar abzugrenzende Bande gegenüber dem bläulichen Hintergrund verifizieren ließ. Die Zonen, die eine hohe proteolytische Aktivität aufwiesen, wurden durch den Farbstoff Coomassie-Blue nicht sichtbar angefärbt; in diesen Bereichen kam es zur Entstehung von Spaltprodukten der Gelatine aus dem Gel heraus. Die ungespaltene Gelatine hingegen wurde blau angefärbt. Als positive Kontrolle wurden auf beiden verwendeten Elektrophorese-Gelen Proben gleicher Konzentration angeordnet.

### **Auswertung der Zymographie**

Die Bilder der in der Elektrophorese-Methode verwendeten Gele wurde mit Hilfe des "BioDoc Analyze Systems" der Firma Biometra, Göttingen, Deutschland, digital festgehalten. Die jeweilige Signaldichte der zu analysierenden Anfärbeareale wurde mittels der Software ImageJ, National

Institutes of Health, USA, ausgewertet. Hierbei wurde die positiven Proben jeweils zum Abgleich eingesetzt. Um den Vergleich beider verwendeter Gele durchführen zu können, wurde die Aktivität der Gelatinase von infizierten Kontrolltieren als relativer Bewertungsmaßstab bezüglich der Aktivität des anderen verwendeten Gels verwendet.

### **3.11 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der gewonnenen Parameter wurde unter Benutzung des Software Programms SPSS Version 12.0 generiert. Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. Die meisten Datensätze zeigten jedoch keine Normalverteilung der Parameter auf. Danach wurde das Vorhandensein einer statistischen Signifikanz unter Einsatz des nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test getestet, welcher von einer Normalverteilung und ungleicher Varianz unabhängig ist.

Statistische Unterschiedlichkeiten wurden unter Verwendung des Kruskal-Wallis Test in Verbindung mit dem Mann-Whitney U-Test berechnet. Die Daten der Mortalitätsstudie nach CVB3-Infektion wurden unter Zugrundelegung der Kaplan-Meier-Methode erstellt und untereinander anhand des log-rank Tests vergleichend berechnet. Ab einem Wert von  $P < 0.05$  wurden alle gewonnenen Daten als statistisch signifikant eingestuft und dementsprechend ausgezeichnet.

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezeichnung	Bezugsquelle
Deckgläser	21 x 26mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Einmalpipetten		Biozym, Hess. Oldendorf, DE
Falcon-Tubes	15ml, 50ml	Sarstedt, Nürnberg, DE
Feintücher	Kim Wipe lite	Hakle-Kimberley, Mainz, DE
Fotopapier	K 65 HM-CE	Sony, Köln, DE
Kryotubes	1,5ml	Greiner, Solingen-Wald, DE
Kunststoffkanüle	18G und 20G	Braun, Meisungen, DE
Objektträger	Super-Frost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
PCR-Tubes	0,2ml, konischer Deckel	Biozym, Hess. Oldendorf, DE
Pipettenspitzen		Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Reaktionsgefäße	Safe-Lock oder RNase-frei	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Spritzenvorsatzfilter	Filtergröße 0,2mm	Biometra, Göttingen, DE
Zentrifugationsgefäße		Kendro, Langenselbold, DE



Tabelle 7: Verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Bezeichnung/Typ	Bezugsquelle
Autoklav		Hartmann, Schleswig, DE
Backofen	Heraeus	Osterode, DE
Beatmungsgerät	Mini-Vent	Harvard Apparatus, Massachusetts, USA
Brutschrank	Function Line	Heraeus, Osterode, DE
Druck-Volumen-Amplifier-System	MPVS 300/400	Millar Instruments, Houston, USA
Eismaschine	AF-10	Scotsman, Vernon Hills, USA
Eisschrank -20 °C	Economic super	Bosch AG, Stuttgart, DE
Eisschrank -80 °C	Nuaire Ultralow Freezer	Zapf Instrumente, Sarstedt, DE
Elektrophoresekammer	Bio-Rad	München, DE
Gelschlitten		Eigenproduktion Charité, DE
Gewebeeinbettungsautomat	Shandon	Frankfurt/Main, DE
Homogenisator	Pellet Pestle Motor	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Horizontalschüttler	SM-25	Edmund Bühler, Tübingen, DE
Konduktanzkatheter	1.2 French	Scisense Inc., Ontario, Canada
Kühlzentrifuge + 4 °C	Megafuge	Heraeus, Osterode, DE
Laborwaage, elektronisch	DMS 580	Kern Elektronik, Albstadt, DE
Magnetrühr-/Heizplatte	Ikamag RCT	IKA-Labortechnik, Staufen, DE
Mikroskop	Eclipse E 600 Pol	Nikon, Tokyo, Japan
Netzgerät	Power Pack P25	Biometra, Göttingen, DE
pH-Meter	Knick Digital 646	Beyer, Düsseldorf, DE
Photometer	DU 640i	Beckman-Coulter, Krefeld, DE

---

Laborgerät	Bezeichnung/Typ	Bezugsquelle
Pipetten		Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Präzisionswaage		Sartorius, Göttingen, DE
Mikrotom	Jung CM 3000	Leica, Bensheim, DE
Szintillationsmessgerät	LS 1701Beckman-Coulter	Krefeld, DE
Thermomixer	Comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Thermozykler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Ultrazentrifuge	Sorval Superspeed RC2	Kendro, Langenselbold, DE
UV-Transilluminator	BioDoc Analyze System	Biometra, Göttingen, DE
Vortexer	VF2	IKA-Labortechnik, Staufen, DE
Wasserbad	GFL	Burgwedel, DE

---

Tabelle 8: Verwendete Puffer und Chemikalien

Artikel	Bezeichnung	Bezugsquelle
100x Denhardts-Lösung		Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
3-Amino-9-Ethylcarbazol		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
ABC-Kit		Vector Labs, Burlingame, USA
Aceton VWR Merck		Darmstadt, DE
Agarose	SeaKem LE Agarose	Cambrex, Rockland, USA
Ammoniumacetat		VWR Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumsulfat		Serva, Heidelberg, DE
Aminopropyltriethoxysilan	(APES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Ampli-Taq Applied	DNA-Polymerase	Biosystems, Darmstadt, DE
Aqua bidest.	Aqua-Spüllösung, steril	Delta Select, Pfullingen, DE
Avidin-Biotin-Blocking-Kit		Vector Labs, Burlingame, USA
Borsäure	für die Molekularbiologie	VWR Merck, Darmstadt, DE
Bovines Serumalbumin	BSA, lyophilisiert	Vector Labs, Burlingame, USA
Brij 35 Solution		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Bromphenolblau		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub> , gekörnt	VWR Merck, Darmstadt, DE
CD3 <sup>+</sup>	Immunhistochemie AK	Santa-Cruz Biotechn., Heidelberg, DE
CD8a <sup>+</sup> , -11b <sup>+</sup> , -68 <sup>+</sup> , -80 <sup>+</sup>	Immunhistochemie AK	Pharmingen, Hamburg, DE
Chloroform		VWR Merck, Darmstadt, DE
Comassie Blue G-250		VWR Merck, Darmstadt, DE
Corbit-Balsam		I. Hecht, Kiel, DE

Artikel	Bezeichnung	Bezugsquelle
Dako EO 468	Immunhistochemie 2. AK	Dako, Hamburg, DE
Dianova	Immunhistochemie 2. AK	Dianova, Hamburg, DE
Diethylpyrocarbonat	(DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Dextransulfat	als Natriumsalz	VWR Merck, Darmstadt, DE
DNase I	RNAse-frei	Roche, Grenzach-Whylen, DE
dNTPs	ATP, CTP, GTP, TTP	AB Gene, Hamburg, DE
Dimethylsulfoxid VWR	DMSO	Merck, Darmstadt, DE
Dithiothreitol (DTT)	als Lösung	Promega, Mannheim, DE
EDTA		VWR Merck, Darmstadt DE
Entwickler	D 19	Kodak, Stuttgart, DE
EnVision	Immunhistochemie 2. AK	Dako, Hamburg, DE
Eosin Y		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Essigsäure	100% (Eisessig)	VWR Merck, Darmstadt, DE
Essigsäureanhydrid		VWR Merck, Darmstadt, DE
Ethanol absolut	Dab 9 reinst	VWR Merck, Darmstadt, DE
Ethidiumbromid	1%-ige wässrige Lösung	VWR Merck, Darmstadt, DE
Fixierer	Fixierer 3000 Lösung A	Kodak, Stuttgart, DE
Formamid		VWR Merck, Darmstadt, DE
Fotoemulsion	Typ G 5	Ilford Imaging, Dreieich, DE
Glycerol		Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Glycin		Serva, Heidelberg, DE
Hämatoxylin		VWR Merck, Darmstadt, DE
Isopropanol		VWR Merck, Darmstadt, DE

Artikel	Bezeichnung	Bezugsquelle
Jet-Star 2.0 Maxi Prep Kit	Maxi-Präparation	Genomed, Löhne, DE
Kaiser's Glyceringelatine		VWR Merck, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid		VWR Merck, Darmstadt, DE
Kaliumdihydrogenphosphat		VWR Merck, Darmstadt, DE
Kollagen I	Immunhistochemie AK	Chemicon, Nürnberg, DE
Kollagen III	Immunhistochemie AK	Calbiochem, Darmstadt, DE
Lithiumcarbonat		Sigma, Taufkirchen, DE
Magnesiumchlorid	als Hexahydrat	VWR Merck, Darmstadt, DE
Methanol		J.T.Baker, Deventer, Holland
Natriumacetat		VWR Merck, Darmstadt, DE
Natriumcarbonat		VWR Merck, Darmstadt, DE
Natriumchlorid		VWR Merck, Darmstadt, DE
Natriumdesoxycholsäure		VWR Merck, Darmstadt, DE
Natriumdihydrogenphosphat		VWR Merck, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid	als Plätzchen	VWR Merck, Darmstadt, DE
N,N-Dimethylformamid		VWR Merck, Darmstadt, DE
Nonidet P-40		Sigma, Taufkirchen, DE
Normalserum	aus dem Kaninchen	Sigma, Taufkirchen, DE
Paraformaldehyd	(PFA)	VWR Merck, Darmstadt, DE
pGEM T-Easy Vector Kit I		Promega, Mannheim, DE
Phloxin B		VWR Merck, Darmstadt, DE
Primer		TIB Molbiol, Berlin, DE
Pronase		Pierce, Rockland, USA

---

Artikel	Bezeichnung	Bezugsquelle
Protein Assay Kit BCA		Roche, Grenzach-Whylen, DE
Ready Precast Gel	10% Tris-HCl Zymogram	Bio-Rad, München, DE
RNA-Polymerase	Sp6 / T7, inkl. Reaktionspuffer	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Rneasy Kit	RNA-Extraktion	Qiagen, Hilden DE
rNTP's	rATP, rCTP, rGTP (für ISH)	AP Biotech, Freiburg, DE
RT System		Promega, Mannheim, DE

---

Artikel	Bezeichnung	Bezugsquelle
RNAse A		Roche, Grenzach-Whylen, DE
RNAse Zap	aktiver RNAse-Inhibitor	Ambion, Austin, USA
Sodium Dodecyl Sulfate	(SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Solvent Blue 38		Sigma, Taufkirchen, DE
Silikon-Lösung		Serva, Heidelberg, DE
Sucrose		Sigma, Taufkirchen, DE
Tissue Tek	Einbettmedium	Sakura, Zoeterwoude, NL
Trapanal	Thiopental	Glaxo-Smith, DE
Trichloressigsäure		VWR Merck, Darmstadt, DE
Triethanolamin		Sigma, Taufkirchen, DE
Tris-amino-methan		VWR Merck, Darmstadt, DE
Tris-HCl		VWR Merck, Darmstadt, DE
Triton X-100		Sigma, Taufkirchen, DE
Trizol LS Reagent	zur RNA-Isolierung	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Tryptone Peptone		BD Biosciences, Heidelberg, DE
Wasserstoffperoxid	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (v/v), wässrig	Sigma, Taufkirchen, DE
VCAM, ICAM	Immunhistochemie AK	Pharmingen, Hamburg, DE
Xylol		VWR Merck, Darmstadt, DE
Zymographie-Gel	Precast Ready Gel 10%	Bio-Rad, München, DE

## 4 Ergebnisse

Im folgenden Teil der Studie sollen die gewonnenen Daten und Ergebnisse hinsichtlich der Relevanz von TRIF bei CVB3-induzierten Myokarditis im murinen Tiermodell dargestellt werden.

An den Anfang werden dabei die Resultate der linksventrikulären Pumpfunktion, die Ergebnisse in Bezug auf Körper- und Herzgewichte der Versuchstiere sowie die Mortalitätsentwicklung nach CVB3-Infektion präsentiert. Im Anschluss hieran wird unter Verwendung der histologischen Hämalaun-Eosin Färbung eine Klassifikation der Myokarditis hinsichtlich der linksventrikulären Morphologie vorgenommen.

Überdies werden die Ergebnisse der Immunzellinfiltration von CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD68<sup>+</sup>- und CD80<sup>+</sup>-Zellen und die verschiedenartige Expression inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 und IL-18 nach CVB3-Infektion im zeitlichen Verlauf aufgeführt und beleuchtet.

Des Weiteren werden die Erhebung der kardialen Viruslast, Viruskontrolle sowie die Funktion des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR) nach CVB3-Infektion aufgezeigt. Zudem werden die Ergebnisse der Entwicklung kardialer Fibrosierung, angezeigt durch die Expression von Kollagen I und III (mRNA und Immunhistologie), MMP2, MMP9 (Immunhistologie) und die zymographische Aktivitätsbestimmung der MMP2 und der MMP9, wiedergegeben. Weiterhin werden die Resultate der kardialen Apoptose und der Modulation von Zelladhäsion nach viraler Infektion veranschaulicht. Sodann werden die mRNA-Expressionsmuster des antiviralwirksamen IFN- $\beta$ , des pro-inflammatorischen TNF- $\alpha$  und des CVB3 während muriner IFN- $\beta$  Substitutionsbehandlung bzw. CVB3-Infektion präsentiert.

Es folgt die Darstellung der erhobenen Ergebnisse der IFN- $\beta$  vermittelten Immunantwort bei der antiviralen Abwehr nach CVB3-Infektion mittels Substitutionsbehandlung durch murines IFN- $\beta$  in einer erneuten Mortalitätsstudie. Abschließend sollen die gewonnenen Ergebnisse und Daten anhand statistischer Analyseverfahren einer kritischen Überprüfung unterzogen werden.

### 4.1 Hämodynamische Funktion

Die nicht-infizierten WT-Mäuse und TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen sieben Tage nach CVB3-Infektion eine simultane LV-Funktion auf. Weiterhin zeigten WT-Mäuse nach CVB3-Infektion eine tendenziell reduzierte LV-Funktion, welche im Vergleich zu den gesunden WT-Mäusen jedoch nicht signifikant unterschiedlich war.

Im Gegensatz hierzu ließen die TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse eine statistisch signifikant eingeschränkte LV-Funktion erkennen, welche durch eine Verminderung bezüglich des Schlagvolumens ( $9 \pm 1$  vs.  $17 \pm 2 \mu\text{l}$ ;  $P < 0.05$ ), Herzzeitvolumen ( $2.9 \pm 0.4$  vs.  $6.3 \pm 0.8 \text{ ml/min}$ ;  $P < 0.05$ ), Ejektionsfraktion ( $36 \pm 1$  vs.  $69 \pm 4 \%$ ;  $P < 0.05$ ) im Vergleich zu den gesunden TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen belegt wurde (Tabelle 9). Hierbei kam es nicht zu statistisch signifikanten Unterschiedlichkeiten der Werte der ermittelten Herzfrequenzen zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen.



Tabelle 9: Hämodynamische Parameter wurden *in vivo* mittels eines 1.2 french Mikrokonduktanzkatheters in Form von Druck-Volumen-Kurven sieben Tage nach CVB3-Infektion gemessen (n = 8 Tiere pro Versuchsgruppe). Die Gruppe der WT-CVB3 Mäuse wies aufgrund der CVB3-Infektion eine kompensierte linksventrikuläre Pumpfunktion auf. Die TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse hingegen zeigten eine reduzierte linksventrikuläre systolische und diastolische Pumpfunktion resultierend in einem herabgesetzten Herzzeitvolumen. Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW) ± des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. (HR = Herzfrequenz, Pmax = Maximaler linksventrikulärer systolischer Druck, SV = Schlagvolumen, EF = Ejektionsfraktion, WT = Wildtyp, CVB3 = Coxsackievirus B3. \* =  $P < 0.05$  vs. TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3).

Tiergruppen	WT	WT CVB3	TRIF <sup>-/-</sup>	TRIF <sup>-/-</sup> -CVB3
HR (Schläge/min)	423.5 ± 18.23	394.1 ± 25.69	383.6 ± 10.90	364.8 ± 16.32
Pmax (mmHg)	76.50 ± 5.268	68.07 ± 4.865*	74.42 ± 2.757	47.53 ± 3.282
dP/dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	4529 ± 328.4	4132 ± 299.7*	4700 ± 579.1	2631 ± 260.5
SV (μl)	16.02 ± 1.861	14.41 ± 1.797*	17.01 ± 2.028	9.361 ± 1.059
Herzzeitvolumen (ml/min)	6835 ± 0.591	5.480 ± 0.916*	6.549 ± 0.756	3.282 ± 0.401
EF (%)	66.36 ± 3.141	62.72 ± 5.265*	69.06 ± 4.264	36.52 ± 1.466
Endsystolisches Volumen (μl)	12.73 ± 3.201	11.59 ± 4.291*	11.34 ± 2.833	17.72 ± 1.676
Enddiastolischer Druck (mmHg)	6.8 ± 2.6	5.8 ± 0.47	6.3 ± 0.48	5.2 ± 0.40
dP/dt <sub>min</sub> (mmHg/s)	-3857 ± 252.2	-3312 ± 365.0*	-3911 ± 383.7	-1949 ± 222.5
Tau (ms)	16.97 ± 0.858	19.41 ± 2.069	16.01 ± 1.217	17.27 ± 0.870
Enddiastolisches Volumen (μl)	29.22 ± 4.079	26.16 ± 4.828	28.48 ± 3.256	26.59 ± 2.608
Ventrikelsteifigkeitsindex (mmHg/μl)	0.08 ± 0.015*	0.15 ± 0.021*	0.09 ± 0.016	0.36 ± 0.057

Ferner wurde in mehreren klinischen und experimentellen Studien bereits gezeigt, dass das enddiastolische Volumen in der akuten Phase der Myokarditis keine relevanten Veränderungen erfährt.

## 4.2 Körper- und Herzgewichte

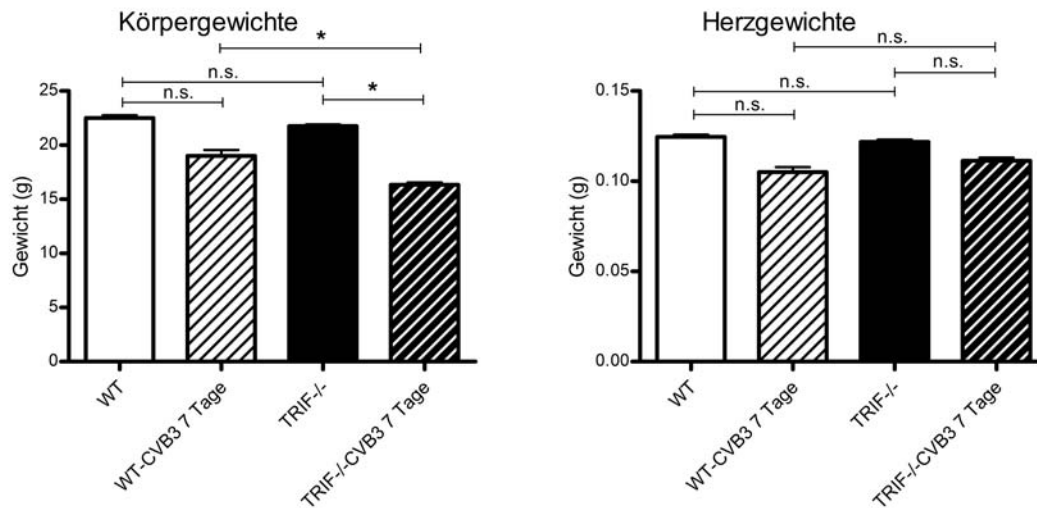


Abbildung 14: Dargestellt sind Körpergewichte (links) und Herzgewichte (rechts) sieben Tage nach CVB3-Infektion. Die infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen ein signifikant reduziertes Körpergewicht nach viraler Infektion im Vergleich zu den WT-CVB3 Mäusen und den gesunden TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen auf (\* =  $P < 0.005$  vs. TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3; n.s. = nicht signifikant). Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) in Gramm (g) ausgewiesen. WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3.

Zu Beginn unserer Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Körpergewicht der Tiergruppen, welche der CVB3-Infektion zugeführt wurden, im Vergleich zu den nicht-infizierten Tiergruppen des gleichen Tierstammes sieben Tage nach Infektion reduziert war.

Insbesondere zeigten die TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse ein signifikant reduziertes Körpergewicht im Vergleich zu den WT-CVB3 Mäusen (Abbildung 14). Des Weiteren wurde eine signifikante Erniedrigung des Herzgewichtes in den infizierten Tiergruppen im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltiergruppen beobachtet (Abbildung 14). Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Herzgewichtes war zwischen den TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen und den WT-CVB3 Mäusen nicht festzustellen.

Während des Erkrankungsprozesses der akuten Myokarditis wird in der Regel eine Reduktion des Herzgewichtes ausgelöst, die auf eine minimierte Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr und die katabolische Stoffwechsellage zurückzuführen ist.

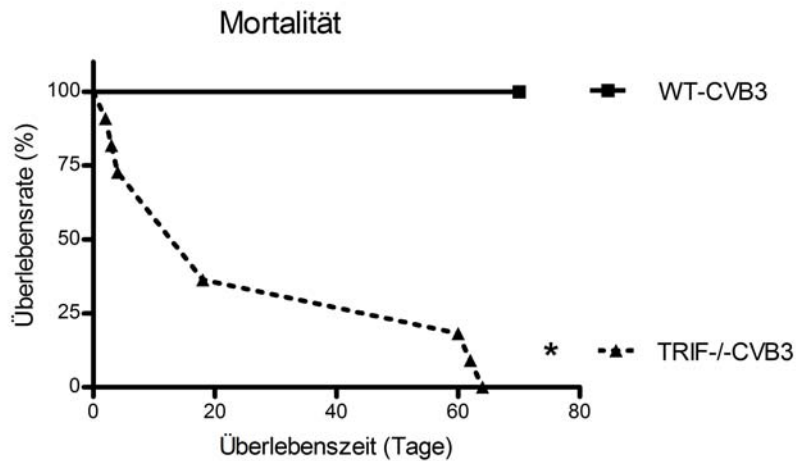


Abbildung 15: Dargestellt werden Kaplan-Meier Überlebenskurven der WT-CVB3 Mäuse und TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse. Die Mortalität in der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse betrug 100%, die der WT-CVB3 Mäuse hingegen wurde im Beobachtungszeitraum nach CVB3-Infektion nicht beeinflusst (\* =  $P < 0.05$  vs. TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3). WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3.

### 4.3 Mortalitätsstudie

Die Mortalität von infizierten WT-Mäusen ( $n = 20$ ) wurde nicht durch CVB3-Infektion moduliert. TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse ( $n = 11$ ) verstarben zu 100% über einen Beobachtungszeitraum von 70 Tagen bei CVB3-induzierter Myokarditis (\* =  $P < 0.001$  vs. WT-CVB3; Abbildung 15).

### 4.4 Hämalan-Färbung und Klassifikation der viralen Myokarditis

Ferner untersuchten wir unter Verwendung der Hämalan-Eosin (HE)-Färbung die Morphologie des linksventrikulären Gewebes, um einen pathologischen Überblick über das untersuchte Herzgewebe zu erhalten. Darüber hinaus erstellten wir anhand dieser histologischen Übersichtsfärbung ( $n = 6$  pro Versuchstiergruppe) eine Myokarditis-Klassifikation für die einzelnen Versuchstiergruppen nach CVB3-Infektion (Abbildung 16 und 17).

Kriterien der Klassifikation: Grad 0 = keine entzündlichen Infiltrate pro Gesichtsfeld, Grad I = geringste Vorkommen von entzündlichen Zellen zwischen den Kardiomyozyten pro Gesichtsfeld, Grad II = größeres Vorkommen von mehr als 100 entzündlichen Zellen pro Gesichtsfeld, Grad III = größere Fläche als 10% entzündliche Infiltrate pro Gesichtsfeld, Grad IV = größere Fläche als 30% entzündliche Infiltrate pro Gesichtsfeld. Die Gruppe der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse zeigte eine signifikant erhöhte Schädigung des linksventrikulären Gewebes und wies ein gesteigertes Vorkommen entzündlicher Infiltrate verglichen mit den WT-CVB3 Mäusen sieben Tage nach CVB3-Infektion auf. Die Kontrollgruppen der gesunden Tiere zeigten erwartungsgemäß keine Veränderungen des linksventrikulären Gewebes.

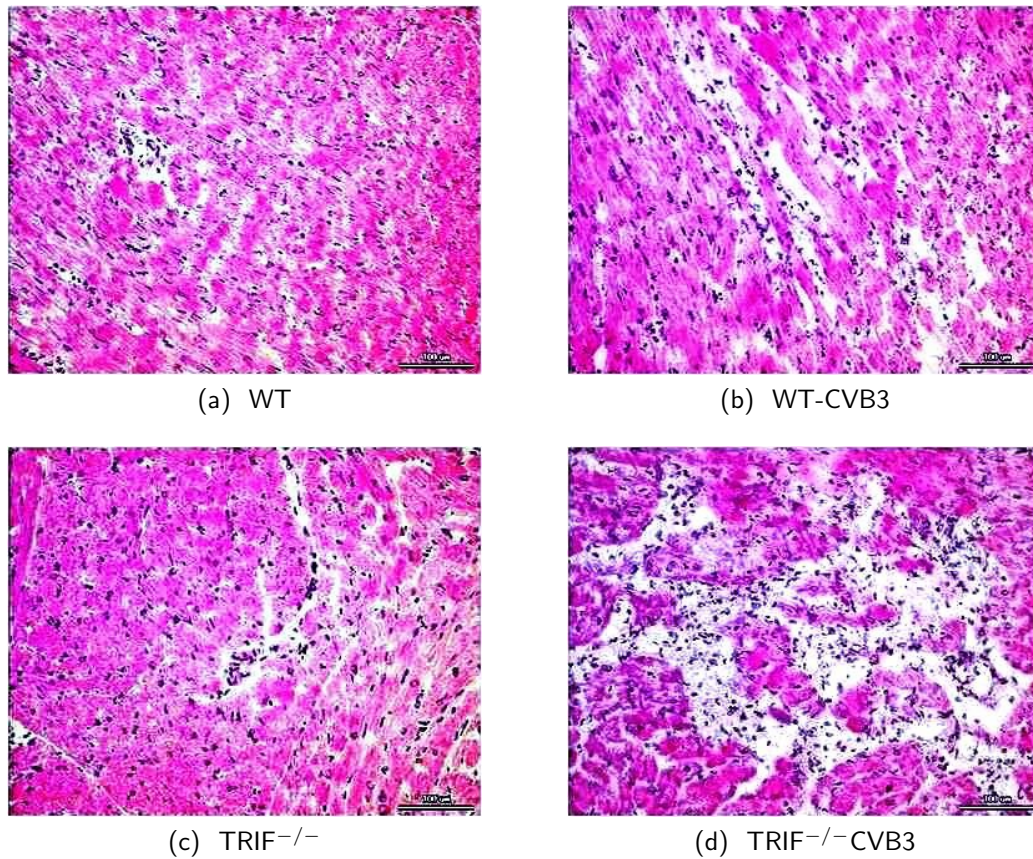


Abbildung 16: Repräsentative histologische Bilder der Hämalaun-Eosin-Färbung (a bis d) im linksventrikulären Gewebe bei einer 200-fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung.

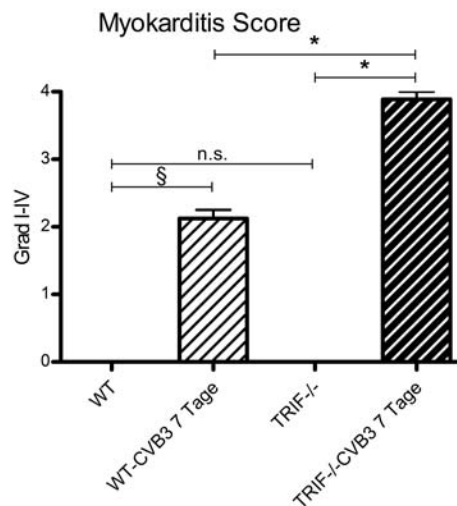


Abbildung 17: Myokarditis Klassifikation nach den Graden I - IV bei den immunhistologischen Präparaten (in Anlehnung an Wang [200]). Die Gruppe der TRIF<sup>-/-</sup>CVB3 Mäuse wies im Vergleich zu den WT-CVB3 Mäusen eine signifikant gesteigerte Schädigung des linksventrikulären Gewebes sieben Tage nach CVB3-Infektion auf (\* =  $P < 0.05$  vs. TRIF<sup>-/-</sup>CVB3 und § =  $P < 0.05$  vs. WT-CVB3). Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3; n.s. = nicht signifikant.

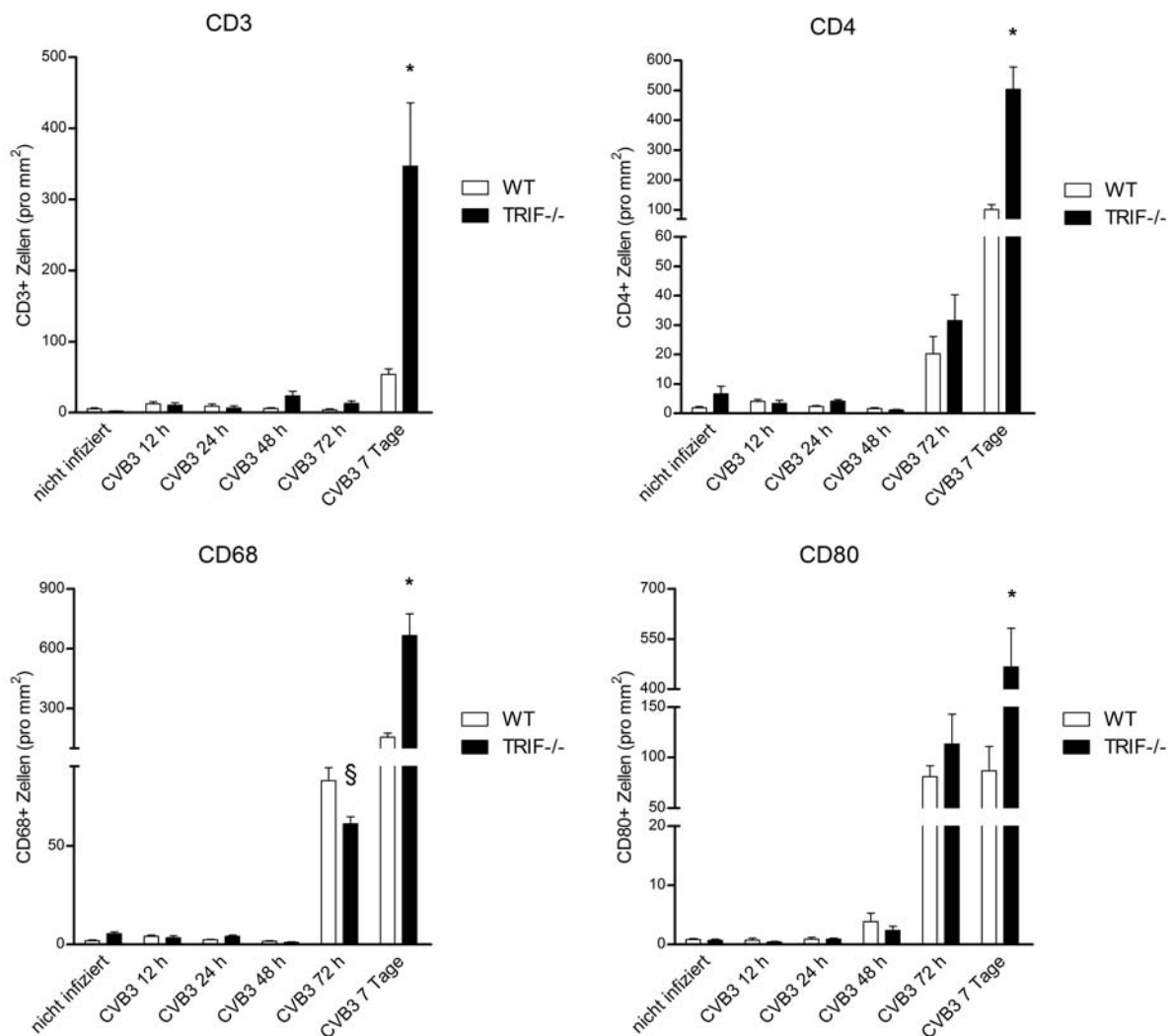


Abbildung 18: Dargestellt ist die kardiale Expression von CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (links oben), CD4<sup>+</sup>-aktivierten T-Lymphozyten (rechts oben), CD68<sup>+</sup>-Makrophagen (links unten) und CD80<sup>+</sup>-aktivierte B-Zellen (rechts unten), erhoben mittels spezifischer Immunhistochemie und quantifiziert durch Verwendung der digitalen Bildanalyse nach CVB3-Infektion (n = 6 pro Versuchstiergruppe). Sieben Tage nach viraler Infektion zeigten die TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse eine exazerbierte kardiale Infiltration von Immunzellen wie CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD68<sup>+</sup>- und CD80<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu den mit CVB3-infizierten WT-Mäusen. Bis 48 Stunden nach CVB3-Infektion stellte sich keine signifikante Induktion der Migration von infiltrativen Immunzellen sowohl in WT-Mäusen als auch in TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen dar. Drei Tage nach Virusinfektion wiesen die TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse - im Gegensatz zum späteren Zeitpunkt - eine herabgesetzte Infiltration von CD68<sup>+</sup>-Makrophagen auf (§ =  $P < 0.05$  vs. WT-CVB3 72 Stunden nach CVB3-Infektion). Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. WT = Wildtyp, CVB3 = Coxsackievirus B3, h = Stunden.

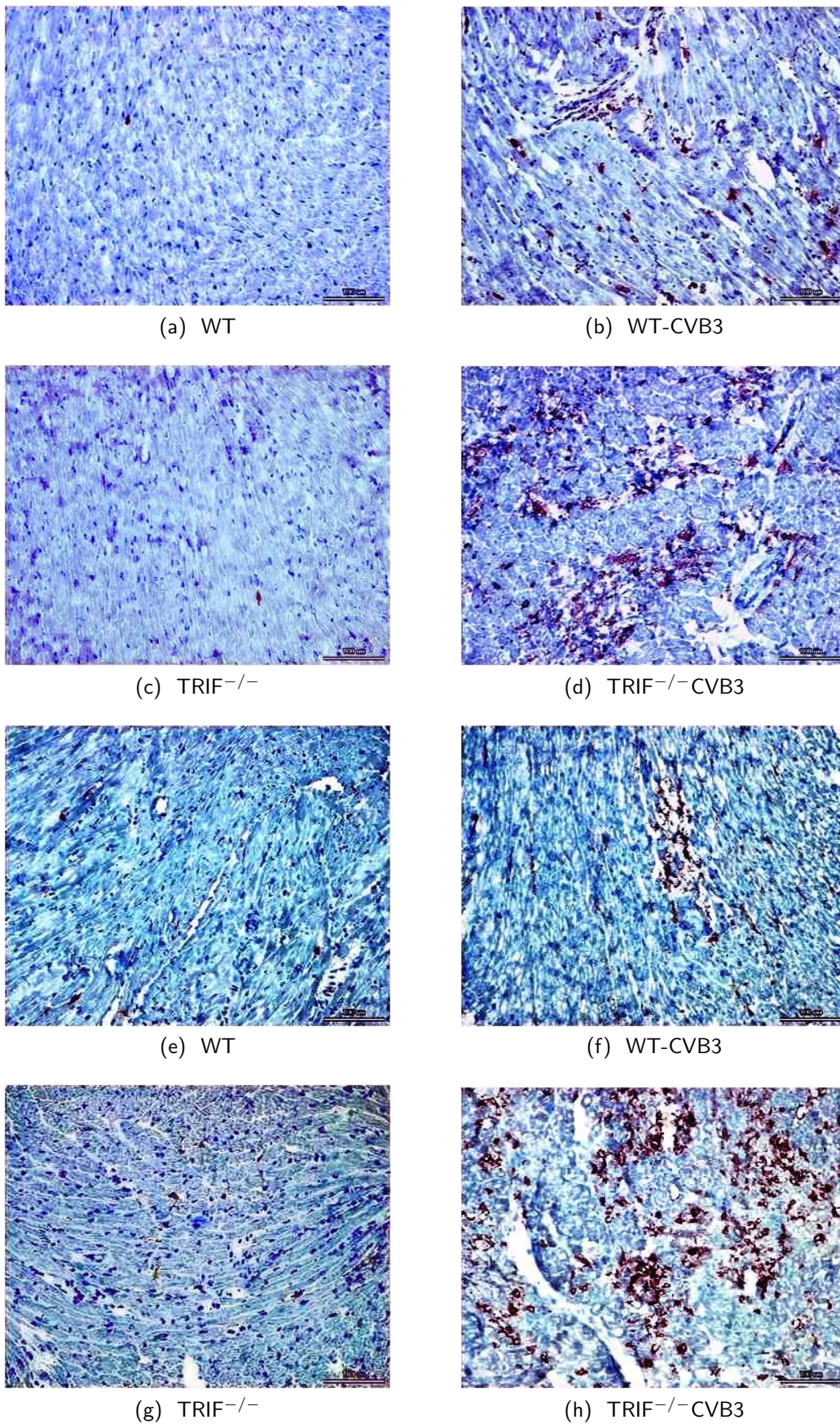


Abbildung 19: Repräsentative immunhistologische Bilder der Anfärbungen für CD3<sup>+</sup>-(a bis d) und CD4<sup>+</sup>-(e bis h) T-Lymphozyten im linksventrikulären Gewebe bei einer 200-fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung.

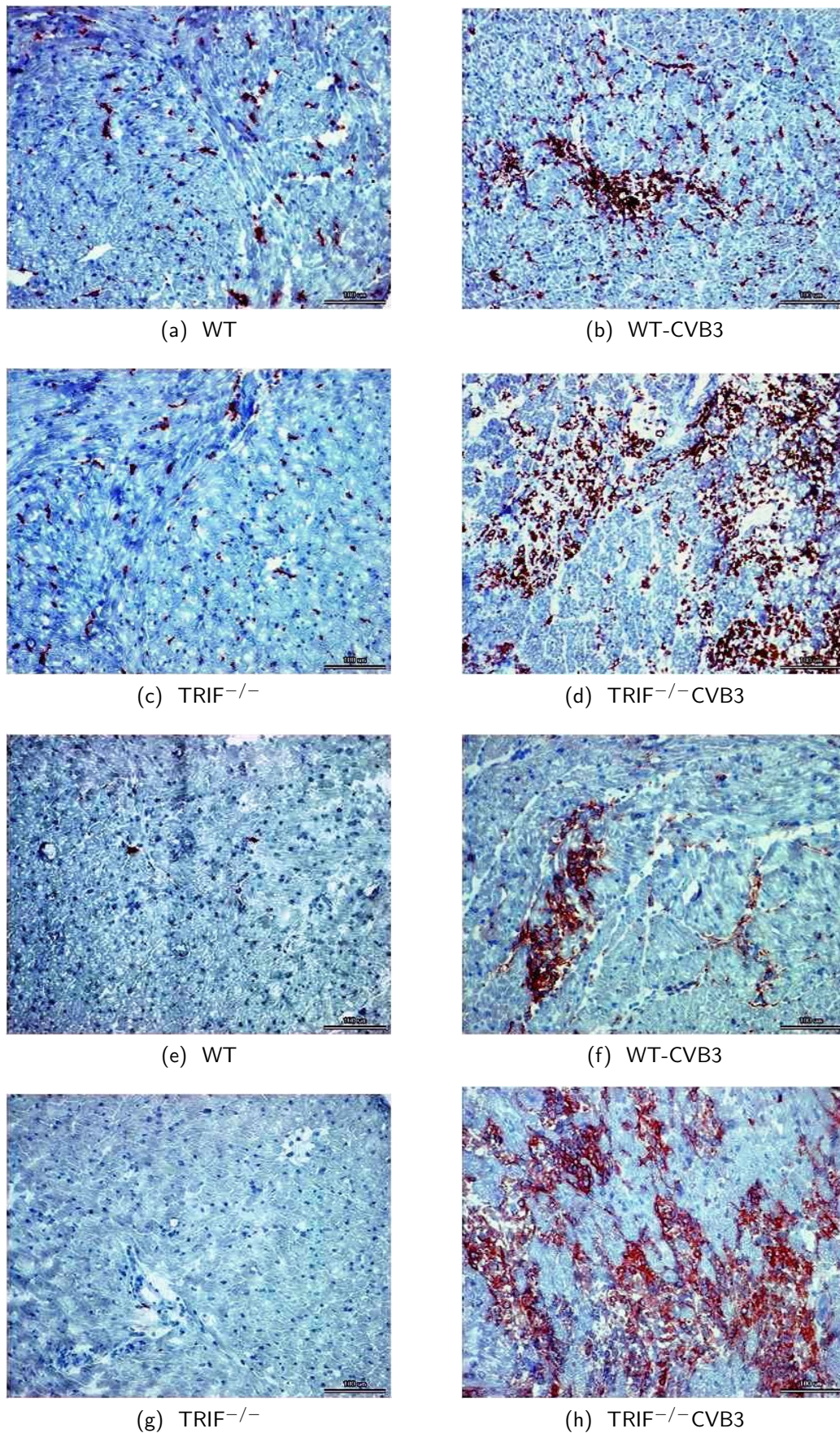


Abbildung 20: Repräsentative immunhistologische Bilder der Anfärbungen für CD68<sup>+</sup>-(a bis d) Makrophagen und CD80<sup>+</sup>-(e bis h) aktivierte B-Zellen im linksventrikulären Gewebe bei einer 200-fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung.

## 4.5 Kardiale Immunzellinfiltration

Um potentielle Quellen für eine TRIF-abhängige Regulation der Aktivierung inflammatorischer Zytokine zu identifizieren, untersuchten wir die kardiale Immunzellinfiltration zu den gleichen Zeitpunkten wie bei den immunhistochemischen Analysen der Zytokinexpression nach CVB3-Infektion.

Den Ergebnissen der Zytokinexpressionsmuster nach CVB3-Infektion folgend wiesen die WT-CVB3 Mäuse einen signifikant erhöhten Gehalt kardialer CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD68<sup>+</sup>- und CD80<sup>+</sup>-Zellen ( $P < 0.001$ ) im Vergleich zu den gesunden WT-Mäusen auf (Abbildung 18, 19 und 20). Überdies ließ sich wiederum eine signifikante gesteigerte kardiale Infiltration von Immunzellen in der Gruppe der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse vergleichend zu WT-CVB3 Mäusen feststellen. Diese wurde indiziert durch einen statistisch signifikant erhöhten Gehalt von CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (5.3-fach und 3.9-fach, \* =  $P < 0.001$ ), CD68<sup>+</sup>-Makrophagen (3.2-fach,  $P < 0.001$ ) und CD80<sup>+</sup>-aktivierten B-Zellen (4.1-fach, \* =  $P < 0.001$ ) sieben Tage nach CVB3-Infektion. Drei Tage nach viraler Infektion zeigte sich – verglichen mit den jeweils dazugehörigen Kontrolltiergruppen – sowohl in WT-Mäusen und TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikant gesteigerte CD4<sup>+</sup>- und CD80<sup>+</sup>-Zellinfiltration. Hierbei wurde zu eben diesem Zeitpunkt keine signifikant unterschiedliche Regulation aller Versuchstiergruppen beobachtet; ausgenommen hiervon war lediglich der Gehalt der CD68<sup>+</sup>-Makrophagen, welche in der Versuchsgruppe der infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse zu dem selben Zeitpunkt nach CVB3-Infektion reduziert waren (§ =  $P < 0.05$ ).

## 4.6 Kardiale Zytokinexpression

Gegenstand unserer Untersuchungen war ferner die Aktivierung inflammatorischer Zytokine, die relevant mit der Genese der viralen Myokarditis assoziiert sind und unter Kontrolle des TLR-Systems und dessen Effektormolekülen exprimiert werden.

Um die Entwicklung der TRIF-abhängigen kardialen Zytokinaktivierung während der Immunantwort nach viraler Infektion zu evaluieren, bedienten wir uns der Methode der RT-PCR zu den Zeitpunkten 12, 24, 48, 72 Stunden und sieben Tage nach CVB3-Infektion. Erwartungsgemäß wurden niedrige Expressionslevel der Zytokine im linksventrikulären Gewebe in allen Versuchstiergruppen einschließlich der gesunden Kontrolltiergruppen festgestellt.

Sieben Tage nach CVB3-Infektion zeigte sich eine generalisierte Exazerbation der inflammatorischen Zytokine im Herzgewebe von TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen angezeigt durch die erhöhten mRNA-Expressionslevel des TNF- $\alpha$  (3.5-fach), IL-1 $\beta$  (3.9-fach), IL-10 (4.1-fach) und IL-18 (3.4-fach) ( $P < 0.001$ ; Abbildung 21). Im Gegensatz hierzu zeigten sich in der frühen Phase der kardialen Virusinfektion verschiedenartig differenzierte Zytokinlevel bis zum 72 Stunden-Zeitpunkt nach CVB3-Infektion zwischen den Tiergruppen der TRIF<sup>-/-</sup>- und WT-Mäuse. Es konnte eine signifikante Regulation von IL-18 bis 24 Stunden nach Virusinfektion unter den verschiedenen Versuchstiergruppen beobachtet werden.



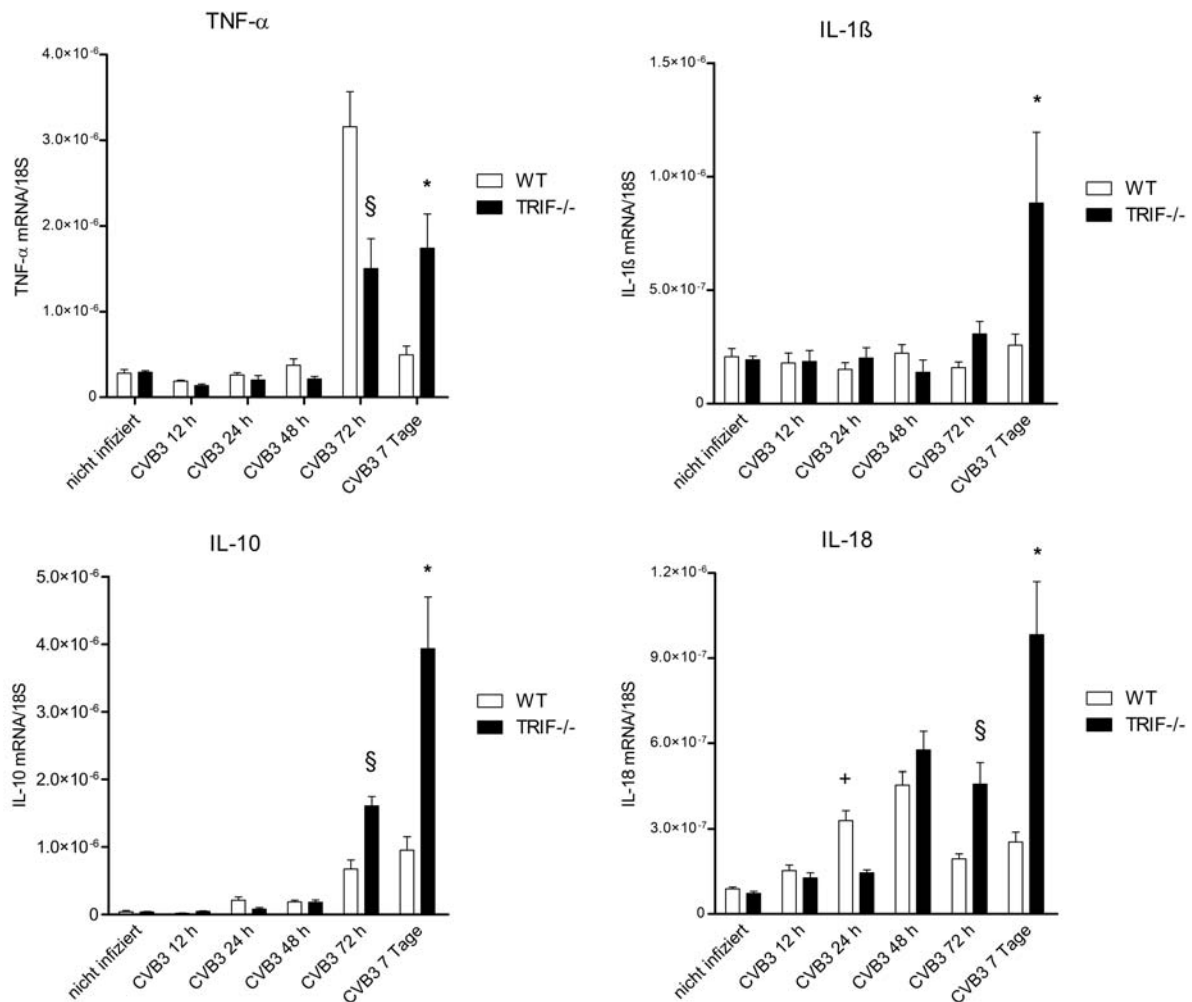


Abbildung 21: Die linksventrikulären mRNA-Expressionen der mittels RT-PCR ( $n = 6$  pro Versuchsgruppe) gemessenen Zytokine wiesen ein differenziertes und zeitabhängiges Expressionsmuster in der frühen Phase bis zu 72 Stunden nach viraler Infektion auf; was durch eine generalisierte Exazerbation inflammatorischer Zytokine in TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen sieben Tage nach CVB3-Infektion im Vergleich zu WT-CVB3 Mäusen seinen Ausdruck fand. (\* =  $P < 0.001$  vs. WT-CVB3 sieben Tage nach CVB3-Infektion). Im Gegensatz hierzu zeigten die TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse ein herabgesetztes mRNA-Level von TNF- $\alpha$  und teilweise von IL-18 vor diesem Zeitpunkt (§ =  $P < 0.01$  vs. WT-CVB3 72 Stunden nach CVB3-Infektion; + =  $P < 0.01$  vs. WT-CVB3 24 Stunden nach CVB3-Infektion). Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3; h = Stunden.

## 4.7 Kardiale Zelladhäsionsprozesse

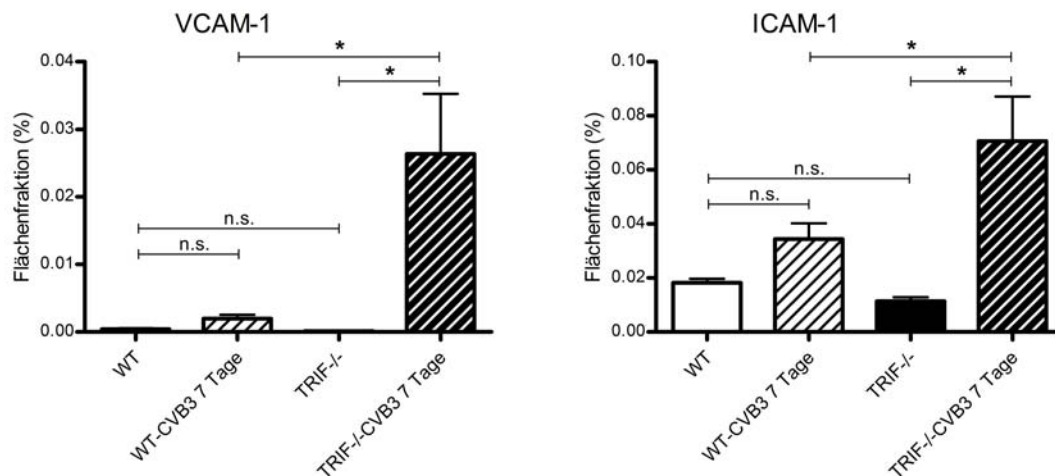


Abbildung 22: Immunhistochemische Bestimmung der VCAM- (links) und ICAM- (rechts) Mengen im Herzen sieben Tage nach CVB3-Infektion (\* =  $P < 0.001$  vs. TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3; n.s. = nicht signifikant). Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3.

Die transendotheliale Migration infiltrativer Immunzellen bei der viralen Myokarditis wird unter anderem durch die Expression der Zelladhäsionsmoleküle VCAM ("Vascular Cell Adhesion Molecule") ICAM ("Intercellular Adhesion Molecule") reguliert und moduliert. Der Gehalt dieser Moleküle wurde in der vorliegenden Studie unter Verwendung der Immunhistochemie bestimmt. Bei den infizierten Tiergruppen konnte im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine erhöhte Regulation von VCAM und ICAM verzeichnet werden. In der Gruppe der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse wurde jeweils ein signifikant erhöhter Gehalt von VCAM und ICAM im Vergleich zu den WT-CVB3 Mäusen beobachtet. Durch diese Regulation der Zelladhäsionsmoleküle wurde die Migration von Leukozyten bei den TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen vermittelt und begünstigt (Abbildung 22 und 23).

## 4.8 Kardiale Viruslast und Funktion des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR)

Um die Beschaffenheit der kardialen Viruskontrolle nach CVB3-Infektion suffizient beleuchten zu können, untersuchten wir den kardialen mRNA-Gehalt des CVB3 unter Zugrundelegung der RT-PCR Methodik und die Replikation des CVB3 mittels Plaque Assay 12, 24, 48 Stunden und sieben Tage nach CVB3-Infektion im linksventrikulären Herzmuskelgewebe.

Sowohl der mRNA-Gehalt als auch die CVB3-Replikation war bis zu 24 Stunden nach CVB3-Infektion zu detektieren. Dabei wies die mRNA-Expression des CVB3 einen signifikanten Anstieg in TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen 48 Stunden nach Infektion auf (48 Stunden: 2,6-fach, 7 Tage: 16,3-fach;  $P < 0.001$ ). Dieser signifikante Unterschied wurde ebenso sieben Ta-

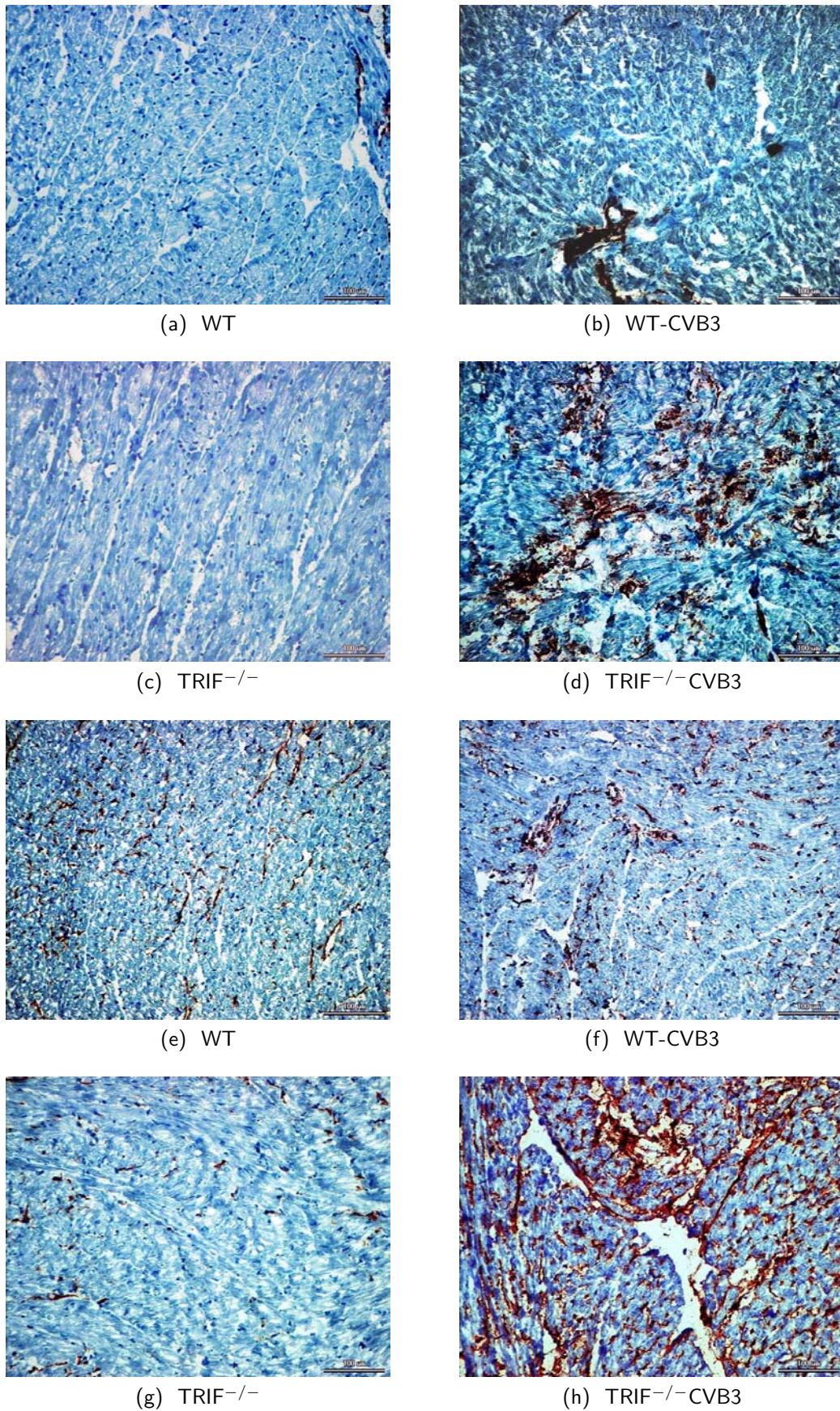


Abbildung 23: Repräsentative immunhistologische Bilder der Anfärbungen für VCAM (a bis d) und ICAM (e bis h) im linksventrikulären Gewebe bei einer 200-fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung. Kollagen-spezifische Epitope sind rot angefärbt.

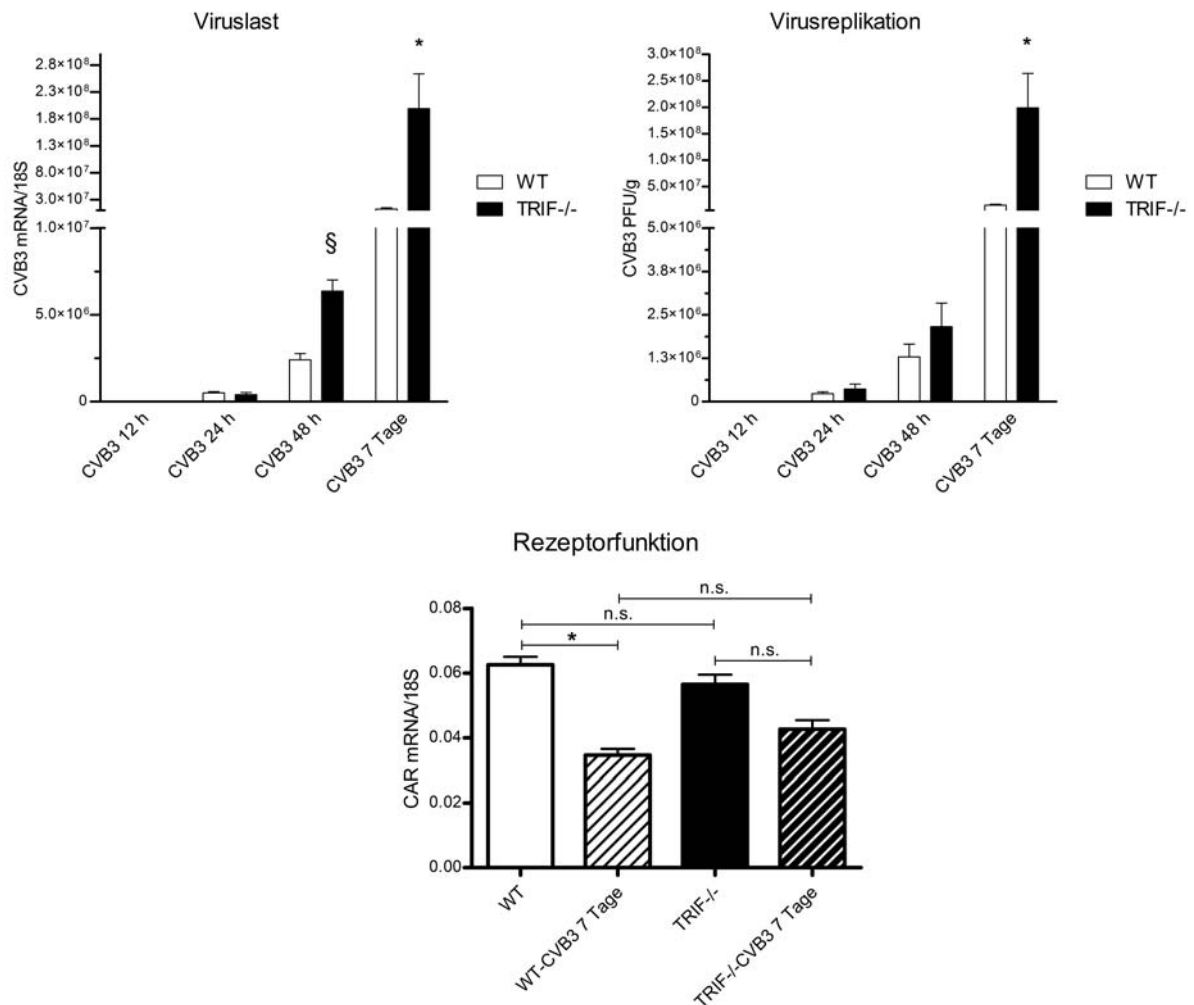


Abbildung 24: Der Coxsackievirus B3 mRNA-Gehalt des linksventrikulären Herzgewebes wurde mittels RT-PCR ( $n = 6$  pro Versuchstiergruppe) ermittelt. Ab 24 Stunden nach CVB3-Infektion konnte der Virus in WT- und TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen gleichermaßen detektiert werden. 48 Stunden nach Infektion wurde ein signifikanter Anstieg von CVB3-mRNA in TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt (§ =  $P < 0.001$  vs. WT-CVB3 48 Stunden nach CVB3-Infektion; \* =  $P < 0.001$  vs. WT-CVB3 sieben Tage nach Infektion). Weiterhin konnte 24 Stunden nach Infektion mit Hilfe des Plaque Forming Assay in beiden Tierstämmen die linksventrikuläre Virusreplikation beobachtet werden. Sieben Tage nach CVB3-Infektion wurde in TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikante Erhöhung der Virusreplikation im Herzgewebe festgestellt ( $n = 6$  pro Versuchstiergruppe) (\* =  $P < 0.001$  vs. WT-CVB3 sieben Tage nach CVB3-Infektion). Die kardiale mRNA-Expression des CAR – durch Benutzung der RT-PCR Methode – sieben Tage nach CVB3-Infektion war signifikant erniedrigt in WT-CVB3 Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollmäusen ( $n = 6$  pro Versuchstiergruppe) (\* =  $P < 0.05$ ), dennoch konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den WT-CVB3 Mäusen und den TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen ermittelt werden. Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3; n.s. = nicht signifikant.

ge nach CVB3-Infektion bei der Anzahl der Virusreplikationen durch die Plaque Assay Analyse angezeigt (13.6-fach;  $P < 0.0001$ ) (Abbildung 24).

Außerdem untersuchten wir die mRNA-Expression des für CVB3 zuständigen Rezeptors, den Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR), und stellten eine signifikante Reduzierung der Rezeptorexpression in WT-CVB3 Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen ( $P < 0.05$ ). Dennoch konnte kein Unterschied hinsichtlich der CAR Expression zwischen den Tiergruppen der WT-CVB3, TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 und TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse verifiziert werden (Abbildung 24).

#### 4.9 Kardiale Apoptose

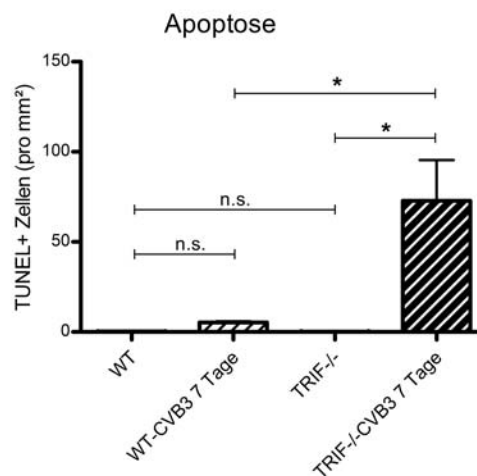


Abbildung 25: Der kardiale Gehalt apoptotischer Zellen wurde mittels der TUNEL<sup>®</sup> Immunfärbung ( $n = 6$  pro Versuchstiergruppe) verifiziert. Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. TUNEL-positive Zellen sind hier rot angefärbt (\* =  $P < 0.05$  vs. TRIF<sup>-/-</sup>-CVB). WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3; n.s. = nicht signifikant.

Darüber hinaus untersuchten wir, ob die linksventrikuläre Dysfunktion mit apoptotischen Prozessen sieben Tage nach CVB3-Infektion assoziiert war. Der Gehalt an apoptotischen Zellen im Herzmuskelgewebe unterschied sich nicht statistisch signifikant bei den WT und WT-CVB3 Mäusen. In der Gruppe der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse wurde hingegen ein signifikant erhöhter Gehalt von apoptotischen Zellen im Vergleich zu TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen (17.3-fach,  $P < 0,05$ ) und WT-CVB3 Mäusen (3.7-fach,  $P < 0.05$ ) nachgewiesen (Abbildung 25).

#### 4.10 Kardiale Umbauprozesse ("Remodeling")

Die Gruppe der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse wies im Vergleich zu den WT-CVB3 Mäusen im linksventrikulären Herzgewebe 12, 24, 48, 72 Stunden und sieben Tage nach CVB3-Infektion eine signifikant erhöhte Induktion kardialer Fibrose, angezeigt durch die gesteigerte mRNA-Expression und dem erhöhten Proteingehalt von Kollagen I und Kollagen III (4.4-fach und 7.9-fach,  $P < 0.05$ ) (Abbildung 26 und 29) auf. Demgegenüber erfuhr die unterschiedliche mRNA-Expression der untersuch-

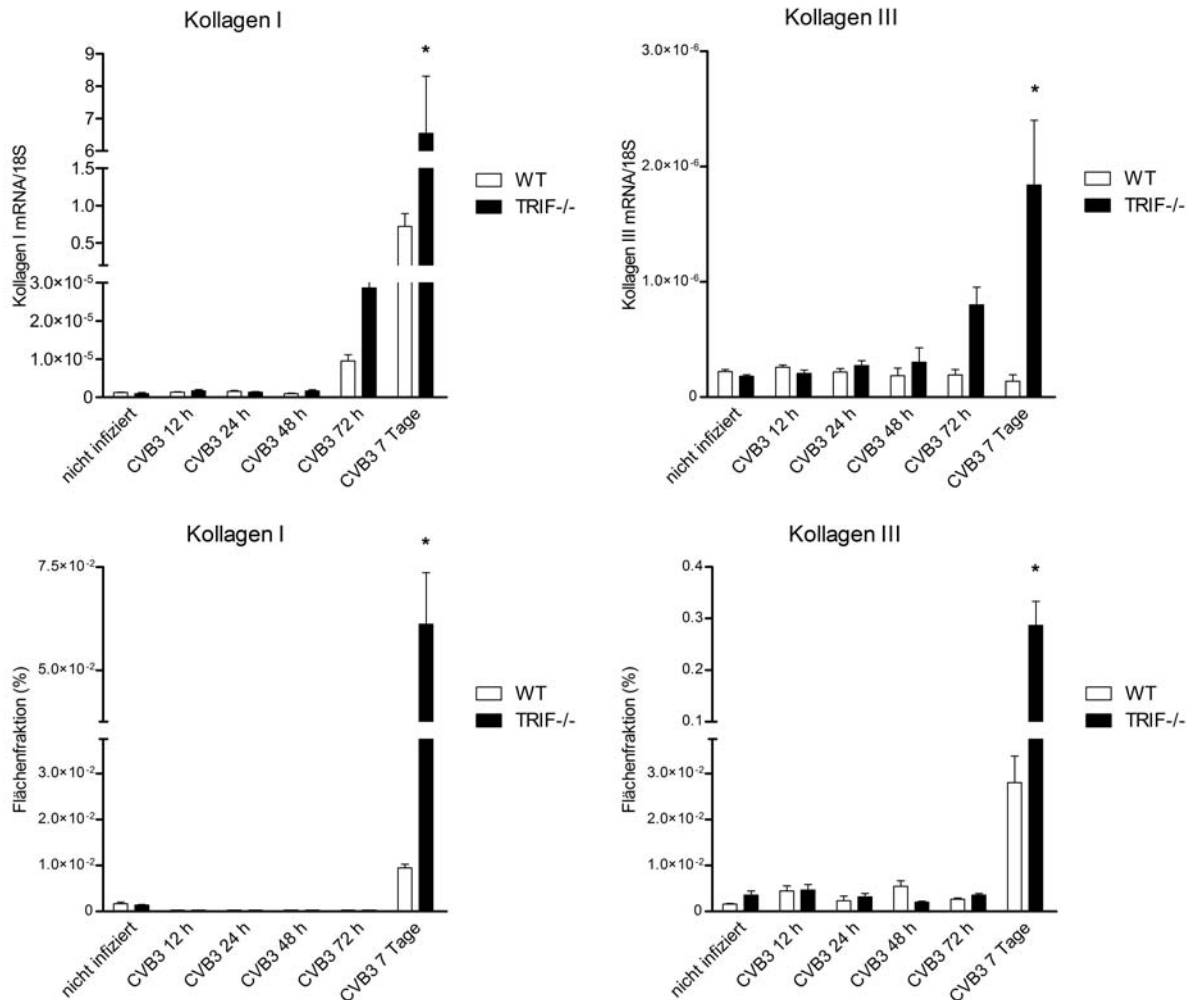


Abbildung 26: TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse wiesen eine extensive Destruktion des Herzgewebes und eine signifikant gesteigerte Immuneinfiltration auf. Der Gehalt von Kollagen I und III in Form von mRNA-Expressionslevel gemessen mittels RT-PCR war statistisch signifikant erhöht in TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen bis drei Tage nach CVB3-Infektion (\* =  $P < 0.001$  gegen WT-CVB3 sieben Tage nach CVB3-Infektion, § =  $P < 0.001$  vs. WT-CVB3 72 Stunden nach CVB3-Infektion) (oben). Ferner wurde ein erhöhter Proteingehalt von Kollagen I und III durch immunhistologische Färbungen sieben Tage nach CVB3-Infektion im Vergleich zu den WT-CVB3 Mäusen ermittelt ( $n = 6$  pro Versuchstiergruppe; \* =  $P < 0.001$  vs. WT-CVB3 sieben Tage nach CVB3-Infektion) (unten). Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3.

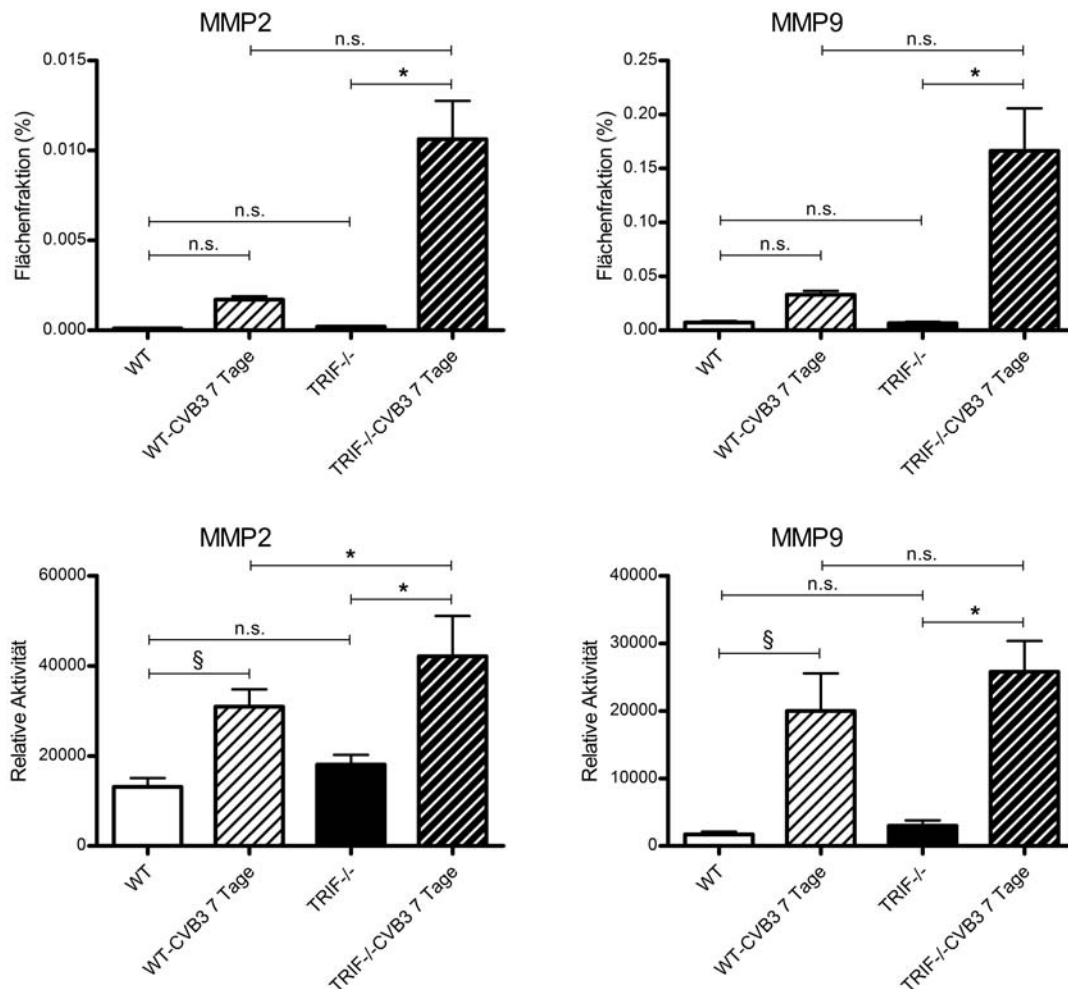


Abbildung 27: Ergebnisse des Proteingehalt und der zymographischen Analysen von MMP2 und MMP9. Es wird ein signifikanter Anstieg des Proteingehalt der MMP2 und MMP9 bei TRIF<sup>-/-</sup>CVB3 Mäusen verglichen mit den infizierten WT-Mäusen festgestellt (oben; \* =  $P < 0.05$  gegen TRIF<sup>-/-</sup>CVB3). Die zymographischen Ergebnisse zeigten eine signifikante Aktivitätssteigerung der MMP2 in den infizierten TRIF<sup>-/-</sup>Mäusen im Vergleich zu WT-CVB3 Mäusen sieben Tage nach CVB3-Infektion (\* =  $P < 0.05$  vs. TRIF<sup>-/-</sup>CVB3 und § =  $P < 0.05$  vs. WT-CVB3 (links unten); eine statistisch signifikante Modulation der Aktivität der MMP9 unter Verwendung zymographischer Analyseverfahren konnte jedoch zwischen den infizierten Tierstämmen nicht beobachtet werden (rechts unten; \* =  $P < 0.05$  vs. TRIF<sup>-/-</sup>CVB3 und § =  $P < 0.05$  vs. WT-CVB3). Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3; n.s. = nicht signifikant.

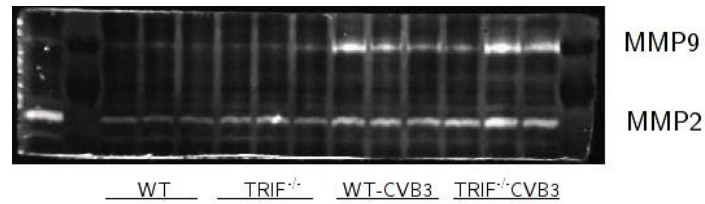


Abbildung 28: Visuelle Ergebnisse der zymographischen Analysen in Banden. Die Ergebnisse der zymographischen Analysen hinsichtlich der MMP2 und MMP2 zeigen auch visuell in Bandendarstellung signifikante Unterschiedlichkeiten der Aktivität der MMP2 – jedoch nicht der MMP9 – sieben Tage nach CVB3-Infektion. Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3.

ten Kollagene I und III in der Gruppe der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse verglichen mit den WT-CVB3 Mäusen einen signifikanten Anstieg bis Zeitpunkt von 72 Stunden post infectionem ( $P < 0.001$ ). Zudem zeigte sich in der Proteinproduktion der charakterisierten Kollagene sieben Tage nach Infektion eine statistisch signifikante Erhöhung des Kollagen I und III in der Versuchstiergruppe der infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den WT-CVB3 Mäusen (Kollagen I: 36-fach und Kollagen III: 9.7-fach,  $P < 0.001$ ). Die gemessenen Parameter wiesen bezogen auf die WT-CVB3 Mäuse und die WT-Mäuse keinen statistisch signifikanten Unterschied auf (Abbildung 26).

Im Weiteren untersuchten wir die Funktion und Aktivität der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) mittels des Analyseverfahrens der Zymographie und Immunhistologie der MMP2 und MMP9. Die Ergebnisse der zymographischen Auswertung zeigten – im Vergleich mit den gesunden Kontrolltiergruppen – eine erhöhte Aktivität der MMP2 und MMP9 in den infizierten Tiergruppen (Abbildung 27). In den beiden Gruppen der gesunden Kontrolltiere konnte erwartungsgemäß nur eine geringgradige Aktivität bzw. Expression von MMP2 und MMP9 festgestellt werden. Unterschiedliche Ergebnisse waren dagegen im Vergleich der infizierten Versuchstiergruppen untereinander zu verifizieren: Bei den TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen war im Gegensatz zu den WT-CVB3 Mäusen sieben Tage nach CVB3-Infektion ein signifikanter Anstieg Aktivitätsveränderung hinsichtlich der MMP2 festzustellen, während sich hinsichtlich der MMP9 zwischen den Versuchstiergruppen der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen und WT-CVB3 Mäusen sieben Tage nach CVB3-Infektion kein relevanter Unterschied ergab (Abbildung 27 und 28).

Bei den Ergebnissen der Immunhistologie hinsichtlich der MMP2 und MMP9 wiesen die TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse verglichen mit den WT-CVB3 Mäusen sieben Tage nach CVB3-Infektion einen signifikant gesteigerten Gehalt im linksventrikulären Herzgewebe auf.

#### 4.11 Interferon- $\beta$ vermittelte Immunantwort und Mortalitätsstudie

Um die IFN- $\beta$  vermittelte Immunantwort während der viralen Myokarditis untersuchen zu können, wurden die entsprechenden mRNA-Expressionen von WT-Mäusen und TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen zu den Zeiträumen 12, 24, 72 Stunden und sieben Tage nach Infektion durch CVB3 ermittelt. In allen Versuchstiergruppen, auch in den Gruppen der gesunden Kontrolltiere, wurde ein geringes Maß



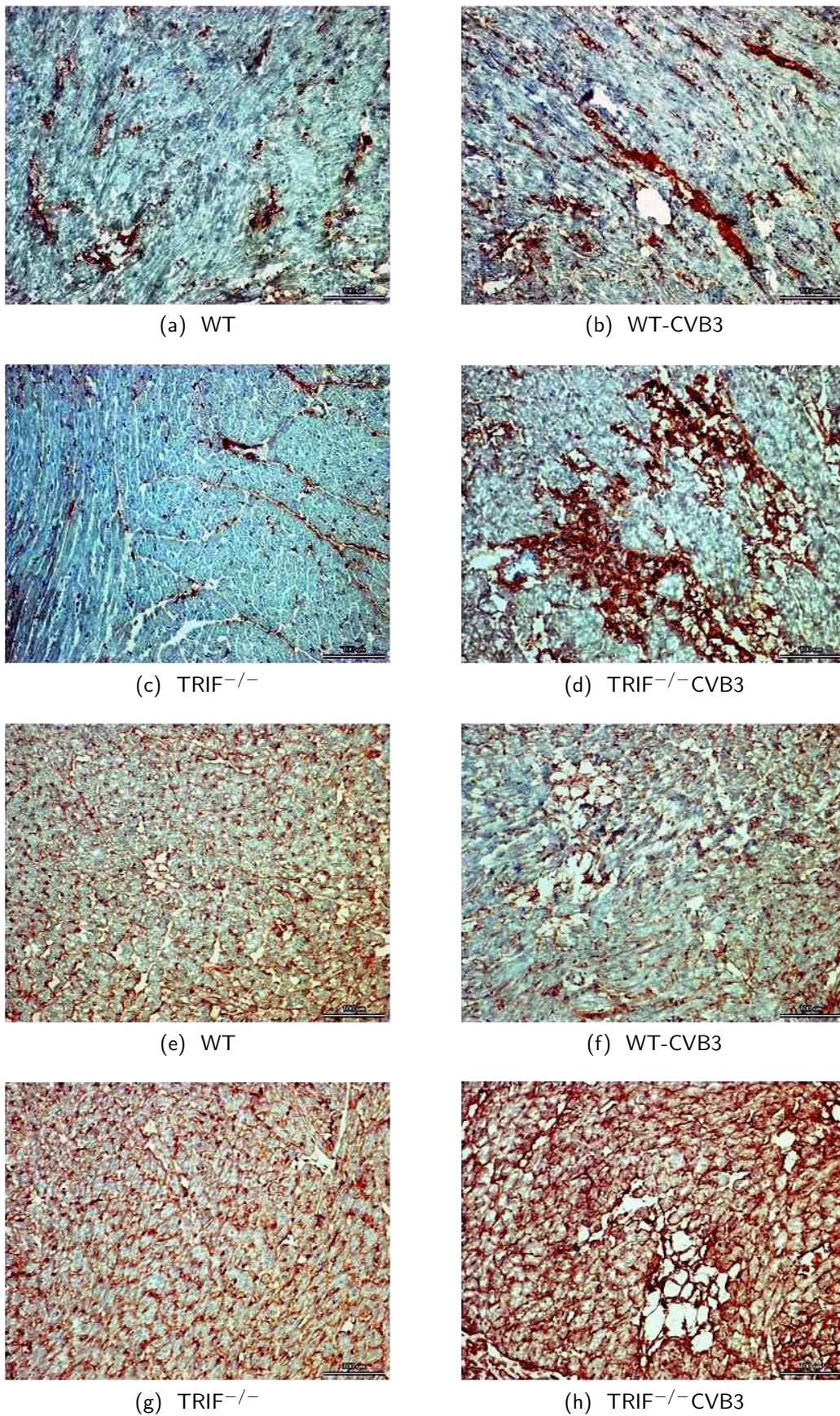


Abbildung 29: Repräsentative immunhistologische Bilder der Anfärbungen für Kollagen I (a bis d) und III (e bis h) im linksventrikulären Gewebe bei einer 200-fachen lichtmikroskopischen Vergrößerung. Kollagen-spezifische Epitope sind rot angefärbt.

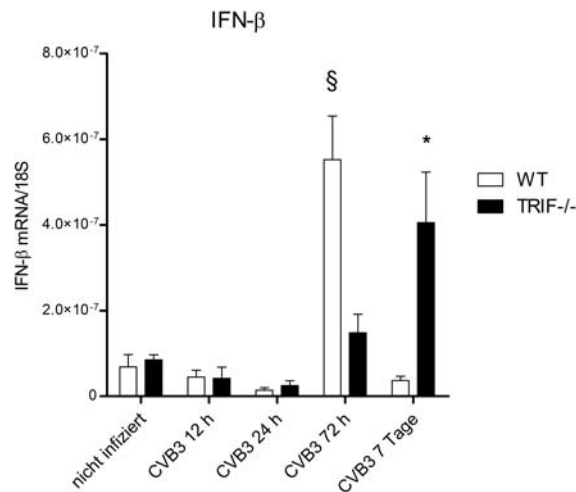


Abbildung 30: TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine mittels RT-PCR gemessene frühe kardial reduzierte mRNA-Expression von IFN- $\beta$  drei Tage nach CVB3-Infektion im Vergleich zu den infizierten WT-Mäusen im gleichen Zeitpunkt nach viraler Infektion (\* =  $P < 0.001$  gegen WT-CVB3 72 Stunden nach CVB3-Infektion). Sieben Tage nach CVB3-Infektion jedoch wurde eine signifikant erhöhte IFN- $\beta$  Expression in TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen gegenüber den infizierten WT-Mäusen festgestellt (§ =  $P < 0.001$  vs. WT-CVB3 7 Tage nach CVB3-Infektion) ( $n = 6$  pro Versuchstiergruppe). Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3; IFN = Interferon.

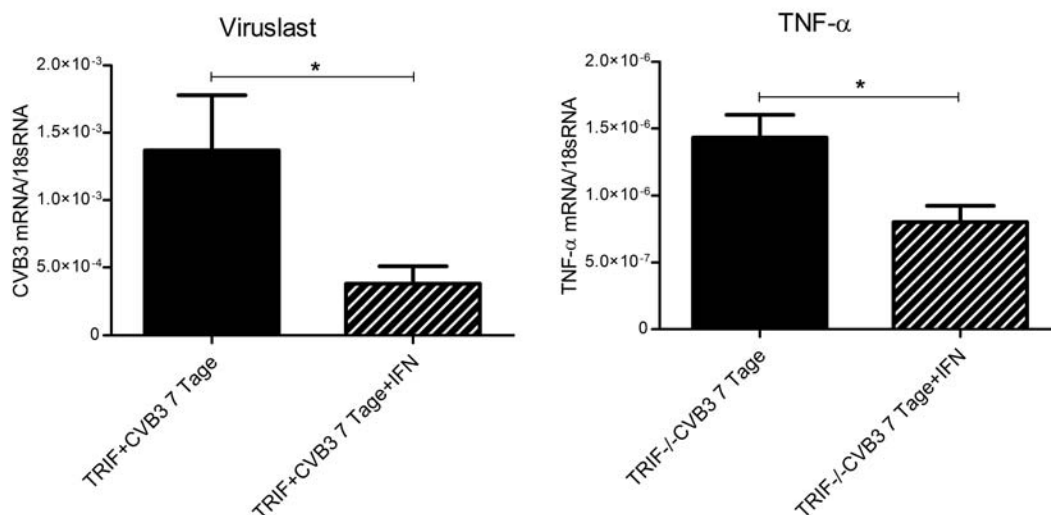


Abbildung 31: Die durch IFN- $\beta$  Substitutionstherapie behandelten (über einen Zeitraum von 14 Tage nach Infektion) TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen einen reduzierten kardialen Gehalt von CVB3 (links) und TNF- $\alpha$  (rechts) mRNA-Expression im Vergleich zu den unbehandelten CVB3-infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen auf ( $n = 6$  pro Versuchstiergruppe) (\* =  $P < 0.05$  vs. TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3). Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3; IFN = Interferon.

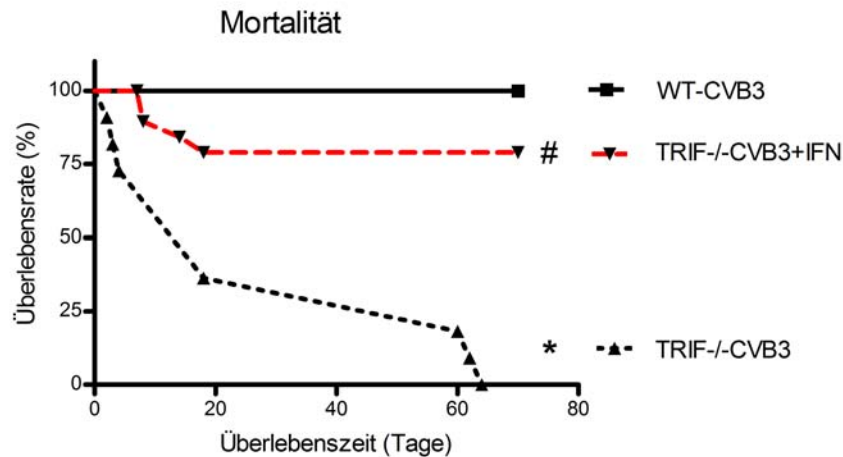


Abbildung 32: Die Substitutionsbehandlung mittels murinen IFN- $\beta$  führte bei den TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen in der akuten Phase der viralen Myokarditis zu einem signifikant verbesserten Überleben von 80% im Vergleich zu den unbehandelten und infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen; (# =  $P < 0.001$  vs. TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3). Alle Datensätze wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SM) ausgewiesen. WT = Wildtyp; CVB3 = Coxsackievirus B3; IFN = Interferon.

der mRNA-Expression von IFN- $\beta$  ermittelt. In Anknüpfung an die dargelegten analytischen Ergebnisse der linksventrikuläre Immunzellinfiltration und der Aktivierung inflammatorischer Zytokine, welche eine generalisierte Exazerbation zeigten, konnten wir überdies mit Hilfe weiterer Untersuchungen einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von IFN- $\beta$  in der Versuchstiergruppe der infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu allen anderen Tiergruppen feststellen (11.0-fach;  $P < 0.001$ ).

Zu einem früheren Zeitpunkt – drei Tage nach viraler Infektion – wurde bei Analyse der mRNA-Expression von IFN- $\beta$  eine signifikante Erniedrigung in TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen verglichen mit den infizierten WT-Mäusen gemessen (-73%;  $P < 0.001$ ) (Abbildung 30). Weiterhin untersuchten wir durch die Behandlung infizierter TRIF<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen mittels der Substitution durch murines IFN- $\beta$  die Auswirkung des IFN- $\beta$  auf die Modulation der Viruskontrolle und die Genese der kardialen Inflammation. Hier zeigten die infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse reduzierte kardiale CVB3 (-72%;  $P < 0.001$ ) (Abbildung 31) und TNF- $\alpha$  (-41%;  $P < 0.01$ ; Abbildung 31) mRNA-Expressionsebenen im Vergleich zu den unbehandelten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Eine Substitutionsbehandlung mit murinen IFN- $\beta$  nach Infektion durch CVB3 *in vivo* in der Versuchstiergruppe der TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse führte zu einer in diesem Ausmaß nicht erwarteten, statistisch signifikanten Überlebensrate im Vergleich zu den unbehandelten CVB3-infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen (Mortalität 20% vs. 100%;  $P < 0.0001$ ) (Abbildung 32).

## 5 Diskussion

Mit der vorgelegten Studie werden – soweit bekannt – erstmals die physiologischen Effekte des Adaptermoleküls TRIF auf den Verlauf der viralen Myokarditis im Tiermodell untersucht.

Dabei konnte zunächst verifiziert werden, dass das intrazelluläre TLR-Mediatorprotein TRIF als ein Essentiale für die Kardioprotektion gegenüber einer CVB3-Infektion in der Maus in Betracht kommt. Eine Defizienz von TRIF führte zum Verlust der Viruskontrolle, der seinerseits eine LV-Dysfunktion auslöste sowie die Entstehung kardialen Remodelings nach viraler Infektion begünstigte.

Überdies zog die TRIF-Defizienz eine Induktion von Mortalität nach sich, die durch IFN- $\beta$  Substitutionsbehandlung deutlich reduziert werden konnte.

Nachstehend sollen die Ergebnisse unserer Untersuchungen im Einzelnen kritisch beleuchtet und diskutiert werden.

Zur Diskussion werden insbesondere die Ergebnisse hinsichtlich der linksventrikulären Funktion, der Körper- und Herzgewichte, der Zytokinexpression, der Immunzellinfiltration, der Viruskontrolle, der Viruslast, der spezifischen Rezeptorfunktion, der Apoptose, des kardialen Remodelings, der Zelladhäsion und die Ergebnisse der Mortalitätsstudie – auch hinsichtlich der murinen IFN- $\beta$  Substitutionstherapie – zu stellen sein.

### 5.1 Hämodynamische Funktion

Dass andere Komponenten des TLR-Systems, namentlich TLR2, TLR4, TLR9 und MyD88, eine Reduktion der linksventrikulären Kontraktilität induzieren, ist wissenschaftlich bereits durch eine Reihe von Experimenten mit unterschiedlichen Tiermodellen zur Herzinsuffizienz und auch in myozytären Zellkulturen hinreichend belegt.

Die vorliegende Studie demonstriert dagegen im Näheren protektive Effekte von TRIF und deshalb eine neue physiologische Relevanz, dies zumindest für einen ausgeprägten Teil des TLR-Systems im Herzen [158-168].

Riad et al. zeigten bereits in einer Studie, dass eine Defizienz des TLR4 zu einer verbesserten linksventrikulären Pumpfunktion in der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie führt [159].

Überdies wurde in einigen Studien auch belegt, dass der TLR4 die Überlebensrate über die Induktion des linksventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt signifikant moduliert [158]. Eine weitere Studie beschreibt zudem die Relevanz des TLR2 im ventrikulären Remodeling im murinen Herzinfarktmodell [164]. In Ergänzung hierzu konnte eine maßgebend durch TLR2 beeinflusste Modulation der kardialen Dysfunktion in der Doxorubicin-toxischen Kardiomyopathie beobachtet und belegt werden. In derselben Studie wurden erstmals präventive Effekte – durch TLR2 vermittelt – bezüglich der kardialen Funktion, einer erhöhten Überlebensrate, der reduzierten Zytokinproduktion und einer reduzierten myokardialen Apoptose in der Doxorubicin-induzierten Kardiomyopathie verifiziert [166].

Unsererseits wurde die globale Herzfunktion mittels der Herzfrequenz, der LV-Volumina, des Schlagvolumens, der Ejektionsfraktion und des Herzzeitvolumens charakterisiert.

Die systolische Funktion wurde genauer durch den produzierten maximalen und endsystolischen Druck und die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit beschrieben. Die diastolische Funktion wurde anhand der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit, des Tau-Wertes, des enddiastolischen und des minimalen LV-Druckes sowie des enddiastolischen Volumens evaluiert.

### 5.1.1 Parameter unter Basalbedingungen

Unter Basalbedingungen wiesen die beiden nicht-infizierten Gruppen der WT-Mäuse und TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse keine signifikanten Unterschiedlichkeiten in ihren hämodynamischen Parametern auf. Die Versuchstiergruppen zeigten weder in den systolischen noch in den diastolischen Funktionen relevante Modulationen der LV-Funktion. Zu Beginn der Studie unterschieden sich sämtliche Versuchstiergruppen auch in ihrem Körpergewicht nicht relevant.

### 5.1.2 Parameter der globalen Funktion

Beide CVB3-infizierten Tiergruppen entwickelten in unseren Untersuchungen im Vergleich zu den nicht-infizierten Versuchstiergruppen eine reduzierte globale Herzfunktion. Die WT-CVB3 Mäuse zeigten sieben Tage nach Infektion einen mildereren Verlauf der viralen Myokarditis über den Experimentationszeitraum.

Frühere Studien zeigten gleiche Ergebnisse, ermittelt mittels der transthorakale Echokardiographie, in demselben durch CVB3-Infektion induzierten experimentellen Myokarditismodell [169]. Die Versuchstiergruppe der WT-CVB3 Mäuse ließ nach Infektion keine signifikante LV-Dysfunktion, immerhin aber eine kardiale Schädigung erkennen, die eben eine LV-Dysfunktion letztlich nicht ausgeschlossen erscheinen lässt. Im Gegensatz hierzu führte eine TRIF-Defizienz in den jeweiligen Versuchstiergruppen unter den beschriebenen Bedingungen zu einer signifikant reduzierten LV-Funktion, die sich – im Vergleich zu den nicht-infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen – in einer herzfrequenzunabhängigen Reduktion des Herzzeitvolumens von 53% niederschlug.

Das SV war in der Gruppe der infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den gesunden TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant reduziert. In den Versuchstiergruppen der WT-Mäuse und der WT-CVB3 Mäuse ergaben sich demgegenüber keine signifikanten Veränderungen.

Zudem zeigte sich in den TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen eine signifikante Erhöhung des LVESV im Vergleich zu den gesunden TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dieses Ergebnis lässt sich mit der signifikanten Verringerung des SV der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse erklären.

Das LVESV stellt einen kaum lastabhängigen Marker der linksventrikulären Kontraktilität dar.

Es wurden insoweit keine statistisch relevanten Abweichungen unter den Versuchstiergruppen der WT-Mäuse auf der einen und den WT-CVB3 Mäusen auf der anderen Seite festgestellt.

Was den hämodynamischen Vergleich angeht, so ist durch eine frühere Studie belegt, dass in der experimentellen CVB3-induzierten Myokarditis die LV-Volumina in WT-Mäusen annähernd konstant bleiben [170].

In Übereinstimmung hiermit konnten auch unsere Untersuchungen im hämodynamischen Vergleich der Versuchstiergruppen der WT-Mäuse und der WT-CVB3 Mäuse keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der linksventrikulären Volumina (LVESV, LVEDV und SV) und der EF belegen.

Die Herzfrequenzen aller Versuchstiergruppen wiesen in der hämodynamischen Messung keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. In Anbetracht dessen kann eine allein von der Varianz der Herzfrequenz abhängige Beeinflussung der Messergebnisse ausgeschlossen werden.

### 5.1.3 Parameter der systolischen Funktion

Vor dem Hintergrund der gewonnenen Analyseergebnisse zur globalen LV-Funktion wurden zudem in der Studie relevante Parameter der systolischen Herzfunktion untersucht.

Ergebnis war die Entwicklung einer erheblichen systolischen Dysfunktion der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse. Sieben Tage nach CVB3-Infektion zeigten die infizierten WT-Mäuse in den Parametern des maximalen LV-Drucks und der maximalen LV-Druckanstiegsgeschwindigkeit im Vergleich zu den gesunden WT-Mäusen eine tendenzielle Verschlechterung der systolischen Pumpfunktion, ohne dass insoweit jedoch auffällige Veränderungen festzustellen gewesen wären.

Im Gegensatz hierzu wiesen die infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse – verglichen mit den nicht infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen – sowohl signifikant reduzierte Werte des  $dP/dt_{max}$ -Wertes als auch des maximalen LV-Drucks auf.

Die hier gemessenen Parameter, nämlich maximaler LV-Druck und  $dP/dt_{max}$ -Wert, müssen nach unseren Erkenntnissen als die bestimmenden Parameter für die Entstehung einer systolischen Dysfunktion im Krankheitsbild der viralen Myokarditis angesehen werden [171].

Die ausgewerteten Parameter belegten eindrucksvoll die deutlich eingeschränkte Kontraktilität und die verminderten Druckverhältnisse des systolischen arteriellen Drucks der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse im Vergleich zu den nicht-infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen.

### 5.1.4 Parameter der diastolischen Funktion

Die Entstehung einer diastolischen Dysfunktion wird als frühzeitiger kritischer Indikator für die Herzfunktion in der viralen Myokarditis beschrieben.

Nach gesicherter wissenschaftlicher Erkenntnis muss man die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit als einen relevanten Parameter mit starker Aussagekraft über die diastolische Funktion ansehen. Deshalb haben wir auch die Messung der Druckabfallsgeschwindigkeit des LV in unsere Untersuchungen einfließen lassen.

Sieben Tage nach Virusinfektion konnte festgestellt werden, dass der Wert des  $dP/dt_{min}$  in der Versuchstiergruppe der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse im Gegensatz zu den gesunden TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant herabgesetzt war.

Zwischen den Tiergruppen der WT-Mäuse und der WT-CVB3 Mäusen wurden diesbezüglich keine Signifikanzen evaluiert.

Demgegenüber wiesen die TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse – angezeigt durch den Ventrikelsteifigkeits-Index – eine signifikant verschlechterte diastolische Herzfunktion im Vergleich zu der Versuchstiergruppe der TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse auf. Eine relevante Modulation des Ventrikelsteifigkeits-Index zwischen den WT-Mäusen und den infizierten WT- Mäusen konnte jedoch nicht festgehalten werden.

Die Parameter Tau, LVEDP und LVEDV ergaben beim Vergleich sämtlicher Versuchstiergruppen in der statistischen Auswertung keine signifikanten Veränderungen. Als denkbare Erklärung für diesen Umstand bietet sich der höhere Gewichtsverlust in der Gruppe der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen an. Die größere Flüssigkeitsreduktion führt nämlich zu einem reduzierten intravaskulärem Volumen. Hierdurch entstehen herabgesetzte Füllungsvolumina, und es ist ein Abfall des jeweiligen Füllungsdrucks im linken Ventrikel zu verzeichnen.

In der Pathogenese der viralen Myokarditis kommt der Viruswirkung auf die Kardiomyozyten eine gewichtige Relevanz zu. Der Eintritt des Virus und die Ausbreitung der hierauf beruhenden Infektion führen zur Herabsetzung der zellulären Synthesemechnismen. Hier werden relevante Zellproteine wie das Dystrophin von Virusproteasen abgebaut.

Des Weiteren wird ein Großteil der Zellenergie, die für die regelrechte Relaxation des Herzens in der Diastole notwendig ist, durch die Vorgänge der Virusreplikation verbraucht. Im Anschluss hieran sind Lyseprozesse in den infizierten Kardiomyozyten zu beobachten. Hierdurch bedingt kommt es zur erneuten Freisetzung des Virus und zur anschließenden Infektion benachbarter Zellen.

Als weitere Folge der Infektion ergibt sich eine Reduzierung der Kardiomyozytenzahl; es treten Funktionsstörungen der übrigen Zellen im Myokard ein.

Da die Viruslast – wie bereits dargelegt – bei den TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen im Gegensatz zu den WT-CVB3 Mäusen um ein Vielfaches erhöht ist, könnte eben hierin die signifikant verschlechterte linksventrikuläre Pumpfunktion eine nachvollziehbare Erklärung finden.

Während der kardialen Entzündung kommt es zur Erhöhung der zirkulierenden inflammatorischen Mediatoren (Zytokine, Chemokine, Antikörper). Diese können zu einer Störung der systolischen und diastolischen Funktion führen. Vor allem TNF- $\alpha$  und IL-6 sind an der Pathophysiologie der akuten Herzinsuffizienz beteiligt [172]. Wie in unseren laboralen Experimenten festgestellt werden konnte, war insbesondere die Expression von TNF- $\alpha$  und IL-6 in den infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 gegenüber den WT-CVB3 Tieren signifikant erhöht.

Eine gewichtige Rolle in der diastolischen Dysfunktion spielt die Steifigkeit des Herzens, die in unmittelbarer Abhängigkeit von Kollagengehalt und Kollagenqualität des Herzmuskels steht

[173]. Wie wissenschaftlich belegt ist, zeigt Kollagen I eine geringere Elastizität als Kollagen III und kann daher zu einer Relaxationsstörung des Herzens führen, wenn seine Konzentration im Herzen ansteigt [174].

Als Evaluierungsmittel zur Verifizierung der Myokardfibrose sind der Kollagengehalt und auch dessen Expressionsmuster insofern von Bedeutung, als sie Aufschluss darüber geben können, ob es zu relevanten Strukturveränderung des Herzmuskels gekommen ist. Dementsprechend haben wir Messungen der Kollagenexpression vorgenommen. Die Messungen ergaben, dass bei den infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den WT-CVB3 Mäusen eine stark signifikante Myokardfibrose, eben angezeigt durch einen angehobenen Gehalt der Kollagenexpressionen, gegeben war.

## 5.2 Körper- und Herzgewichte

Nach unseren weiteren Messungen wiesen die TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse im Gegensatz zu den WT-CVB3 Mäusen sieben Tage nach viraler Infektion ein signifikant reduziertes Körpergewicht auf. Die deutlich messbare Körpergewichtsabnahme – eines der wichtigsten klinischen Kriterien für die Beurteilung der Morbidität bei der akuten Myokarditis – unterstreicht die Annahme, dass die TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse unter einem deutlich schwereren Krankheitsverlauf als die WT-CVB3 Mäuse litten [175]. Im Krankheitsbild der viralen Myokarditis wird eine Abnahme des Herzgewichtes beobachtet, die ihre Ursache im allgemein erhöhten Katabolismus und ebenfalls in der reduzierten Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr bei den infizierten Mäusen findet [170].

Körper- und Herzgewicht stellen relevante klinische Parameter dar, die nach unserer Einschätzung auf eine außergewöhnliche Exazerbation der Myokarditis bei den TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen hindeuten.

## 5.3 Kardiale Inflammation

### 5.3.1 Immunezellinfiltration

Obgleich die TLRs und deren nachgeschalteten Adaptermoleküle einschließlich TRIF nahezu ubiquitär auf humanen und murinen Organismen exprimiert werden, findet sich die höchste Expression der TLRs auf Immunezellen.

Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass eben jenen Immunezellen hinsichtlich der TLR-Signalvermittlung eine nicht zu unterschätzende Bedeutung zukommt, deren Tragweite allerdings noch nicht abschließend beurteilt werden kann [95,178].

Im Hinblick hierauf wurde ein Schwerpunkt bei unseren Untersuchungen auf die Identifikation möglicher Immunezellpopulationen im Herzen gelegt, die verantwortlich für die Vermittlung der überschießenden inflammatorischen Antwort in TRIF-defizienten Mäusen nach CVB3-Infektion sind.



Aus diesem Bestreben heraus haben wir den kardialen Gehalt von CD68<sup>+</sup>-Makrophagen, CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, CD4<sup>+</sup>-aktivierten T-Zellen und CD80<sup>+</sup>-aktivierten B-Zellen gemessen. Die genannten Zellpopulationen sind als Quelle für die Zytokinproduktion bekannt und unterliegen in ihrer Funktion TLR-vermittelten Kontrollmechanismen [179-180].

Bei unseren Experimenten konnten wir einen deutlichen Anstieg der kardialen Immunzellinfiltration aller Zellarten in TRIF-defizienten Mäusen verzeichnen. Dieser Umstand legt die Folgerung nahe, dass die Überexpression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IL-18 in unserer Studie möglicherweise durch einen generellen Effekt unterschiedlicher Immunzellpopulationen begründet wird. Denn die Überexpression des IL-21 suggeriert, dass CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Herzen der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse eine signifikante Bedeutung in der exazerbierten inflammatorische Antwort unter diesen Bedingungen innehaben. Dies darf deshalb nicht außer Betracht gelassen werden, weil das IL-21 als neuestes Mitglied der IL-2 Familie von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sezerniert wird [181].

### 5.3.2 Zytokinexpression

Da wissenschaftlich gesichert ist, dass das TLR-System in die Regulation der Zytokinaktivierung eingreift, mussten wir es als naheliegend ansehen, dass eben dieser Effekt jedenfalls als eine nicht gänzlich untergeordnete Ursache für die von uns festgestellte schädliche Wirkung einer TRIF-Defizienz in Form einer Dysbalance der Zytokinregulation darzustellen scheint.

In mehreren humanen und tierexperimentellen Studien wurde bewiesen, dass sowohl die virale Infektion als auch die Entstehung einer Herzinsuffizienz mit einem ausgedehnten Spektrum der Zytokinaktivierung eng in Verbindung steht.

Im Speziellen zeigten die Studien, dass eine Zytokinaktivierung einschließlich der inflammatorischen Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-18 die Entwicklung einer LV-Dysfunktion und das kardiale Remodeling verstärken kann [175-177]. Satoh et al. beschrieben in ihrer Arbeit, dass es durch die Aktivierung der inflammatorischen Zytokinkaskade in der humanen Herzinsuffizienz zu einer relevanten Immunmodulation kommt. Hierbei führte nach ihren Erkenntnissen im Besonderen der Anstieg inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und dessen Rezeptor zu myozytärer Apoptose und auch zur Aktivierung der MMPs. Dies wiederum aktivierte Modifikationsprozesse der interstitiellen Matrix und initiierte die Genese des ventrikulären Remodelings. Mit einer weiteren Arbeit konnte belegt werden, dass die vermehrte Zytokinproduktion des IL-1 $\beta$  und IL-18 eine signifikante Rolle in der Pathogenese der CVB3-induzierten Myokarditis einnimmt und über Modulation der Immunantwort und der Virusreplikation zu einer Exazerbation nach viraler Infektion führt.

In Einklang mit diesen Erkenntnissen fanden wir sieben Tage nach CVB3-Infektion eine generalisierte Exazerbation der Zytokinaktivierung im Herzgewebe als Resultat der TRIF-Defizienz vor.

Dies könnte als das Ergebnis einer Induktion des MyD88-Signalweges als zweiter ausgeprägter Signalkaskade des TLR4 trotz des Vorhandenseins des TRIF-Signalweges zu interpretieren sein. Das Fehlen des gewichtigen TLR-Adapterproteins MyD88 führt überdies – wie als gesichert angesehen werden kann – zu einer Suppression der kardialen Zytokinaktivierung im gleichen experimentellen Tiermodell [109]. Eine weitere Ursache für die überschießende Zytokinaktivierung könnte in einer ergänzenden MyD88-unabhängigen Zytokinaktivierung als Folge der Virusinfektion oder der kardialen Schädigung zu suchen sein.

### 5.3.3 Regulation von Zelladhäsionsmolekülen

Es muss im Grundsätzlichen davon ausgegangen werden, dass die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM und ICAM in der CVB3-Myokarditis über das TLR-System induziert und relevant moduliert wird.

Hier sind im Besonderen die Signalkaskaden der TLRs und deren Wirkung auf inflammatorische Zytokine wie das IL-1 $\beta$ , IL-4 und TNF- $\alpha$  involviert [191].

Anhand eines experimentellen Modell der Myosin-induzierten Myokarditis ist die relevante Modulation der Expression von VCAM und ICAM hinsichtlich der Migration autoreaktiver T-Zellen im Myokard belegt [192]. Die betreffende Studie beschreibt einleuchtend, dass die Adhäsionsmoleküle eine bedeutsame Rolle während der Transmigration der infiltrativen Immunzellen besitzen.

In unserer Versuchstiergruppe der TRIF<sup>-/-</sup>CVB3 Mäuse wurde eine signifikant erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM und ICAM im Vergleich zu WT-CVB3 Mäusen festgestellt. Diese signifikant gesteigerte Expression in TRIF<sup>-/-</sup>CVB3 Mäusen vergleichend zu den WT-CVB3 Mäusen spricht dafür, dass die Modulation der Zellinfiltration auf der Ebene der immunmodulierenden Zytokine und Chemokine stattfindet.

## 5.4 Kardiale Apoptose

Ein weiteres Kennzeichen der viralen Myokarditis stellt die Induktion der Apoptose dar [185]. Die Induktion der Apoptose setzt bevorzugt im weit fortgeschrittenen Stadium der CVB3-Infektion ein.

Zu diesem Zeitpunkt wird das Virus aus der infizierten und apoptotischen Zelle freigesetzt und es kommt zu einer erneuten Infektion benachbarter Zellen im Myokard. Es ist bereits wissenschaftlich aufbereitet, dass in der CVB3-induzierten Myokarditis ein gesteigerter Gehalt apoptotischer Kardiomyozyten vorzufinden ist.

Der Gehalt apoptotischer Zellen weist allerdings eine Varianz zwischen den unterschiedlichen Mausstämmen auf. Ferner scheint die Induktion der Apoptose eng verknüpft mit der Ausdehnung der Virusreplikation in Kardiomyozyten zu sein.

Nach einer weiteren Studie lässt sich ein enger Zusammenhang zwischen der myokardialen Inflammation in Abwesenheit von IFN- $\gamma$  mit einer reduzierten kardialen Apoptose und der Expansion aktivierter T-Zellen in der experimentellen Myokarditis ableiten [185].

Als ein weiteres Resultat unserer Untersuchungen zeigte sich aufgrund der angewandten TUNEL-Färbemethode ein mehrfach erhöhter Gehalt apoptotischer Zellen als Resultat einer TRIF-Defizienz nach viraler Infektion. Die beträchtliche LV-Dysfunktion der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse nach viraler Infektion wird – unserer Einschätzung nach – maßgeblich durch das signifikant erhöhte Vorkommen apoptotischer Zellen im Myokard begünstigt. Ein Erklärungsmodell für dieses Phänomen könnte die erheblich erhöhte Viruspersistenz im Herzgewebe der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse im Vergleich zu den infizierten WT-Mäusen sein. Jedenfalls wird diese Annahme durch die signifikant gesteigerte kardiale Inflammation der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäuse argumentativ unterstützt. Leukozyten sind in der Lage, apoptotische Vorgänge zu induzieren [186-187]. Ferner führen apoptotische Zellen und pro-apoptotische Proteine zur Induktion einer erweiterten Zytokinproduktion, die in der Folge eine überschießende Inflammation auslöst. Ein derart ausgeprägter Befund an inflammatorischer Reaktion nach Virusinfektion wie in den von uns untersuchten TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen suggeriert, dass es in dieser Versuchstiergruppe zur Entstehung eines "Circulus vitiosus" gekommen ist.

Die heraufgesetzte Virusreplikation führte zur Erhöhung der Apoptose in Kardiomyozyten sowie in eingewanderten infiltrativen Immunzellen. Auf diesem Weg kam es zur vermehrten Freisetzung des Virus und zur Infektionsausweitung im betroffenen Herzgewebe.

Infolgedessen wurde die Expression von Zytokinen und Chemokinen gesteigert, was wiederum zum erneuten Einwandern infiltrativer Immunzellen ins Herz führte. Gerade die selbst infizierten Immunzellen aber tragen maßgebend zur Entstehung der extrem erhöhten Viruslast im Myokard bei; sie induzieren ebenfalls eine neuartige Vielfalt apoptotischer Vorgänge und fördern somit wiederum die globale Infektion kardialer Zellen.

## 5.5 Kardiale Viruslast und Funktion des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptors (CAR)

TRIF wurde bereits als gewichtiger Mediator in der antiviralen Wirtsabwehr gegenüber doppelsträngiger RNA und deren Analoga poly I:C identifiziert. Die antivirale Wirtsabwehr wurde sowohl im Fall der dsRNA als auch deren Analoga über den TLR3 vermittelt [182-183].

Diese Ergebnisse wurden durch unsere Untersuchungen bestätigt. Die markant erhöhte CVB3 mRNA-Expression und CVB3-Replikation in den Herzen der TRIF-defizienten Mäuse gingen nämlich mit einem deutlichen Verlust der kardialen Viruskontrolle einher.

Die Forschungsgruppe um Yamamoto untersuchte die Rolle von TRIF im MyD88-unabhängigen TLR-Signalweg und gelangte zu der Erkenntnis, dass TRIF essentielle Bedeutung für die TLR3- und TLR4-vermittelten Signalwege und unterstützend in der antiviralen Wirtsabwehr im Säugetier beizulegen ist.

Eine weitere Studie hat die Existenz eines bis dahin unbekanntes weiteren Adaptermoleküls, nämlich des "Toll-interleukin 1 receptor domain (TIR)-containing adaptor molecule" (TICAM-1), in der TLR3-vermittelten IFN- $\beta$  Produktion nachgewiesen und gleichzeitig dessen Bedeutung in anderen TLR-IFN- $\beta$  Signalkaskaden herausgestellt, die ihrerseits wiederum Teil der MyD88-unabhängigen und zellulären Immunantwort sind.

Mit einer ergänzenden Studie wurde eine signifikante Rolle des TLR4 als Induktor der CVB3-Replikation identifiziert [175].

In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen konnte verifiziert werden, dass MyD88-defiziente Mäuse, welche bis auf TLR3 über alle übrigen TLRs signalisiert werden, eine verbesserte Viruskontrolle, eine herabgesetzte chronische Zytokinaktivierung und schließlich eine gesteigerte Überlebensrate in einem unserer Studie ähnelnden CVB3-Myokarditismodell aufwiesen.

Mit einer weiteren Studie gelang es, einen signifikanten Anstieg der Genexpression vornehmlich für TLR7 und TLR8 in Myozyten nach CVB3-Infektion zu beschreiben. Nach den dort gewonnenen Erkenntnissen kann dem TLR7 und TLR8 eine regulative Funktion im angeborenen Immunsystem unter diesen Bedingungen zugeordnet werden [113].

In Ergänzung hierzu gibt unsere Studie Aufschluss darüber, dass TRIF ebenfalls die virale Infektion durch das einzelsträngige CVB3-Virus beeinflusst. Im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Studien, die davon ausgehen, dass das TLR-System die kardiale Viruskontrolle für CVB3 supprimiert, belegt die vorliegende Studie eine bisher nicht erkannte Relevanz des Adaptermoleküls TRIF. Diese neugeartete Relevanz besteht darin, dass TRIF nach den Ergebnissen unserer Studie auch kardioprotektive Wirkung entfaltet.

Die unsererseits gewonnenen Daten unterstützen die wissenschaftlich bereits gesicherte Evidenz, dass die Aktivierung des TRIF-Signalweges für eine suffiziente antivirale Immunabwehr gegen dieses Virus essentiell ist.

## 5.6 Kardiale Umbauprozesse ("Remodeling")

Es besteht eine gesicherte Evidenz hinsichtlich des linksventrikulären Remodelings dahin, dass das Remodeling eine Schädigung der kardialen EZM fördert und einen wichtigen pathogenen Faktor der LV-Dysfunktion im Krankheitsbild der viralen Myokarditis darstellt.

In den unserer Studie zugrunde liegenden Experimenten wurden deutlich erhöhte Expressionslevel kardialer Kollagene in CVB3-infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen gemessen.

Die gewonnenen Daten zeigen ein gesteigertes LV-Remodeling in TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen im Vergleich zu den WT-CVB3 Mäusen, welches anderweit sowohl bei herzinsuffizienten Patienten als auch bei Tieren gemessen wurde [158,188-189]. Darüber hinaus konnten wir durch die vorgelegte Studie belegen, dass das LV-Remodeling bei Abwesenheit von TRIF nach CVB3-Infektion maßgeblich erhöht ist.

Riad et al. zeigten schon, dass der TLR4 über die Modulation des linksventrikulären Remodelings die Überlebensrate nach einem Herzinfarkt im murinen Tiermodell signifikant beeinflusst. Danach profitieren TLR4-defiziente Mäuse nach Myokardinfarkt von einer verbesserten Überlebensrate sowie von geringeren Remodelingprozessen im Herzen [158].

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden überdies mehrfach erhöhte Proteinexpressionen der MMP2 und der MMP9 in TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen im Vergleich zu den infizierten WT-Mäusen über den Beobachtungszeitraum gemessen.

Einen wichtigen Signalweg hinsichtlich der Modulation der EZM stellt die Aktivierung der MMPs dar. *In vitro* Studien konnten bereits aufzeigen, dass oxidativer Stress und verändertes kardiales Anspannungsverhalten während der Herzaktion die Aktivierung von MMPs induzieren. Auch unsere zymographischen Ergebnisse verifizierten eine signifikante Aktivitätssteigerung der MMP2 in den infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu WT-CVB3 Mäusen sieben Tage nach CVB3-Infektion. Die MMP2 nimmt aktiv am Abbau der EZM teil und ist relevant in der Prozessierung des Remodelings verschiedenster Organe (Herz, Niere, Lunge, etc.) involviert.

Ferner modulieren die MMPs auch die Migration infiltrativer Immunzellen im Rahmen der Immunreaktion. Eine andere Funktion der MMPs liegt in der Spaltung verschiedenartiger Zytokine, Chemokine und Signalmoleküle. Durch eben diese Funktionen wirken die MMPs immunmodulatorisch auf die Matrix der EZM. Die Rolle der MMPs wurde bereits in unterschiedlichen Herzerkrankungen untersucht. Beim Myokardinfarkt ist vor allem die Expression von MMP2 und MMP9 im Herzgewebe erhöht, was wiederum zu einer gesteigerten Inflammation und zum EZM-Abbau führt [190].

Aus der von uns festgestellten deutlich angehobenen Aktivität der MMP2 in infizierten TRIF-defizienten Tieren schließen wir, dass diese Versuchstiergruppe ein markant erhöhtes kardiales Remodeling aufweist und es somit zur verstärkten Strukturschädigung der EZM in deren Herzen kommt.

Die gesteigerte myokardiale Fibrosierung der TRIF<sup>-/-</sup>CVB3 Mäuse war mit einer signifikant herabgesetzten LV-Funktion und einer Hochregulation der MMP2 und MMP9 auf Proteinebene nach CVB3-Infektion assoziiert. Die Ergebnisse der zymographischen Analysen in TRIF<sup>-/-</sup>CVB3 Mäusen mRNA-Ebene hinsichtlich der MMP2 und MMP9 zeigten – verglichen mit den WT-CVB3 Mäusen – sieben Tage nach CVB3-Infektion signifikante Unterschiedlichkeiten der Aktivität der MMP2, nicht jedoch der MMP9.

Dies scheint eine mögliche Erklärung für vermehrte Umbauprozesse der kardialen EZM und mit einer Diskrepanz der MMP2 und MMP9 auf mRNA- und Proteinebene zu sein. Hier soll indessen nicht unerwähnt bleiben, dass wir die CVB3-induzierte Myokarditis im murinen Modell in einem akuten Stadium untersucht haben.

Angesichts des begrenzten Untersuchungssegmentes müssen wir unsere Annahmen zwangsläufig mit einer Einschränkung versehen und mit Zurückhaltung bewerten. Denn es lässt sich zumindest nicht ausschließen, dass sich in der chronischen Phase der viralen Myokarditis im Herzen eine vermehrte Fibrose entwickelt, die meistens ca. 28 Tage nach Beginn der Infektion detektiert wird [27].

## 5.7 Mortalität

Um zu überprüfen, ob der Verlust der Viruskontrolle die kardiale Schädigung und die exazerbierte Zytokinaktivierung in Folge der TRIF-Defizienz eine initiale reversible Situation – wie vermehrt in klinischen Studien beobachtet – darstellt oder zumindest einen relevanten Einfluss auf die Langzeitprognose nach CVB3-Infektion besitzt, führten wir ergänzend eine Mortalitätsstudie durch [35,193].

Hierbei konnten wir verifizieren, dass die Defizienz des Adapterproteins TRIF über einen Beobachtungszeitraum von 70 Tagen zur Induktion einer 100%-igen Mortalität nach viraler Infektion führte.

Im Gegensatz hierzu war bei den WT-Mäusen keine Mortalität festzustellen. Dies belegt augenfällig die neu aufkommende Relevanz von TRIF in der Immunantwort nach CVB3-Infektion. Hinsichtlich der Immunantwort stellt die Genaktivierung der Interferone des Typ I wie IFN- $\beta$  nach Stimulation des TLR3 und TLR4 den bedeutsamen Effekt von TRIF dar [193].

Andere Arbeiten haben bereits eine gewichtige Bedeutung der Inflammation in der Pathogenese der inflammatorischen Kardiomyopathie und deren Verlauf aufgezeigt; überschießende und nicht-kontrollierte Immunreaktionen haben sich nach den dortigen Erkenntnissen als maßgebliche Ursache für die erwähnten schädlichen Folgen im Organismus identifizieren lassen [33,194-196]. Wir haben in unseren Experimentalreihen zu klären versucht, ob IFN- $\beta$  bedeutend in der TRIF-abhängigen antiviralen Immunantwort und der kardialen Protektion gegenüber des CVB3 involviert ist.

Zu diesem Zweck substituierten wir TRIF-defizienten Mäusen murines IFN- $\beta$  kontinuierlich innerhalb der virämischen Phase unseren Tiermodells [192]. Damit erhöhte sich die Überlebensrate der TRIF-defizienten Mäuse annäherungsweise auf 80% über den gesamten Beobachtungszeitraum. Die IFN- $\beta$  Behandlung führte zur Kompensation der TRIF-Defizienz nach CVB3-Infektion. Nach allem spricht das Ergebnis dieser Mortalitätsstudie dafür, dass die TRIF-abhängige IFN- $\beta$  Aktivierung Bestandteil eines relevanten protektiven Mechanismus in der CVB3-induzierten Myokarditis ist.

## 5.8 Methodenkritik

Um eine mögliche Relevanz von TRIF in der experimentellen CVB3-induzierten Myokarditis wissenschaftlich verifizieren zu können, verwendeten wir ein "knockout"-Mausmodell, in dem das spezifische Gen des Adaptermoleküls TRIF genetisch deletiert wurde.

Seitdem die Erstellung transgener Tiere genetisch ermöglicht wurde, wurde eine Vielzahl transgener Tiermodelle entwickelt. Anhand eben dieser transgenen Tiermodelle können verschiedenartige menschliche Erkrankungen simuliert werden, um neue pathophysiologische Erkenntnisse über die jeweilige Erkrankung zu gewinnen und bewährte Therapiestrategien sowie pharmakologische Interventionsmöglichkeiten zu überprüfen. Hierbei wird gezielt die Pathophysiologie bestimmter menschlicher Erkrankungen simuliert und im Idealfall die Ursache der menschlichen Erkrankung nachgebildet.

Als Beispiele für die Simulation von Krankheitszuständen sei – stellvertretend für eine Vielzahl anderer Modelle – das des arteriellen Hypertonus erwähnt. Durch Überexpression von Faktoren des Renin-Angiotensin-Systems wird ein Bluthochdruck *in vivo* simuliert [197].

Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurden darüber hinaus transgene Tiermodelle mit einer sogenannten "Schalter-Sequenz" generiert. Dabei kommt es unter Tetrazyklin-Gabe (z.B. Doxzyklin) vorübergehend zu einer induzierbaren Genausschaltung. Solche temporären transgenen Tiermodelle stellen für experimentelle Untersuchungen von Erkrankungen die optimale Forschungsgrundlage dar.

Die Maus hat sich als Versuchstier für experimentelle Tiermodelle ganz besonders bewährt. Gründe hierfür sind zunächst die geringen Anschaffungs- und Unterhaltungskosten der Tiere, ihre handliche Größe, die Haltung und Behandlung deutlich erleichtern, und im Besonderen die Möglichkeit der Generierung transgener Mäuse ermöglichen.

Zwar ist nicht zu verkennen, dass zwischen Mensch und Maus – wie sich etwa in der hohen Herzfrequenz von ca. 400-600 Schlägen pro Minute bei der Maus zeigt [198] – relevante physiologische und pathologische Unterschiede bestehen, doch weist die Herz- und Kreislaufphysiologie eine Vielzahl von Analogien zu derjenigen des Menschen auf.

In Anbetracht dessen lassen Experimente mit Mäusen valide Rückschlüsse auf humane Krankheitsbilder zu.

Eine Einschränkung hinsichtlich der wissenschaftlichen Verwertbarkeit der auf transgene Mäuse bezogenen Erkenntnisse muss dahin gesehen werden, dass bei Ausschaltung eines Genes direkte und indirekte Beeinflussungen auf den kardialen Phänotyp des Tieres unter Basalbedingungen nicht auszuschließen sind.

Spezies wie Hunde und Schweine sind zwar der humanen Physiologie näher verwandt; sie sind aber genetisch nur schwierig zu manipulieren, stehen mithin nur zu selten transgen verändert zur Verfügung und waren deshalb für unsere Experimente nicht hinreichend tauglich.

Was die Untersuchungsmethoden betrifft, so hat sich die hämodynamische Untersuchung der Herzfunktion mittels Konduktanzkatheter-Methode als eine exakte und anderen – wie etwa die der Echokardiographie – qualitativ nicht nachstehende Methode zur Bestimmung der Herzfunktion erwiesen und bewährt [34]. Die speziellen Vorteile der Konduktanzkatheter-Methode liegen in der gleichzeitigen Aufzeichnung von Druck und Volumen im Herzen und somit von Druck-Volumen-Kurven in Echtzeit. Mit ihrer Hilfe können vor- und nachlastunabhängige Daten zuverlässig erfasst werden.

Für die Anwendung der Methode ist allerdings eine Narkotisierung der Tiere indiziert. Die Mehrzahl der Betäubungsmittel, darunter auch das von uns eingesetzte Thiopental, weist indessen kardiodepressive Effekte auf, die – wie wir wissen – wiederum nach Mausstamm und Geschlecht variieren können [60]. In Anbetracht dessen wurde in unseren Experimenten explizit und gezielt Wert darauf gelegt, ein optimales Gleichgewicht zwischen ausreichender Narkotisierung und assoziierter Kardiodepression zu erzielen. Entsprechende Untersuchungen im Zusammenhang mit der experimentellen Anwendung der Konduktanzkatheter-Technik an vigilanten Mäusen wurden anderweit bereits wissenschaftlich protokolliert.

Diese Art der Katheterisierung an vigilanten Mäusen verfügt nach aktuellem Wissensstand über keine ausreichende Etablierung und unterliegt nicht zuletzt aus Gründen medizinischer Rücksichtnahme auf die Versuchstiere erheblichen Bedenken und hieraus sich ergebenden Einschränkungen [199]. Mit der Injektion des 10%-igen Kochsalzes in die *Vena jugularis* zur Bestimmung der Parallelkonduktanz geht eine weitere Limitation der Messung einher. Wie durch andere Experimente bereits belegt wurde, könnte das verabreichte Volumen und auch die Hypertonizität des Kochsalzes die linksventrikuläre Herzfunktion modulieren [171].

Im Gegensatz hierzu folgt die von uns angewandte Methode der theoretischen Grundannahme, dass die Injektion ohne Auswirkung auf die hämodynamische LV-Funktion bleibt.

Auch die molekularbiologischen Methoden unterliegen nicht unerheblichen Einschränkungen und haben dementsprechend nur begrenzte wissenschaftliche Aussagekraft.

Die unsererseits gefertigten immunhistochemischen Färbungen wurden mit Gefrierschnitten durchgeführt, die zuvor bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgekühlt wurden. Deshalb lässt sich die Möglichkeit einer Antigen-Veränderung nicht gänzlich ausschließen.

Da wir die weiteren molekularbiologischen Untersuchungen auch auf der mRNA-Ebene durchführten,



waren wir zudem in der Lage, die immunhistologisch quantifizierten Parameter und Ergebnisse auf anderweitige Analyseebenen zu transponieren.

Dabei haben wir uns der sogenannten TUNEL-Methode bedient. Diese Methode hat prinzipiell spezifische Bedeutung für die quantitative Bestimmung der Apoptoserate. DNA-Veränderungen nekrotischer Zellen, die denen der apoptotischen Zellen ähneln, können nicht immer zuverlässig erkannt werden und werden deshalb unter Umständen falsch positiv demarkiert [200].

In den diesseits durchgeführten Experimenten wurden verschiedenartige Genexpressionen unterschiedlicher Proteine mittels der RT-PCR untersucht. Die bestimmten mRNA-Konzentrationen geben in quantitativer Hinsicht Aufschluss über Proteinmengen im Herzgewebe. Die exakte Konzentration der Proteinmengen kann allerdings physiologisch durch ihre Modifikation oder ihren Abbau variieren, so dass die tatsächlichen Proteinmengen nicht immer in Übereinstimmung mit den gemessenen mRNA-Mengen stehen. Da diesen Aussagedefiziten letztlich aber nur periphere Bedeutung beizulegen ist, lassen sich sehr wohl aus der Untersuchung der Genexpressionen wichtige Informationen in Bezug auf regulatorische Mechanismen in Zelle und Herzgewebe ableiten.

Das hier zugrunde gelegte durch CVB3-induzierte Myokarditis-Modell ist wissenschaftlich hinreichend etabliert. Das Modell erzeugt über die artifiziell herbeigeführte CVB3-Infektion einen ähnlichen Zustand wie bei an Myokarditiden erkrankten Menschen, bei denen Coxsackieviren auch zu den erworbenen Verursachern einer viralen Myokarditis zählen.

Angesichts dessen kommt das angewandte Tiermodell einem optimalen Myokarditis-Modell nahe, weil eben die entwickelte Myokarditis dieselbe Ursache besitzt wie die Erkrankung beim Menschen. Ein weiterer Vorzug des Modells liegt in dem gut überschaubaren Zeitrahmen, in dem sich das Krankheitsbild der viralen Myokarditis entwickelt.

Um die aus dem Tierexperiment gewonnenen Ergebnisse kongruent, d. h. im Verhältnis 1:1, auf den Menschen verlässlich übertragen zu können, bedarf es allerdings noch weiterer Absicherungen auf dem Boden kontrollierter und human klinischer Studien. Ob und inwieweit Ursachen für die virale Myokarditis auch auf atomarer und molekularer Ebene zu suchen sind, ist bislang wissenschaftlich nicht erschöpfend ergründet.

## 6 Zusammenfassung

In der hier entstandenen Studie wird erstmals die Evidenz des Adaptermoleküls TRIF als ein essentieller kardioprotektiver Effektor des TLR-Systems in der CVB3-induzierten Myokarditis anhand eines experimentellen Mausmodells wissenschaftlich belegt. Zugleich wird eine neue Bedeutung des TLR-Systems für die virale Myokarditis sichtbar gemacht.

Im Rahmen der erforderlichen Experimente wurden TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse und WT-Mäuse verwendet und durch eine CVB3-Infektion dem gut etablierten experimentellen Mausmodell der viralen Myokarditis zugeführt.

Sieben Tage nach der CVB3-Infektion, in der virämischen Phase der Myokarditis, wurde die linksventrikuläre Pumpfunktion charakterisiert und das Herzgewebe mittels immunhistologischer und molekularbiologischer Verfahren tiefergehend untersucht. Im Anschluss hieran wurde das Überleben nach CVB3-Infektion und IFN- $\beta$  Substitution der unterschiedlichen Tiergruppen nähergehend beleuchtet. Von allen in die Studie eingegliederten Tieren wurde die Herzfunktion mittels der Konduktanz-Kathetertechnik bestimmt, und es wurde eine signifikant verschlechterte systolische und globale linksventrikuläre Pumpfunktion in der Tiergruppe der TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen im Vergleich zu den WT-CVB3 Mäusen festgestellt.

Die Ergebnisse der immunhistologischen und molekularbiologischen Untersuchungen ließen im Abgleich zu den WT-CVB3 Mäusen eine signifikant erhöhte kardiale Inflammation in den TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen erkennen.

Weiterhin wurde in der Gruppe der infizierten TRIF<sup>-/-</sup>-Mäuse ein erhöhter Gehalt infiltrativer Immunzellen (Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, zytotoxischen T-Zellen) im myokardialen Gewebe aufgefunden. Überdies war eine gesteigerte Expression pro-inflammatorischer Zytokine und auch erhöhte Expressionen der Zelladhäsionsmoleküle wie VCAM und ICAM nach CVB3-Infektion in TRIF<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen mit den WT-CVB3 Mäusen zu verifizieren.

Schließlich konnten eine erhöhte Viruslast, eine gleichbleibende spezifische Rezeptorfunktion und eine signifikant gesteigerte Apoptoseraten und in TRIF<sup>-/-</sup>-CVB3 Mäusen im Vergleich zu WT-CVB3 Mäusen nach CVB3-Infektion verzeichnet werden.

In summa lässt sich aus den von uns erhobenen Daten ableiten, dass eine TRIF-Defizienz zu einer deutlichen Exazerbation der viralen Myokarditis einschließlich des Verlust der kardialen Viruskontrolle einhergehend mit der Entwicklung einer LV-Dysfunktion und einer schwerwiegenden myokardialen Schädigung führt. Darüber hinaus führt eine TRIF-Defizienz zur erhöhten Induktion der Mortalitätsrate nach CVB3-Infektion, die maßgeblich durch eine insuffiziente kardiale IFN- $\beta$  Antwort induziert wurde.

Die vorliegende Studie analysiert und beschreibt – auf der Grundlage breit angelegter Untersuchungsreihen im Mausmodell – erstmalig und eingehend die Evidenz von TRIF als einen essentiellen kardioprotektiven TLR-Effektor im Krankheitsbild der viralen Myokarditis und indiziert eine neuartige Relevanz des TLR-Systems hinsichtlich dieser myokardialen Erkrankung.

## Literatur

- [1] Mattingly TW. Changing Concepts of Myocardial Diseases. JAMA 1965;191:33-7.
- [2] Wenger NK, W.H. Abelmann, and W.C. Roberts. Myocardial disease New York; 1982.
- [3] Aretz HT. Myocarditis: the Dallas criteria. Hum Pathol 1987;18:619-24.
- [4] Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. Am J Cardiovasc Pathol 1987;1:3-14.
- [5] Cooper J. Myocarditis: From Bench to Bedside. Humana Press, 1st Edition 2002.
- [6] 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;93:841-2.
- [7] 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;113:1807-16.
- [8] Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. Circulation 2006;113:876-90.
- [9] Maisch B, Portig I, Ristic A, et al. Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report. Herz 2000;25:200-9.
- [10] Gerok W. Innere Medizin. Schattauer: Stuttgart 10th Edition 2000.
- [11] Braunwald PLaE. Braunwald's heart disease : a textbook of cardiovascular medicine, 8th Edition. Saunders/Elsevier, Philadelphia; 2008.
- [12] Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. Heart 2006;92:316-20.
- [13] Saphir O. Myocarditis, a general overview, with an analysis of two hundred and forty cases. Arch Pathol Lab Med 1941;32: p. 1000-51.
- [14] Gore laOS. Myocarditis, a classification of 1402 cases. American Heart Journal 1947;34: p. 827-30.
- [15] Blankenhorn MA, Gall EA. Myocarditis and myocardosis; a clinicopathologic appraisal. Circulation 1956;13:217-23.

- 
- [16] 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;42:466-72.
- [17] 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;111:887-93.
- [18] Matsumori A. Hepatitis C virus infection and cardiomyopathies. *Circ Res* 2005;96:144-7.
- [19] Patane S, Marte F, Sturiale M, et al. Myocarditis and cardiomyopathy HIV associated. *Int J Cardiol* 2009.
- [20] Warren-Gash C, Smeeth L, Hayward AC. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2009;9:601-10.
- [21] Gifford R, Dalldorf G. The morbid anatomy of experimental Coxsackie virus infection. *Am J Pathol* 1951;27:1047-63.
- [22] Falke D. Picorna-Viren. In: Hahn H, Falke D, Klein P Edts.: *Medizinische Mikrobiologie*, 2nd Edition. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg; 1994.
- [23] Clements G. Characteristics of viruses inducing cardiac disease. In: Banatvala JE, ed. *Viral infections of the heart*. London: Edward Arnold; 1993.
- [24] Huber S. Experimental studies Part I: Animal models: immunological aspects. In: Banatvala JE, Ed. *Viral infections of the heart*. London: Edward Arnold; 1993.
- [25] Matsumori A. Animal models: pathological findings and therapeutic considerations. In: Banatvala JE, ed. *Viral infections of the heart*. London: Edward Arnold; 1993.
- [26] Matsumori A. Role of hepatitis C virus in cardiomyopathies. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006:99-120.
- [27] Esfandiarei M, McManus BM. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol* 2008;3:127-55.
- [28] S. Tracy MSO, and K. M. Drescher. *Group B Coxsackieviruses*. Springer, 1st Edition 2008.
- [29] Liu P, Fuse K, Chu G, et al. Recent insights into the role of host innate and acquired immunity responses. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006:123-39.
- [30] Mena I, Perry CM, Harkins S, et al. The role of B lymphocytes in coxsackievirus B3 infection. *Am J Pathol* 1999;155:1205-15.

- [31] Shi Y, Chen C, Lisewski U, et al. Cardiac deletion of the Coxsackievirus-adenovirus receptor abolishes Coxsackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1219-26.
- [32] Selinka HC, Wolde A, Pasch A, et al. Comparative analysis of two coxsackievirus B3 strains: putative influence of virus-receptor interactions on pathogenesis. *J Med Virol* 2002;67:224-33.
- [33] Esparza J, Kruse M, Lee J, et al. MMP-2 null mice exhibit an early onset and severe experimental autoimmune encephalomyelitis due to an increase in MMP-9 expression and activity. *FASEB J* 2004;18:1682-91.
- [34] Woodruff JF. Viral myocarditis. A review. *Am J Pathol* 1980;101:425-84.
- [35] Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics-2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;117:e25-146.
- [36] Kuhl U, Pauschinger M, Seeberg B, et al. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005;112:1965-70.
- [37] Felker GM, Thompson RE, Hare JM, et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000;342:1077-84.
- [38] Lieberman EB, Hutchins GM, Herskowitz A, et al. Clinicopathologic description of myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1991;18:1617-26.
- [39] Rose NR, Hill SL. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:S92-9.
- [40] Wilson FM, Miranda QR, Chason JL, et al. Residual pathologic changes following murine coxsackie A and B myocarditis. *Am J Pathol* 1969;55:253-65.
- [41] Badorff C, Berkely N, Mehrotra S, et al. Enteroviral protease 2A directly cleaves dystrophin and is inhibited by a dystrophin-based substrate analogue. *J Biol Chem* 2000;275:11191-7.
- [42] Wessely R, Henke A, Zell R, et al. Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytopathic effect in culture: an approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes. *Circulation* 1998;98:450-7.
- [43] Seko Y, Shinkai Y, Kawasaki A, et al. Expression of perforin in infiltrating cells in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *Circulation* 1991;84:788-95.
- [44] Feldman AM, McNamara D. Myocarditis. *N Engl J Med* 2000;343:1388-98.

- [45] Chow LH, Beisel KW, McManus BM. Enteroviral infection of mice with severe combined immunodeficiency. Evidence for direct viral pathogenesis of myocardial injury. *Lab Invest* 1992;66:24-31.
- [46] Herzum M, Ruppert V, Kuytz B, et al. Coxsackievirus B3 infection leads to cell death of cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:907-13.
- [47] McManus BM, Chow LH, Wilson JE, et al. Direct myocardial injury by enterovirus: a central role in the evolution of murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:159-69.
- [48] Melnick J. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Fields BN ed: *Virology*. Raven Press, New York, USA; 1990.
- [49] Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation* 1999;99:1091-100.
- [50] 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;183:105-8.
- [51] Seko Y, Tsuchimochi H, Nakamura T, et al. Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3. *Circ Res* 1990;67:360-7.
- [52] Huber SA, Polgar J, Schultheiss P, et al. Augmentation of pathogenesis of coxsackievirus B3 infections in mice by exogenous administration of interleukin-1 and interleukin-2. *J Virol* 1994;68:195-206.
- [53] Nakano A, Matsumori A, Kawamoto S, et al. Cytokine gene therapy for myocarditis by in vivo electroporation. *Hum Gene Ther* 2001;12:1289-97.
- [54] Neumann DA, Lane JR, Allen GS, et al. Viral myocarditis leading to cardiomyopathy: do cytokines contribute to pathogenesis? *Clin Immunol Immunopathol* 1993;68:181-90.
- [55] Snicks JV. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990;8:253-78.
- [56] Kanda T, McManus JE, Nagai R, et al. Modification of viral myocarditis in mice by interleukin-6. *Circ Res* 1996;78:848-56.
- [57] 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;33:1627-35.
- [58] Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, et al. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992;257:387-9.

- [59] Suthanthiran M LB, Song JO, Ding R, et al. Transforming growth factor-beta 1 hyperexpression in African-American hypertensives: A novel mediator of hypertension and/or target organ damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(7):3479-84.
- [60] Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, et al. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:1435-40.
- [61] Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:221-33.
- [62] Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A, et al. Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *J Am Coll Cardiol* 1986;7:868-72.
- [63] 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;128:455-63.
- [64] Matsumori A. Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cardiomyopathy-role of viruses, cytokines, and nitric oxide. *Jpn Circ J* 1997;61:275-91.
- [65] 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;66:355-60.
- [66] Klingel K HC, Canu A, Albrecht M, 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;89:314-8.
- [67] Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, et al. From infection to autoimmunity. *J Autoimmun* 2001;16:175-86.
- [68] 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;86:1605-14.
- [69] Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM. Differential effects of myocarditic variants of Coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage. *Lab Invest* 1991;64:55-64.
- [70] 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;62:149-58.
- [71] Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 2005;125:629-37.

- [72] Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*;327:291-5.
- [73] Cho CT, Feng KK, McCarthy VP, et al. Role of antiviral antibodies in resistance against coxsackievirus B3 infection: interaction between preexisting antibodies and an interferon inducer. *Infect Immun* 1982;37:720-7.
- [74] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819-26.
- [75] Lundegaard C, Lund O, Kesmir C, et al. Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations. *Bioinformatics* 2007;23:3265-75.
- [76] Anderson DR, Wilson JE, Carthy CM, et al. Direct interactions of coxsackievirus B3 with immune cells in the splenic compartment of mice susceptible or resistant to myocarditis. *J Virol* 1996;70:4632-45.
- [77] Sato S, Tsutsumi R, Burke A, et al. Persistence of replicating coxsackievirus B3 in the athymic murine heart is associated with development of myocarditic lesions. *J Gen Virol* 1994;75 (Pt. 11):2911-24.
- [78] Opavsky MA, Penninger J, Aitken K, et al. Susceptibility to myocarditis is dependent on the response of alphabeta T lymphocytes to coxsackieviral infection. *Circ Res* 1999;85:551-8.
- [79] Huber SA. Coxsackievirus-induced myocarditis is dependent on distinct immunopathogenic responses in different strains of mice. *Lab Invest* 1997;76:691-701.
- [80] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007;7:353-64.
- [81] Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007;19:24-32.
- [82] Janeway C. *Immunobiology*: Garland Science; June 2004.
- [83] Akira S. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;311:1-16.
- [84] Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985;42:791-8.
- [85] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.
- [86] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.



- [87] Rock FL, Hardiman G, Timans JC, et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:588-93.
- [88] Choe J, Kelker MS, Wilson IA. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* 2005;309:581-5.
- [89] Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003;2003:re3.
- [90] Watters TM, Kenny EF, O'Neill LA. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol* 2007;85:411-9.
- [91] Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* 2004;76:514-9.
- [92] Beutler B, Hoebe K, Du X, et al. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 2003;74:479-85.
- [93] Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002;168:554-61.
- [94] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol* 2007;Chapter 14:Unit 14 2.
- [95] O'Neill LA. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity* 2008;29:12-20.
- [96] Tulic MK, Hurrelbrink RJ, Prele CM, et al. TLR4 polymorphisms mediate impaired responses to respiratory syncytial virus and lipopolysaccharide. *J Immunol* 2007;179:132-40.
- [97] Datta A, Sinha-Datta U, Dhillon NK, et al. The HTLV-I p30 interferes with TLR4 signaling and modulates the release of pro- and anti-inflammatory cytokines from human macrophages. *J Biol Chem* 2006;281:23414-24.
- [98] Murawski MR, Bowen GN, Cerny AM, et al. Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2. *J Virol* 2009;83:1492-500.
- [99] Holm CK, Petersen CC, Hvid M, et al. TLR3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid induces IL-17A and IL-21 synthesis in human Th cells. *J Immunol* 2009;183:4422-31.
- [100] Adams M, Navabi H, Jasani B, et al. Dendritic cell (DC) based therapy for cervical cancer: use of DC pulsed with tumour lysate and matured with a novel synthetic clinically non-toxic double stranded RNA analogue poly [I]:poly [C(12)U] (Ampligen R). *Vaccine* 2003;21:787-90.
- [101] Gregoire M, Ligeza-Poisson C, Juge-Morineau N, et al. Anti-cancer therapy using dendritic cells and apoptotic tumour cells: pre-clinical data in human mesothelioma and acute myeloid leukaemia. *Vaccine* 2003;21:791-4.

- [102] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004;16:3-9.
- [103] Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, et al. TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis. *J Immunol* 2004;173:5901-7.
- [104] Hosoi T, Suzuki S, Nomura J, et al. Bacterial DNA induced iNOS expression through MyD88-p38 MAP kinase in mouse primary cultured glial cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;124:159-64.
- [105] Lowenstein CJ, Hill SL, Lafond-Walker A, et al. Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis. *J Clin Invest* 1996;97:1837-43
- [106] Horng T, Barton GM, Flavell RA, et al. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002;420:329-33.
- [107] O'Neill LA. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol* 2004;25:687-93.
- [108] Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv* 2003;3:466-77.
- [109] Fuse K, Chan G, Liu Y, et al. Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of Coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences type I interferon production. *Circulation* 2005;112:2276-85.
- [110] Cabral CM, Choudhury P, Liu Y, et al. Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways. *J Biol Chem* 2000;275:25015-22.
- [111] Lutton CW, Gauntt CJ. Ameliorating effect of IFN-beta and anti-IFN-beta on coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *J Interferon Res* 1985;5:137-46.
- [112] Gauntt CJ, Godeny EK, Lutton CW, et al. Role of natural killer cells in experimental murine myocarditis. *Springer Semin Immunopathol* 1989;11:51-9.
- [113] Triantafilou K, Orthopoulos G, Vakakis E, et al. Human cardiac inflammatory responses triggered by Coxsackie B viruses are mainly Toll-like receptor (TLR) 8-dependent. *Cell Microbiol* 2005;7:1117-26.
- [114] Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Viruses as adjuvants for autoimmunity: evidence from Coxsackievirus-induced myocarditis. *Rev Med Virol* 2005;15:17-27.
- [115] Mueller T, Terada T, Rosenberg IM, et al. Th2 cytokines down-regulate TLR expression and function in human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2006;176:5805-14.

- [116] Huber SA, Mortensen A, Moulton G. Modulation of cytokine expression by CD4+ T cells during coxsackievirus B3 infections of BALB/c mice initiated by cells expressing the gamma delta + T-cell receptor. *J Virol* 1996;70:3039-44.
- [117] Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* 2005;7:12-9.
- [118] Kawai T, Adachi O, Ogawa T, et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999;11:115-22.
- [119] Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, et al. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 2000;12:113-7.
- [120] Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002;169:10-4.
- [121] Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, et al. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 2000;192:595-600.
- [122] Schnare M, Holt AC, Takeda K, et al. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 2000;10:1139-42.
- [123] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002;3:196-200.
- [124] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-103.
- [125] Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, et al. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 2002;17:251-63.
- [126] Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, et al. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 2002;3:392-8.
- [127] Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, et al. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 2002;14:1225-31.
- [128] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-8.
- [129] Weaver BK, Kumar KP, Reich NC. Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Mol Cell Biol* 1998;18:1359-68.

- [130] Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, et al. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* 1998;17:1087-95.
- [131] Sato M, Suemori H, Hata N, et al. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 2000;13:539-48.
- [132] Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, et al. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003;300:1148-51.
- [133] Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4:491-6.
- [134] Conzelmann KK. Transcriptional activation of alpha/beta interferon genes: interference by nonsegmented negative-strand RNA viruses. *J Virol* 2005;79:5241-8.
- [135] Oritani K, Kanakura Y. IFN-zeta/ limitin: a member of type I IFN with mild lymphomyelosuppression. *J Cell Mol Med* 2005;9:244-54.
- [136] Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004;202:8-32.
- [137] Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, et al. Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 1998;8:77-87.
- [138] Saura M, Zaragoza C, McMillan A, et al. An antiviral mechanism of nitric oxide: inhibition of a viral protease. *Immunity* 1999;10:21-8.
- [139] Zaragoza C, Ocampo CJ, Saura M, et al. Nitric oxide inhibition of coxsackievirus replication in vitro. *J Clin Invest* 1997;100:1760-7.
- [140] Zaragoza C, Ocampo C, Saura M, et al. The role of inducible nitric oxide synthase in the host response to Coxsackievirus myocarditis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2469-74.
- [141] Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2001;2:1144-50.
- [142] Asselin-Paturel C, Brizard G, Chemin K, et al. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med* 2005;201:1157-67.
- [143] Li H, Gade P, Xiao W, Kalvakolanu DV. The interferon signaling network and transcription factor C/EBP-beta. *Cell Mol Immunol* 2007;4:407-18.
- [144] Deonarain R, Cerullo D, Fuse K, et al. Protective role for interferon-beta in coxsackievirus B3 infection. *Circulation* 2004;110:3540-3.

- [145] Matsumori A, Tomioka N, Kawai C. Protective effect of recombinant alpha interferon on coxsackievirus B3 myocarditis in mice. *Am Heart J* 1988;115:1229-32.
- [146] Coles B, Fielding CA, Rose-John S, et al. Classic interleukin-6 receptor signaling and interleukin-6 trans-signaling differentially control angiotensin II-dependent hypertension, cardiac signal transducer and activator of transcription-3 activation, and vascular hypertrophy in vivo. *Am J Pathol* 2007;171:315-25.
- [147] Sriramula S, Haque M, Majid DS, et al. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in angiotensin II-mediated effects on salt appetite, hypertension, and cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2008;51:1345-51.
- [148] Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* 2007;87:1285-342.
- [149] Fratzl P. Collagen: Structure and Mechanics; May 2008.
- [150] Woodiwiss AJ, Tsoetsi OJ, Sprott S, et al. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation* 2001;103:155-60.
- [151] Diwan A, Dibbs Z, Nemoto S, et al. Targeted overexpression of noncleavable and secreted forms of tumor necrosis factor provokes disparate cardiac phenotypes. *Circulation* 2004;109:262-8.
- [152] 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;9:21-31.
- [153] Spotnitz MD, Lesch M. Idiopathic dilated cardiomyopathy as a late complication of healed viral (Coxsackie B virus) myocarditis: historical analysis, review of the literature, and a postulated unifying hypothesis. *Prog Cardiovasc Dis* 2006;49:42-57.
- [154] Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, et al. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail* 2002;4:411-7.
- [155] Kallwellis-Opara A, Dorner A, Poller WC, et al. Autoimmunological features in inflammatory cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol* 2007;96:469-80.
- [156] Hsu SM. Phenotypic expression of cells of stationary elements in human lymphoid tissues. A histochemical and immunohistochemical study. *Hematol Pathol* 1987;1:45-56.
- [157] Fritz P, Muller J, Wegner G, et al. Immunohistochemistry: theoretical potentials and practical application. *Zentralbl Allg Pathol* 1985;130:187-203.

- [158] Riad A, Jager S, Sobirey M, et al. Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *J Immunol* 2008;180:6954-61.
- [159] Riad A, Bien S, Gratz M, et al. Toll-like receptor-4 deficiency attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Eur J Heart Fail* 2008;10:233-43.
- [160] Frisancho-Kiss S, Davis SE, Nyland JF, et al. Cutting edge: cross-regulation by TLR4 and T cell Ig mucin-3 determines sex differences in inflammatory heart disease. *J Immunol* 2007;178:6710-4.
- [161] Stapel H, Kim SC, Osterkamp S, et al. Toll-like receptor 4 modulates myocardial ischaemia-reperfusion injury: Role of matrix metalloproteinases. *Eur J Heart Fail* 2006;8:665-72.
- [162] Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001;167:2887-94.
- [163] Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* 2008;102:257-64.
- [164] Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, et al. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2003;108:2905-10.
- [165] Sakata Y, Dong JW, Vallejo JG, et al. Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H503-9.
- [166] Nozaki N, Shishido T, Takeishi Y, et al. Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice. *Circulation* 2004;110:2869-74.
- [167] Hua F, Ha T, Ma J, et al. Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *J Immunol* 2007;178:7317-24.
- [168] Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, et al. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res* 2008;78:26-35.
- [169] Klingel K, Rieger P, Mall G, et al. Visualization of enteroviral replication in myocardial tissue by ultrastructural in situ hybridization: identification of target cells and cytopathic effects. *Lab Invest* 1998;78:1227-37.
- [170] Tschope C, Westermann D, Steendijk P, et al. Hemodynamic characterization of left ventricular function in experimental coxsackieviral myocarditis: effects of carvedilol and metoprolol. *Eur J Pharmacol* 2004;491:173-9.

- [171] Nishio R, Sasayama S, Matsumori A. Left ventricular pressure-volume relationship in a murine model of congestive heart failure due to acute viral myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1506-14.
- [172] Chen D, Assad-Kottner C, Orrego C, et al. Cytokines and acute heart failure. *Crit Care Med* 2008;36:S9-16.
- [173] Muller-Brunotte R, Kahan T, Lopez B, et al. Myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in patients with hypertension: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA). *J Hypertens* 2007;25:1958-66.
- [174] Villarreal F. *Interstitial Fibrosis in Heart Failure*: Springer-Verlag, 1st Edition; 2004.
- [175] Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA, et al. IL-12 protects against coxsackievirus B3-induced myocarditis by increasing IFN-gamma and macrophage and neutrophil populations in the heart. *J Immunol* 2005;174:261-9.
- [176] Liu P, Aitken K, Kong YY, et al. The tyrosine kinase p56lck is essential in coxsackievirus B3-mediated heart disease. *Nat Med* 2000;6:429-34.
- [177] Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, et al. Immune modulation: role of the inflammatory cytokine cascade in the failing human heart. *Curr Heart Fail Rep* 2008;5:69-74.
- [178] De Kleijn D, Pasterkamp G. Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003;60:58-67.
- [179] Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214:149-60.
- [180] Monson NL. The natural history of B cells. *Curr Opin Neurol* 2008;21 Suppl 1:S3-8.
- [181] Moroz A, Eppolito C, Li Q, et al. IL-21 enhances and sustains CD8+ T cell responses to achieve durable tumor immunity: comparative evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *J Immunol* 2004;173:900-9.
- [182] Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, et al. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003;4:161-7.
- [183] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301:640-3.
- [184] Afanasyeva M, Georgakopoulos D, Belardi DF, et al. Impaired up-regulation of CD25 on CD4+ T cells in IFN-gamma knockout mice is associated with progression of myocarditis to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:180-5.
- [185] Saraste A, Arola A, Vuorinen T, et al. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2003;12:255-62

- [186] Teodoro JG, Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 1997;71:1739-46.
- [187] Huber SA. T cells expressing the gamma delta T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2000;45:579-87.
- [188] Westermann D, Mersmann J, Melchior A, et al. Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2008;117:1269-76.
- [189] Deschamps AM, Apple KA, Leonardi AH, et al. Myocardial interstitial matrix metalloproteinase activity is altered by mechanical changes in LV load: interaction with the angiotensin type 1 receptor. *Circ Res* 2005;96:1110-8.
- [190] Tao ZY, Cavasin MA, Yang F, et al. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci* 2004;74:1561-72.
- [191] S. Tracy MSO, and K. M. Drescher. *Group B Coxsackieviruses*, Springer, 1st Edition; 2008.
- [192] Pummerer CL, Grassl G, Sailer M, et al. Cardiac myosin-induced myocarditis: target recognition by autoreactive T cells requires prior activation of cardiac interstitial cells. *Lab Invest* 1996;74:845-52.
- [193] Heymans S, Pauschinger M, De Palma A, et al. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator or matrix metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis. *Circulation* 2006;114:565-73.
- [194] Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, et al. The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis. *J Immunol* 2002;169:2643-7.
- [195] Garg P, Rojas M, Ravi A, et al. Selective ablation of matrix metalloproteinase-2 exacerbates experimental colitis: contrasting role of gelatinases in the pathogenesis of colitis. *J Immunol* 2006;177:4103-12.
- [196] Matsusaka H, Ikeuchi M, Matsushima S, et al. Selective disruption of MMP-2 gene exacerbates myocardial inflammation and dysfunction in mice with cytokine-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H1858-64.
- [197] Lavoie JL, Lake-Bruse KD, Sigmund CD. Increased blood pressure in transgenic mice expressing both human renin and angiotensinogen in the renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F965-71.
- [198] Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D. Murine cardiac function: a cautionary tail. *Circ Res* 1998;82:519-22.



- [199] Joho S, Ishizaka S, Sievers R, et al. Left ventricular pressure-volume relationship in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H369-77.
- [200] Watanabe M, Hitomi M, van der Wee K, et al. The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. *Microsc Microanal* 2002;8:375-91.

---

## Abbildungsverzeichnis

1	Struktureller Aufbau der TLRs . . . . .	12
2	Schematische Abbildung zu "TIR domain-containing" - Adaptermolekülen und zum TLR-Signaling . . . . .	14
3	Schematische Abbildung zum TRIF-abhängigen TLR-Signaling . . . . .	16
4	Druck- und Volumenkurven der gesunden Maus in Echtzeit . . . . .	29
5	Druck-Volumen-Kurven der Maus bei Vorlastreduktion . . . . .	31
6	Erhöhung des Konduktanzsignals bei Bolusgabe in der Maus . . . . .	32
7	Extensionsphase bei der TaqMan <sup>®</sup> -PCR . . . . .	36
8	Bestimmung der Genexpression mittels TaqMan <sup>®</sup> -PCR . . . . .	38
9	Zeitlicher Ablauf des Plaque Assay . . . . .	40
10	Schematische Darstellung der Verdünnungsreihen des Plaque Assay . . . . .	41
11	Schematische Darstellung der ABC-Methode . . . . .	44
12	Schematische Darstellung der EnVision <sup>®</sup> -Detektionsmethode . . . . .	46
13	Schematische Darstellung der indirekten Methode . . . . .	47
14	Herz- und Körpergewichte sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	65
15	Mortalitätsstudie . . . . .	66
16	Histologische Bilder der Hämalaun-Eosin-Färbung sieben Tage nach CVB3-Infektion	67
17	Myokarditis Klassifikation sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	67
18	Kardiale Immunzellinfiltration sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	68
19	Immunhistologische Bilder der CD3 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	69
20	Immunhistologische Bilder der CD68 <sup>+</sup> -Makrophagen und CD80 <sup>+</sup> -aktivierte B-Zellen sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	70
21	Kardiale Zytokinexpression sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	72
22	Kardiale Zelladhäsionsprozesse sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	73
23	Immunhistologische Bilder für VCAM und ICAM sieben Tage nach CVB3-Infektion	74
24	Kardiale Viruslast und Funktion des CAR sieben Tage nach CVB3-Infektion . . .	75
25	Kardiale Apoptose sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	76
26	Kardiales Remodeling hinsichtlich des Kollagenproteingehalts sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	77
27	Kardiales Remodeling hinsichtlich der MMPs und ihrer Aktivität sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	78
28	Kardiales Remodeling hinsichtlich der zymographischen Ergebnisse der MMPs sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	79
29	Immunhistologische Bilder für Kollagen I und Kollagen III sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	80
30	IFN- $\beta$ vermittelte Immunantwort nach CVB3-Infektion . . . . .	81

31	CVB3-und TNF- $\alpha$ mRNA-Expression sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	81
32	Substitutionsbehandlung mittels murinen IFN- $\beta$ nach CVB3-Infektion . . . . .	82

---

## Tabellenverzeichnis

1	Übersicht exogener TLR-Liganden . . . . .	11
2	Studiendesign der verwendeten Tiere . . . . .	24
3	Verwendete Primer der Genexpressionsuntersuchungen . . . . .	39
4	Bestimmung von CVB3-RNA-Kopien mittels TaqMan <sup>®</sup> -PCR . . . . .	40
5	Verwendete Antikörper der immunhistochemischen Untersuchungen . . . . .	43
6	Verwendete Verbrauchsmaterialien . . . . .	55
7	Verwendete Laborgeräte . . . . .	56
8	Verwendete Puffer und Chemikalien . . . . .	58
9	Hämodynamische Parameter sieben Tage nach CVB3-Infektion . . . . .	64

## Danksagung

Zu allererst bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Carsten Tschöpe für seine umfängliche und nachhaltige Betreuung meiner Arbeit. Seine stete Ansprechbarkeit und seine Hilfsbereitschaft bei der Lösung komplizierter Fragen trugen entscheidend zum Gelingen der Studie bei.

Des Weiteren schulde ich Dank Herrn Prof. Dr. med. Heinz-Peter Schultheiss für seine kompetente Unterstützung und die Möglichkeit experimenteller Forschung im molekularbiologischen Labor der Medizinischen Klinik II mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie und Pulmologie der Charité – Universitätsmedizin, Campus Benjamin Franklin.

Zu ganz persönlichem Dank bin ich Herrn Dr. med. Alexander Riad verpflichtet, der mich in meiner Arbeit mit viel Geduld und hoher sachlicher Kompetenz begleitet und mir in allen theoretischen und experimentellen Problemen helfend zur Seite gestanden hat. Ohne sein stetiges Motivieren und seine fortwährende Hilfsbereitschaft wäre die Studie in Art und Umfang nicht umsetzbar gewesen.

Zum anderen darf ich mich bei Herrn Dr. med. Dirk Westermann bedanken, der mich ebenfalls mit motivierender Anteilnahme und einer Vielzahl wertvoller Ratschläge in meiner Arbeit unterstützt hat.

Überdies möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre im Experimentallabor bei den dortigen Mitarbeitern bedanken. Frau Kerstin Puhl, Herr Georg Zingler, Herr Mathias Pippow, Frau Christin Zietsch, Frau Alice Weithäuser und Frau Dr. Diana Lindner haben mich mit sachlich anregender Diskussion und von Geduld geprägter Hilfsbereitschaft in angenehmer Weise unterstützt; ein großer Dank geht an Herrn Dr. med. Kostas Savvatis für die großartige Zusammenarbeit im Rahmen der tierexperimentellen Studien. Sie alle haben mir Anregungen und Ideen gegeben, die Eingang in meine wissenschaftliche Arbeit gefunden haben.

Ein liebender Dank gebührt meiner Freundin Sina Bauer für ihre Mühen beim Korrekturlesen und ihre sonstige unermüdliche Unterstützung.

Dank auch an meinen Freund Marko Natho, der mir in bemerkenswerter Weise insbesondere beim „Layout“ der Arbeit zur Seite gestanden hat.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mich immer und in allen Lagen unterstützt haben. Ohne sie wäre weder mein Medizinstudium noch diese Dissertation möglich gewesen.

## Selbstständigkeitserklärung

Ich, Peter Moritz Becher, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel: „Die Bedeutung des TIR-domain-containing adaptor protein inducing Interferon- $\beta$  (TRIF) bei der viralen Myokarditis im murinen Modell“ 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.

Peter Moritz Becher

Berlin, Mai 2011

## **Lebenslauf**

**Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht angezeigt.**

## Publikationsliste

**“Ivabradine attenuates Angiotensin II-mediated cardiac dysfunction, inflammation and cardiac remodeling”**

Becher PM, Westermann D, Savvatis K, Lindner D, Schultheiss HP, Tschöpe C.

Eingereicht – peer reviewed Journal (Mai 2011)

**“Decreased cytokine activation caused by a loss of Toll-like receptor 2 contributes to decreased virus load and improved left ventricular function in coxsackievirus B3-induced myocarditis”**

Riad A, Becher PM, Savvatis K, Heimesaat MM, Bereswill S, Schultheiss HP, Tschöpe C.

Beide als Erstautoren gleichberechtigt

Eingereicht – peer reviewed Journal (April 2011)

**“Small Animal Look-Locker Inversion recovery (SALLI) for simultaneous generation of cardiac T1 maps, cine, and IR-prepared images at high heart rates: Initial experience”**

Messroghli DR, Nordmeyer S, Buehrer M, Dietrich T, Kaschina E, Becher PM, Hucko M, Berger F, Klein C, Kühne T.

Im Druck – Radiology (Mai 2011; Impact factor 6.4)

**“Mesenchymal stem cells ameliorate coxsackievirus B3-induced myocarditis involving upregulation of regulatory T cells”**

Savvatis K, van Linthout S, Miteva K, Westermann D, Schefold JC, Fusch G, Weithäuser A, Kang YM, Becher PM, Kurtz A, Schultheiss HP, Tschöpe C.

Eingereicht – peer reviewed Journal (April 2011)

**“Reduced degradation of the chemokine MCP-3 by matrix metalloproteinase-2 exacerbates myocardial inflammation in experimental viral cardiomyopathy”**

Westermann D, Savvatis K, Lindner D, Zietsch C, Becher PM, Heimesaat MM, Bereswill S, Plendl J, Klingel K, Poller W, Schultheiss HP, Tschöpe C.

Im Druck – Circulation (Mai 2011; Impact factor 14.6)

**“MMP9 activation in viral myocarditis is regulated by the TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$  (TRIF) during cardiac fibrosis“**

Riad A, Zietsch C, Becher PM, Savvatis K, Bereswill S, Schultheiss HP, Tschöpe C.

Eingereicht – peer reviewed Journal (April 2011)



**“TRIF is a critical survival factor in viral cardiomyopathy”**

Riad A, Westermann D, Zietsch C, Savvatis K, Becher PM, Bereswill S, Heimesaat MM, Lettau O, Lassner D, Dörner A, Poller W, Busch M, Felix SB, Schultheiss HP, Tschöpe C.

Januar 2011

Journal Immunology (Impact factor 6.7)

**“Myeloid differentiation factor-88 contributes to TLR9-mediated modulation of acute coxsackievirus B3-induced myocarditis in vivo”**

Riad A, Westermann D, Escher F, Becher PM, Savvatis K, Lettau O, Heimesaat MM, Bereswill S, Volk HD, Schultheiss HP, Tschöpe C.

Juni 2010

Am J Physiol Heart Circ Physiol. (Impact factor 3.1)

**“Pre-treatment with statin attenuates the cardiotoxicity of doxorubicin in mice”**

Riad A, Bien S, Westermann D, Becher PM, Landmesser U, Schultheiss HP, Tschöpe C.

November 2008

Cancer Research (Impact factor 7.7)

**“Renin inhibition improves cardiac function and remodeling after myocardial infarction independent of blood pressure”**

Westermann D, Riad A, Lettau O, Roks A, Savvatis K, Becher PM, Escher F, Danser J, Schultheiss HP, Tschöpe C.

Oktober 2008

Hypertension (Impact factor 7.2)

**“Enhancement of endothelial nitric oxide synthase production reverses vascular dysfunction and inflammation in the hindlimbs of a rat model of diabetes”**

Riad A, Westermann D, Linthout SV, Mohr Z, Uyulmaz S, Becher PM, Rütten H, Wohlfart P, Peters H, Schultheiss HP, Tschöpe C.

September 2008

Diabetologia (Impact factor 5.8)

## Wissenschaftliche Auszeichnungen

Auszeichnung mit dem **“Young Investigator Award”** der Deutschen Hochdruckliga im Rahmen des 34. Jahreskongresses in Berlin (Dezember 2010)

Auszeichnung mit dem **“Young Investigator Award”** der Deutschen Hochdruckliga im Rahmen des 33. Jahreskongresses in Lübeck (November 2009)

## Wissenschaftliche Vorträge und Präsentationen

**“Novel Insights into the Mechanisms Mediating Myocardial Inflammation and Cardiac Remodeling of the Extracellular Matrix During Experimental Coxsackievirus B3 (CVB3)-induced Myocarditis: The Role of Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) Regarding to Monocyte Chemotactic Protein 3 (MCP-3)”**

Becher PM, Westermann D, Savvatis K, Zietsch C, Schultheiss HP, Tschöpe C.

Jahreskongress „Hypertonie 2010“ der Deutschen Hochdruckliga in Berlin - Dezember 2010

**“Matrix metalloproteinase 2 reduces myocardial inflammation and attenuates cardiac dysfunction during experimental coxsackievirus B3-induced myocarditis in the mouse through modulation of the immune response”**

Becher PM, Savvatis K, Riad A, Westermann D, Schultheiss HP, Tschöpe C.

14. Jahreskongress der European Council for Cardiovascular Research in Nizza, Frankreich - Oktober 2009

**“Toll-like receptor 4 overexpression leads to increased cardiac susceptibility to angiotensin II by early increased cytokine activation”**

Becher PM, Riad A, Westermann D, Lettau O, Savvatis K, Bereswill S, Heimesaat M, Poller W, Schultheiss HP, Tschöpe C.

14. Jahreskongress der European Council for Cardiovascular Research in Nizza, Frankreich - Oktober 2009

**“Toll-like receptor 4 overexpression leads to increased cardiac susceptibility to angiotensin II by early increased cytokine activation”**

Riad A, Westermann D, Becher PM, Lettau O, Savvatis K, Bereswill S, Heimesaat M, Poller W, Schultheiss HP, Tschöpe C.

75. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim - April 2009

**“The role of TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- beta (TRIF) in Coxsackievirus-B3-induced myocarditis in mice”**

Becher PM, Riad A, Lettau O, Lassner D, Bereswill S, Heimesaat MM, Westermann D, Schultheiss HP, Tschöpe C.

Kongress “Hypertension 2008” der Europäischen Gesellschaft für Hypertonie, der Internationalen Gesellschaft für Hypertonie und der Deutschen Hochdruckliga