

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

DISSERTATION

**Interaktion zwischen myokardialer Inflammation, Expression von
matrixaktiven Substanzen, oxidativem Stress und kardialem Renin-
Angiotensin-Aldosteron-System am Modell der murinen Myokarditis**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leonid Ladyshenskij

aus Kirowograd

Gutachter/in: 1.: Prof. Dr. med. M. Pauschinger

2.: Prof. Dr. med. J. M. Albes

3.: Prof. Dr. med. G. Linß

Datum der Promotion: 03. September 2010

Gewidmet meinen Eltern,
Anna und Igor
Ladyshenskij

"Fakten findet man immer genügend – manchmal fehlt es an Fantasie."

D. I. Blochintzev

(Principles of Quantum Mechanics, 1956)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Prognose der Myokarditis	1
1.2 Zielsetzung der experimentellen Arbeit	2
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Kardiomyopathien und Myokarditis	4
2.1.1 Kardiomyopathien	4
2.1.2 Dilatative Kardiomyopathie und inflammatorische Kardiomyopathie	5
2.1.3 Myokarditis	6
2.2 Coxsackievirus	8
2.3 Pathogenese der viralen Myokarditis	9
2.3.1 Pathomechanismen der Virusmyokarditis	9
2.3.2 Verlauf der experimentellen viralen Myokarditis im Mausmodell	12
2.3.2.1 Akute Phase der viralen Myokarditis (0. – 3. Tag p.i.)	13
2.3.2.2 Subakute Phase der viralen Myokarditis (4. – 14. Tag p.i.)	13
2.3.2.3 Chronische Phase der viralen Myokarditis (ab 15. Tag p.i.)	15
2.3.3 Die Rolle der spezifischen Immunantwort bei der viralen Myokarditis	16
2.3.3.1 T _{H1} - und T _{H2} -Immunantwort	17
2.3.3.2 Einfluss der T _H -Immunantwort auf den Verlauf der Myokarditis	19
2.4 Zytokine und matrixaktive Substanzen	19
2.4.1 Bedeutung der Zytokine bei viraler Myokarditis	19
2.4.2 Interferon-gamma (IFN- γ)	20
2.4.3 Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 (TGF- β_1)	21
2.4.4 Interleukin 6 (IL-6)	22
2.4.5 Interleukin 10 (IL-10)	23
2.4.6 Zellkernfaktor kappa B (NF- κ B)	24
2.5 Die myokardiale extrazelluläre Matrix (ECM)	25
2.5.1 Bestandteile und Funktionen der ECM	25
2.5.2 Myokardiales Remodeling	25
2.5.3 Matrixmetalloproteinasen (MMP's)	26
2.5.4 Regulation des myokardialen Remodelings	27
2.6 Oxidativer Stress	30
2.6.1 Freie Radikale	30
2.6.2 Sauerstoffradikale und Oxidativer Stress bei viraler Myokarditis	31
2.6.3 Nitritoxidradikal (NO [*])	32

2.6.4	NADPH-Oxidase (Nox)	33
2.6.5	Antioxidatives System	35
2.6.6	Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD)	36
2.7	Myokardiales Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	37
2.7.1	Systemisches und lokales RAAS	37
2.7.2	Angiotensinogen	40
2.7.3	Angiotensin II und seine Rezeptoren	40
2.7.3.1	AT ₁ -Rezeptor	41
2.7.3.2	AT ₂ -Rezeptor	43
2.7.4	Kardialer Mineralkortikoid-Rezeptor und Aldosteron	44
3	Material und Methoden	45
3.1	Mausmodell	45
3.1.1	CVB-3-Virus	45
3.1.2	Versuchstiere	45
3.1.3	Gruppeneinteilung und Versuchsablauf	45
3.1.4	Hämodynamische Messungen	46
3.1.5	Gewebeentnahme	46
3.2	RNA-Präparation	47
3.2.1	RNA-Extraktion mittels TRIZOL [®]	47
3.2.2	DNase-Verdau	47
3.2.3	cDNA-Synthese	48
3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	48
3.3.1	Prinzip der PCR	48
3.3.2	Primer für den Nachweis des enteroviralen Genoms	49
3.3.3	Primer für die semiquantitative RT-PCR	49
3.3.4	Optimierung der PCR-Bedingungen	50
3.3.5	Nachweis enteroviraler RNA mit RT-PCR und nested-RT-PCR	52
3.3.6	Semiquantitative RT-PCR	53
3.4	Agarose-Gelelektrophorese	53
3.5	Statistische Auswertung	54
3.5.1	Stichproben	54
3.5.2	Hypothesen	55
3.5.3	Irrtumswahrscheinlichkeit und Signifikanz	55
3.5.4	Statistische Tests	56
3.5.4.1	Mann-Whitney-U-Test	56
3.5.4.2	Kruskal-Wallis-H-Test	57

3.5.4.3	Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson	57
3.5.5	Merkmalcharakterisierung	58
3.5.6	Graphische Auswertung	59
3.5.6.1	Box-and-Whisker-Plot	59
3.5.6.2	Histogramm / Häufigkeitspolygon	60
3.5.6.3	Streudiagramm (Scatterplot)	60
3.6	Verwendete Arbeitsmittel	61
3.6.1	Laborgeräte	61
3.6.2	Verbrauchsmaterialien	61
3.6.3	Puffer und Chemikalien	62
3.6.4	Software	62
3.7	Tierversuchsantrag	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Krankheitssymptomatik	63
4.2	Mortalität	63
4.3	Körper- und Herzgewichte der Versuchstiere	63
4.4	Hämodynamik	65
4.4.1	Linksventrikulärer endsystolischer Druck (LVsP)	65
4.4.2	Linksventrikuläre Auswurffraktion (EF, ejection fraction)	66
4.4.3	Endsystolisches Volumen (ESV)	67
4.4.4	Enddiastolisches Volumen (EDV)	68
4.4.5	Schlagvolumen (SV)	69
4.5	Nachweis enteroviraler RNA	69
4.6	Veränderungen der mRNA-Expression	70
4.6.1	Semiquantitative RT-PCR	70
4.6.1.1	IL-6	70
4.6.1.2	IL-10	71
4.6.1.3	INF- γ	72
4.6.1.4	TGF- β_1	73
4.6.1.5	p47phox	74
4.6.1.6	p67phox	75
4.6.1.7	gp91Phox	75
4.6.1.8	MnSOD	76
4.6.1.9	Angiotensinogen	77
4.6.1.10	AT _{1A} -Rezeptor	78
4.6.1.11	AT _{1B} -Rezeptor	79

4.6.1.12	AT ₂ -Rezeptor	80
4.6.2	Pearson-Korrelation	81
5	Diskussion	83
5.1	Klinische Erscheinung und Mortalität	84
5.2	Körper- und Herzgewichte	84
5.3	Hämodynamik	85
5.3.1	Linksventrikulärer systolischer Druck (LVsP)	86
5.3.2	Ventrikuläres enddiastolisches Volumen (EDV) und endsystolisches Volumen (ESV)	87
5.3.3	Schlagvolumen (SV) und Auswurfraction (EF)	88
5.3.4	Erfassung des hämodynamischen Wandels im Verlauf der CVB-3-Myokarditis	89
5.4	Virale Persistenz	91
5.5	mRNA-Expression von Zytokinen und matrixaktiven Substanzen im Verlauf der viralen Myokarditis	92
5.5.1	Regulation von IFN- γ im Verlauf der viralen Myokarditis	92
5.5.2	Regulation von IL-10 im Verlauf der viralen Myokarditis	94
5.5.3	Regulation von IL-6 im Verlauf der viralen Myokarditis	96
5.5.4	Regulation von TGF- β_1 im Verlauf der viralen Myokarditis	98
5.5.5	T _H -Regulation im Verlauf der viralen Myokarditis	99
5.6	Oxidativer Stress bei viraler Myokarditis	101
5.6.1	Regulation der NADPH-Oxidase im Verlauf der viralen Myokarditis	101
5.6.2	Regulation von MnSOD im Verlauf der viralen Myokarditis	104
5.7	Rolle des kardialen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in der viralen Myokarditis	107
5.7.1	Regulation von Angiotensinogen im Verlauf der viralen Myokarditis	107
5.7.2	Expression des Ang-II-AT ₁ -Rezeptors im Verlauf der viralen Myokarditis	108
5.7.3	Expression des Ang-II-AT ₂ -Rezeptors im Verlauf der viralen Myokarditis	111
5.7.4	Optionen zur Beeinflussung des kardialen RAAS in der viralen Myokarditis	113
5.8	Quintessenz	114
6	Zusammenfassung	116
7	Abkürzungsverzeichnis und chemische Substanzen	118
8	Lebenslauf	121
9	Selbständigkeitserklärung	123
10	Danksagung	124
11	Literaturquellen	125

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Prognose der Myokarditis

Bei der Myokarditis handelt es sich um einen entzündlichen Herzmuskelprozess, welchem unterschiedlichste Ursachen, Verläufe und Prognosen zugrunde liegen. Durch die starken Variationen in der Symptomausprägung und Intensität ist die Häufigkeit der Erkrankung schwer zu beurteilen. Die virusinduzierten Formen der Myokarditis machen den Hauptanteil der entzündlichen Herzmuskelerkrankungen aus¹. Nach den Schätzungen der World Health Organisation (WHO) liegt bei systemischen Virusinfekten in ca. 1% der Fälle eine kardiale Mitbeteiligung vor. Bei ausgesprochen kardiotropen Viren (z.B. Coxsackievirus B) werden 4% angenommen². Die genaue Datenlage bleibt aber weitgehend unbekannt, weil nichtinvasive Methoden zur Diagnosesicherung fehlen. Klinischen Recherchen zufolge leiden ca. 10% aller Patienten mit unklarer Kardiopathie an einer Myokarditis³, wobei die Zahl der stationär diagnostizierten Myokarditiden in den letzten Jahren deutlich zunahm⁴.

Neben asymptomatischen Verläufen und Chronifizierung kann eine Myokarditis auch fulminant ablaufen und zum plötzlichen Herztod führen. Dies ist zwar für die Gesamtheit der Erkrankung nicht repräsentativ, stellt jedoch eine klinisch wichtige Verlaufsform dar. Größere Statistiken zeigen in ca. 17 – 19% aller plötzlichen Herztodesfälle entzündliche Myokardveränderungen und verdeutlichen damit die Bedeutung der Myokarditis unter den letalen Kardiopathien¹. Das Krankheitsbild der Myokarditis kann in allen Altersgruppen vorkommen. Auch bei Kindern, die einen plötzlichen Herztod erlitten, wurde in 16 – 21% der Fälle eine Myokarditis autoptisch gesichert⁵. Im Myocarditis-Treatment-Trial starben 56% von 214 Patienten mit klinischer Herzinsuffizienz und einer histologisch verifizierten Myokarditis nach vier Jahren Beobachtungszeitraum oder wurden einer Herztransplantation unterzogen⁶. Bei der seltenen idiopathischen Giant-cell-Myokarditis steigt die Mortalitätsrate sogar auf 89% nach einem halben Jahr, unabhängig von einer eventuell durchgeführten immunsuppressiven Therapie⁷.

In den überwiegenden Fällen heilt eine unkomplizierte Myokarditis ab. Es kann allerdings auch zu einer viralen, bzw. entzündlichen Persistenz kommen, welche zu einer erst nach Jahren manifest werdenden dilatativen Kardiomyopathie (DCM) oder inflammatorischen Kardiomyopathie (InfCM) führt. Nach verschiedenen Quellen ist dies in 6 bis 21% der Fälle^{1,8}. Da die Todesfälle auf die Manifestation einer DCM und den plötzlichen Herztod zurückzuführen sind, weist die Myokarditis mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 45% eine ernste Prognose auf⁹.

Aus den Untersuchungsergebnissen der letzten Jahre konnte neben der Bedeutung der Coxsackieviren als ätiologischer Faktor eine Beeinflussung und Regulation der Myokarditis-

Pathogenese durch multiple Faktoren sowie kardiale und extrakardiale Systeme geschlossen werden. So sollen Zytokine und Wachstumsfaktoren, aber auch lokale Prozesse wie oxidativer Stress und kardiales Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) am pathologischen Prozess beteiligt sein. Weder die einzelnen Einflussgrößen noch die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Systemen sind bislang ausreichend geklärt. Auch angesichts der vielen widersprüchlichen Studienergebnisse ist eine weitergehende Klärung der pathogenetischen Mechanismen des hochkomplexen Krankheitsbildes – Myokarditis – erforderlich.

1.2 Zielsetzung der experimentellen Arbeit

Die Untersuchung der viralen Myokarditis beim Menschen ist bei der niedrigen Inzidenz der Erkrankung und der häufig unspezifischen Klinik problematisch. Aus diesem Grund wurde die Dynamik des Entzündungsgeschehens bei Coxsackievirus-B3-(CVB-3)-induzierter Myokarditis in SWR/J-Mäusen untersucht. Durch eine experimentelle CVB-3-Infektion entwickelt dieser Mausstamm eine Myokarditis mit progredienter linksventrikulärer Dysfunktion¹⁰. Durch die Verwendung von Inzuchtstämmen handelt es sich bei den SWR/J-Mäusen um genetisch identische Studienobjekte, wodurch sich die Ergebnisse gut vergleichen und statistisch auswerten lassen. In dieser Arbeit wurde die CVB-3-induzierte Myokarditis auf Expression inflammatorischer Zytokine, matrixaktiver Mediatoren, Entwicklung des oxidativen Stresses und Funktion des kardialen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in der akuten, subakuten und chronischen Erkrankungsphase untersucht. Dabei wurde versucht, folgende Aspekte in Erfahrung zu bringen:

1	<ul style="list-style-type: none">• Veränderungen in der mRNA-Expression inflammatorischer Zytokine und matrixaktiver Substanzen (IL-6, IL-10, IFN-γ, TGF-β_1) in der akuten, subakuten und chronischen Phase der CVB-3-Myokarditis• Charakterisierung des Zytokin-Profiles für eines der T_H-Antworten, für die Entwicklung des oxidativen Stresses und für die Dynamik im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System• Assoziation der Expressionsveränderungen mit der jeweiligen kardialen Situation
2	<ul style="list-style-type: none">• Expression der einzelnen Subunits der NADPH-Oxidase (p47phox, p67phox, gp91phox) während der drei ausgewählten Myokarditis-Stadien• An- / Abwesenheit von Anzeichen eines kardialen oxidativen Stresses• Verhalten des lokalen antioxidativen Systems, vertreten durch MnSOD, in den einzelnen Myokarditis-Stadien

3	<ul style="list-style-type: none">• Expressionsveränderung der einzelnen Komponenten des kardialen RAAS (Angiotensinogen, AT_{1A}-Rezeptor, AT_{1B}-Rezeptor, AT₂-Rezeptor) während verschiedener Myokarditis-Stadien• Verhältnisse der Expressionsintensität der Rezeptoren-Subtypen zueinander, Prüfung gegenseitiger Beeinflussung (Agonismus / Antagonismus)• Schlussfolgerung einer bestimmten Funktion der einzelnen Rezeptoren in der viralen Myokarditis aus den eventuell entstandenen Unterschieden in der mRNA-Expression
4	<ul style="list-style-type: none">• Korrelationen zwischen den einzelnen Systemen während des Erkrankungsverlaufs• Zusammenhänge zwischen den Zytokin-Expressionen und den Expressionen der einzelnen Komponenten des oxidativen Stresses und des RAAS• Gegenüberstellung der eruierten Zusammenhänge mit der kardialen Dysfunktion des jeweiligen Myokarditis-Stadiums

Die Zielstellung dieser Arbeit ist es, einerseits die relevanten pathogenetischen und prognostischen Faktoren bei der viralen CVB-3-induzierten Myokarditis zu identifizieren, um daraus Ansätze für kausale Therapieverfahren ableiten zu können, und andererseits eine Basis für neue experimentelle Anstöße zur tiefgreifenden Erforschung der Myokarditis-Pathogenese zu bilden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Kardiomyopathien und Myokarditis

2.1.1 Kardiomyopathien

Entsprechend den Kriterien der American Heart Association (AHA) von 2006 definiert man Kardiomyopathien als heterogene Erkrankungen des Myokards, welche mit mechanischer und / oder elektrischer Dysfunktion assoziiert sind. Dabei gehen Kardiomyopathien meist mit einer inadäquaten ventrikulären Hypertrophie oder Dilatation einher¹¹.

Gemäß der aktuellen AHA-Klassifikation werden primäre von sekundären Kardiomyopathien unterschieden, wobei die primären Typen in genetisch bedingte, gemischte und erworbene Kardiomyopathien unterteilt werden. Sekundäre Kardiomyopathien entstehen demnach auf dem Boden einer extrakardialen Systemerkrankung¹¹.

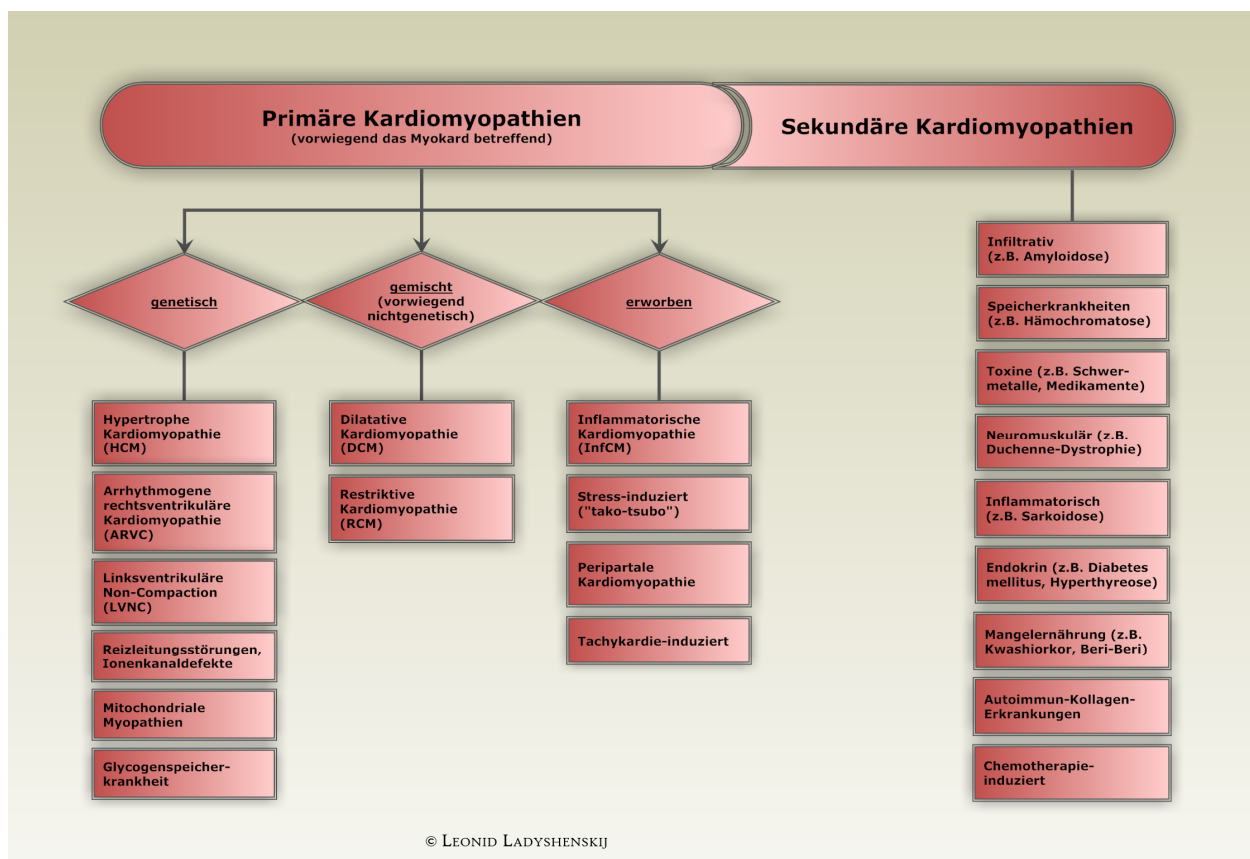


Abb. 2.1 Klassifikation der Kardiomyopathien (AHA 2006)¹¹

2.1.2 Dilatative Kardiomyopathie und inflammatorische Kardiomyopathie

Die DCM ist die häufigste Form der Kardiomyopathien. Sie ist als kardiale Dilatation mit gestörter Kontraktilität des linken oder beider Ventrikel, hervorgerufen durch virale, immunologische oder toxische Agenzien, idiopathische Faktoren oder genetische Prädisposition, definiert^{11,12}. Die DCM präsentiert sich meist mit progressivem Herzversagen, Arrhythmien und Thromboembolien. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 58%, was auf die Progression zur terminalen Herzinsuffizienz und den gehäuft auftretenden plötzlichen Herztod zurückzuführen ist¹³.

Bei einem großen Anteil der Endomyokardbiopsien (ca. 50%) von DCM-Patienten konnte eine virusassoziierte chronische Entzündung nachgewiesen werden^{14,15,16}. In der Kardiomyopathien-Klassifikation der WHO und der International Society and Federation of Cardiology Task Force (ISFC) von 1995 findet sich für dieses Krankheitsbild der Begriff der entzündlichen (inflammatorischen) Kardiomyopathie als Äquivalent einer chronischen Myokarditis mit Zeichen der myokardialen Dysfunktion¹². Sowohl die Viruspersistenz als auch die chronische Entzündung sind bei DCM-Patienten mit einer entscheidend schlechteren Prognose assoziiert^{17,18,19}.

Die Einteilung der inflammatorischen Kardiomyopathien erfolgt auf ätiologischer Basis: man unterscheidet idiopathische, autoimmune und infektiöse Formen. Bei infektiösen Kardiomyopathien wird die chronisch-entzündliche Reaktion des Myokards durch eine Erregerpersistenz im Myokard, bei autoimmunen Kardiomyopathien durch überschießende Autoimmunmechanismen ungeachtet einer Elimination des Erregers aus dem Myokard aufrechterhalten^{20,21,22}. Abhängig vom jeweiligen Pathomechanismus lassen sich bei Patienten mit dem klinischen Bild einer dilatativen Kardiomyopathie anhand von immunhistologischen und molekularbiologischen Verlaufuntersuchungen vier verschiedene Krankheitsentitäten unterscheiden (Tab. 2.1)²³.

	Histologie	Immunhistologie	Molekularbiologie
Postmyokarditische Herzmuskelerkrankung	Bild einer DCM	kein chronisch-entzündlicher Prozess	keine Viruspersistenz
Chronisch-virale Herzmuskelerkrankung	Bild einer DCM	kein chronisch-entzündlicher Prozess	Viruspersistenz
Entzündliche Kardiomyopathie (chronisch-persistierende Virusmyokarditis)	Bild einer DCM	aktiv entzündlicher Prozess, autoimmunologischer Prozess	Viruspersistenz
Entzündliche Kardiomyopathie (chronisch-autoimmunologische Myokarditis)	Bild einer DCM	aktiv entzündlicher Prozess, autoimmunologischer Prozess	Keine Viruspersistenz

Tab. 2.1 Einteilung der dilatativen Kardiomyopathien anhand histologischer, immunhistologischer und molekularbiologischer Analysen²³

2.1.3 Myokarditis

Die Myokarditis ist definiert als eine entzündliche Erkrankung des Myokards bzw. des Kardiomyozyten und zählt in Verbindung mit kardialer Dysfunktion zu den inflammatorischen Kardiomyopathien^{11,12}. 1806 wurde das Krankheitsbild erstmals durch Corvisart²⁴ beschrieben. Der Begriff „Myokarditis“ wurde 1837 durch Sobernheim²⁵ eingeführt. Abramov (1897) und Fiedler (1900) beschrieben erstmals die schweren idiopathischen Myokardschäden.

Mit der Einführung der Myokardbiopsie zur Diagnose der Myokarditis entstand 1984 die Dallas-Klassifikation der Myokarditis, basierend auf histopathologischen Kriterien. Hier wurde die Myokarditis als entzündliches Infiltrat mit angrenzender Myokardnekrose und interstitiellem Ödem definiert²⁶. 1991 hat Liebermann den Begriff Myokarditis nach klinisch-pathologischen Kriterien neu konkretisiert²⁷. Seine Betrachtungen waren auf Faktoren wie das Vorhandensein von Prodromalsymptomen, plötzlicher oder schleichender Beginn der Krankheit, der Nachweis oder das Fehlen einer ventrikulären Funktionsstörung sowie der histologische Befund gerichtet. Basierend auf diesen Kriterien wird schließlich ein akuter, subakuter und chronischer Verlauf der Myokarditis beschrieben.

Die Virusätiologie der Myokarditis war lange Zeit umstritten, da es mit den üblichen Nachweismethoden der Virusisolation nicht gelang, einen positiven Virusnachweis zu erbringen. Der spezifische Nachweis des viralen Genoms in Myokardbiopsien ist erst durch die Einführung molekularbiologischer Techniken, wie der In-situ-Hybridisierung^{28,29}, Filterhybridisierung³⁰ und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)^{31,32,33} möglich geworden.

In 50% der Fälle wird die Myokarditis-Ätiologie als idiopathisch eingestuft. Neben zahlreicher klar identifizierbarer infektiöser und nicht-infektiöser Agenzien (Pilze, Bakterien, Parasiten, Allergene, Systemerkrankungen, Medikamente, Chemikalien, physikalische Noxen)¹¹ werden in Europa und den USA in der Mehrheit der Fälle (in ca. 50%) Enteroviren^{34,35} und Adenoviren^{32,36} für die Myokarditis verantwortlich gemacht. Darüber hinaus werden nach neueren Studien weitere Viren, wie humanes Herpesvirus Typ 6, Epstein-Barr-Virus und Parvovirus B19 zu den epidemiologisch relevanten kardiotropen Viren gezählt^{32,37,38,39,40}. Bei ca. 20% der Myokarditis-Patienten sind Mehrfachinfektionen mit diversen Viren nachweisbar.

Klinisch kann es vor allem bei Frühgeborenen und bei Kindern durch Coxsackieviren zu akuten Myokarditis-Verlaufsformen kommen, bei denen die linksventrikuläre Herzfunktionsbeeinträchtigung im Vordergrund steht. Bei Erwachsenen dagegen verläuft eine Vielzahl viraler Myokarditiden inapparent, oder es überwiegen die begleitenden Virusmanifestationen. Die symptomatischen Formen können sehr vielgestaltig sein: im Vordergrund stehen generelle Abgeschlagen-

heit, Pleurodynie, Myalgien, unspezifische Entzündungsreaktionen im oberen Respirationstrakt und Gliederschmerzen⁴¹. Schwerere Verlaufsformen manifestieren sich in 10 – 30% als akuter Thoraxschmerz, in 5 – 15% als Rhythmusstörungen, in 60 – 70% als Herzinsuffizienz oder in 5 – 10% als kardiogener Schock⁴² (Abb. 2.2). Die chronische Myokarditis äußert sich oft als akute oder langsam progrediente Herzinsuffizienz und kann in das Endstadium, in die post-inflammatorische dilatative Kardiomyopathie übergehen^{43,44}.

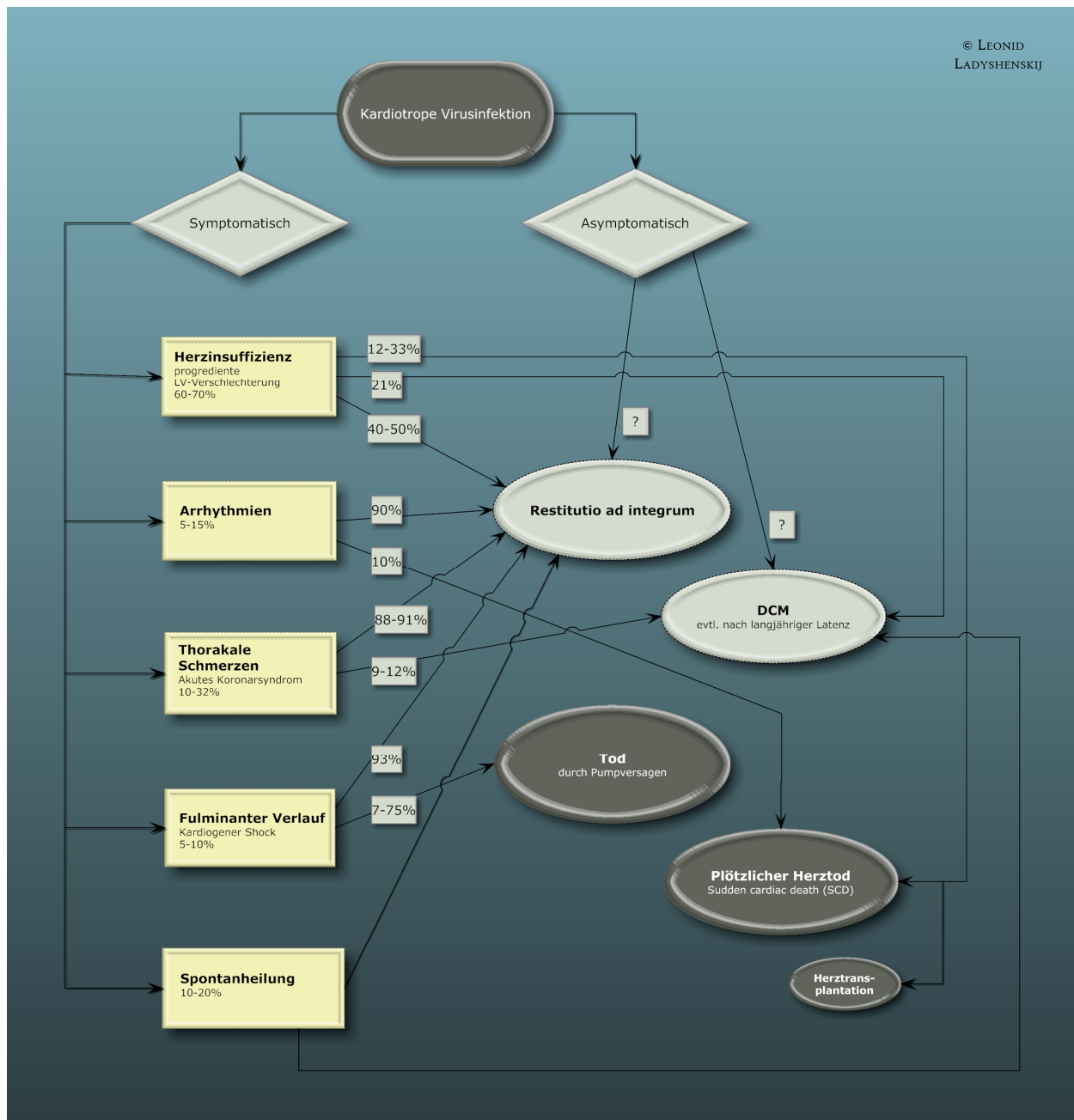


Abb. 2.2 Klinische Präsentation und möglicher Verlauf der akuten Myokarditis (modifiziert nach Naegeli et al.)⁴⁵

2.2 Coxsackievirus

Der Name des Virus geht auf einen Städtenamen in den USA zurück, wo 1948 die Erstisolierung gelang. 1956 wurde zum ersten Mal der CVB-3 in einer Myokarditis nachgewiesen⁴⁶. Der Coxsackievirus mit den beiden Stämmen A (CVA) und B (CVB) gehört der Gattung *Enterovirus* und der Familie *Picornaviridae* an. Enteroviren, insbesondere Coxsackieviren der Gruppe B wurden mit gesicherter Ätiopathogenese als kardiotope Erreger im menschlichen Herzen identifiziert^{30,33,47,48}.

Die Unterteilung in die Untergruppen A (24 Serotypen) und B (6 Serotypen) beruht auf dem unterschiedlichen Schädigungsmuster in der Babymaus⁴⁹. Viren der Untergruppe A erzeugen bei der Babymaus eine diffuse Myositis, die der Untergruppe B bewirken dagegen eine herdförmige Myositis, oft kombiniert mit zahlreichen anderen Organläsionen (Enzephalomyelitis, Pankreatitis, Endokarditis und Myokarditis). Der natürliche Wirt ist nur der Mensch, experimentell infizierbar sind aber auch Mäuse^{50,51}, Hamster⁵², Ratten⁵³ und Schimpansen⁵⁴. Die Übertragung erfolgt per Tröpfchen-, Kontakt- oder Schmierinfektion. Enteroviren sind säurestabil und können daher die Verdauungswege als Eintrittspforte benutzen. Sie residieren im retikuloendothelialen System (insbesondere in B-Lymphozyten und Makrophagen) im Sinne eines extrakardialen Reservoirs¹⁰ und vermehren sich hier, ohne dass klinische Symptome in Erscheinung treten. Nachdem jedoch eine hämatogene Generalisierung und Ansiedelung in sekundären Organen stattgefunden hat, entstehen spezifische Organschäden und Krankheitsbilder. Die Infiltration des Myokards erfolgt durch spezifische Interaktion des Virus mit dem Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) der Kardiomyozyten^{55,56} und mit dem Decay accelerating factor (DAF), welcher die Komplement-Aktivierung unterdrückt⁵⁷.

Beim Coxsackievirus handelt es sich um einen kleinen, ca. 28 – 30 nm durchmessenden unbehüllten Einzel(+)-Strang-RNA-Virus ((+)ssRNA). Umgeben vom ikosaederförmigen Kapsid ist die (+)-Strang-RNA etwa 7500 bp lang. An ihrem 5'-Ende befindet sich eine nicht-kodierende Region, am 3'-Ende – eine kodierende Region, gefolgt von einer Poly-Adenosin-Sequenz. Am 5'-Ende der (+)- und (–)-RNA-Stränge sitzt jeweils ein kovalent gebundenes VPg-Protein, das als Primer für die Replikation erforderlich ist^{58,59}. Vier Strukturproteine (VP1 – VP4) bilden zusammen mit zwei Proteinasen (2A und 3C), dem VPg (3B) und der viralen Polymerase (3D) das virale Kapsid^{60,61}. VP1 – VP3 bestimmen die Ausbildung der Virusgestalt, VP4 wird zur Stabilisation des Kapsids und der Interaktion zwischen Kapsid und Virusgenom benötigt^{49,62}.

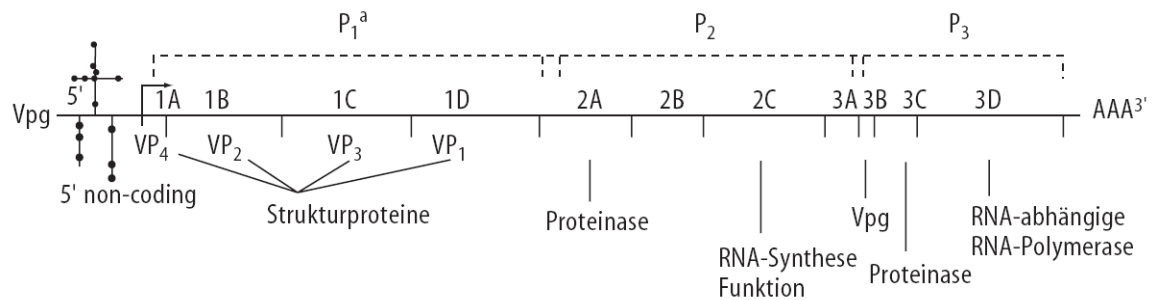
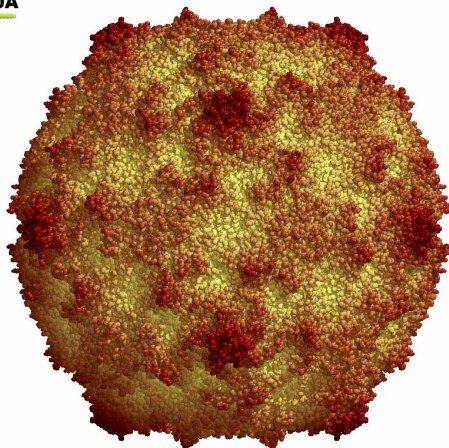


Abb. 2.3 Schematische Darstellung des enteroviralen Genoms (aus Kandolf 1998)⁶¹

Dem VP1-Protein wird eine wichtige Rolle bei der Adsorption des Virus an die Zielzelle zugeschrieben. Diese erfolgt über den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor und ermöglicht die Endozytose des Virus. Nach der Penetration des Virus in die Wirtszelle wird die virale Nukleinsäure aus der Capsidhülle freigesetzt (Uncoating) und in die (+)-Strang-RNA überführt. Diese wird als Vorlage für die Transkription und anschließende Translation verwendet.

20A



Es kommt zur Virusproteinsynthese und Replikation neuer viraler RNA, während die zelleigene RNA-Synthese inhibiert wird. Im Rahmen des Processings entstehen unter dem Einfluss viraler Proteasen individuelle strukturelle und nicht-strukturelle Proteine. Die Synthese zelleigener Proteine wird ebenfalls gehemmt⁶¹. Die gleichen Proteasen sorgen durch Modifikation der Zellmembran und Änderung der Membranpermeabilität für die Freisetzung der Virionen aus der Wirtszelle.

Abb. 2.4 Falschfarbendarstellung des Humanen Coxsackievirus B3 (aus Muckelbauer et al. 1995)⁶³

2.3 Pathogenese der viralen Myokarditis

2.3.1 Pathomechanismen der Virusmyokarditis

Die molekularen Mechanismen der viralen Infektion und Persistenz in der myokardialen Matrix sind nicht detailliert geklärt. Die umfangreichsten Erkenntnisse liegen in Bezug auf Coxsackieviren vor. Es bleibt unklar, ob der Pathomechanismus des Coxsackievirus auf andere kardiotope (Entero-)Viren übertragbar ist. Dagegen spricht z.B. das grundsätzlich unterschiedliche Infektionsmuster von Parvovirus B19 mit Befall von Endothelzellen im Gegensatz zu der Kardiomyozyten-Infektion durch Coxsackieviren^{64,65}.

Der Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) wird auf adulten Kardiomyozyten unter physiologischen Bedingungen nicht exprimiert. Die Expression von CAR bei 63% der DCM-Herzen könnte einerseits für die spezifische Affinität von Coxsackieviren zu den Kardiomyozyten^{66,67}, andererseits auch für Co-Infektionen mit den nicht-verwandten Viren verantwortlich sein^{37,67}. Die Mechanismen der CAR-Induktion bei DCM sind nicht vollständig geklärt, aber immunkompetente Mediatoren wie Zytokine sowie spezifische zelluläre Interaktionen sind mit großer Wahrscheinlichkeit daran beteiligt^{68,69}. Mutationen des CAR-Gens sind bei DCM-Patienten nicht nachweisbar⁷⁰, so dass die Anfälligkeit von Myokarditis-Patienten für eine Infektion mit Coxsackieviren am ehesten auf einer Regulation der CAR-Expression beruht.

Die vaskuläre CAR-Expression ist auf die subendothelialen glatten Gefäßmuskelzellen beschränkt, hingegen weisen die Endothelzellen selbst keine CAR-Expression auf. Die Interaktion mit den endothelialen Zelladhäsionsmolekülen (CAM's) ist für die Überwindung dieser „Endothel-Barriere“ verantwortlich, so dass die Migration von infizierten Immunzellen in das Myokard ermöglicht wird. Die CAM's-Expression auf dem aktivierten Endothel korreliert signifikant mit der zellulären Infiltration bei InfCM⁷¹. Die deutliche Assoziation zwischen der CAM's-Expression und der endothelialen Dysfunktion lässt die Annahme zu, dass Endothelien bei Myokarditis- und DCM-Patienten systemisch beeinträchtigt sind, möglicherweise durch zirkulierende immunkompetente Mediatoren (Zytokine)⁷².

Im Myokard können Viren nicht nur latent persistieren, sondern sich auch replizieren³⁵ und, eine CAR-Expression vorausgesetzt, auch benachbarte Kardiomyozyten infizieren („viral spreading“)⁶⁶. Für enterovirales Protein wurde eine direkte Pathogenität festgestellt⁷³: bei der enteroviralen Infektion kommt es zur direkten Zellabtötung im Rahmen des intrazellulären Vermehrungszyklus⁵⁴. In-vitro-Untersuchungen an isolierten nicht-infizierten Herzmuskelzellen zeigten, dass eine CVB-3-Infektion allein zum Zelluntergang führte⁷⁴. Weil Kluster von infizierten Zellen vorgefunden wurden, werden einzelne infizierte Zellen für multifokale Läsionen verantwortlich gemacht: es wird postuliert, dass über Zell-Zell-Kontakte nicht infizierte Zellen den zytopathischen Effekten der infizierten Nachbarzellen unterliegen⁷⁵. Im Herzmuskel infizierter Mäuse konnten ausgedehnte nekrotische Areale nachgewiesen werden⁷⁶. In diesem Zusammenhang gibt es Hinweise auf apoptotische Prozesse. Das Virus bedient sich wahrscheinlich des Apoptoseprogramms der Zelle, um in den apoptoseinduzierten Zellfragmenten (sog. „membrane bound bodies“) persistieren zu können und auf diese Weise der Elimination durch das Immunsystem auszuweichen. So konnte zum Beispiel unter in-vitro-Bedingungen nachgewiesen werden, dass die apoptoseinduzierende Caspase 3 infolge einer CVB-3-Infektion aktiviert wird⁷⁷. Weiterhin konnte in einem Hefe-Zweihybrid-Screen gezeigt werden, dass VP2 mit dem humanen proapoptotischen Protein Siva interagiert⁷⁸.

Bei der viralen Myokarditis kommt es zur Myokardschädigung in erster Linie also durch die direkte zytotoxische Wirkung der Viren^{21,77,79}. Virale Proteinasen (z.B. Protease 2A) verursachen u.a. die Spaltung des Dystrophins in den Myozyten, was zum Verlust der Integrität des Zytoskeletts und damit zu einer Einschränkung der Kontraktilität sowie zur Ventrikeldilatation führt⁷³. Im Rahmen der Virusreplikation wird auch das Aktingerüst der Zielzelle spezifisch zerstört. Auch bei einer nicht-replizierenden Infektion mit niedriger Kopienzahl sind virusinduzierte zytopathische Effekte nachweisbar⁸⁰. Insbesondere durch die Aufrechterhaltung der Infiltration durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL's) kommt es zu Myozytolyse und zum kontinuierlichen Verlust an kontraktilen Elementen, woraus eine Kontraktileinschränkung resultiert⁸¹ (s. Kap. 2.3.2.3). Auf diese Weise kann eine Persistenz des Virus auch bei verringerter Virulenz

zur Chronifizierung der Erkrankung führen⁸².

Einen sekundären Pathomechanismus stellt die infektgetriggerte autoimmunologische Entzündungsreaktion im Myokard dar^{83,84,85}. Die Präsentation von Virusfremdproteinen aktiviert das Immunsystem primär gegen diese Fremdantigene⁸⁶. Das Ziel der antiviralen Entzündungsreaktion ist in erster Linie die effektive Viruselimination, so dass aus einer zeitlich limitierten Herzmuskelentzündung nicht zwingend eine dauerhafte Myokardschädigung resultieren muss⁸⁷. Sekundär kann sich die virusinduzierte Immunantwort, verursacht durch ein *molekulares Mimikry*, auch gegen Herzmuskelproteine richten^{88,89}.

Beim molekularen Mimikry bilden sich Autoantikörper gegen das eigene Gewebe durch das Vorkommen gleicher Epitope auf dem Erreger und auf körpereigenen Strukturen, so dass die gegen den Erreger gebildete Antikörper mit den körpereigenen Strukturen kreuzreagieren^{90,91}. Bei Patienten mit Myokarditis und auch DCM war im Bereich des zellulären Immunsystems eine

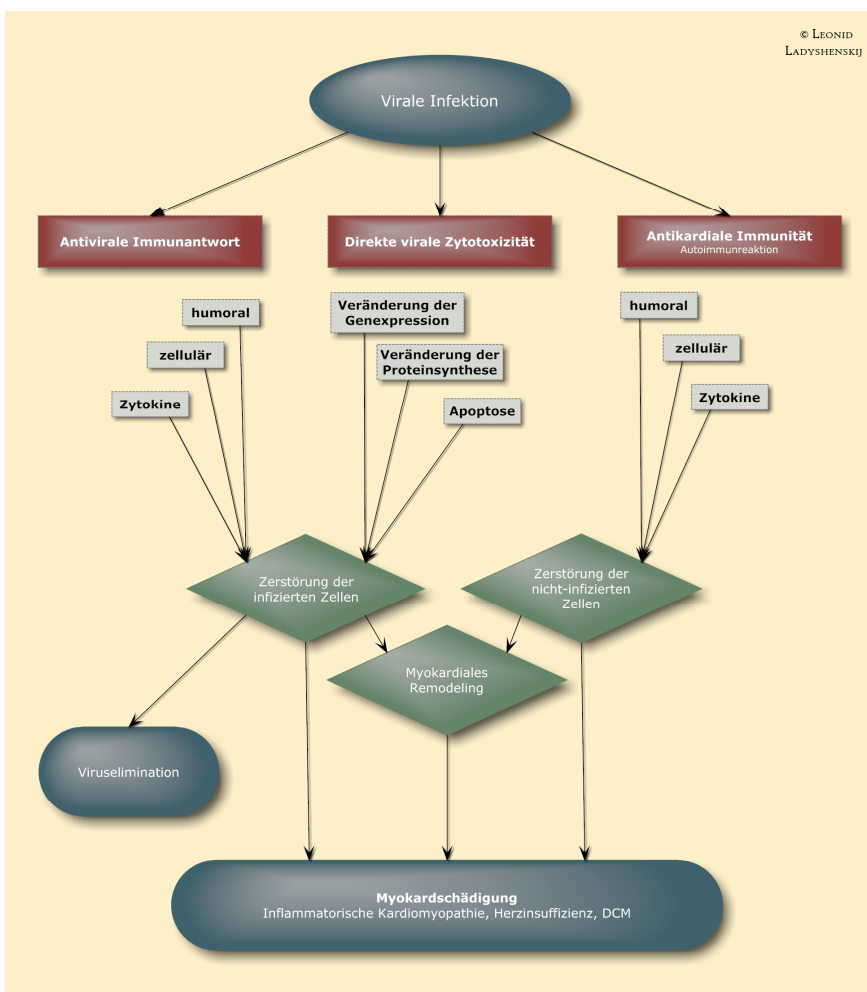


Abb. 2.5 Pathogenese und Immunpathogenese der Myokarditis

bis zu zehnfach erhöhte Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen vorzufinden⁹². In weiteren Arbeiten wurde in 87% der Fälle mit Myokarditis eine gegen das Myokard gerichtete Sensibilisierung von peripheren Lymphozyten beschrieben, bei welcher ein Teil eine herzmuskelspezifische zytotoxische Immunantwort zeigte^{93,94}.

Bei Ausbildung einer postviralen Autoimmunität wird die Immunreaktion nicht mehr vom Virus getriggert und persistiert unabhängig von dem Verlauf der Virusinfektion. Die Autoantikörper sind gegen Strukturproteine und kontraktile Proteine des Myokards (Aktin, Myosin, Myofibrillen)^{95,96,97}, Bestandteile der extrazellulären Matrix (z.B. Laminine⁹⁸), Endothelzellen⁹⁹, Sarkolemm¹⁰⁰, Epitope sarkoplasmatischer und mitochondrialer Antigene (z.B. ADP/ATP-Carrier^{101,102}), sowie verschiedene Rezeptoren (z.B. β -adrenerger Rezeptor)^{103,104,105} gerichtet. Wiederum kann eine Viruspersistenz über die primär antivirale Immunität eine antikardiale Immunität aufrechterhalten^{87,106}. Aktivierte B-Lymphozyten produzieren primär gegen Virusantigene gerichtete Antikörper, die mit Myokard-Antigenen kreuzreagieren und so zur Einschränkung der myokardialen Kontraktilität beitragen^{107,108,109}.

Neben Myozytolyse und Veränderungen des kontraktilen Apparates bewirken Umbauprozesse der extrazellulären Matrix Störungen im Sinne eines myokardialen Remodelings (s. Kap. 2.5.2). Die extrazelluläre Matrix ist für die Integrität und Funktion des Herzens verantwortlich¹¹⁰. Die durch den Immunprozess ausgelöste Induktion von Zytokinen führt zum Ungleichgewicht der matrixregulierenden Enzyme und fördert die Kardiomyozytenhypertrophie und das Remodeling^{110,111,112}. Diese Imbalance zwischen den Matrixmetalloproteinasen (MMP's) und ihren Inhibitoren (TIMP's) zugunsten der MMP's führt möglicherweise zu einer Geometrieänderung des linken sowie des rechten Ventrikels. Darüber hinaus sind Zytokine auch direkt an der myokardialen Kontraktilitätseinschränkung beteiligt¹¹³. Auf der anderen Seite fungieren Interleukine als regulierende Faktoren für das Wachstum und die gegenseitige Differenzierung und Aktivierung der peripheren Blutlymphozyten^{114,115,116} (s. Kap. 2.4).

2.3.2 Verlauf der experimentellen viralen Myokarditis im Mausmodell

Es lassen sich drei Phasen im Verlauf der viralen Myokarditis in der Maus unterscheiden¹¹⁷: die akute Phase (0. – 3. Tag p.i.), welcher sich die subakute Phase (4. – 14. Tag p.i.) anschließt. Sowohl die akute als auch die subakute Phase können entweder ausheilen, oder in die chronische Phase (ab 15. Tag p.i.) übergehen. Ursächlich dafür können die genetische Prädisposition des Wirtes¹¹⁸, aber auch Strukturveränderungen in de-novo-synthetisierten viralen Polypeptiden, die Entstehung von fehlstrukturierten oder aggregierten Proteinformen und das Phänomen des molekularen Mimikries sein⁵⁷.

2.3.2.1 Akute Phase der viralen Myokarditis (0. – 3. Tag p.i.)

In der akuten Phase der Virusmyokarditis zeigt sich im Mausmodell eine virusinduzierte Zytotoxizität mit Myofibrillennekrosen¹¹⁹, während ein zelluläres Infiltrat nicht nachweisbar ist¹²⁰. Demnach ist allein der direkte zytotoxische Effekt des Virus in der Frühphase der Myokarditis für die myokardialen Schäden verantwortlich^{76,121,122}. Die Zellyse erfolgt im Rahmen des viralen Replikationszyklus durch die direkte Pathogenität des enteroviralen Proteins, Membranschädigungen werden durch die perizellulär freigesetzte virale Protease verursacht.

In den ersten drei Tagen lässt sich im Myokardgewebe eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ)^{123,124} durch ortsständige Immunzellen feststellen. Ab dem dritten Tag sind vereinzelt inflammatorische Zellinfiltrate aus Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen als Ausdruck der Aktivierung der unspezifischen Immunantwort nachweisbar^{120,125}.

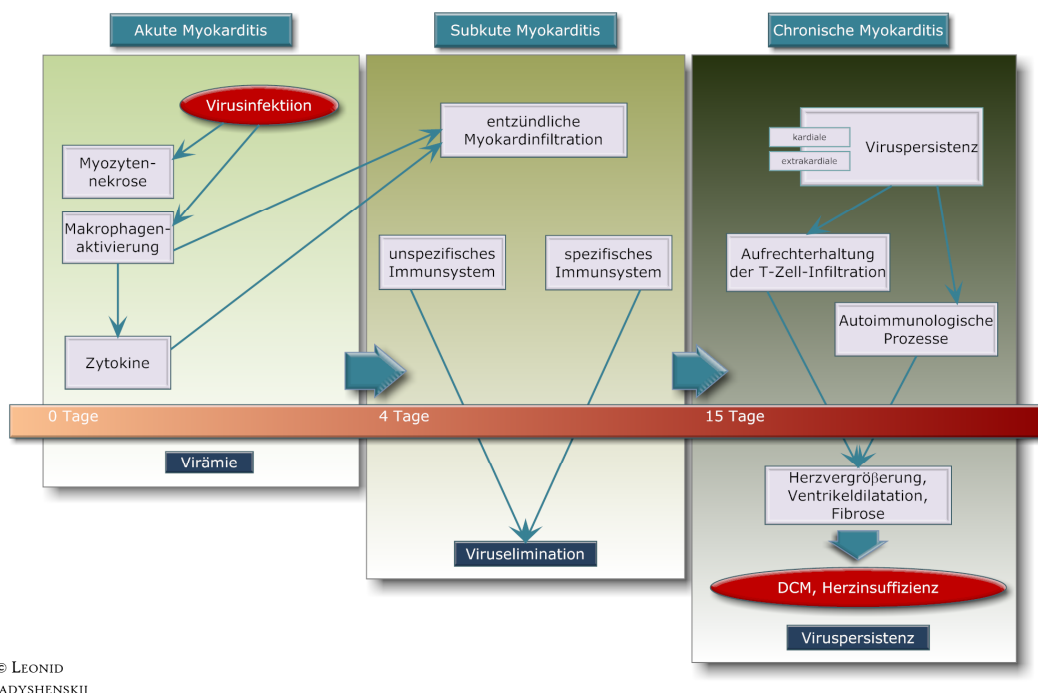
2.3.2.2 Subakute Phase der viralen Myokarditis (4. – 14. Tag p.i.)

Die subakute Phase stellt die Hauptphase der kardialen Schädigung dar. Sie zeichnet sich durch die Zunahme an entzündlichen zellulären Infiltraten im Myokardgewebe mit Aktivierung des spezifischen Immunsystems und Produktion von Antikörpern aus. Die Infiltrate bestehen vor allem aus Makrophagen, T-Lymphozyten und Fibroblasten¹¹⁷. Die Lymphozyten sind durch NK-Zellen, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen vertreten¹²⁶. Zu Beginn überwiegen die NK-Zellen, wobei sich das Verhältnis später zugunsten der CD8⁺-T-Zellen verändert. B-Lymphozyten und Plasmazellen sind nur vereinzelt nachweisbar.

Aktiviert NK-Zellen sind bedeutsam für die Viruselimination in der subakuten Phase der Myokarditis^{127,128, 129}. Es handelt sich um frühe Effektorzellen der angeborenen, nicht-adaptiven Immunantwort. Sie suchen Kardiomyozyten nach MHC-I-Proteinen ab. Wird ein verändertes oder kein MHC-I-Komplex identifiziert (Viren hemmen in infizierten Zellen die MHC-Synthese, damit bei der adaptiven Immunantwort die Erkennung durch CTL's verhindert wird), lösen die NK-Zellen im betroffenen Kardiomyozyten die Apoptose aus oder zerstören ihn durch Freisetzung von Perforin¹³⁰. Von der Vernichtung sind ausschließlich virusinfizierte Kardiomyozyten betroffen¹²⁹. Außerdem produzieren die NK-Zellen auf Antigenkontakt Zytokine (IL-1 β , TNF- α) und beschleunigen damit das Einsetzen der adaptiven Immunantwort. In Mausstämmen mit verminderter NK-Anzahl ließ sich ein aggressiverer Verlauf der Myokarditis bei erhöhtem Virustiter nachweisen^{129,131}.

Zytokine spielen eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese der Myokarditis. In Abhängigkeit von der Art und vom Umfang der Zytokinproduktion verlaufen die spezifische und die unspezifische Immunantwort sowie Autoimmunmechanismen. Zytokine können Zellen aktivieren und inaktivieren, andere Zytokine induzieren¹¹⁷ sowie die Hämodynamik beeinflussen. Dadurch ergeben sich unterschiedlichste Effekte auf das Myokardgewebe mit daraus resultierendem Krankheitsverlauf. Getriggert durch die virale Infektion^{132,133} findet sich bis zum 7. Tag p.i. eine gesteigerte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α und IFN- γ in den Myozyten und Endothelzellen^{133,134}. Zum Zeitpunkt des Auftretens der inflammatorischen Zytokine IL-2, IL-4 und IL-10 ab dem 5. Tag p.i. beginnt eine massive zelluläre Infiltration des Myokards^{125,135}. Es ist nicht geklärt, ob diese Expressionssteigerung viral-bedingt oder durch die gesteigerte Zellzahl im Myokard hervorgerufen wird^{133,136}.

In der akuten Phase der Virusmyokarditis steigt die Viruskonzentration im Myokard rapide an, so dass am 4. Tag p.i. Maximalwerte erreicht werden¹³⁷. Zu diesem Zeitpunkt sind noch keine neutralisierenden Antikörper nachweisbar. Der Antikörpertiter steigt vom 8. – 10. Tag p.i. an, Maximalwerte finden sich am 14. Tag p.i.. Andererseits kann der Virus bereits ab dem 10. Tag p.i. im Myokardgewebe nicht mehr nachgewiesen werden^{131,137,138}. Die Elimination des Virus wird außer durch neutralisierende Antikörper von den NK-Zellen und den infiltrierenden Makrophagen vorangetrieben^{131,138,139}. Aus diesem Grund ist ca. ab dem 10. Tag p.i. eine direkte, durch den Virus bedingte Myokardschädigung nicht mehr anzunehmen¹¹⁷.



© LEONID
LADYSHENSKIJ

Abb. 2.6 Schematische Darstellung der Entwicklung einer Myokarditis bis zum Endstadium einer dilatativen Kardiomyopathie am Beispiel der tierexperimentellen viralen Myokarditis¹²⁰

Die Viruselimination scheint vorwiegend B-Zell-vermittelt (humorale Immunität) und kaum durch die Aktivität der T-Zellen zu geschehen. Bei genetisch veränderten oder experimentell mit anti-T-Zell-Antikörpern behandelten T-Lymphozyten-defizienten Mäusen blieb sowohl der Virustiter als auch die Nekrosereduktion im Vergleich zu immunkompetenten Tieren nicht beeinflusst^{140,141}. Wiederum korrelieren gravierende pathologische Veränderungen im Myokard mit der zunehmenden T-Zell-Infiltration zwischen dem 7. und 14. Tag p.i.¹⁴². In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die T-Lymphozyten-Antwort für die Ausbildung einer Myokarditis essentiell ist (s. Kap. 2.3.3.1). In T-Lymphozyten-supprimierten Mausstämmen bildete sich die Krankheit nicht in vollem Maßstab aus: die pathologischen Veränderungen waren geringer ausgeprägt, und es war keine Dilatation der Ventrikel zu verzeichnen. Auch die Überlebensrate war bei Abwesenheit einer effektiven T-Zell-Immunantwort deutlich höher gegenüber Mausstämmen mit intaktem Immunsystem^{140,141,143}.

Die zelluläre Immunität scheint also nach Entfernung der Viren aus dem Myokardgewebe verantwortlich für die fortschreitende Myokardschädigung zu sein. Zytotoxische T-Lymphozyten erkennen virale Antigene auf infizierten Myozyten. Die Antigen-Präsentation erfolgt auf MHC-Klasse-I-Molekülen, wonach die CTL's die betroffenen Kardiomyozyten lysieren können^{144,145}. Dies geschieht entweder über die Ausschüttung von Lymphokinen oder über die Aktivierung von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen. Die T-Lymphozyten sind damit mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des zellulären Infiltrates^{145,146}.

Während der subakuten Phase der Myokarditis kommt es zu einer progredienten klinischen Verschlechterung der Herzfunktion. Die kardiale Dysfunktion beginnt ab dem 5. Tag p.i. und erreicht am 7. – 10. Tag p.i. die schlechtesten Werte⁷⁴.

2.3.2.3 Chronische Phase der viralen Myokarditis (ab 15. Tag p.i.)

In der chronischen Phase der Myokarditis lässt sich kaum mehr ein entzündliches Infiltrat nachweisen. Auch der direkte Virusnachweis und der Nachweis von Viruskapsidproteinen ist nicht mehr möglich, jedoch konnte mittels In-situ-Hybridisierung virale RNA ca. 3 Wochen p.i. im Myokard und ca. 4 Wochen p.i. im Gehirn infizierter Mausstämmen entdeckt werden¹⁴⁷. Auch mittels PCR wurde eine persistierende virale RNA bis zu 90 Tage p.i. belegt^{148,149}. Es wird davon ausgegangen, dass die persistierende Virus-RNA in der chronischen Myokarditis-Phase die T-Zell-Infiltration aufrechterhält^{80,82}. In einer experimentellen Studie entwickelten drei verschiedene immunkompetente Mausstämmen, in denen enterovirale RNA persistierte, eine chronische Myokarditis, während DBA/1-Mäuse, welche die virale RNA in der Frühphase eliminieren, nicht zur Chronifizierung neigten⁷⁵.

Die Aufrechterhaltung der chronischen Phase der Myokarditis kann, wie oben bereits dargestellt, auch durch autoimmunologische Prozesse erfolgen. Dabei greifen die autoreaktiven T-Lymphozyten auch nicht-infizierte Kardiomyozyten an^{88,89}. Es erfolgt eine Kreuzreaktion mit kardialen antigenen Strukturen im Sinne eines molekularen Mimikries (s. Kap. 2.3.1). Als häufigstes Autoantigen fungiert das kardiale Myosin^{150,151,152}. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass isolierte Myosin-Autoantikörper mit CVB-3-Kapsidproteinen kreuzreagieren (Myosin und CVB-3-Kapsidproteine zeigen eine ca. 40%-ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz)¹⁵³. Eine rein myosininduzierte nicht-virale Autoimmunmyokarditis ähnelt histologisch und klinisch der Virusmyokarditis^{88,150,151}. Am Autoimmunprozess können auch Makrophagen beteiligt sein, die nach Abbau lysierter Kardiomyozyten die Bestandteile an der Oberfläche präsentieren und so eine B-Zell-vermittelte Autoimmunantwort induzieren. In dieser Hinsicht scheint sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität für die fortschreitende myokardiale Schädigung in der chronischen Myokarditis-Phase verantwortlich zu sein.

Eine weitere Möglichkeit der Myokardschädigung kann durch Persistenz der viralen Infektion in extrakardialen Kompartimenten wie Milz, Lymphknoten, Leber und Pankreas bestehen^{75,149,154}. Eine kontinuierliche oder periodische Freisetzung chronisch infizierter Immunzellen könnte zu einer persistierenden viralen Infektion des Myokards beitragen¹⁵⁵.

90 Tage nach viraler Infektion sind Erhöhung des Herzgewichts, Vergrößerung und Dilatation des linken Ventrikels und Auftreten von fibrotischen Veränderungen in Mäuseherzen zu verzeichnen. Diese Veränderungen sollen mit IL-1 assoziiert sein¹²⁴ und ähneln den kardialen Läsionen bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie¹⁵⁶. Es ließ sich außerdem feststellen, dass Mausstämme, bei denen die Myokarditis normalerweise ausheilt, durch Gabe von IL-1 β und TNF- α eine chronische Myokarditis entwickeln¹⁵⁷. Die Entwicklung einer Myokarditis zur dilatativen Kardiomyopathie ist weiterhin im Detail nicht geklärt. Das Persistieren der viralen RNA, immunologisches Mimikry und eine anhaltende extrakardiale Virusinfektion sind mit hoher Wahrscheinlichkeit daran beteiligt^{158,159}.

2.3.3 Die Rolle der spezifischen Immunantwort bei der viralen Myokarditis

Die Hauptphase der kardialen Schädigung während der Myokarditis wird T-Zell-vermittelt vorangetrieben. T-Lymphozyten machen ca. 70% der im Körper zirkulierenden Lymphozyten aus. Die mit MHC-Komplexen präsentierten hochspezifischen Peptidantigene können mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors erkannt werden. Allerdings kann nur mit einem Co-Rezeptor die maximale Bindungsfähigkeit des T-Zell-Rezeptors erreicht werden. Die zytotoxischen T-Lymphozyten (30 – 45% aller T-Lymphozyten) tragen den Co-Rezeptor CD8⁺, welcher mit MHC-I-Proteinen

interagiert. MHC-Klasse-I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Körperzellen und präsentieren körperfremde Antigenpeptide. Somit reagieren die CTL's mit allen virusinfizierten bzw. transformierten Körperzellen. T-Helfer-Lymphozyten (T_H) tragen den Co-Rezeptor $CD4^+$ (55 – 70% aller T-Lymphozyten) und reagieren mit MHC-II-Proteinen, welche fremde Antigenpeptide auf antigenpräsentierenden Zellen (B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen)¹⁶⁰ exponieren. Den $CD4^+$ -T-Lymphozyten wird bei der Koordinierung der Immunantwort eine besondere Rolle zugeteilt.

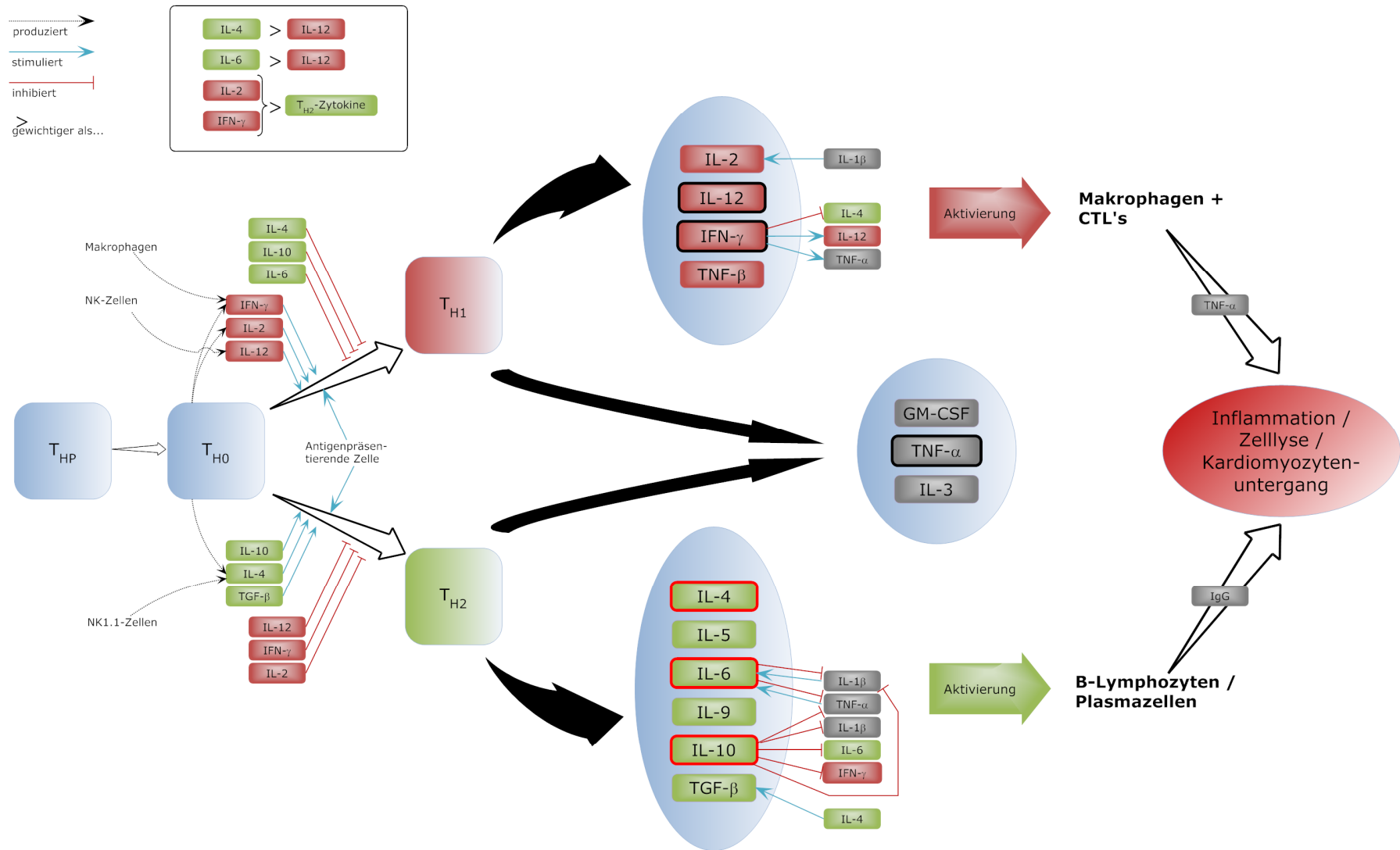
2.3.3.1 T_{H1} - und T_{H2} -Immunantwort

Es werden zwei unterschiedliche funktionelle T-Helfer-Populationen unterschieden: T_{H1} - und T_{H2} -Zellen reifen aus naiven T_{H0} -Zellen nach Stimulation der letzteren durch antigenpräsentierende Zellen¹⁶⁰. Die T_{H0} -Lymphozyten differenzieren sich wiederum aus den Vorläuferzellen T_{HP} ¹⁶¹. Nach Antigenkontakt sezernieren naive T_{H0} -Lymphozyten geringe Mengen IL-2, IL-4 und $IFN-\gamma$, was zum Ausreifen der T_{H0} -Zellen zu T_{H1} - und T_{H2} -Zellen führt^{162,163,164}.

T_{H1} - und T_{H2} -Lymphozyten unterscheiden sich in ihrem Zytokinexpressionsmuster und damit in der spezifischen biologischen Funktion. T_{H1} -Zellen sezernieren $IFN-\gamma$, $TNF-\beta$, IL-12 und IL-2 – es kommt zur Stimulation von proinflammatorischen Zytokinen und Makrophagenaktivierung¹⁶¹. Die T_{H1} -Antwort bewirkt die Differenzierung der $CD8^+$ -Lymphozyten zu zytotoxischen T-Zellen, aktiviert NK-Zellen und neutrophile Granulozyten und forciert auf diese Weise die Viruselimination¹⁶⁵. Verallgemeinert wird die zelluläre Immunantwort als T_{H1} -vermittelt betrachtet¹⁶⁶.

Die meisten Antigene allein können nicht die Umwandlung der B-Lymphozyten zu antikörperproduzierenden Plasmazellen bewirken. T_{H2} -Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und $TGF-\beta$ und induzieren die humorale Immunantwort mit B-Zell-Proliferation, Differenzierung zu Plasmazellen und Antikörperproduktion¹⁶⁶. Aus der Stimulierung von eosinophilen Granulozyten und Inhibierung der Makrophagenaktivierung resultieren lokale antiinflammatorische Effekte¹⁶⁷.

Beide T_H -Zell-Arten sezernieren $TNF-\alpha$, IL-3 und GM-CSF. Welche T_H -Zell-Antwort aktiviert wird, hängt von Faktoren wie Antigen dosis, Antigeneintrittsort, Art der antigenpräsentierenden Zelle und genetische Prädisposition des Wirtes ab. Zwischen der T_{H1} - und der T_{H2} -Antwort bestehen Autoregulationsmechanismen: Während die T_{H1} -Differenzierung durch $IFN-\gamma$ und IL-12 stimuliert wird, ist die Entwicklung der T_{H2} -Lymphozyten auf den Einfluss von IL-4 zurückzuführen^{164,168}. Positive Rückkopplung besteht für die T_{H1} -Antwort durch die Produktion von IL-2 und $INF-\gamma$ und für die T_{H2} -Antwort durch IL-10 und IL-4. Zudem supprimieren IL-4 und IL-10 die T_{H1} -Antwort, während IL-2 und $INF-\gamma$ die T_{H2} -Antwort hemmen^{169,170}.



© LEONID LADYSHENSKIJ

Abb 2.7 TH-Antwort-spezifische Zytokinexpression bei viraler Myokarditis (modifiziert nach Mosmann et al.)¹⁶¹

2.3.3.2 Einfluss der T_H -Immunantwort auf den Verlauf der Myokarditis

In verschiedenen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die T_{H1} - als auch die T_{H2} -Antwort über die Induktion von spezifischen Zytokinen regressive und progressive Effekte auf die Entwicklung der Myokarditis haben können. Jedoch werden einige die für T_{H1} - bzw. T_{H2} -Zellen typischen Zytokine auch von anderen Leukozyten und Nichtimmunzellen sezerniert, z.B. von CTL's, NK-Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten^{171,172}. Die T_{H1} -Antwort wird in der akuten und subakuten Myokarditis-Phase aufgrund der stärkeren Expression von IL-2 und INF- γ gegenüber den schwächer produzierten T_{H2} -induzierten Interleukinen als dominierend betrachtet^{133,173}.

Eine myosininduzierte Myokarditis bei Ratten konnte durch Behandlung mit IL-12 verstärkt werden, was auf einen verschlechternden Effekt der T_{H1} -Antwort hinweist¹⁷⁴. Im Gegensatz dazu konnte durch eine IL-12-Substitution bei EMCV-induzierter Myokarditis reduzierte Myokardschädigung und gesenkte Mortalität nachgewiesen werden¹⁷⁵. Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden in CVB-3-infizierten BALB/c-Mäusen gezeigt: männliche Mäuse mit der nachgewiesenen dominierenden T_{H1} -Antwort neigen zur Chronifizierung der Myokarditis, während weibliche BALB/c-Mäuse mit einer dominierenden T_{H2} -Antwort eine akute Myokarditis ausheilen^{176,177}. Andererseits konnte durch die Behandlung mit anti-IL-4-Antikörpern eine deutliche Reduktion der CVB-3-Myokarditis in A/J- und BALB/c-Mäusen erreicht werden¹⁷⁸, was für einen negativen Effekt der T_{H2} -Antwort spricht. Die Applikation von Antikörpern gegen die Co-Rezeptoren der Antigenpräsentierung B7-1 und B7-2 in A/J-Mäusen führte zur Besserung der chronischen Myokarditis bei Überwiegen von T_{H2} -Zellen¹⁷⁹.

Während in der Mehrheit der Modelle die T_{H1} -Antwort für die kardialen Schädigungen bei der Myokarditis verantwortlich erscheint, und die T_{H2} -Antwort eher protektiv wirkt¹⁸⁰, lässt sich in einigen Mausstämmen ein reziproker Effekt durch die T_H -Subtypen beobachten.

2.4 Zytokine und matrixaktive Substanzen

2.4.1 Bedeutung der Zytokine bei viraler Myokarditis

Zytokine sind endogene Peptide, welche bei der Myokarditis als immunkompetente Mediatoren und Regulatoren des myokardialen Remodelings fungieren. Sie werden durch zahlreiche ortständige und in Gewebe eingewanderte Zellen synthetisiert und sezerniert¹⁸¹. Über Zell-Zell-Interaktionen wird die Aktivierung, Differenzierung, Wachstum und Tod von vielen verschiedenen Zelltypen, insbesondere von Immunzellen, reguliert¹⁸². So werden sowohl Autoimmunmechanismen als auch die T-Zell-Immunantwort durch Zytokine kontrolliert. Die T-Helferzell-

Population kann in Richtung T_{H1} - oder T_{H2} -Antwort moduliert werden^{183,184} (s. Kap. 2.3.3.1). Zusätzlich induzieren Zytokine die CAM's-Expression auf dem Gefäßendothel und ermöglichen damit die transendotheliale Migration von Immunzellen in das Myokard⁷¹.

Es wird angenommen, dass die Induktion der Zytokinsynthese bei viraler Myokarditis durch freie Sauerstoffradikale vermittelt wird. Diese entstehen durch Gewebehypoxie infolge des Endothelschadens und Leukozyten-Akkumulation nach viraler Infektion^{185,186}. Andersherum können Zytokine (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) auch ihrerseits den oxidativen Stress induzieren (s. Kap. 2.6.3). Weiterhin beeinflussen Zytokine die Expression von MMP's und deren spezifischen Inhibitoren – TIMP's – und kontrollieren damit indirekt die Zusammensetzung und die Funktionalität der extrazellulären Matrix (s. Kap. 2.5.4). Der Gesamteinfluss einzelner Zytokine auf die Pathogenese der Myokarditis ist schwer zu beurteilen, da Zytokine multiple biologische Effekte haben und die Expression anderer Zytokine stimulieren und inhibieren können¹¹⁷.

2.4.2 Interferon-gamma (IFN- γ)

IFN- γ wird von CTL's, T_{H0} - und T_{H1} -Lymphozyten produziert, besitzt besonders antivirale und immunmodulatorische Eigenschaften, ist jedoch ebenfalls wesentlich an der Regulation von ECM-Bestandteilen beteiligt. Es wird eine Hemmung der MMP's- und Steigerung der TIMP's-Expression bewirkt. Außerdem kommt es durch IFN- γ zur Makrophagenaktivierung, erhöhter Expression von MHC-I- und MHC-II-Komplexen, Proliferation und Differenzierung von CD8⁺-Zellen. Neuerdings wird auch postuliert, dass die NK-Zellen-Antwort in der akuten Phase der CVB-3-Myokarditis durch IFN- γ induziert bzw. reguliert wird, d.h. dass die IFN- γ -Produktion noch vor der eigentlichen Zytotoxizität ansteigt¹⁸⁷.

In erster Linie verfügt IFN- γ über direkte antivirale Eigenschaften, demgemäß wird durch das Fehlen des Zytokins die virale Persistenz begünstigt^{188,189,190}. In CVB-3-infizierten transgenen Mäusen, welche in ihren pankreatischen β -Zellen IFN- γ verstärkt exprimierten, konnte keine myokardiale Inflammation festgestellt werden. Dieser Effekt wurde ebenfalls auf die IFN- γ -vermittelte Reduktion der CVB-3-Replikation zurückgeführt¹⁹¹.

Durch IFN- γ wird die T_{H1} -Immunantwort über IL-12-Stimulation¹⁹² angetrieben und in Makrophagen die Expression antiviraler Effektor-Moleküle, wie z.B. NO^{193,194}, aktiviert. Physiologischerweise wird die Expression von IFN- γ durch IL-10 inhibiert. Bei Patienten mit fulminanter Myokarditis wurden deutlich erhöhte IL-10-Werte im Blutserum gefunden, wobei IFN- γ -Werte nicht erhöht waren^{195,196}. Der letale Ausgang eines Viertels dieser Patienten, bei denen auch die höchsten IL-10-Werte eruiert wurden, wird somit plausibel. Andererseits bewirkt NO durch den

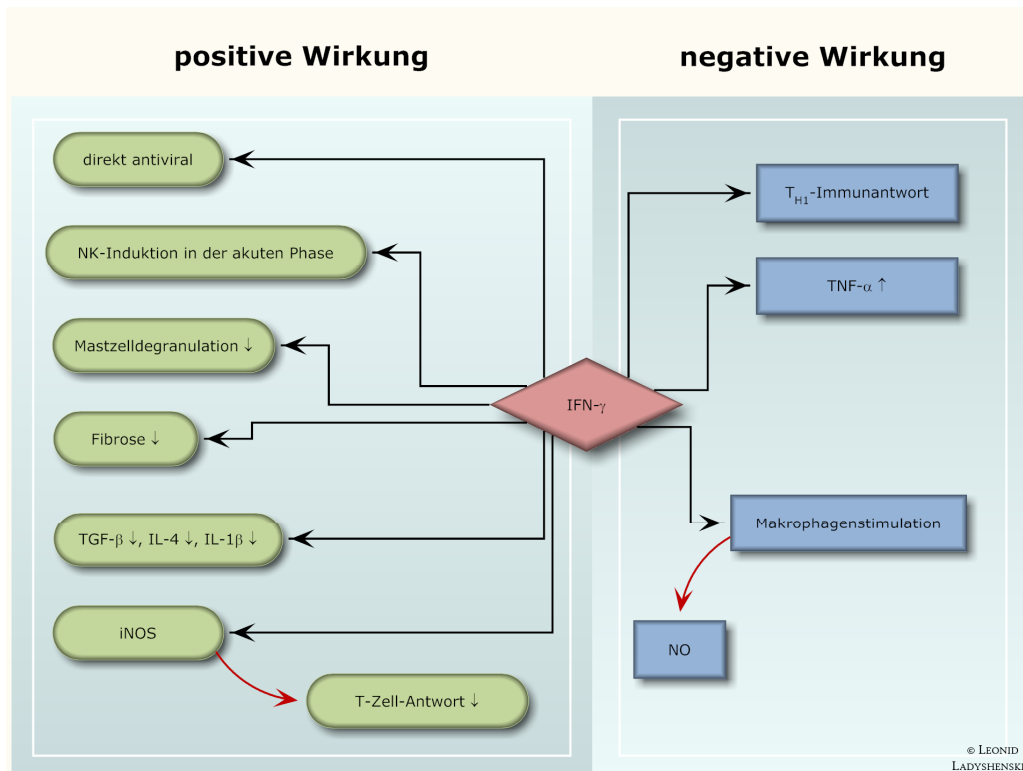


Abb. 2.8
Eigenschaften
von IFN-γ

oxidativen Stress besonders in chronischen Myokarditis-Stadien den Zelltod. Es gibt auch Hinweise darauf, dass kardiotoxische IFN-γ-Effekte auf die Induktion von autoimmunen Mechanismen während der viralen Myokarditis zurückzuführen sind.

2.4.3 Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 (TGF-β₁)

Von einigen Tumorzellen werden Faktoren produziert, welche es den Fibroblasten ermöglichen, in einer Suspension zu proliferieren, wobei normale Fibroblasten nur bei einer Heftung an feste Oberflächen wachsen können. Solche Faktoren haben die Bezeichnung TGF (transforming growth factors) erhalten.

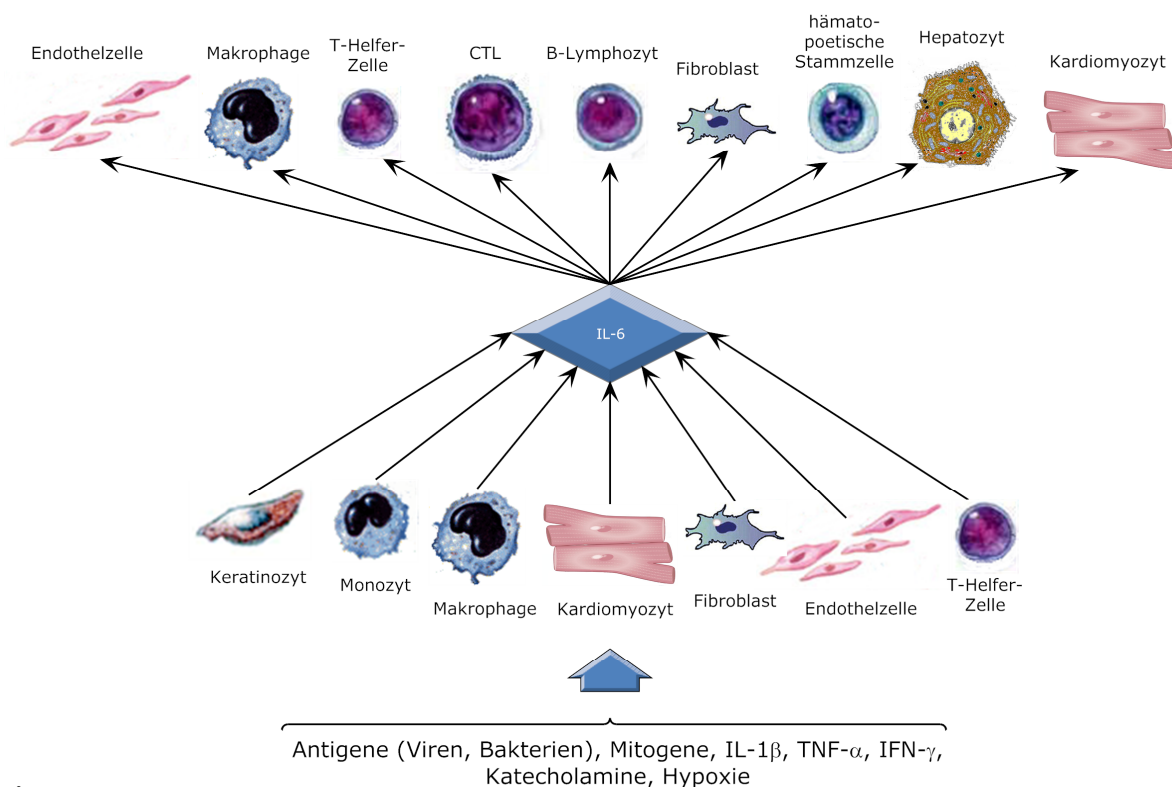
Der antiinflammatorische Wachstumsfaktor TGF-β₁ wird von aktivierten Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten (T_{H2} > T_{H1}), Epithel- und Endothelzellen produziert. TGF-β₁ hat einen starken inhibierenden Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation von T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und NK-Zellen^{197,198,199}. Bei einer CVB-3-vermittelten autoimmunen Myokarditis konnte durch TGF-β nicht nur die virale Replikation, sondern auch der autoimmune Prozess merklich supprimiert werden²⁰⁰.

TGF-β₁ ist ein wichtiger Stimulator der Fibroblastenproduktion, seine Inhibierung reduziert deutlich den Grad der kardialen Fibrose²⁰¹ (s. Kap. 2.5.4). In einem Experiment mit BALB/c-Mäusen wurde die Korrelation zwischen der kardialen Fibrosierung und cTGF-Expression (connective

tissue growth factor) in der akuten CVB-3-induzierten Myokarditis bestätigt. Außerdem konnte beobachtet werden, dass der cTGF-produzierende Zelltyp während der Akutphase der Infektion von interstitiellen Zellen zu Kardiomyozyten wechselte²⁰². Ferner wurde zwischen der Zell-Apoptose-Rate und der TGF- β_1 -Expression ein signifikanter Zusammenhang bei einer viralen Herpes-simplex-Virus-I-induzierten Myokarditis in BALB/c-Mäusen festgestellt²⁰³.

2.4.4 Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 ist eines der wichtigsten T_{H2}-Zytokine im myokardialen Entzündungsgeschehen, welches unterschiedlichste Aspekte der Immunantwort zu regulieren vermag. Es nimmt eine Sonderstellung bei den inflammatorischen Proteinen ein, da es sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte besitzt²⁰⁴. IL-6 ist außerdem ein potenter Induktor der CAM's-Expression (ICAM-1) auf Endothelien der Kardiomyozyten²⁰⁴ (s. Kap. 2.3.1). Außer der Funktion als Mediator der Makrophagenaktivierung²⁰⁵ und B-Zell-Differenzierung²⁰⁶ fungiert IL-6 als Hauptregulator der Akute-Phase-Reaktion und bewirkt durch die Hepatozyten-Stimulation die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen (CRP, Fibrinogen)²⁰⁷. Die Produktion von IL-6 erfolgt durch Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten (vor allem T_{H2}), Fibroblasten, Endothelzellen und Kardiomyozyten²⁰⁴. Stimuliert wird die IL-6-Bildung durch TNF- α und IL-1 β ²⁰⁸ sowie Katecholamine und Hypoxie²⁰⁷.



© LEONID
LADYSHENSKIJ

Abb. 2.9 Induktoren, Produzenten und Zielzellen von IL-6

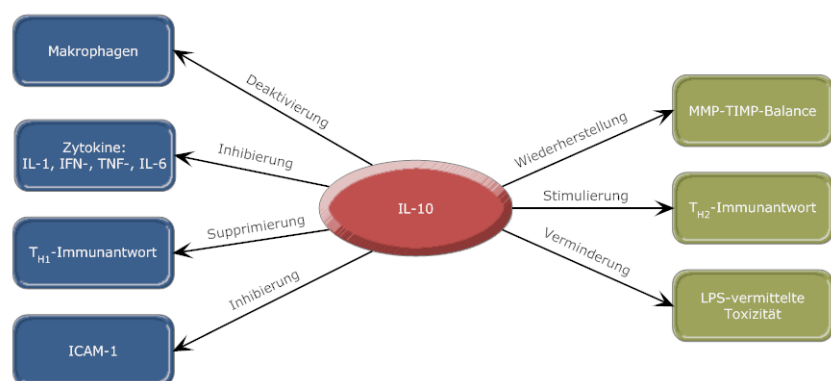
Im Rahmen der kardialen Erkrankungen gilt IL-6 als prognostischer Faktor bei Myokarditis und DCM²⁰⁹. Ebenso bedeutsam ist IL-6 für die virale Antigenpräsentation, frühe Aktivierung der Immunantwort und signifikante Minderung der viralen Replikation²¹⁰. Die IL-6-Wirkung wird durch Signaltransduktion über das Rezeptor-Bestandteil gp130 in der Zellwand vermittelt²¹⁰. Durch anschließende Aktivierung von Signalproteinen (z.B. JAK/STAT) werden die Signale an das Zellinnere weitergeleitet und verändern die Expression von zahlreichen Zielgenen. Auf diesem Weg erhält das myokardiale IL-6 die kardiale Inflammation aufrecht, reduziert die Kontraktibilität des Herzmuskels durch Störung der Kalzium-Homöostase und ruft die myokardiale Hypertrophie hervor^{204,211}.

Zum Wirkungsspektrum von IL-6 gehören auch zytoprotektive Effekte. So wird die Unterdrückung der Apoptose durch Hochregulierung antiapoptotischer Gene bewirkt²⁰⁴. Die antiinflammatorische Wirksamkeit des IL-6 beruht auf der Inhibierung der TNF- α - und IL-1 β -Expression sowie der Synthesereduktion der entsprechenden Rezeptoren^{207,212}.

2.4.5 Interleukin 10 (IL-10)

IL-10 ist ein natürliches antiinflammatorisches Zytokin, welches die Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IFN- γ , TNF- α und IL-6 supprimiert^{134,213,214}. So wurden bei IL-10-defizienten Mäusen signifikant erhöhte TNF- α - und IL-6-Konzentrationen im kardialen Muskelgewebe festgestellt²¹⁵. Ferner wird durch IL-10 die T_{H1}-Antwort gehemmt, während die Erhaltung der T_{H2}-Antwort unterstützt wird²¹⁶. Die Synthese von IL-10 erfolgt hauptsächlich durch Monozyten, Makrophagen, Keratinozyten, B- und T-Lymphozyten (vor allem T_{H2})²¹⁷.

Die protektive Funktion von IL-10 wurde anhand einer CVB-3-induzierten Myokarditis in



© LEONID LADYSHENSKIJ

Abb. 2.10 Effekte von IL-10^{217,222} (LPS: Lipopolysaccharide)

Mäuseherzen veranschaulicht: IL-10 bewirkte eine verminderte Gewebeschädigung und zeigte einen schützenden Effekt bezüglich der Letalität im Vergleich zu immundefizienten Mäusen²¹⁸.

Außerdem konnte durch IL-10-Gentransfer eine Protektion des myokardialen Gewebes nachgewiesen werden^{219,220}.

IL-10 wird auch für die Down-Modulation der Makrophagen-Aktivität und der durch Makrophagen synthetisierten Zytokine verantwortlich gemacht^{221,222}. Makrophagen exprimieren u.a. NO, welches einerseits antiviral wirkt, andererseits aber durch den oxidativen Stress die Apoptose herbeiführt (s. Kap. 2.6.3).

2.4.6 Zellkernfaktor kappa B (NF-κB)

NF-κB ist ein in der Myokarditis wichtiger proinflammatorischer Transkriptionsfaktor, der in nahezu allen Zelltypen vorkommt. NF-κB spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und der Apoptose und wird vielseitig reguliert (s. Tab. 2.2).

TNF-α und IL-1β können den NF-κB-Transduktionsweg induzieren, infolgedessen Inflammation und oxidativer Stress entstehen (s. Abb. 2.13). Auch andersherum stimuliert NF-κB die Produktion proinflammatorischer Zytokine, welche ihrerseits Akute-Phase-Antwort in der Leber, die Immunantwort und das myokardiale Remodeling induzieren. Unter den für NF-κB bedeutsamen Signalwegen ist insbesondere der MAP-Kinase-Weg wichtig. MAP-Kinasen (mitogenaktivierte Proteinkinasen) sind unter anderem an der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose, Transformation und Vasokonstriktion beteiligt²²³. Über NF-κB induziert Angiotensin II den MAP-Kinase-Weg und stimuliert Endothelzellen zur Freisetzung von VCAM-1, wodurch die Lymphozyten- und Makrophagenmigration in das kardiale Gewebe ermöglicht wird.

Glukokortikoide und Zyklosporine können die Aktivierung von NF-κB effektiv inhibieren²²⁴. NF-κB-Hemmung führte zu deutlich verminderter Inflammation und iNOS-Expression (s. Kap. 2.6.3), erniedrigte die Zytotoxizität und Zellproliferation in transgenen Ratten²²⁵.

Aktivatoren	Inhibitoren
<ul style="list-style-type: none"> • Zytokine: TNF-α und TNF-β, IL-1, IL-2, IL-17 • Wachstumsfaktoren: GM-CSF, Insulin, NGF, PDGF • Immunrezeptorliganden: IgM, CD3, CD4, CD28, CD40 • Stressreaktionen: Reoxygenation, Hypoxie, Blutung • Angiotensin II • Bakterien und Bakterienprodukte: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, Lipopolysaccharide, Exotoxin B, Toxic-shock-syndrom-Toxin • Viren und Virenprodukte: HIV-1, HTLV-1, CMV, EBV, doppelsträngige RNA • Freie Radikale • Xenobiotika: Antigene, Cycloheximide, Phorbolster, Concanavalin A, Phythämagglutinin, Calciumionophore • Umgebungsnoxen: UV-Licht, ionisierende Strahlung, Chrom, Kobalt, Nickel 	<ul style="list-style-type: none"> • Zytokine: IL-10 • Immunsuppressiva: Glukokortikoide, T-Zell-Blocker (Cyclosporin, Tacrolimus, Rapamycin) • NSAID: ASS, Tepoxalin • cAMP-Agonisten und -Aktivatoren: PGE2 • Neurotransmitter: NO • Antioxidantien • Goldverbindungen • Gliotoxin (fungaler Metabolit) • synthetische Peptidproteosomen-Inhibitoren

Tab. 2.2 NF-κB-Regulation

2.5 Die myokardiale extrazelluläre Matrix (ECM)

2.5.1 Bestandteile und Funktionen der ECM

Die extrazelluläre Matrix (ECM) stellt die Gesamtheit aller Makromoleküle im Interzellularraum des Herzens dar. Das dreidimensionale Netzwerk besteht zu 90% aus Kollagenen²²⁶ und anderen Bestandteilen, wie Fibronectin, Elastin, Laminin, Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glukosaminoglykanen. Es handelt sich hierbei um ein dynamisches Gewebe, welches durch permanente Synthese- und Abbauprozesse der Bindegewebsstrukturen gekennzeichnet ist. Durch die Balancierung der Umbauprozesse kann die strukturelle Architektur der aktuellen hämodynamischen Belastung angepasst werden, ohne das Gerüst der Matrix zu destabilisieren. Damit ist die ECM bedeutend für den Erhalt der kardialen systolischen und diastolischen Funktionalität. Durch die Interaktion der ECM-Adhäsionsproteine mit Integrin-Rezeptoren werden zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Zell-Zell-Interaktion und Apoptose von Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Immunzellen koordiniert^{227,228}.

2.5.2 Myokardiales Remodeling

Unter myokardialem Remodeling wird ein pathologischer Umbau der extrazellulären Matrix verstanden, welcher auch zelluläre Veränderungen (Myozytenhypertrophie, Fibroblastenproliferation, Apoptose) nach sich zieht^{229,230}. In erster Linie handelt es sich hierbei um Kompensationsmechanismen, die unter pathologischen hämodynamischen Bedingungen die Steigerung bzw. Stabilisierung der Herzleistung gewährleisten. Dieser Effekt ist allerdings zeitlich begrenzt, so dass es über Veränderungen der Struktur und der Funktion der ECM zu Umgestaltung der Herzgeometrie (Hypertrophie / Dilatation) mit konsekutiver Störung der kardialen Funktion kommt²³¹. Das Remodeling wurde bei Myokardinfarkten, Myokarditiden, Kardiomyopathien und chronischem arteriellem Hypertonus beobachtet^{232,233,234,235}. Die Regulation des Remodeling-Prozesses erfolgt durch komplexe, noch nicht vollständig geklärte Interaktionen von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen²³⁶, wobei auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und oxidativer Stress einen bedeutenden Einfluss haben.

So wie der Remodeling-Prozess zur Apoptose führen kann, können auch Apoptose oder Nekrose der Zellen das Remodeling induzieren. Da abgestorbene Zellen nicht ersetzt werden können, steigt für die verbleibenden Kardiomyozyten die Wandspannung an. Kompensatorisch hypertrophieren die Kardiomyozyten und es kommt zur Aktivierung des ECM-Remodelings mit gesteigerter Fibrosierung. So setzt sich als Folge der Apoptose das Myokard im Vergleich zum normalen Herzgewebe aus deutlich weniger und zum Teil massiv hypertrophierten Kardiomyozyten zusammen.

myozyten und Kollagen zusammen²³⁷. Ein progredienter Zellverlust kann zur progressiven Entwicklung der DCM und Herzinsuffizienz führen²³⁸. Zwischen der Apoptoserate und dem Ausmaß des kardialen Remodeling wurde eine strenge Korrelation während der subakuten Myokardinfarkt-Phase festgestellt²³⁹. Neurohumorale Faktoren (Katecholamine, RAAS), Zytokine (z.B. TNF- α), oxidativer Stress und mitochondriale Schädigung sind Trigger der Apoptose²⁴⁰.

Die Funktion der ECM wird sowohl von der Menge des Kollagengehalts, als auch von der Qualität der Quervernetzung und des Verhältnisses der einzelnen Kollagene zueinander bestimmt. Den größten Kollagen-Anteil der ECM bilden Kollagen Typ I (85%) und Typ III (11%)^{241, 242}. Aus Kollagen I bestehen dicke, parallel angeordnete Fibrillen, welche dem Herzgewebe Zugfestigkeit und Steife verleihen („tensile strength“). Kollagen I übertrifft an Reißfestigkeit selbst Stahl und hält unter experimentellen Bedingungen Druck- und Zugbelastungen von bis 500 mmHg aus²⁴³. Dagegen sorgt Kollagen III durch Formung eines feinen dreidimensionalen Netzwerkes für hohe Elastizität. Sowohl in hypertrophierten Herzen^{234,244} als auch bei Myokarditis^{245,246} und DCM^{231,247} konnte ein gesteigerter Gehalt an Kollagen und z.T. Fibronectin nachgewiesen werden. Ein erhöhter Kollagenumsatz bewirkt eine qualitätsverminderte Quervernetzung der Kollagenfibrillen^{248,249} und eine Veränderung des Verhältnisses von Typ-I- zu Typ-III-Kollagen^{247,250}. Trotz des erhöhten Kollagengehaltes kommt es schließlich nicht zu einer Versteifung des Muskelgewebes, sondern zur Herzdilatation aufgrund der dominierenden Aktivität der ECM-abbauenden Matrixmetalloproteinasen (MMP's).

2.5.3 Matrixmetalloproteinasen (MMP's)

Kollagene zeichnen sich durch eine außerordentlich hohe proteolytische Resistenz aus. Lediglich Vertreter der Familie der zinkabhängigen Endoproteasen – MMP's – sind in der Lage, effektiv die fibrillären Kollagene zu degradieren²⁵¹. MMP's werden in ihrer aktiven Form durch TIMP's (tissue inhibitor of metalloproteinases), welche u.a. von Kardiomyozyten und Makrophagen sezerniert werden, gehemmt^{252,253}. Zu den MMP's-produzierenden Zellen gehören Fibroblasten,

MMP-Klasse	MMP's	Funktion
Collagenasen	MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18	Spaltung fibrillärer Kollagene ²⁵⁴
Gelatinasen	MMP-2, MMP-9	Spaltung von denaturiertem Kollagen (Gelatin) und Kollagen Typ IV ²⁵⁵
Stromelysine	MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11	weites Spektrum der Degradierung ²⁵⁶ , z.B. Kollagene, Gelatin, Fibronectin, Laminin und Proteoglykane ²⁵⁷
membrangebundene MMP's (MT-MMP's)	MT1 (MMP-14), MT2 (MMP-15), MT3 (MMP-16), MT4 (MMP-17), MT5 (MMP-24), MT6 (MMP-25)	Abbau der Kollagene und Gelatine + Aktivierung anderer MMP's ²⁵⁸
andere MMP's	MMP-26, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23	unspezifischer ECM-Abbau (Kollagene, Gelatine, Fibronectin, Elastin)

Tab. 2.3 Einteilung der MMP's

Kardiomyozyten, Endothelzellen, neutrophile Granulozyten, Makrophagen sowie viele Tumorzellen²⁵⁹. Nach ihrer Struktur und nach ihrer Substratspezifität werden die MMP's in fünf Klassen eingeteilt (Tab. 2.3).

Zwischen der Aktivität von MMP's und TIMP's besteht im physiologischen Zustand ein Gleichgewicht²⁶⁰. Stimuliert durch verstärkte Ablagerung der Kollagene, kommt es beim Remodeling zur gesteigerten Synthese und Aktivierung der MMP's sowie einer Down-Regulation von TIMP's^{186,231}.

In mehreren Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass pathologisches, myokardiales Remodeling durch MMP-Modulation induziert oder inhibiert werden kann. So bewirkte die Überexpression von MMP-1 am Herzen transgener Mäuse verstärkte Hypertrophie, Dilatation und systolische Dysfunktion²⁶¹. Durch eine Hemmung der MMP's in Mäuseherzen konnte die linksventrikuläre Dilatation nach einem Myokardinfarkt deutlich reduziert werden²⁶². Auch die Inhibierung der aktiven MMP ADAM-12 bei Labormäusen verhinderte sowohl die Entstehung einer Hypertrophie als auch der Dilatation des linken Ventrikels²⁶³. Dagegen führte eine totale MMP-Inhibition zum erhöhten interstitiellen Kollagengehalt und damit zur erhöhten myokardialen Steifheit mit kardialen Funktionsverlust²⁶⁴. Dass auch zwischen den einzelnen MMP's unter physiologischen Bedingungen ein kontrolliertes Gleichgewicht besteht, zeigten Versuche, bei denen aus selektiver MMP-Inhibition ein kompensatorischer Anstieg anderer MMP's resultierte²⁶¹.

2.5.4 Regulation des myokardialen Remodelings

Die Expression der ECM-Komponenten und damit auch der des pathologischen Remodelings wird durch inflammatorische Zytokine induziert und reguliert. Ein wichtiges Zytokin ist TGF- β_1 , welches einerseits die Synthese von Kollagenen²⁶⁵, Fibronektin, Proteoglykanen und Elastinen in der ECM stimuliert^{266,267}, andererseits den enzymatischen Abbau der ECM verringert. Der letztgenannte Effekt resultiert aus der Inhibierung der MMP's-Produktion bei gleichzeitiger Stimulation der TIMP's -Sekretion^{268,269}. Die TGF- β_1 -vermittelte Kollagenbildung erfolgt nach der Einwanderung der Makrophagen in das myokardiale Gewebe: Sie produzieren die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die Cyclooxygenase (COX) und TGF- β_1 . iNOS und COX verursachen ihrerseits Kollagendegradation und Apoptose. Die zeitgleich eingewanderten Fibroblasten werden durch TGF- β_1 zu Myofibroblasten transformiert²⁴³. Die letzteren produzieren nachfolgend Fibronektin und später, über Prokollagen Typ III und Typ I, fibrilläres Kollagen.

Hingegen wurde für IL-1 β und TNF- α ein stimulierender Effekt auf die mRNA-Expression von MMP's beschrieben^{270,271}. Beide Zytokine verringern damit den myokardialen Kollagengehalt,

während die Fibronectin-Synthese in der ECM stimuliert wird^{272,273}. Daneben kann TNF- α selbst durch MMP's aktiviert werden. Dieser Effekt wird durch Gabe von MMP's-Inhibitoren gehemmt und durch zusätzliche Gabe von Kollagenasen, Gelatinasen und Stromelysinen wieder hervorgerufen^{274,275}. In neueren experimentell-therapeutischen Ansätzen konnte durch TNF- α -Inhibition die linksventrikuläre Dilatation und kardiale Dysfunktion in knock-out-Mäuseherzen verringert werden²⁷⁶. Über einen Rückkopplungsmechanismus können IL-1 β und TNF- α ihrerseits auch TGF- β und IL-6 stimulieren, wodurch eine MMP's-Erhöhung unter physiologischen Bedingungen limitiert werden kann²⁷⁷.

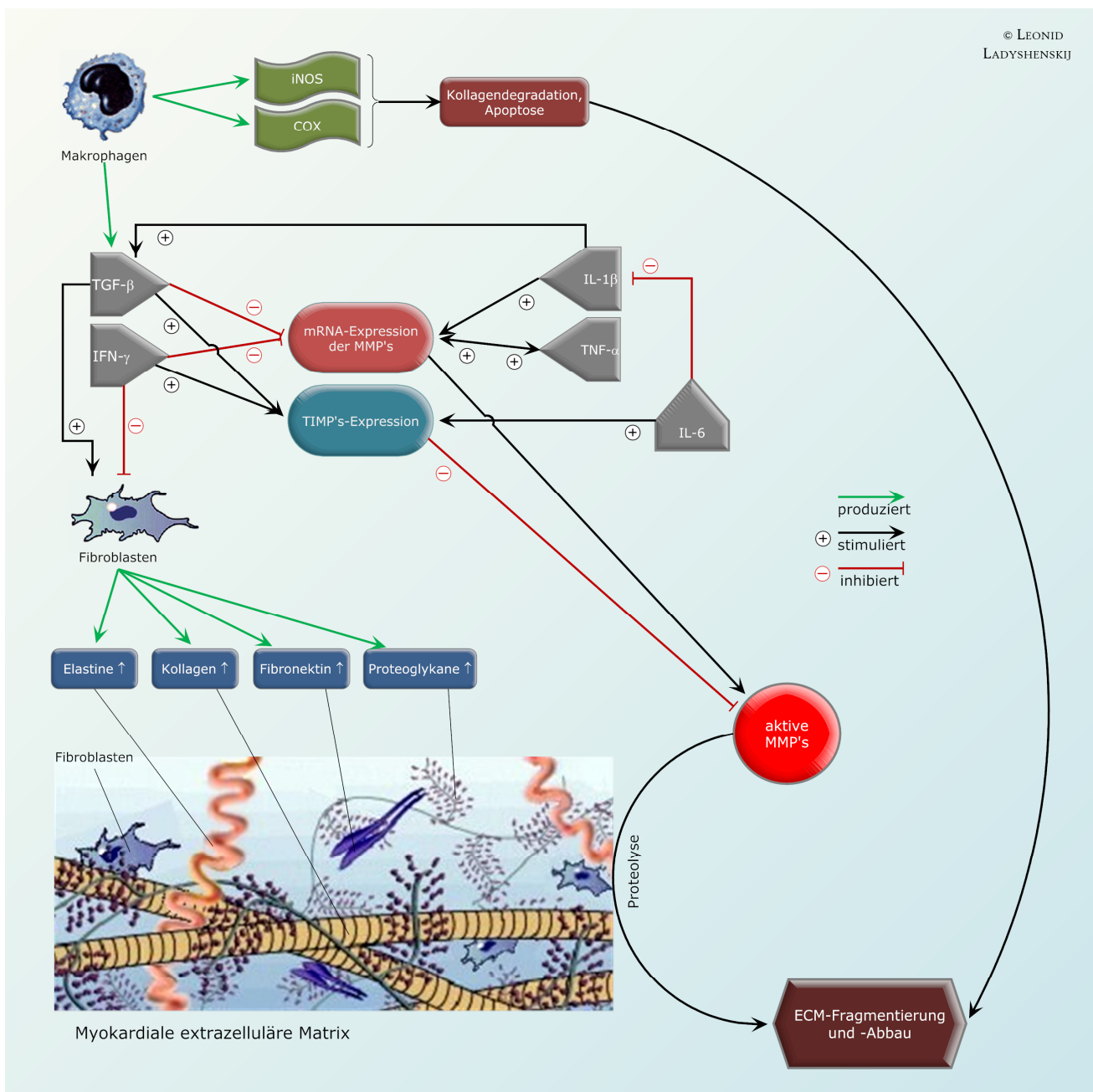


Abb. 2.11 Zytokin-vermittelte Regulation des myokardialen Remodelings

Außer der antiviralen und immunmodulatorischen Effekte besitzt auch IFN- γ wesentliche Einflüsse in der Regulation der ECM. In experimentellen Studien wurde verdeutlicht, dass IFN- γ über die Wirkung auf kardiale Fibroblasten die Expression der kollagenen ECM-Bestandteile senkt und simultan MMP's-Abbau induziert^{278,279,280}. Gleichzeitig wird die TIMP-1-Expression gesteigert²⁸¹. Ein weiteres wichtiges Zytokin beim Remodeling-Prozess ist IL-6. Für IL-6 konnte eine IL-1-antagonistische Wirkung mit positivem Effekt auf TIMP-1-Erhöhung eruiert werden^{282,283}. Ein begünstigtes kardiales Remodeling und positiv-inotroper Effekt waren in einer tierexperimentellen Studie mit der IL-6-Expressions-Steigerung assoziiert²⁸⁴.

Noch sehr wenig bekannt ist über den Einfluss des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 auf den myokardialen Remodeling-Prozess. In Rattenherzen bewirkte die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zugunsten des antiinflammatorischen IL-10 eine Steigerung der linksventrikulären Funktion und verminderte Ausprägung der Herzinsuffizienz im Rahmen eines Postinfarkt-Remodelings^{285,286}. Eine exogene IL-10-Applikation reduziert den Schweregrad, Mortalität und kardiale Dysfunktion bei Autoimmunmyokarditis²¹⁹. Die Wirkung von IL-10 auf den ECM-Metabolismus bei viraler Myokarditis ist nicht zuletzt auf die Inhibition der inflammatorischen Immunantwort zurückzuführen²⁸⁷.

MMP's-Induktoren	MMP's-Suppressoren
IL-1, IL-6	IFN- γ
TNF- α	Heparin
PDGF	Retinoide (Vitamin A)
TGF- β_1	Kortikosteroide
PGF ₂ - α	TIMP's
O ₂ -Radikale	Tetrazykline

Tab. 2.4 MMP's-Regulatoren



Sowohl oxidativer Stress als auch das kardiale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System spielen eine wesentliche Rolle in der Induktion und Progression des myokardialen Remodelings. Auf dieses Thema wird näher in den Kapiteln 2.6.2 und 2.7 eingegangen.

Abb. 2.12

Circulus vitiosus des linksventrikulären Remodelings

2.6 Oxidativer Stress

2.6.1 Freie Radikale

Freie Radikale sind Atome oder Moleküle, die ungepaarte Elektronen besitzen. Da freie Elektronen danach „streben“, ein Elektronenpaar zu bilden, sind Radikale extrem reaktionsfreudig. Von besonderer Bedeutung sind mögliche Schädigungen der Nukleinsäurebasen (bes. Thymin und Guanin) mit daraus resultierenden chromosomalen Veränderungen. Auch Proteine werden durch freie Radikale angegriffen und verändert, wodurch eine Funktionseinschränkung oder Funktionsänderung entsteht. Bei Lipiden treten durch Radikale-Wirkungen gravierende Schädigungen auf. Da Lipide ein Hauptbestandteil von Zytomembranen sind, können hier erhebliche Beeinträchtigungen der Integrität von Zellmembraneigenschaften hervorgerufen werden. Unmittelbare Folgen sind ein verstärkter Kalzium-Einstrom in die Zellen und die Störung zahlreicher Rezeptoren. Intrazellulär können vor allem die Integrität der Mitochondrienmembran und damit auch der oxidative Stoffwechsel beeinträchtigt sowie die DNA geschädigt werden.

Auch O_2 ist ein Radikal, weil es zwei ungepaarte Elektronen besitzt. Daher tendiert Sauerstoff dazu, Elektronen aufzunehmen. Durch die Aufnahme eines Elektrons entsteht das Superoxid-anion ($O_2^{\cdot-}$), ebenfalls ein hochreaktives Radikal, da noch immer ein ungepaartes Elektron vorliegt. Sauerstoffradikale entstehen im menschlichen Körper ganz natürlich während des Energiestoffwechsels bei der unvollständigen Reduzierung des Sauerstoffs zu Wasser. Insbesondere in Mitochondrien entsteht Superoxid als Zwischenprodukt der intrazellulären Atmungskette. Während 96 – 99% des Sauerstoffs in der Atmungskette durch Cytochromoxidasen vollständig zu H_2O reduziert werden, erfolgt die Freisetzung von circa 1 – 4% als Superoxid. Sauerstoffradikale können mit vielen anderen Molekülen und Verbindungen interagieren und dabei neue Radikale erzeugen (Radikalkettenreaktion). Die Superoxidkonzentration in den Zellen nimmt proportional zu steigendem Sauerstoffpartialdruck zu. Die freien Radikale des Sauerstoffs und seiner Verbindungen werden zusammen mit nicht-radikalischen, aber sehr reaktiven Sauerstoffverbindungen als Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet.

Antioxidantien (s. Kap. 2.6.5) neutralisieren die freien Radikale im Organismus durch Übertragung eines Elektrons. Normalerweise liegt zwischen oxidativen und den, durch Antioxidantien induzierten, reduktiven Prozessen ein Gleichgewicht vor. Der Zustand, bei welchem die Konzentration freier Radikale die antioxidative Kapazität des Organismus übersteigt, wird als oxidativer Stress bezeichnet²⁸⁸.

2.6.2 Sauerstoffradikale und Oxidativer Stress bei viraler Myokarditis

Während der viralen Coxsackievirus-induzierten Myokarditis führt ein reduzierter antioxidativer Status zum Anstieg des oxidativen Stresses mit Verschlechterung der Krankheitssymptomatik und Progression der Infektion²⁸⁹. In Serumuntersuchungen der Patienten mit Myokarditis wurden erhöhte Konzentrationen an Lipidperoxiden als Zeichen des oxidativen Stresses bei gleichzeitigem Verlust an GSH-Px- und SOD-Aktivität (enzymatische Antioxidantien) gefunden^{290,291}. Relevante Ursachen für die Entstehung des oxidativen Stresses während der viralen Myokarditis können zytokinbedingte Induktion, inflammatorische Stimuli, hoher O₂-Verbrauch und genetische Prädisposition sein. Das bei der hämodynamischen Dysfunktion verstärkt sezernierte Angiotensin II scheint ebenfalls an der Initialisierung und Aufrechterhaltung des oxidativen Stresses beteiligt zu sein. Zytokine, die an der Pathogenese der Myokarditis beteiligt sind (TNF- α , IL-1 β , TGF- β), können auch ihrerseits oxidativen Stress initialisieren. So verursacht TNF- α über die Bindung an NF- κ B die ROS-Entstehung und die mitochondriale Dysfunktion. Auf diesen Sachverhalt werden auch die zytotoxischen Eigenschaften von TNF- α zurückgeführt^{292,293}.

Verschiedene Tiermodelle (Kaninchenseptum, isoliertes Rattenherz und Papillarmuskel)^{294,295} belegten funktionelle Einschränkungen und strukturelle Änderungen im Myokard, bedingt durch eine gesteigerte ROS-Bildung. Es kam zu Reaktionen mit Biomolekülen und daraus resultierenden Schädigungen des Herzmuskelgewebes. Über Lipidperoxidation und Oxidation von Thiolgruppen resultierten Veränderungen in der Formation der Nukleinsäurebasen, es entstanden dysfunktionelle Membranstrukturen und zum Teil vollständige Membrandestruktionen²⁹⁶.

In experimentellen Arbeiten erwies sich das Superoxidanion als am meisten schädigend für Kardiomyozyten in CVB-3-infizierten Mäusen²⁹⁷. Das Superoxidanion bewirkt über Lipidperoxidation die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) in den Endothelzellen der Gefäße und ermöglicht durch die Anheftung und Einwanderung von Monozyten, Makrophagen und weiteren Leukozyten in das myokardiale Gewebe die Inflammation. Das aus der Dismutation des Superoxidanions resultierende Wasserstoffperoxid (s. Kap. 2.6.6) bewirkt allein keine signifikante Myozytenschädigung²⁹⁷, begünstigt aber auch die Inflammation im myokardialen Gewebe: H₂O₂ aktiviert die Myosinkinase der Endothelzellen, wodurch es zur Kontraktion und anschließender Formveränderung der Endothelzellen kommt. Die Folge sind gestörte Zell-Zell-Kontakte mit erhöhter Permeabilität und Einwanderung von inflammatorischen Zellen.

Erwiesen ist außerdem, dass Superoxide durch Störung der Ca²⁺-Aufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum die Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration behindern und damit die myokardiale Kontraktionsfähigkeit senken^{298,299}. Weiterhin wird durch ROS der Ca²⁺/Na⁺-

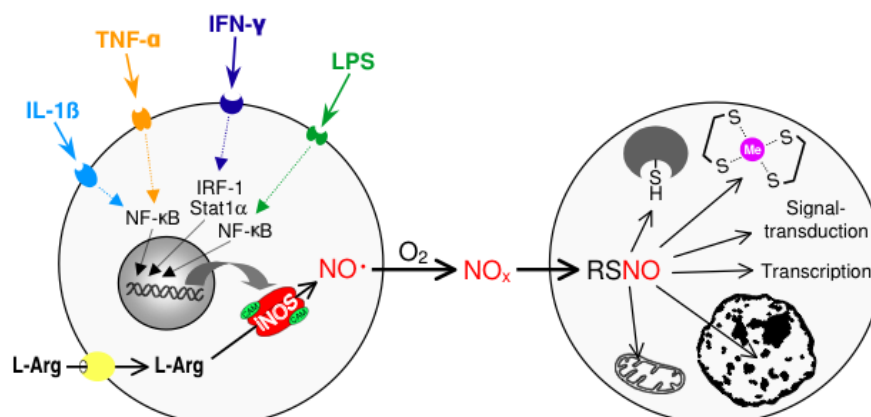
Austausch, die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase, sarkolemmaler Ca²⁺-ATPase und myofibrillärer ATPase behindert. Es kommt zur Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und Glykolyse.

Sauerstoffradikale gelten als potente Induktoren und Mediatoren der Myozytenhypertrophie³⁰⁰. Durch zusätzliche Stimulation der Fibroblastenproliferation in der extrazellulären Matrix nehmen Sauerstoffradikale eine Schlüsselrolle in der Induktion des myokardialen Remodelings ein^{186,301}. Darüber hinaus wird durch den oxidativen Stress die Apoptose in den Kardiomyozyten ausgelöst, welche die dilatative Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz zur Folge hat^{302,303}. In der experimentellen Coxsackievirus-Myokarditis korrelierte das Ausmaß des oxidativen Stresses mit dem Umfang der Kardiomyozytenapoptose, wobei die Phase mit den geringsten Glutathion-Plasmakonzentrationen als am meisten gefährdet für das Apoptoserisiko identifiziert wurde³⁰⁴.

2.6.3 Nitritoxidradikal (NO[•])

NO gehört zu den wichtigen bioaktiven Molekülen mit regulatorischen, zytotoxischen und zyto- protektiven Eigenschaften. Die Synthese von NO aus L-Arginin wird durch das Enzym NOS (nitric oxide synthetase) katalysiert. Die Expression der induzierbaren Form der NOS – iNOS – wird durch Zytokine reguliert und ist in die komplexe myokardiale Immunantwort bei der Entero- virusinfektion eingebettet. Die induzierbare Isoform wird erst nach inflammatorischen Stimuli exprimiert. Die iNOS-Produktion konnte sowohl in akuter als auch in chronischer Myokarditis- Phase bei CVB-3-infizierten NMRI-Mäusen nachgewiesen werden. Dabei war das Expressions- profil von TGF-β dem von iNOS sehr ähnlich³⁰⁵.

Durch Zytokinfreisetzung während der viralen Myokarditis (z.B. TNF-α, IL-1β) können über zel- luläre Rezeptoren Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, welche die Expression von iNOS bewirken. Gebildete Nitritoxidradikale diffundieren aus der Zelle und können mit Sauerstoff zu höheren Stickoxiden (NO_x) reagieren. Durch S-Nitrosothiole (RSNO) wird NO intrazellulär ange- reichert und führt zur Blockade der mitochondrialen Atmung und DNA-Schädigung. Gleichzeitig



kommt es zur Beein- trächtigung der intrazel- lulären Signaltransduk- tion und Transkription. Darüber hinaus vermit-

Abb. 2.13

Mechanismus der iNOS- Aktivierung und NO-Wir- kungen (aus Sies et al.)³⁰⁶

telt RSNO die Hemmung Thiolgruppen-abhängiger Enzyme sowie die Freisetzung von Metallen aus Metall-Schwefel-Komplexen.

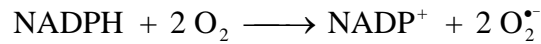
Die Rolle von NO hat in der virusinduzierten Myokarditis divergente Funktionen: Einerseits verursacht NO direkt antivirale Effekte in CVB-3-infizierten Mäuseherzen durch die direkte Suppression der viralen Proteinase³⁰⁷. Andererseits führt der oxidative, nitrosamine Stress zum programmierten Zelltod der Kardiomyozyten³⁰⁸. Weiterhin induziert NO Matrixmetalloproteinasen, die den Umbau der extrazellulären Matrix bewirken. Deswegen führt die unkontrollierte NO-Synthese durch aktivierte Makrophagen zur kardialen Gewebeschädigung und bedarf einer Regulation. Ein bedeutsames Zytokin in dieser Hinsicht ist IL-10, welcher die Down-Modulation der Makrophagen-Aktivität herbeiführt³⁰⁹. IFN- γ vermag dagegen, die iNOS-Expression in Makrophagen zu initialisieren und zu stimulieren, wodurch die NO-Produktion gesteigert und die coxsackievirale Replikation inhibiert wird¹⁹⁴. In der akuten Myokarditis-Phase bedeutet die iNOS-Induktion Schutz vor dem letalen Ausgang, virale Reduktion und Protektion des kardialen Gewebes¹⁹⁴. Aus diesem Grund konnte in IL-10-defizienten Mäusen, ungeachtet der erfolgreichen kompletten Elimination des CVB-3 während der akuten Myokarditis-Phase, eine persistierende iNOS-mRNA-Expression und progressive myokardiale Schädigung auch nach dem Abklingen der akuten Phase registriert werden. Die banale Erklärung für dieses Phänomen ist die fehlende IFN- γ -Inhibition durch IL-10 in IL-10-defizienten Mäusen³¹⁰.

2.6.4 NADPH-Oxidase (Nox)

Die bedeutendste Quelle für ROS-Bildung im Herzen und im Gefäßsystem ist die NADPH-abhängige Oxidase. Es handelt sich hierbei um einen membranassoziierten Enzym, von welchem zwei Arten unterschieden werden: die sogenannte phagozytäre NADPH-Oxidase, welche in den Membranen des Phagozyten-Systems (neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) vorkommt, und die vaskuläre NADPH-Oxidase welche in Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen exprimiert wird³¹¹. Zwischen den beiden Formen bestehen zelltypspezifische Unterschiede in der Zusammensetzung der Nox³¹² und in der Aktivität bezüglich der Superoxid-Produktion. So ist die Produktivität der Nox in den Granulozyten durch geeignete Stimuli sehr schnell und stark induzierbar („oxidative burst“)³¹³. Dagegen erfolgt die ROS-Bildung in den vaskulären Zellen eher statisch und in geringerem Ausmaß³¹⁴.

Vermittelt durch die Proteinkinase C wird die membranständige NADPH-Oxidase aktiviert, wodurch der Transfer eines Elektrons vom zytoplasmatischen NADPH auf extrazellulären O₂ unter Bildung von reduziertem Superoxidradikal katalysiert wird. Das entstandene Superoxidradikal wird anschließend zu Wasserstoffperoxid und zu anderen toxischen Sauerstoffformen umge-

wandelt. H_2O_2 , Chlor und Myeloperoxidase (MPO) der Phagozyten bilden ein System, welches hochtoxische Substanzen hervorbringt: Hypochlorit (Chloridooxygenat = OCI^-) und molekularer Chlor (Cl_2). Diese Substanzen oxidieren und halogenieren die Bestandteile von Bakterien und Tumorzellen, bewirken in größeren Konzentrationen aber auch starke Schäden am körpereigenen Gewebe.



Die NADPH-Oxidase besteht mit 4 Untereinheiten aus einer membranösen und einer zytosolischen Komponente: p47phox und p67phox sind im nichtaktivierten Zustand zytosolisch lokalisiert, p22phox und gp91phox sind membrangebunden. Bei Aktivierung der Nox kommt es zur membranassoziierten Komplexbildung aller vier Untereinheiten.

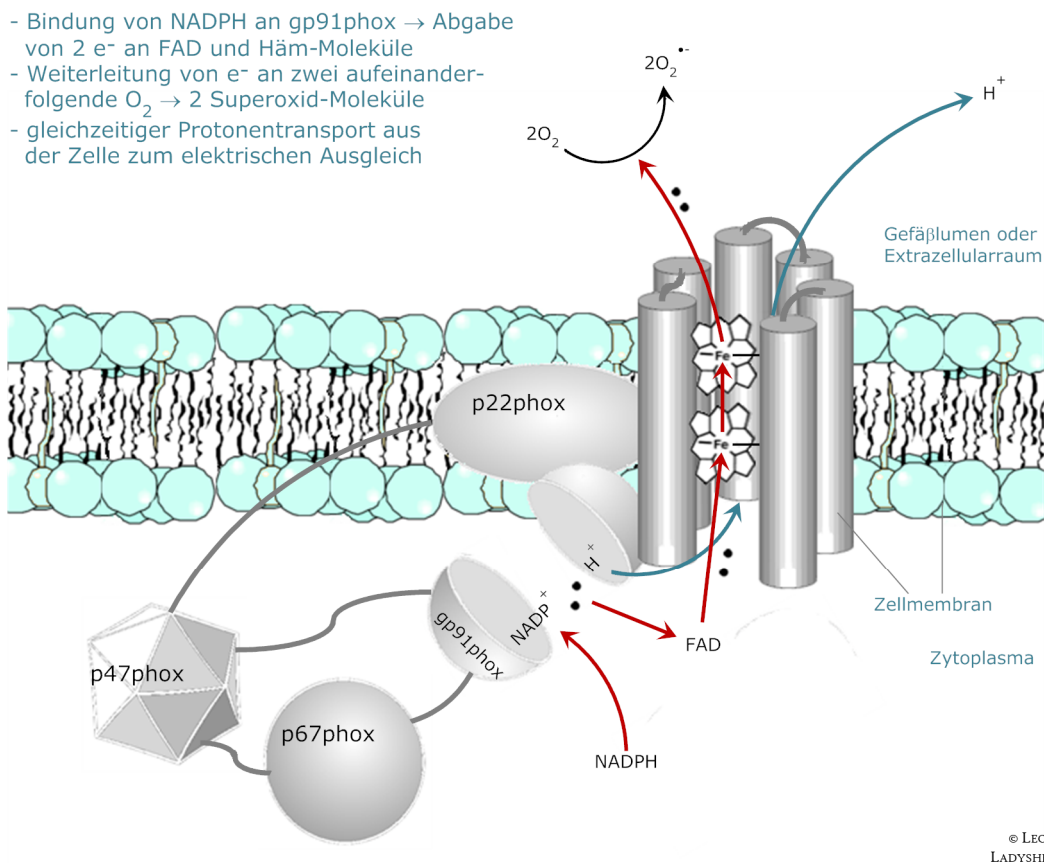


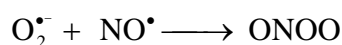
Abb. 2.14 Nox-vermittelte Oxidierung von NADPH

Expression und Aktivität der NADPH-Oxidase wird vielseitig reguliert. Eine besondere Bedeutung der Nox-Aktivierung und damit der Stimulation der Superoxidproduktion wird dem Angiotensin II über den AT₁-Rezeptor zugemessen³¹⁵. Angiotensin II aktiviert in den Fibroblasten die Untereinheit p67phox, in den Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen wird die Expression von p22phox, p47phox, p67phox und gp91phox stimuliert.

Up-Regulation der vaskulären Nox	Down-Regulation der vaskulären Nox	Tab. 2.5 Überblick über die Induktion und Inhibition der vaskulären Nox
Angiotensin II ³¹⁶ PDGF Thrombin Zytokine (IL-1 β , TGF- β , TNF α) ³¹⁷ PGF2	AT ₁ -Rezeptor-Blocker ³¹⁸ Statine (Lipidsenker) (Inhibition von gp91phox) ³¹⁹ PPAR (peroxisom proliferator-activated receptor) Östrogene (Inhibition von gp91phox)	

Einen stimulierenden Effekt auf die Nox-Expression und -Aktivität haben auch verschiedene Zytokine (IL-1 β , TNF- α , TGF- β), deren verstärkte Expression während der viralen Myokarditis und der InfCM erwiesen ist (s. Kap. 2.3.2). Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Regulation sind bis heute nicht ausreichend geklärt.

Die NADPH-Oxidase vermag auch die iNOS zu aktivieren³²⁰ und so den nitrosaminen Stress zu induzieren. Das durch die NADPH-Oxidation entstehende Superoxidanion kann zusätzlich mit NO \cdot reagieren, wobei das schwer zytotoxische Peroxynitrit (ONOO) entsteht³²¹. Durch die Beeinträchtigung der Proteinstruktur kommt es zu gravierenden Störungen der Signaltransduktion.



2.6.5 Antioxidatives System

Die Protektion vor übermäßigem Anfall an ROS wird auf 3 Ebenen reguliert:

1. Inhibition der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies;
2. Hemmung der ROS-Wirkungen;
3. Beseitigung und Reparatur der durch ROS verursachten Schäden.

Antioxidative Schutzmechanismen sind auf der 2. und 3. Ebene wirksam. Das antioxidative System besteht aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Komponenten (Tab. 2.6).

Nichtenzymatisches System	Enzymatisches System
α -Tocopherol (Vitamin E) β -Carotin (Vitamin A-Vorstufe) Ascorbat (Vitamin C) Glutathion Harnsäure Bilirubin Thiolgruppen Selen	Glutathionperoxidase (GSH-Px) Glutathion-S-Transferase Superoxiddismutase (SOD) Katalase (CAT)

Tab. 2.6 Wichtige Bestandteile des antioxidativen Systems

Da Metallionen wie Eisen oder Kupfer die Oxidation fördern, sind metallionenbindende Proteine wie Transferrin, Haptoglobin und Caeruloplasmin ebenfalls antioxidativ wirksam. Moleküle, die Radikalschäden in Zellen minimieren – Heat-Shock-Proteine (HSP's) –

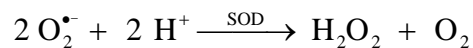
müssen ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt werden. HSP's sorgen für den Erhalt der räumlichen Struktur der Proteine durch Stabilisierung der Tertiär- und Quartärstruktur sowie der DNA-Doppelhelix. Die Denaturierung von funktionsgestörten Proteinen wird durch HSP's gefördert^{322,323}.

Die enorme Wichtigkeit des natürlichen antioxidativen Systems wurde in vielen klinischen und experimentellen Studien deutlich gemacht. So erlitten z.B. CVB-3-infizierte Mäuse mit einer diätetisch erzeugten Vitamin-E-Defizienz massive Herzschäden³²⁴.

2.6.6 Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD)

Bereits in den 80er Jahren ist die protektive Funktion des Enzyms Superoxiddismutase (SOD) bei experimenteller Myokarditis beschrieben worden³²⁵. Die SOD liegt in eukaryonten Zellen in zwei Isoenzymformen vor, welche in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind: zytoplasmatisches und mitochondriales Isoenzym.

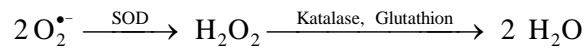
Die induzierbare Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD) ist in erster Linie in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und stellt einen primären Abwehrmechanismus gegenüber ROS-Schädigungen in sauerstoffmetabolisierenden Zellen dar³²⁶. Bereits physiologischerweise in geringer Menge in der Atmungskette im Rahmen der mitochondrialen Oxidation entstehende Sauerstoffradikale werden durch die MnSOD zu H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) und O₂ metabolisiert³²⁷. Dabei nimmt das Superoxidanion einen Elektronen auf. Die MnSOD-katalysierte Dismutation von reduziertem Superoxidanion zählt mit zu den schnellsten enzymatischen Reaktionen im Organismus.



Das mitochondriale Isoenzym der MnSOD stellt einen Tetramer mit einem Molekulargewicht von 80.000 Da dar, bei welchem im aktiven Zentrum dreiwertiges Mangan gebunden ist. Für die katalytische Funktion ist das Mangan unabdingbar. Der katalytische Beitrag von MnSOD an der Gesamtaktivität des Herzens beträgt rund 10% der Gesamt-SOD-Aktivität. Die Synthese von MnSOD passt sich dem jeweiligen intrazellulären Superoxid-Anfall an und kann als Antwort auf oxidativen Stress deutlich gesteigert werden^{328,329}. Einerseits kann die MnSOD-Produktion direkt durch ROS stimuliert werden, andererseits können Zytokine wie TNF- α und IL-1 β über die Bindung an NF- κ B die MnSOD-Expression in den Mitochondrien induzieren und steigern^{330,331}.

Außer der bekannten protektiven MnSOD-Funktion wird der MnSOD auch ein, unter bestimmten Bedingungen, schädigender Effekt angelastet: Bei einer insuffizienten Inaktivierung von dem aus der Reduktion des Superoxidanions anfallenden H₂O₂ durch die Vertreter des antioxidativen Systems (Katalase, Glutathion), kann MnSOD durch die exzessive H₂O₂-Produktion eine prooxidative Eigenschaft annehmen³³². Wasserstoffperoxid ist kein Radikal, gehört aber zu ROS, da es leicht reaktive Verbindungen eingeht. So werden von H₂O₂ die Enzyme der Glykolyse gehemmt und in Gegenwart von Fe²⁺ zahlreiche organische Moleküle oxidiert, wodurch

Zell- und Membranschädigungen entstehen. Damit ist in der antioxidativen Abwehr die Balance zwischen SOD und peroxidreduzierenden Enzymen von enormer Bedeutung³³³.



Deutlich positive Effekte der MnSOD erbrachte die Untersuchung der Überlebensrate von kardialen Fibroblasten unter oxidativem Stress: Im Mäusemyokard wurden Kontroll-Fibroblasten und genetisch veränderte, MnSOD-überexprimierende Fibroblasten unter normalen (20% O₂) und hyperoxischen (85% O₂) Bedingungen kultiviert. Auf den Phasenkontrast-Bildern konnte eine deutlich höhere Überlebensrate unter oxidativem Stress bei den MnSOD-überexprimierenden Fibroblasten beobachtet werden³³⁴.

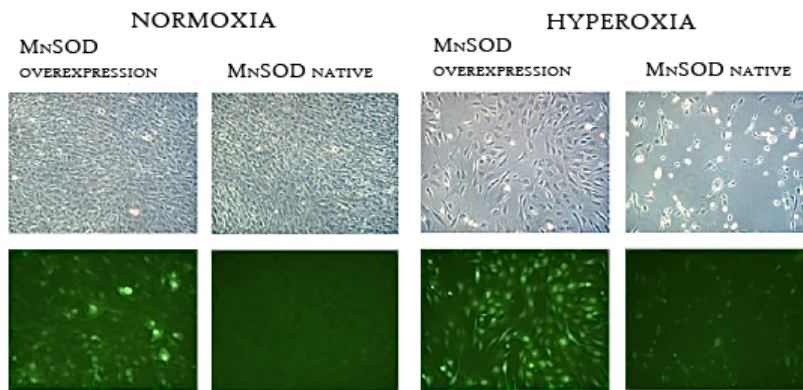


Abb. 2.15

Phasenkontrastaufnahmen: protektiver MnSOD-Effekt bei oxidativem Stress. Die MnSOD-Überexpression ist durch die grüne Fluoreszenz erkenntlich – linke Bildseite und Bildmitte (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. Braun, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim)³³⁴

Versuche an transgenen Tieren haben außerdem gezeigt, dass eine Überexpression der SOD die toxischen Wirkungen einer Hyperoxie herabsetzt³³⁵, während die Deletion des Gens für die kardiale mitochondriale SOD zur verstärkten Superoxidbildung führt und die Hyperoxie-Wirkungen steigert^{335,336}.

2.7 Myokardiales Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

2.7.1 Systemisches und lokales RAAS

Das RAAS stellt einen wichtigen Kompensationsmechanismus bei kardialen dekompensatorischen Erkrankungen dar. Es wird das klassische, renal-endokrine RAAS von lokalen Renin-Angiotensin-Systemen unterschieden. Seit bereits 20 Jahren ist bekannt, dass einzelne Organe lokale Angiotensin-II-generierende Systeme besitzen, die vom endokrinen RAAS völlig unabhängig sind³³⁷. Für nahezu alle Komponenten des RAAS wurde die RNA-Expression der verantwortlichen Proteine in Geweben, wie Niere, Nebenniere, Herz³³⁸, Gefäßmuskulatur und Gehirn nachgewiesen^{339,340}. Während systemische RAAS-Mechanismen, etwa bei akut eintretendem Blutdruckabfall infolge der kardialen Dekompensation, kompensatorisch wirken und die

Organperfusion aufrechterhalten, werden die gewebeständigen Systeme bei chronischer Aktivierung für die negativen funktionellen und strukturellen Veränderungen von Niere, Gefäßen und Herz verantwortlich gemacht. Die Effektor-Substanz des RAAS – das Angiotensin II (Ang II) – vermittelt seine Wirkung über die beiden Rezeptorenarten AT₁ und AT₂.

Im ersten Schritt der RAAS-Kaskade wird aus Angiotensinogen, katalysiert durch die Endopeptidase Renin, Angiotensin I (Ang I) gebildet. Prorenin wird in extrarenalen Geweben ausschließlich in sehr geringen Mengen freigesetzt. Die Renin-Sekretion wird durch intrahepatische, sympathische und humorale Mechanismen geregelt. Vasokonstriktion (z.B. durch Ang II ausgelöst) und Volumenexpansion der Extrazellulärflüssigkeit hemmen die Renin-Freisetzung im Sinne eines negativen Feedbacks. Allerdings kann Ang I auch unabhängig von Renin über Enzymsysteme wie Tonin und Cathepsin G von Angiotensinogen abgespalten werden³⁴¹.

Während unter physiologischen Bedingungen die Zinkmetallopeptidase – Angiotensin converting enzyme (ACE = Kininase II) – vor allem im Endothel der kleineren Arterien und Arteriolen zu finden ist, erfolgt im Rahmen des kardialen Remodelings eine Induktion in Kardiomyozyten und Fibroblasten²⁴⁰. Durch ACE wird die Umsetzung des nahezu inaktiven Ang I in das aktive Ang II katalysiert. Ang II entfaltet bei intravenöser Applikation eine ca. 100-fach größere Wirkung an peripheren Gefäßen als Ang I³⁴². ACE ist allerdings nicht spezifisch für Ang I, da die Inaktivierung von Bradykinin und von anderen vasoaktiven Peptiden auch durch ACE initialisiert wird. Am Herzen findet sich eine homogen verteilte ACE-Aktivität in Herzklappen, Vorhöfen, Koronararterien und in den Ventrikeln³⁴³. Eine Konversion von Ang I zu Ang II konnte auch am isolierten Rattenherz nachgewiesen werden^{342,344}.

Ang II kann auch über einen alternativen Weg aus Ang I gebildet werden: Enzyme wie Trypsin, Cathepsin oder auch die Serinprotease Chymase, ein in kardialen Mastzellen gebildetes Enzym, vermögen unabhängig von ACE Ang II aus Ang I zu bilden³⁴⁵. Auch kann Ang II ACE-unabhängig über Substanzen wie, Tonin, tPA (tissue plasminogen activator) und Cathepsin G direkt aus Angiotensinogen abgespalten werden³⁴⁶. Von besonderer Bedeutung scheint die kardiale Chymase zu sein, die hochspezifisch Ang II generiert. In tierexperimentellen und klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass mehr als 80% der Ang-II-Bildung im Herzen und mehr als 60% in den Gefäßen durch Chymase vermittelt sind^{347,348}. ACE-Inhibitoren können die Chymase nicht hemmen, aber spezifische Chymaseinhibitoren (z.B. Chymostatin) verbessern die Herzfibrose und verringern die Ang-II-induzierte TGF- β -Expression in Tiermodellen^{349,350}.

Vermittelt durch die Aminopeptidase A, entsteht nach der Abspaltung von zwei Aminosäuren aus Ang II – Angiotensin III (Ang III). Die meisten pharmakologischen Wirkungen von Ang III entsprechen denen von Ang II, allerdings hat Ang III eine viel kürzere Plasmahalbwertszeit

(< 120 Sek.). In der Niere kann Ang III durch Peptidasen zu Ang IV metabolisiert werden³⁵¹, welches über spezifische AT₄-Rezeptoren, die nicht durch Sartane antagonisiert werden, profibrogene Wirkungen (bisher nur an der Niere erwiesen) entfaltet³⁵². Der endgültige Abbau der Angiotensine I – IV zu inaktiven Fragmenten erfolgt durch sogenannte Angiotensinasen.

Ein alternativer Weg der Ang-I-Umsetzung wird über ACE 2 katalysiert. ACE 2 ist ebenfalls eine Zinkmetallopeptidase und das einzige bekannte Homolog von ACE beim Menschen³⁵³. Ang I wird in das Angiotensin 1-9 gespalten, welches anschließend über das „klassische“ ACE zu Angiotensin 1-7 metabolisiert wird³⁵³. Dem Angiotensin 1-7 werden konträre Wirkungen von Angiotensin II zugeteilt. So induziert Angiotensin 1-7 beispielsweise Vasodilatation, Prostaglandin- und Bradykininsynthese und wirkt antifibrotisch^{237,354}.

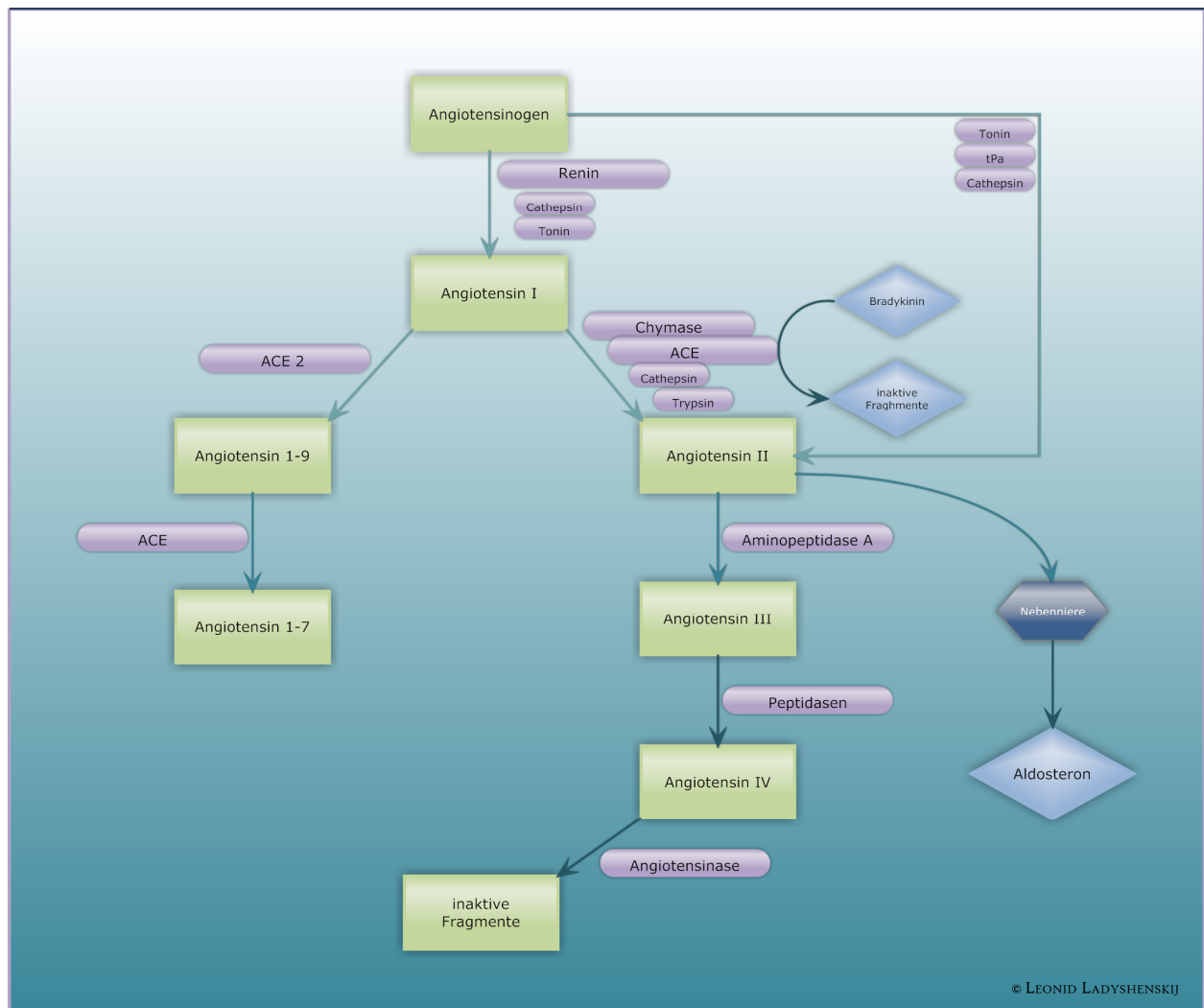


Abb. 2.16 Mechanismen der RAAS-Aktivierung

2.7.2 Angiotensinogen

Das einzig bekannte Substrat für Renin ist Angiotensinogen. Es handelt sich um einen α_2 -Globulin mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa. Angiotensinogen wird vorwiegend in der Leber synthetisiert, aber auch eine rein kardiale Expression, vornehmlich in den Kardiomyozyten, wurde nachgewiesen²⁴⁰. Glukokortikoide, Östrogene, Schilddrüsenhormone und Ang II stimulieren die Angiotensinogenproduktion und -freisetzung³⁵⁵. Angiotensinogen wird durch Renin in das weitestgehend inaktive Ang I umgesetzt und bildet damit die Vorstufe der Effektor-Substanz Ang II.

2.7.3 Angiotensin II und seine Rezeptoren

Beide Ang-II-Rezeptorenarten, AT₁- und AT₂-Rezeptor, haben die Konfiguration von sieben Transmembrandomänen, aber nur etwa 34% Proteinhomologie. Auch die Signaltransduktionswege unterscheiden sich (s. unten). Die Aminosäuresequenz der beiden Rezeptoren scheint über alle Spezies stabil zu sein sowie innerhalb der einzelnen Geweben in den Spezies³⁵⁶. Die Zuweisung der beiden Rezeptorenarten während der akuten und chronischen Phase der viralen Myokarditis ist bislang nicht bekannt.

Im Herzen überwiegen zahlenmäßig bei weitem die AT₁-Rezeptoren, AT₂-Rezeptoren sind nur gering exprimiert³⁵⁷. Untersuchungen mittels single-cell-RT-PCR ergaben beispielsweise, dass ungefähr 40% der reifen Ratten-Kardiomyozyten AT₁-Rezeptoren exprimieren, jedoch nur auf ungefähr 10% der Zellen AT₂-Rezeptoren zu finden sind³⁵⁸. Während der AT₁-Rezeptor bei physiologischen Bedingungen als der Effektor-Rezeptor von Ang II betrachtet wird, scheint der AT₂-Rezeptor die Rolle eines Modulators zu spielen, die unter pathophysiologischen Umständen durch die verstärkte AT₂-Rezeptor-Expression und die zum AT₁-Rezeptor antagonistischen Wirkungen in Erscheinung tritt³⁵⁹.

Rezeptor	Lokalisation	Funktion
AT ₁	Gefäße, Herz, Gehirn, Niere, Nebenniere, Nervengewebe	<ul style="list-style-type: none"> ○ Vasokonstriktion ○ Sympathikus-Aktivierung ○ Inotropie ↑ ○ Chronotropie ↑ ○ Na⁺-Retention ↑ ○ Endothelin-Sekretion ↑ ○ Vasopressin-Sekretion ↑ ○ Renin-Sekretion ↓ ○ Myozytenhypertrophie ○ Kardiale und vaskuläre Fibrose ↑ ○ Superoxidbildung ↑
AT ₂	Nebenniere, Herz, Gehirn, Myometrium, Foetus, geschädigtes Gewebe	<ul style="list-style-type: none"> ○ Zelluläre Antiproliferation ○ Zelldifferenzierung ○ Gewebereparatur ○ Apoptose ○ Vasodilatation ○ Bradykinin-Sekretion ↑ ○ Prostaglandin-Sekretion ↑
AT ₃	Neuroblastomzellen	○ unbekannt
AT ₄	Gehirn, Herz, Lunge, Gefäße, Prostata, Nebenniere, Niere	<ul style="list-style-type: none"> ○ Vasodilatation (renal) ○ Plasminogen-Stimulation

Tab. 2.7 Funktion und Lokalisation der Ang-II-Rezeptoren³⁵⁶

2.7.3.1 AT₁-Rezeptor

AT₁-Rezeptoren sind an heterotrimere G-Proteine gekoppelt und induzieren verschiedene Signaltransduktionswege, wie z.B. die Aktivierung der Phospholipase C, Inhibition der Adenylatcyclase, Stimulierung von Tyrosinkinasen und anderer Second messenger³⁶⁴. Der Rezeptor ließ sich in der Gefäßmedia, in der Leber, der Niere, der Nierenrinde, dem Gehirn und dem Herzen finden^{365,366,367}. Der AT₁-Rezeptor ist in seiner Expression variabel und kann durch unterschied-

Up-Regulation ^{360,361}	Down-Regulation ^{362,363}
Glukokortikoide	Serumzunahme
Cholesterin	Ang II
Insulin	Mineralkortikoide
IGF-1 (insulin-like growth factor)	all-trans-Retinsäure
EGF (epidermal growth factor)	Stickstoffmonoxid (NO)
Progesteron	Östrogen

liche Stimuli (z.B. Hypercholesterinämie, Osmolalitätsveränderung) hochreguliert werden. Ang II supprimiert dagegen die AT₁-Expression im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus^{364,369}.

Tab. 2.8 Regulation der AT₁-Rezeptor-Expression^{359,368}

Fast alle bekannten Ang-II-induzierten physiologischen und pathophysiologischen Funktionen werden über AT₁-Rezeptoren vermittelt^{364,369}. Im Herzen kann das Ang II durch Stimulation des Proteinkinase-C-Signalwegs positiv inotrop wirken, doch scheint dieser Effekt auf die Vorhöfe beschränkt zu sein. Durch Aktivierung der Tyrosinkinasen- und der NF-κB-Signaltransduktion kommt es zur Induktion der MAP-Kinasen, die mit Apoptose, Zellproliferation, Differenzierung, Transformation und Vasokonstriktion in Zusammenhang gebracht werden²²³.

Ang II kann über den AT₁-Rezeptor die JAK/STAT-Kaskade aktivieren. Besonders interessant ist die Aktivierung von diesem Signalweg bei kardialen pathologischen Prozessen³⁷⁰. Mehrere Protoonkogene (c-fos, c-jun, c-myc u.a.) und der Protoonkogen/Aktivator-Protein-1-Komplex werden vom JAK/STAT-Signalweg angesprochen²²³. Protoonkogene wirken als Transkriptionsfaktoren und veranlassen die Transkription von zahlreichen, für Kardiomyopathien bedeutsamen Substanzen (Tab. 2.9)^{359,368}.

Auf diesem Signaltransduktionsweg bewirkt Ang II zelluläres Wachstum, Zelladhäsion, und -migration, adaptive Prozesse bei myokardialem Remodeling, proinflammatorische und profibrogene Effekte. In kardialen Fibroblasten wird die Expression von TNF-α und IL-6 induziert, in den Kardiomyozyten wird die TGF-β-Expression stimuliert^{224,371}.

Lokal-kardiales Ang II, über die Chymase generiert, übt auf die Blutdruckregulation keinen we-

Wachstumsfaktoren: PDGF (platelet-derived growth factor) EGF (epidermal growth factor) TGF-β (transforming growth factor β) IGF-1 (insulin-like growth factor 1) bFGF (basic fibroblast growth factor) PAF (platelet-activating factor)
Vasokonstriktorische Substanzen: ET-1 (Endothelin-1)
Adhäsionsmoleküle: ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) E-Selectin
Integrine
TNF-α (tumor nekrosis factor α)

Tab. 2.9 Durch den JAK/STAT-Signalweg induzierte Substanzen

sentlichen Einfluss aus, ist aber auf lokaler Ebene für die strukturellen Umbaumaßnahmen hochwirksam^{243,372}. Mit Ang II sind auch die anderen Komponenten des kardialen RAAS im kardialen Remodeling-Prozess integriert. Ang II induziert die Hypertrophie der kardialen Myozyten und steigert die kardiale Fibroblastenproliferation mit Kollagensynthese²³⁹. Dies geschieht insbesondere über Ang-II-induzierte Produktionssteigerung von TGF- β_1 (s. Kap. 2.5.4). So zeigten TGF- β_1 -defiziente Mäuse nach Behandlung mit Ang II keine signifikante linksventrikuläre Massenänderung, während Wild-Typ-Mäuse deutliche Hypertrophie und kardiale Dysfunktion hervorbrachten³⁷³. Außerdem wird über den AT₁-Rezeptor durch die induzierbare Cyclooxygenase 2 (COX-2) die Biosynthese der MMPs gefördert³⁷⁴. Abgesehen von der Fibronektin- und Kollagen-Synthese wird durch Ang II auch die Produktion anderer, am kardialen Remodeling beteiligter ECM-Komponenten, solcher wie Proteoglykane, Glykosaminoglykane, Tenascin, Chondroitin- und Dermatansulfate, stimuliert^{375,376}.

Ang II fördert die Inflammation einerseits durch Expressionssteigerung von Adhäsionsmolekülen und die Induktion von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), und andererseits über die Aktivierung von NF- κ B^{377,378}. NF- κ B stimuliert die Produktion proinflammatorischer Zytokine, fördert die Immunantwort und ist am kardialen Remodeling mitbeteiligt (s. Kap. 2.4.6). Bei EMCV-infizierten AT₁-Rezeptor-knockout-Mäusen wurde bewiesen, dass über den kardialen AT₁-Rezeptor ein proinflammatorischer Ang-II-Effekt erzwungen wird. Nach intravenöser Ang-II-Injektion kam es zur NF- κ B- und Zytokin-Aktivierung (TNF- α und IL-1 β) im Herzgewebe der Wild-Mäuse, aber nicht in den knockout-Mäusen. Die letzteren wiesen eine signifikant höhere Überlebensrate, geringeren Ausmaß der zellulären Infiltration und der Nekrose auf³⁷⁹.

Über die Aktivierung der NADPH-Oxidase stimuliert Ang II die Produktion von Peroxiden in Makrophagen und induziert so den oxidativen Stress^{315,380}. Der Anstieg der Aldosteron-Produktion im Rattenherz wird ebenfalls durch die Wirkung von Ang II über den AT₁-Rezeptor auf kardiale Myozyten bedingt³⁸¹.

Der AT₁-Rezeptor wird im Maus- und Rattenmodell in AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor subklassifiziert^{367,382}. Der erstmalig aus Rinder-Nebennieren-Zel-

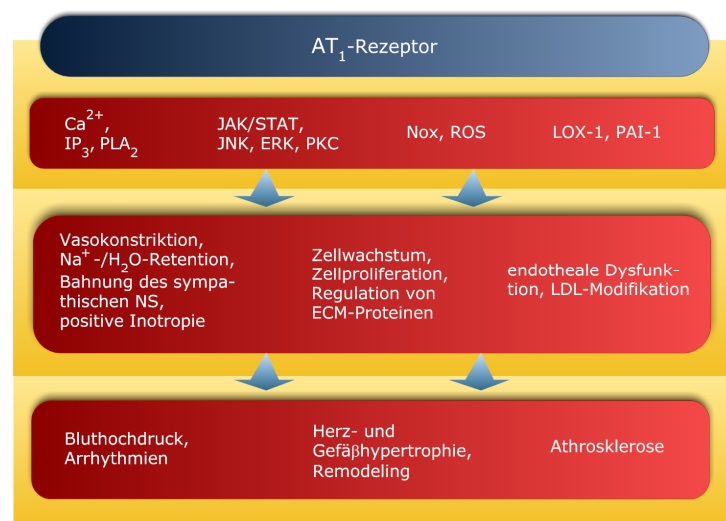


Abb. 2.17 Hauptsignalwege und AT₁-Rezeptor-vermittelte Effekte (aus Kaschina 2003)³⁶⁸

len³⁸² und glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte³⁸³ isolierte AT₁-Rezeptor wurde als AT_{1A}-Rezeptor bezeichnet. Die zweite Form des AT₁-Rezeptors – AT_{1B} – wurde aus der Ratten-Hypophyse³⁸⁴ und Ratten-Nebenniere³⁸⁵ isoliert. Dabei wiesen die beiden Subtypen eine sehr hohe Homologie ihrer Sequenzen, gleichartige Bindungsarten und analoge funktionelle Eigenschaften auf. Auch konnten bisher keine gravierenden qualitativen Differenzen der pharmakologischen Eigenschaften eruiert werden³⁸⁶. Beide Subtypen werden von zahlreichen Geweben (Niere, Nebenniere, Leber, Gehirn, Hypophyse, Hoden, Lunge, Herz, Aorta) im tierexperimentellen Modell exprimiert^{387,388}, wobei eine gewebespezifische mRNA-Regulation vorliegt^{385,387}. In den meisten Geweben ist der AT_{1A}-Rezeptor die quantitativ dominierende Isoform³⁸⁷.

In Bezug auf die menschliche Subtypisierung des AT₁-Rezeptors gibt es diskrepante Ergebnisse: Gemäß einer klinischen Studie beinhalten menschliche Gene die Subtypenklassifizierung des AT₁-Rezeptors³⁸⁹, während eine andere Arbeit das Vorhandensein eines beim Menschen nicht weiter differenzierbaren AT₁-Rezeptors ohne Subtypisierung postulierte³⁸⁴.

2.7.3.2 AT₂-Rezeptor

AT₂-Rezeptoren sind bei Erwachsenen in nur geringen Mengen in der Niere, in der Nebenniere, im Zentralnervensystem und im Herzen (Kardiomyozyten, Fibroblasten) nachzuweisen³⁵⁶. Sie scheinen in entzündlich veränderten und verletzten Geweben, aber auch bei experimenteller kardialer Hypertrophie, Myokardinfarkt sowie pathologischen Gefäßprozessen erneut gebildet und heraufreguliert zu werden. Im Gegensatz zu AT₁-Rezeptoren-Expression werden AT₂-Rezeptoren nicht durch hohe Ang-II-Spiegel supprimiert^{364,369}. Dennoch wird die AT₂-Rezeptor-Expression vielseitig reguliert (Tab. 2.10).

Über die Signaltransduktionswege des AT₂-Rezeptors ist wenig bekannt. Jedoch werden Serin- und Tyrosinphosphatasen, Phospholipase A2, Stickstoffmonoxid (NO) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) an der Beteiligung der Signalwege vermutet³⁸⁸.

Up-Regulation ^{360,361}	Down-Regulation ^{362,363}
Serumentzug	Erhöhung des Serumvolumens
Insulin	Lysophosphatsäure
IGF-1	Phorbolester
IFN-γ	Glukokortikoide
IL-1β	Wachstumsfaktoren: PDGF, NGF, EGF und bFGF

Tab. 2.10 Regulation der AT₂-Rezeptor-Expression³⁵⁹

Auch sind die physiologischen Effekte von Ang II über die AT₂-Rezeptoren nicht ausreichend untersucht. Jedoch wird postuliert, dass die Ang-II-Wirkung über den AT₂-Rezeptor grundsätzlich konträr derjenigen über den AT₁-Rezeptor ist^{359,390}. So kommt es beispielsweise durch die Aktivierung von AT₂-Rezeptoren zur Vasodilatation, möglicherweise verursacht durch die Freisetzung von NO und Bradykinin³⁹⁰. Auch andere AT₂-Rezeptor-vermittelte Effekte, wie Regeneration, Apoptose, Hemmung der Proliferation und Förderung der Zelldifferenzierung wurden

beschrieben³⁹⁰. Myokardhypertrophie, ECM-Fibrosierung und myokardiales Remodeling werden durch AT₂-Rezeptor-Aktivierung inhibiert²⁴⁰. So wurde experimentell demonstriert, dass transgene Mäuse mit einer kardialen AT₂-Rezeptor-Überexpression eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion während eines linksventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt aufwiesen³⁹¹. AT₂-Rezeptor-defiziente Mäuse waren normotensiv, zeigten jedoch eine verstärkte Reaktion auf Ang II. Außerdem wiesen diese Tiere einen Mangel an Bradykinin und NO auf, gleichzeitig waren die Konzentrationen an Prostaglandin E₂ und Prostazyklin deutlich erhöht^{356,392}. Andere Studien verwiesen auf einen eventuellen Antagonismus des AT₂-Rezeptors zum AT₁-Rezeptor auf der Ebene der Signalkaskaden, wodurch ebenfalls kardioprotektive Effekte entstehen könnten³⁹³.

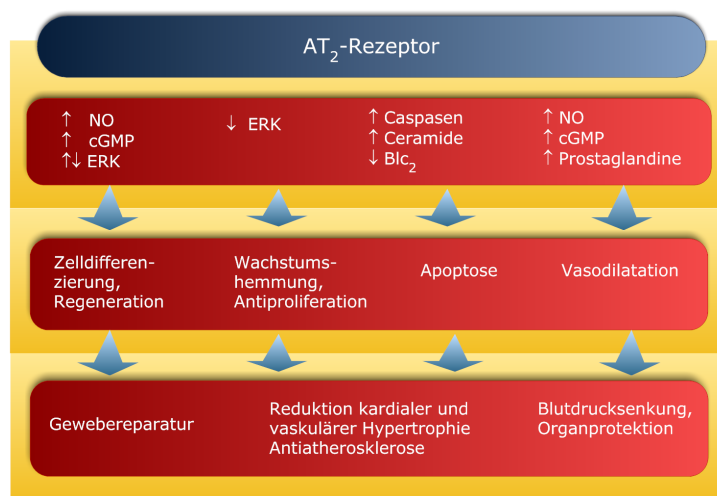


Abb. 2.18

Hauptsignalwege und AT₂-Rezeptor-vermittelte Effekte (aus Regitz-Zagrosek 2003)³⁵⁵

2.7.4 Kardialer Mineralkortikoid-Rezeptor und Aldosteron

Die Expression des Mineralkortikoid-Rezeptors von Aldosteron konnte im Herzen auf Myozyten, Endothelzellen und Fibroblasten diverser Spezies wie Ratten, Kaninchen und Menschen nachgewiesen werden^{394,395}. Auch die Enzyme der Aldosteronbiosynthese werden in extraadrenalen Geweben (Gefäßwand³⁹⁶, Myokard³⁹⁴) exprimiert, so dass eine kardiovaskuläre Aldosteron-Produktion möglich ist. Die Sekretion des Steroids, sowohl in der Nebennierenrinde als auch in anderen Organen, wird über den AT₁-Rezeptor durch Ang II stimuliert. Am Herzen ist Aldosteron an der Progression der Hypertrophie, an der interstitiellen Makrophagen-Infiltration und auch an fokal-kardialen inflammatorischen Läsionen wesentlich beteiligt³⁹⁷. Über die Aldosteron-vermittelte Induktion der ROS-Bildung und oxidativen Stress kann auch die kardiale pathognomische Gen-Expression induziert werden³⁹⁷. Darüber hinaus führt die direkte parakrine Aldosteronwirkung am Herzen zu vermehrter Kollagenablagerung und Myokardfibrose. Aldosteron potenziert die Wirkung von Ang II und verstärkt die durch Ang II induzierte Aktivierung der MAP-Kinasen^{395,398}.

3 Material und Methoden

3.1 Mausmodell

3.1.1 CVB-3-Virus

Um eine Myokarditis zu induzieren, wurden die Versuchstiere mit einer kardiotropen Variante des Coxsackievirus B3 (Nancy strain) infiziert. Das Virus wurde in einer Konzentration von 1×10^8 plaque forming units (PFU) in HeLa-Medium bei -80°C gelagert. Die Infektionsdosis von 5×10^5 PFU wurde zum Gebrauch schonend aufgetaut und in 0,2 ml $1 \times \text{PBS}^*$ gelöst.

3.1.2 Versuchstiere

Für die Versuchsreihe wurden ausschließlich männliche, sechs Wochen alte SWR/J (H-2q) Mäuse aus Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) verwendet. Diese wurden in Gruppen von 10 Tieren in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Makrolol III) auf staubfreiem Weichholzgranulat gehalten. Zur Akklimatisation an die konstanten Umweltbedingungen (Raumtemperatur: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit: $55 \pm 5\%$, Belichtung: im 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus) wurden zwei Wochen gewährleistet. Die Nahrung wurde kontinuierlich in Form von Pillen und sterilem Leitungswasser verabreicht. Die Tiere wurden täglich beobachtet, ihre Verhaltensweisen wurden protokolliert.

3.1.3 Gruppeneinteilung und Versuchsablauf

Insgesamt kamen 60 Tiere zum Einsatz, von denen 30 mit CVB-3 infiziert wurden. Den restlichen 30 Mäusen wurde eine äquivalente Menge $1 \times \text{PBS}$ als Scheininfektion injiziert (Kontrolltiere). Alle Tiere wurden zufällig auf 6 Gruppen verteilt (Tab. 3.1).

Versuchsgruppe	Anzahl der Tiere	Infektionsstatus
K ₄	n = 10	nicht infizierte Kontrollgruppe am 4. Tag p.i.
I ₄	n = 10	infizierte Gruppe am 4. Tag p.i.
K ₇	n = 10	nicht infizierte Kontrollgruppe am 7. Tag p.i.
I ₇	n = 10	infizierte Gruppe am 7. Tag p.i.
K ₂₈	n = 10	nicht infizierte Kontrollgruppe am 28. Tag p.i.
I ₂₈	n = 10	infizierte Gruppe am 28. Tag p.i.

Tab. 3.1 Gruppenverteilung

Am ersten Versuchstag (= Tag 0 p.i.) wurden die Gruppen I₄, I₇ und I₂₈ (n = 30) mit dem Coxsackievirus B3 mit einer Dosis von 5×10^5 PFU in 0,2 ml $1 \times \text{PBS}$ mittels intraperitonealer Injektion

* $1 \times \text{PBS}$ -Puffer = 150 mmol NaCl, 2 mmol KCl, 2 mmol KH₂PO₄

infiziert. Den Kontrolltieren ($n = 30$) der Gruppen K_4 , K_7 und K_{28} wurde 0,2 ml 1× PBS ohne Virus i.p. appliziert.

Die Tiere wurden am 4. (Gruppen K_4 und I_4), am 7. (Gruppen K_7 und I_7) und am 28. (Gruppen K_{28} und I_{28}) Tag p.i. getötet, nachdem die hämodynamischen Parameter ermittelt wurden. Die Saktifizierungstage 4, 7 und 28 sollten repräsentativ für die einzelnen Myokarditis-Stadien sein:

- 4. Tag p.i. – Ende der akuten (0. – 3. Tag p.i.) und Beginn der subakuten Myokarditis-Phase; der 4. Tag p.i. repräsentiert die in der Akutphase stattgefundenen Veränderungen und wird im weiteren als „spätakut“ bezeichnet;
- 7. Tag p.i. – manifeste subakute Myokarditis-Phase (4. – 14. Tag p.i.);
- 28. Tag p.i. – manifeste chronische Myokarditis-Phase (ab 15. Tag p.i.).

3.1.4 Hämodynamische Messungen

Die hämodynamische Messung erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. C. Tschöpe (Institut für Kardiologie und Pulmologie, Charité Campus Benjamin Franklin, Charité-Universitätsmedizin).

Am 4., 7. bzw. 28. Tag p.i. wurden die Tiere intraperitoneal anästhesiert, intubiert und maschinell beatmet. Um Manipulationen durch Katheterisierung über die Herzspitze bei offenem Thorax zu vermeiden, erfolgte die hämodynamische Messung am geschlossenen Thorax durch Einführung eines Millar-Tip-Katheters in die A. carotis externa. Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgte mit einem Mark VII Linearrecorder (Graptec Corp., Tokyo, Japan). Folgende hämodynamischen Parameter wurden erhoben:

- Linkventrikulärer endsystolischer Druck (LVsP)
- Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF)
- Linksventrikuläres endsystolisches Volumen (ESV)
- Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (EDV)
- Linksventrikuläres Schlagvolumen (SV)

3.1.5 Gewebeentnahme

Im Anschluss an die hämodynamischen Messungen wurden die Herzen unter sterilen Bedingungen entnommen. Nach Entfernen der intrakardialen Blutmenge wurden sie gewogen und zur späteren Protein- und mRNA-Extraktion in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

3.2 RNA-Präparation

Für die RNA-Präparation und die Reverse Transkription wurden ausschließlich sterile, RNase-freie Substanzen benutzt. Dazu wurden alle selbst hergestellten Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und autoklaviert, Glaswaren gebacken, Arbeitsflächen und Einmalhandschuhe mit RNase-Zap[®] behandelt.

3.2.1 RNA-Extraktion mittels TRIZOL[®]

Die RNA-Isolation wurde mit Trizol[®]-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Es handelt sich um die verbesserte Version der Ein-Stufen-Methode nach Chomczynski und Sacchi³⁹⁹. Die Herzproben wurden aus flüssigem Stickstoff direkt in 400 µl Trizol[®] gegeben, gewogen und mit Homogenisierstäbchen vollständig homogenisiert. Anschließend wurden 400 µl Trizol[®] nachgefüllt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 160 µl Chloroform und 15-sekündigem kräftigem Schütteln wurde erneut für 2 – 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden für 15 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert, wobei sich drei Phasen separierten. Die obere, wässrige, RNA-haltige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und in 500 µl Isopropanol gelöst, wodurch die RNA zur Fällung gebracht wurde. Der Ansatz wurde anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut bei 12.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert, wobei sich die RNA als Pellet absetzte. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet mit 800 µl 75%-igem Ethanol gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 7.500 g und 4°C. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet kurz an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die RNA in RNase-freiem Wasser bei 55°C 10 min lang gelöst.

Um die Konzentration und Qualität der RNA beurteilen zu können, wurde die photometrische Analyse bei 260 und 280 nm durchgeführt, wobei eine $A_{260/280}$ -Ratio von 1,6 – 1,8 als qualitativ gut definiert wurde.

3.2.2 DNase-Verdau

Vor der Umschreibung der RNA in die cDNA wurde eine DNA-Verdauung mit der RNase-freien DNase I[®] (Roche, Mannheim) vorgenommen, um chromosomale DNA aus den RNA-Proben zu eliminieren und damit Fehler bei der RT-PCR zu vermeiden. Dazu wurden 10 µg RNA in einem 50 µl Reaktionsgemisch (25 mmol Tris-HCl, 0,1 mmol EDTA, 5 mmol MgCl₂, pH 7,2) mit 25 U DNase I[®] für 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase wurden die Ansätze für 5 min bei 90°C inkubiert und dann für 3 min auf Eis gekühlt. Anschließend erfolgte eine β-Aktin-

PCR (s. Kap. 3.3) zur Überprüfung der vollständigen DNA-Eliminierung. Bei verbliebener DNA-Kontamination wurden weitere 25 U DNase I[®] in den Reaktionsansatz gegeben, erneut für eine Stunde verdaut und abschließend wieder eine Kontroll-PCR mit β -Aktin-Primern durchgeführt. Vollständig verdaute Proben wurden mehrmals photometrisch bei 260 und 280 nm erfasst und die Konzentration bestimmt.

3.2.3 cDNA-Synthese

Die in den gewonnenen und verdauten RNA-Proben enthaltene mRNA (messenger RNA) lässt sich mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umwandeln. Die cDNA kann direkt in der PCR eingesetzt werden.

Die *Reverse Transkription* (RT) erfolgte mit dem cDNA-Synthese-Kit (Promega, Mannheim). 1,5 μ g der gewonnenen RNA wurden in 10 μ l DEPC-H₂O gelöst, 10 min bei 70°C denaturiert und in einem 10- μ l-Reaktionsgemisch (2 μ l 10 \times RT-Puffer, 4 μ l 25 mmol MgCl₂, 2 μ l 10 mmol dNTPs, 0,5 μ l RNAsin[®], 0,5 μ l AMV Reverse Transkriptase, 1 mg Oligo(-dt)₁₅-Primer) bei 42°C für 40 min inkubiert. Anschließend wurde durch Erhitzen auf 95°C für 5 min und Abkühlen auf Eis für 3 min das Enzym inaktiviert. Zu den so gewonnenen 20 μ l cDNA wurden 40 μ l DEPC-H₂O hinzugegeben (= 60 μ l Gesamtvolumen) und bei -20°C gelagert*.

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.1 Prinzip der PCR

Das 1983 von Kary Mullis⁴⁰⁰ entwickelte Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (*PCR, polymerase chain reaction*) dient zur Amplifizierung, d.h. Vervielfachung einer spezifischen Sequenz eines DNA-Doppelstrangs. Durch Erhöhen der Temperatur auf 90°C kann der Doppelstrang in Einzelstränge (ssDNA) denaturiert werden. Rasches Abkühlen auf 50 – 60°C, sog. *Annealing*- oder *Hybridisierungstemperatur*, verhindert die Re-Assoziation der ssDNA und ermöglicht die Anlagerung von zwei Oligonukleotiden (*Primer*, Startermoleküle) an die komplementären 5'-Enden der Einzelstränge. Dieser Vorgang wird als *Primer-Annealing* oder *Primerhybridisierung* bezeichnet. Der Zusatz einer thermostabilen DNA-Polymerase katalysiert in Anwesenheit von einzelnen DNA-Nukleotiden (dNTPs) die Komplementierung der beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang. Die Reaktionstemperatur wird dazu auf das Optimum der Polymerase

* Für den Nachweis enteroviraler RNA wurde das gleiche Protokoll leicht modifiziert: statt des Oligo(-dt)₁₅-Primer wurde ein Random-Primer eingesetzt, da die virale RNA keinen Poly-A-Schwanz für die Anlagerung des Oligo(-dt)₁₅-Primer besitzt.

erhitzt. Die DNA-Polymerasen stammen von thermophilen Bakterien, behalten deswegen auch bei Temperaturen bis 100°C ihre Aktivität. Am Ende des ersten Zyklus entstehen also zwei Doppelstränge. Derartige Reaktionszyklen können mehrfach wiederholt werden und ergeben eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA.

3.3.2 Primer für den Nachweis des enteroviralen Genoms

Für die Amplifikation enteroviraler RNA wurden Primersequenzen in der nicht-kodierenden Region nahe dem 5'-Ende des Coxsackievirus-Genoms verwendet. Dieser Bereich ist durch eine hohe Homologie zwischen den einzelnen Enteroviren gekennzeichnet, so dass durch den Primer verschiedene Enterovirengruppen spezifiziert werden können. Für die nested-PCR wurde ein sekundäres Primerpaar gewählt (s. Kap. 3.3.5).

Template	Länge	Annea- lingtemp.	Zyklen	Primersequenz
β-Aktin	450 bp	60,0°C	23	5'-Primer: 5' - AGG GAA ATC GTG CGT GAC AT - 3' 3'-Primer: 5' - CAT CTG CTG GAA GGT GGA CA - 3'
CVB-3 RT-PCR	314 bp	60,0°C	30	5'-Primer: 5' - AGG GAA ATC GTG CGT GAC AT - 3' 3'-Primer: 5' - CAT CTG CTG GAA GGT GGA CA - 3'
CVB-3 nested-PCR	195 bp	55,0°C	35	5'-Primer: 5' - CGG TAC CTT TGT GCG CCT GT - 3' 3'-Primer: 5' - CAG GCC GCC AAC GCA GCC - 3'

Tab. 3.2 Primersequenzen für den Nachweis enteroviraler RNA und für β-Aktin zur internen Kontrolle

3.3.3 Primer für die semiquantitative RT-PCR

Die mRNA-Sequenzen für die untersuchten Enzyme wurden aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) entnommen⁴⁰¹.

Template	Länge	Annea- lingtemp.	Zyklen	Primersequenz
β-Aktin	450 bp	60,0°C	23	5'-Primer: 5' - AGG GAA ATC GTG CGT GAC AT - 3' 3'-Primer: 5' - CAT CTG CTG GAA GGT GGA CA - 3'
IL-6	273 bp	60,0°C	31	5'-Primer: 5' - GAG AGG AGA CTT CAC AGA GG - 3' 3'-Primer: 5' - GGT ACT CCA GAA GAC GAC AG - 3'
IL-10	245 bp	61,0°C	40	5'-Primer: 5' - ACA TAC TGC TAA CCG ACT CCT - 3' 3'-Primer: 5' - ACT CTT CAC CTG CTC CAC TGC - 3'
TGF-β₁	346 bp	59,0°C	35	5'-Primer: 5' - CGG AAG CGC ATC GAA GCC ATC C - 3' 3'-Primer: 5' - GCA AGC GCA GCT CTG CAC GG - 3'
INF-γ	456 bp	62,9°C	40	5'-Primer: 5' - AGC AAC AGC AAG GCG AAA AAG - 3' 3'-Primer: 5' - GTT GTA TCT GGG GGT GGG GGA - 3'
P47Phox	233 bp	55,0°C	36	5'-Primer: 5' - ATA CTT CAA CGG CCT CAT GG - 3' 3'-Primer: 5' - CTG TTC CCG AAC TCT TCT CG - 3'
P67Phox	243 bp	55,0°C	36	5'-Primer: 5' - GCA GTG GCC TAC TTC CAG AG - 3' 3'-Primer: 5' - CTT CAT GTT GGT TGC CAA TG - 3'
GP91Phox	201 bp	55,0°C	36	5'-Primer: 5' - ACT GCG GAG AGT TTG GAA GA - 3' 3'-Primer: 5' - GGT GAT GAC CAC CTT TTG CT - 3'
MnSOD	213 bp	55,0°C	27	5'-Primer: 5' - GGC CAA GGG AGA TGT TAC AA - 3' 3'-Primer: 5' - CCT TGG ACT CCC ACA GAC AT - 3'
Angiotensi- nogen	220 bp	57,0°C	32	5'-Primer: 5' - ACC CCT GCT ACA GTC CAT TG - 3' 3'-Primer: 5' - GTC TGT ACT GAC CCC CTC CA - 3'

AT_{1A}-Rezeptor	234 bp	60,0°C	34	5'-Primer: 5' - GGA AAC AGC TTG GTG GTG AT - 3' 3'-Primer: 5' - GAG ACA CGT GAG CAG GAA CA - 3'
AT_{1B}-Rezeptor	226 bp	51,0°C	34	5'-Primer: 5' - TAC GCC AAG GAA TGA TGA CA - 3' 3'-Primer: 5' - CCC CAG AAA GCA ATA AAA CA - 3'
AT₂-Rezeptor	188 bp	60,0°C	38	5'-Primer: 5' - CCC AGG TCC ACA GAA CTC AT - 3' 3'-Primer: 5' - CAG CAT CAA TCC AGG AAG GT - 3'

Tab. 3.3 Primersequenzen für die semiquantitative RT-PCR und für β -Aktin zur internen Kontrolle

3.3.4 Optimierung der PCR-Bedingungen

Bei der Etablierung der Primer für qualitativere PCR-Ergebnisse sind insbesondere die Annealingtemperatur, die Zyklenzahl und die eingesetzte $MgCl_2$ -Konzentration von Bedeutung.

Um herauszufinden, bei welcher Temperatur sich die Primer optimal an die cDNA anlagern (Annealingtemperatur), wurde für jeden Primer eine Gradienten-PCR durchgeführt. Hierbei wurde mit Hilfe des Gradienten-Thermozyklers der Firma Eppendorf® zunächst eine PCR mit ca. 10 gleichen Proben mit einem groben Temperaturgradienten ($60^\circ C \pm 10^\circ C$) laufen gelassen, d.h. für jede Probe wurde eine andere Primeranlagerungstemperatur verwendet. Die $MgCl_2$ -Konzentration betrug bei allen Proben 2,0 mmol, und es wurde die für den jeweiligen Primer gängige Zyklenzahl eingestellt (z.B. 23 Zyklen bei β -Aktin). Anschließend wurde um die Temperatur des stärksten Signals ein enger Gradient ($\pm 3^\circ C$) gelegt.

Die $MgCl_2$ -Konzentration hat einen wesentlichen Einfluss auf die Effektivität der PCR-Reaktion. Mg^{2+} -Ionen werden von der DNA-Polymerase benötigt, um dNTPs einbauen zu können. Eine zu geringe Konzentration führt zu einer nicht effizienten DNA-Synthese, eine zu hohe $MgCl_2$ -Konzentration bewirkt eine zu starke Anlagerung der DNA-Stränge aneinander, wodurch eine vollständige Denaturierung der Stränge verhindert wird. Zur Ermittlung der optimalen $MgCl_2$ -Konzentration wurde eine zusätzliche PCR mit den Temperaturen des engen Gradienten des jeweiligen Primers durchgeführt, da die $MgCl_2$ -Konzentration auch einen gewissen Einfluss auf die Annealingtemperatur hat. Hierbei wurde die $MgCl_2$ -Konzentration in den einzelnen Proben in einem Bereich von 1,5 – 3,0 mmol verändert. Die Bande mit einer guten Signaldichte und ohne Nebensignale entsprach der am besten eingesetzten $MgCl_2$ -Konzentration.

Um größtmögliche Unterschiede in der Genexpression zu zeigen, sollte eine PCR im linear ansteigenden Bereich der DNA-Amplifikationskurve ablaufen, und nicht im Sättigungsbe-

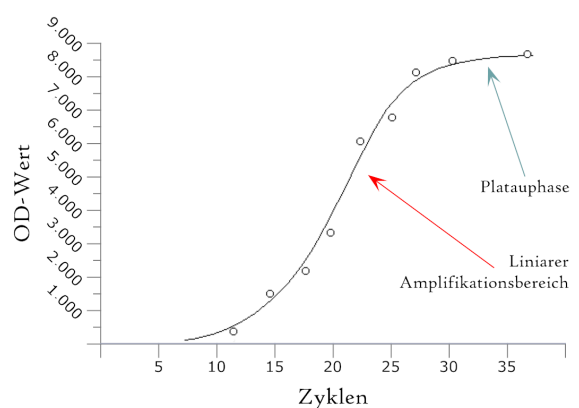


Abb. 3.3 DNA-Amplifikationskurve

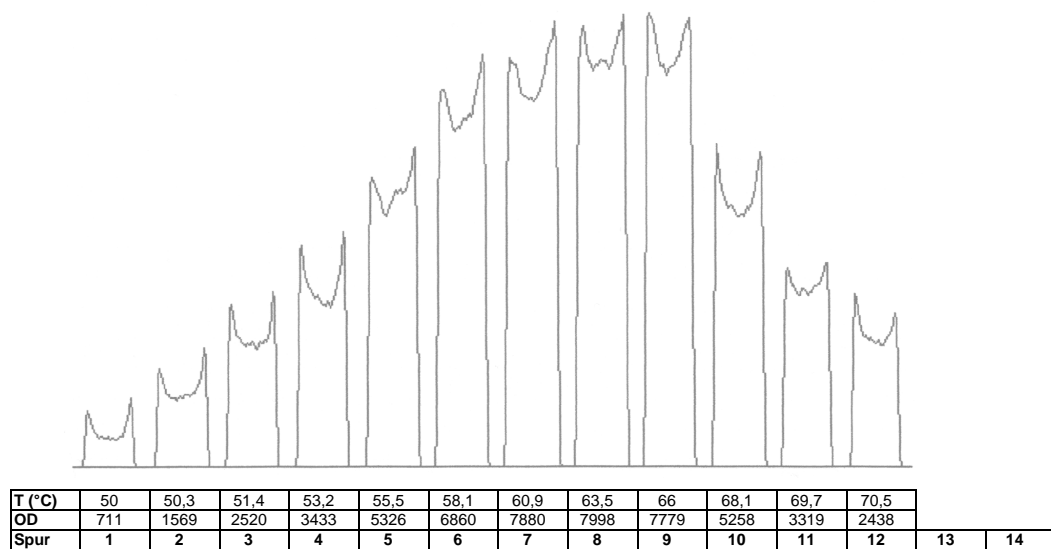


Abb. 3.1 Gradienten-PCR von β -Aktin:
 T = 60,0°C, G = 10,0°C, 2,0 mmol MgCl₂, 23 Zyklen

Unten: Darstellung im 2%-igen Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gel
 Spur 1 – 12 zunehmende Annealingtemperaturen: s. Tab.
 Spur 13: DNA-Längenmarker (Marker VIII)
 Spur 14: Negativkontrolle (H₂O)

Oben: Ermittlung der optischen Dichte (OD) und graphische Darstellung der Gradienten-PCR mit Hilfe der Software Scion Image beta (Scion Corporation[®], Maryland, USA)

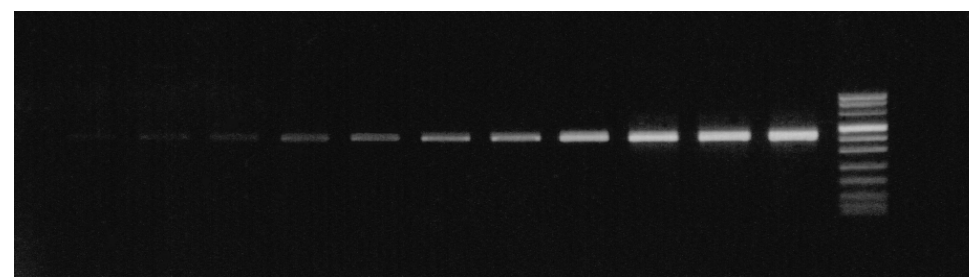
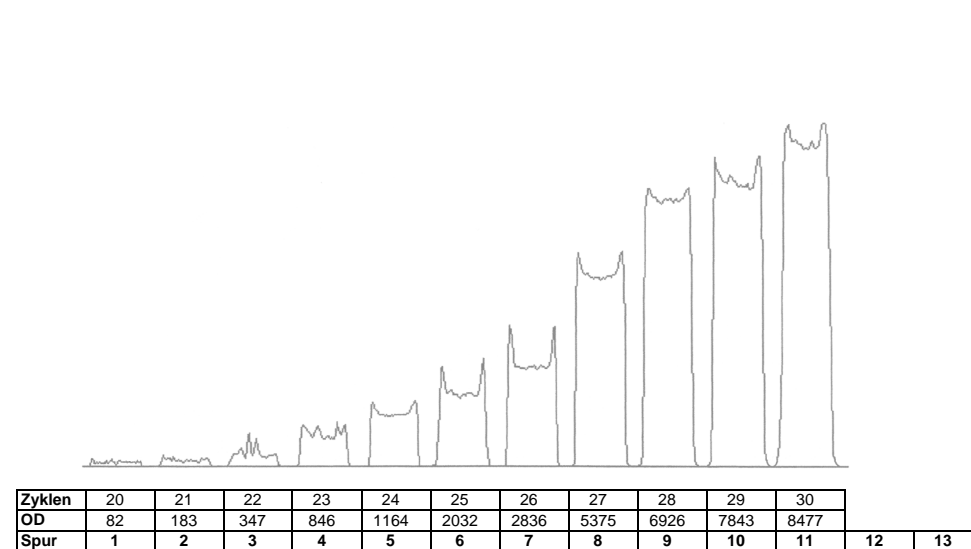


Abb. 3.2 Sättigungs-PCR von β -Aktin:
 T = 60,0°C (konstant), 2,0 mmol MgCl₂, Zyklenzahl variabel

Unten: Darstellung im 2%-igen Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gel
 Spur 1 – 11 zunehmende Zyklenzahl: s. Tab.
 Spur 12: DNA-Längenmarker (Marker VIII)
 Spur 13: Negativkontrolle (H₂O)

Oben: Ermittlung der optischen Dichte (OD) und graphische Darstellung der Sättigungs-PCR mit Hilfe der Software Scion Image beta (Scion Corporation[®], Maryland, USA)

reich (Abb. 3.3). Daher wurde für jeden Primer eine Sättigungs-PCR zur Ermittlung der günstigsten Zyklenzahl durchgeführt. Bei jeder einzelnen Probe einer PCR wurde eine andere Zyklenzahl gewählt, wobei der Reaktionsansatz bei allen Proben gleich blieb. Die PCR-Produkte mit unterschiedlichen Zyklenzahlen wurden in einem Agarose-Gel (s. Kap. 3.4) nebeneinander aufgetragen. Aus den erhaltenen Banden wurden mittels der Software Scion Image beta (Scion Corporation[®], USA) die Signalstärken in den einzelnen PCR-Proben berechnet und als Pixel-Werte gegen die Zyklenzahlen aufgetragen (s. Abb. 3.1 und 3.2). Für die semiquantitative RT-PCR wurde eine Zykluszahl im unteren, linear ansteigenden Teil der Amplifikationskurve gewählt.

3.3.5 Nachweis enteroviraler RNA mit RT-PCR und nested-RT-PCR

Um enterovirale RNA in den aufgearbeiteten Herzproben nachzuweisen, wurde eine RT-PCR modifiziert nach Saiki et al.⁴⁰² durchgeführt. Zunächst erfolgte die reverse Transkription, gemäß des Protokolls im Kapitel 3.2.3, wobei anstatt des Oligo(-dt)₁₅-Primers ein Random-Primer genutzt wurde. Der Ansatz erfolgte hier in einem 20- μ l-Reaktionsgemisch mit Verwendung der MMLV reverse transcriptase. Nach der reversen Transkription wurden 5 μ l des Reaktionsansatzes für die PCR eingesetzt.

Die cDNA-Amplifikation wurde im Eppendorf[®]-Thermozykler durchgeführt. Das Programm beinhaltete 30 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus 60 sec Denaturierung bei 94°C, 60 sec Primer-Annealing bei 60°C und 60 sec DNA-Synthese bei 72°C bestand. Abschließend durchliefen die Proben eine finale Inkubation für 10 min bei 72°C. Für die amplifizierten cDNA-Proben wurden Wasserproben zur Negativkontrolle und koamplifiziertes endogenes β -Aktin sowie die klonierte cDNA von CVB-3 zur Positivkontrolle mitgeführt. Das PCR-Ergebnis wurde in einem 2%-igen Agarose-Gel (s. Kap. 3.4) kontrolliert.

Zur Steigerung der Sensitivität wurde im Anschluss eine nested-PCR durchgeführt. Es wurden 2 μ l aus der primären PCR entnommen und in 98 μ l TE-Puffer (100mM Tris-Base, 10 mM EDTA, pH 7,4) verdünnt. Von der Verdünnung wurden wiederum 2 μ l entnommen und in einer 30 Zyklen umfassenden sekundären PCR erneut amplifiziert. Jeder Zyklus bestand aus 40 sec Denaturierung bei 94°C, 60 sec Annealing bei 55°C und 60 sec Elongation bei 72°C. Auch hier wurde abschließend eine 10-minütige DNA-Synthese bei 72°C durchgeführt. Die Auswertung der PCR erfolgte in einem 2%-igen Agarose-Gel.

3.3.6 Semiquantitative RT-PCR

Die bei der reversen Transkription hergestellte cDNA wurde auf die Gentranskripte von IL-6, IL-10, TGF- β_1 , INF- γ , Angiotensinogen, AT_{1A}-Rezeptor, AT_{1B}-Rezeptor, AT₂-Rezeptor, MnSOD, p47phox, p67phox und gp91phox untersucht. Um in den einzelnen Proben eine Expressionsveränderung verzeichnen zu können, wurde als interne Kontrolle parallel endogenes β -Aktin amplifiziert. Dieses wird in allen Eukaryotenzellen in hohem Maße exprimiert und als *housekeeping gene* bei Virusinfektionen nicht vermehrt exprimiert.

Im Reaktionsansatz für die semiquantitative PCR wurden 3,0 μ l cDNA, 29,9 μ l H₂O und 12,1 μ l PCR-Mix eingesetzt. Das Gesamtreaktionsvolumen pro Tube betrug damit 45 μ l. Der PCR-Mix bestand pro Tube aus 4,5 μ l 10x PCR-Puffer, 2,0 μ l 50 mmol dNTPs, 1,8 μ l 25 mmol MgCl₂, 1,8 μ l 50 ng/ μ l 3`Primer, 1,8 μ l 50 ng/ μ l 5`Primer und 0,2 μ l 5 U Biotherm-Taq-Polymerase. Für alle verwendeten Primer wurde bis auf die Annealingtemperatur und die Zyklenzahl das gleiche PCR-Programm verwendet:

Vorgang	Temperatur	Zeit	
1. Initiale Denaturierung	94°C	5 min	

2. Denaturierung	94°C	30 sec	} zyklische Wiederholung, Primer-spezifisch
3. Annealing	Primer-spezifisch	30 sec	
4. DNA-Synthese	72°C	35 sec	

5. DNA-Synthese (finale Elongation)	72°C	10 min	
6. Reaktionsstop	4°C		

Die Schritte 2. – 4. wurden zyklisch wiederholt. Die Annealingtemperatur und die Zyklenzahl richteten sich nach dem verwendeten Primerpaar (s. Tab. 3.3).

Um durch zufällige Fehler bedingte Schwankungen zu vermindern, wurden alle PCRs zweifach durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde bei jeder PCR ein Reaktionsansatz mit sterilem Wasser anstatt Template amplifiziert. Zur semiquantitativen Auswertung wurden die in den einzelnen Proben gemessenen Werte auf die jeweiligen Werte des endogenen β -Aktin bezogen. Die Auswertung der PCR erfolgte auf 2%-igen Agarose-Gelen. Die Stärke der im UV-Transluminator digitalisierten Signale wurde mit dem Software-Programm Scion Image beta (Scion Corporation[®], Maryland, USA) in OD-Werte transformiert. (s. Abb. 3.1 und 3.2).

3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Als Elektrophorese bezeichnet man die Wanderung gelöster, elektrisch geladener Teilchen im elektrischen Gleichspannungsfeld. Zur Auftrennung von Nukleinsäuren wird die Agarose-

Gelelektrophorese eingesetzt. Im elektrischen Feld wandert die DNA aufgrund ihrer nach außen hin negativen Ladung (Phosphatgruppen) in Richtung Anode. Da das Gel als Molekularsieb fungiert, wandern kleinere DNA-Fragmente schneller durch die Gelmatrix als größere und legen somit eine längere Strecke zurück. Damit wird die Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht. Dem Agarose-Gel wird Ethidiumbromid zugesetzt, ein Fluoreszenzfarbstoff, das sich in die Doppelhelix der DNA einlagert. Dadurch kann die DNA unter UV-Strahlung sichtbar gemacht werden. Die Größenbestimmung der DNA-Proben erfolgte mittels eines DNA-Längenmarkers (Marker VIII), welcher eine Mischung verschiedener DNA-Stränge bekannter Länge beinhaltet. Damit die Nucleinsäuren innerhalb der Gelspur verbleiben, wurden sie mit Hilfe eines Ladepuffers beschwert.

Zur Auftrennung der DNA-Stränge bzw. der PCR-Produkte wurden 2%-ige Agarose-Gele (w/v) verwendet.

Größe der Gelkammer	0,5 × TBE	Agarose-Pulver	Ethidiumbromid
Klein	50 ml	1 g	2 µl
Mittel	150 ml	3 g	6 µl
Groß	200 ml	4 g	8 µl

Tab. 3.4 Merkmale der Agarose-Gelherstellung

Die Trennung erfolgte in 0,5× TBE-Laufpuffer in einer Horizontalgelelektrophoresekammer bei 120 V für kleine Gelkammern bzw. bei 200 V für mittlere und große Gelkammern innerhalb von 20 min. Pro Gelslot wurden 10 ml der jeweiligen DNA-Probe in Ladepuffer (40% Sucrose (w/v), 0,25% Bromphenolblau (w/v)) aufgetragen.

Die Auswertung der Elektrophorese erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm und wurde mittels des BioDocAnalyze-Systems (Biometra®, Göttingen, Deutschland) aufgezeichnet und dokumentiert. Einstellungen am UV-Transilluminator: Belichtung 1000 ms, Blende 4,0, Vergrößerungsfaktor 20 für kleines und mittleres Gel und 12 für großes Gel.

Die Signalstärken wurden mit Hilfe des Gelplot-2-Makros der Software Scion Image beta (Scion Corporation®, Maryland, USA) in Pixel-Werte (optische Dichte = OD) umgerechnet und graphisch dargestellt (s. Abb. 3.1 und 3.2). Das Verhältnis der Probe-OD zu β -Aktin-OD wurde für die Kalkulation der relativen mRNA-Expression berechnet.

3.5 Statistische Auswertung

3.5.1 Stichproben

Da zwischen den einzelnen Stichproben keine Verbindung besteht, die Einzelwahrscheinlichkeiten aus den verschiedenen Stichproben sich also nicht gegenseitig beeinflussen, werden bei den vorliegenden Versuchen *unabhängige (= unverbundene) Stichproben* betrachtet. Die Messwiederholungen bei infizierten bzw. nicht infizierten Tieren, die in den festgelegten Intervallen

post infectionem durchgeführt wurden, erfolgten an nichtidentischen Mäusen (*zeitliche Unabhängigkeit*), weil zur Datenerfassung die Sakrifizierung des untersuchten Tieres notwendig ist.

3.5.2 Hypothesen

Die *Nullhypothese* würde der Gleichheit zwischen den beobachteten Tiergruppen für eine Variable entsprechen. Die *Alternativhypothese* bedeutete die Ungleichheit zwischen den beobachteten Gruppen für eine Variable.

1. Hypothese:

Die 1. Nullhypothese bedeutete, dass kein Unterschied in der Expressionsstärke von matrixaktiven Substanzen zwischen den infizierten und den nicht infizierten Versuchstieren bestünde: $K_4 = I_4$, $K_7 = I_7$, $K_{28} = I_{28}$.

Sollte die Alternativhypothese zutreffen, wäre die Richtung der Veränderung (Expressionssteigerung oder Expressionsminderung der untersuchten Substanzen) nicht vorgegeben, d.h. es läge eine *zweiseitige Fragestellung* vor.

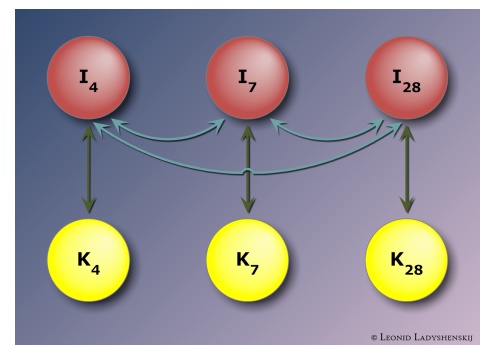


Abb. 3.4 Durchgeführte Vergleiche zwischen den definierten Tiergruppen

2. Hypothese:

Die 2. Nullhypothese bedeutete, dass es keine temporären Unterschiede zwischen den infizierten Gruppen gäbe: $I_4 = I_7$, $I_4 = I_{28}$, $I_7 = I_{28}$.

Auch hier läge im Falle der Alternativhypothese eine *zweiseitige Fragestellung* vor.

3.5.3 Irrtumswahrscheinlichkeit und Signifikanz

Die Irrtumswahrscheinlichkeit α ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass man sich fälschlicherweise für die Alternativhypothese entscheidet, obwohl in Wirklichkeit die Nullhypothese richtig ist (= Fehler 1. Art oder α -Fehler). In unseren Versuchen bedeutete dies, dass wir beispielsweise eine Expressionsveränderung nachweisen, obwohl die CVB-3-Infektion diesen Einfluss gar nicht aufweist. Damit entspricht der α -Fehler dem Signifikanzniveau und wird in unseren Versuchen mit 5% festgesetzt.

Der β -Fehler oder Fehler 2. Art bedeutet, dass man sich aufgrund des Testergebnisses für die Nullhypothese entscheidet, obwohl die Alternativhypothese richtig ist. Um den β -Fehler zu ver-

ringern, ist die Erhöhung des Stichprobenumfangs notwendig. Der Stichprobenumfang beträgt bei unseren Versuchen 60 (= 60 Versuchstiere).

Test-Schlussfolgerung \ Unbekannte Wirklichkeit	H ₀ ist richtig	H ₀ ist falsch
	H ₀ -Annahme	Richtige Schlussfolgerung
H ₀ -Ablehnung	Fehler 1. Art (α-Fehler)	Richtige Entscheidung

Tab. 3.5
α- und β-Fehler

Der p -Wert entspricht der Wahrscheinlichkeit, mit welcher das vorliegende Testergebnis unter der Nullhypothese zustande kommt. Ist $p < \alpha$, ist das Ergebnis signifikant. D.h. das Ergebnis ist kaum mit der Nullhypothese vereinbar, die Alternativhypothese wird angenommen.

Die Signifikanz (Wahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art) wurde bei unseren Versuchen für den H-Test (s. Kap. 3.5.4.2) als $p < 0,05$ festgelegt. Da beim U-Test (s. Kap. 3.5.4.1) drei Einzelvergleiche zwischen den Gruppen durchgeführt werden, musste das Signifikanzniveau durch eine α -Adjustierung nach *Bonferroni* auf $p < 0,016$ gesenkt werden⁴⁰³.

3.5.4 Statistische Tests

Im vorliegenden Experiment wurden zur statistischen Analyse nichtparametrische Tests verwendet, da auf der Normalverteilung bzw. auf der Homogenität der Fehlerkomponenten basierende Tests bei einem Vergleich von Gruppengrößen < 10 nicht sinnvoll sind⁴⁰⁴. Alle statistischen Tests wurden unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS Ver. 13.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Für die graphische Darstellung wurden SPSS Ver. 13.0 und Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corp., USA) verwendet.

3.5.4.1 Mann-Whitney-U-Test

Der Test wurde von Mann und Whitney (1947)⁴⁰⁵ sowie Wilcoxon (1945)⁴⁰⁶ entwickelt und wird deshalb auch als *Mann-Whitney-Wilcoxon (MWW)*-Test bezeichnet. Der U-Test gehört zu den parameterfreien Testverfahren und dient zur Überprüfung des Zusammenhangs zweier unabhängiger Verteilungen.

Man vergleicht jeden Wert der einen Stichprobe mit dem Wert der anderen Stichprobe und prüft damit, ob beide Stichproben aus einer Grundgesamtheit stammen. Beim vorliegenden Experiment werden die infizierten Gruppen untereinander und bezüglich der äquivalenten Kontroll-

gruppen für jedes untersuchte Merkmal (Expressionsstärken, Herzleistungsparameter usw.) verglichen.

In unseren Versuchen besagt die Nullhypothese H_0 , dass es keinen Unterschied zwischen den einzelnen Verteilungen gibt (s. Kap. 3.5.2).

3.5.4.2 Kruskal-Wallis-H-Test

Der von Kruskal und Wallis (1952)⁴⁰⁷ entwickelte parameterfreie Test ist eine Erweiterung des U-Tests auf mehr als zwei Gruppen. Er verwertet wie der U-Test Informationen über die rangmäßige Abstufung der Stichprobenwerte. Es wird geprüft, ob die Gesamtzahl der unabhängigen Stichproben, in denen eine stetige Untersuchungsvariable betrachtet wird, aus der gleichen Grundgesamtheit stammt (gemessen am Medianwert).

Die Nullhypothese H_0 lautet hier: zwischen allen untersuchten Tiergruppen besteht kein Unterschied und sie sind alle einer Grundgesamtheit zuzuordnen ($I_4 = I_7 = I_{28} = K_4 = K_7 = K_{28}$). Kann die Nullhypothese widerlegt werden, können auf dieser Basis dann Einzelvergleiche zwischen den Versuchsgruppen mit dem U-Test vorgenommen werden. Aus diesem Grund wird der H-Test auch zuerst durchgeführt.

3.5.4.3 Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson

Für metrisch skalierte Merkmale stellt der Korrelationskoeffizient r nach Bravais⁴⁰⁸ und Pearson⁴⁰⁹ ein Maß für die lineare Abhängigkeit zweier statistischer Variablen dar. Es können lediglich Werte zwischen -1 und $+1$ verarbeitet werden. Bei einem Wert von $+1$ (bzw. -1) besteht ein vollständig positiver, gleichsinniger (bzw. negativer, reziproker) linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Merkmalen. Je näher r bei 0 ist, desto schwächer ist der lineare Zusammenhang, d.h. die Korrelation. Allerdings können diese Merkmale ungeachtet dessen in nicht-linearer Weise voneinander abhängen.

Je größer die Zahl der Merkmalsträger ist, desto aussagekräftiger ist r . Die Interpretation des Korrelationskoeffizienten erfolgt immer auf dem Hintergrund einer linearen Regressionsfunktion (s. Kap. 3.5.6.3).

Die Stärke des Zusammenhangs wurde bei unseren Versuchen wie folgt interpretiert:

$r < 0,05$:	kein Zusammenhang
$r = 0,05 - 0,2$:	geringer Zusammenhang
$r = 0,2 - 0,5$:	mittlerer Zusammenhang
$r = 0,5 - 0,7$:	hoher Zusammenhang
$r > 0,7$:	sehr hoher Zusammenhang

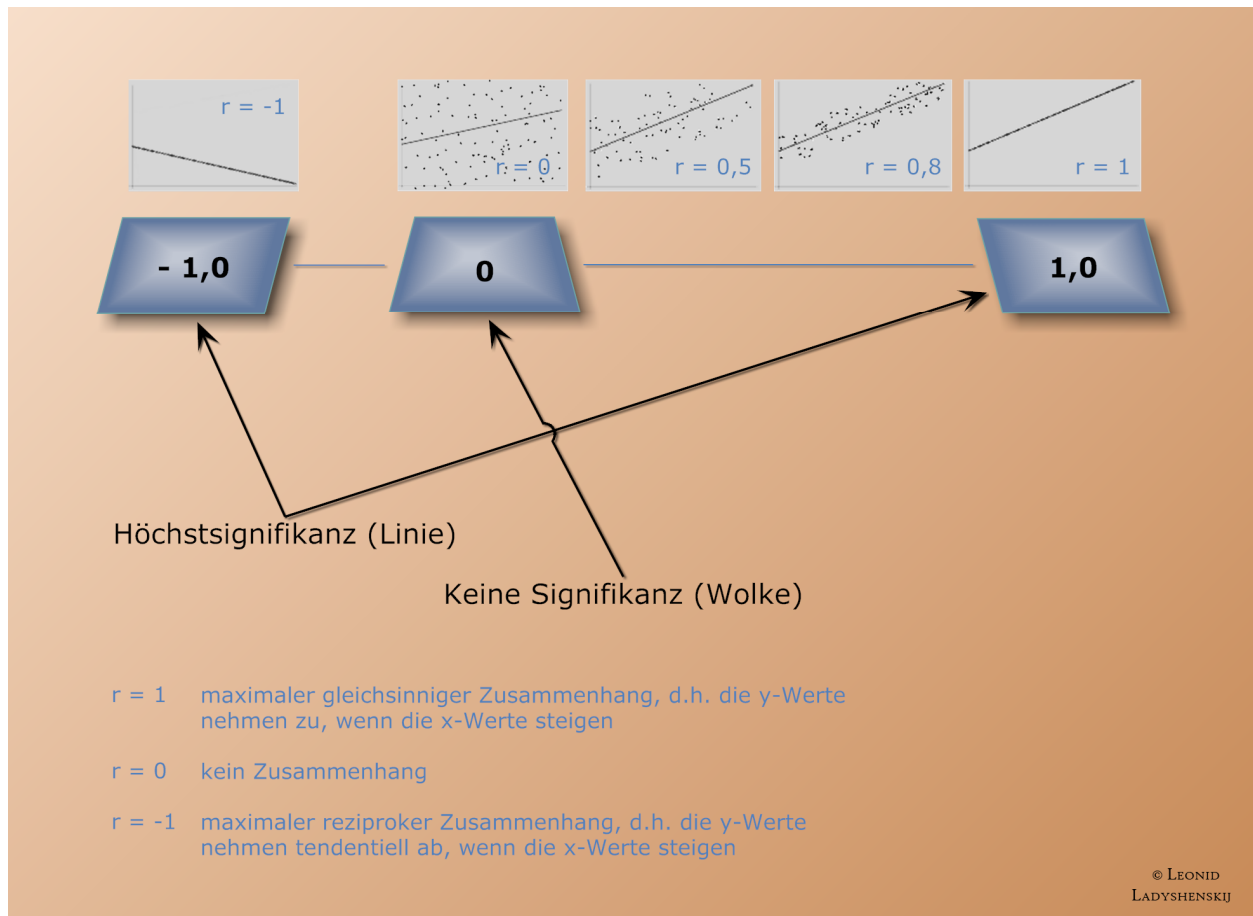


Abb. 3.5 Korrelation; Beispiele für Regressionen

3.5.5 Merkmalcharakterisierung

Zu den statistischen Größen, welche die Charakterisierung eines Merkmals quantitativ erlauben, gehören der Mittelwert, der Median, Quartile und Streuungsmaße:

Mittelwert:

Der Mittelwert \bar{x} ist ein Lageparameter und entspricht dem *Durchschnitt* im Sinne der Arithmetik. Es ist sehr empfindlich gegenüber Ausreißern. In unseren Versuchen wurde der Mittelwert aus der Summe der Beobachtungen dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen berechnet.

Median:

Der Median \tilde{x} (oder *Zentralwert* = 50%-Quantil = 2. Quartil Q_2) teilt die Stichprobenwerte entsprechend ihrer Größe in zwei Hälften, d.h. dass die Hälfte der Werte kleiner oder gleich und die andere Hälfte größer oder gleich dem Medianwert sind. Dieses Lagemaß wird auch bei quantitativen Merkmalen verwendet, die schief verteilt sind oder Ausreißer

aufweisen. In diesen Fällen weichen der Mittelwert und der Median stark voneinander ab. Bei annähernd symmetrischen Verteilungen sind die beiden Maße ähnlich groß.

Quartile:

Die Quartile Q_1 und Q_3 teilen die Stichprobe in vier Abschnitte: Q_1 umfasst 25%, Q_3 75% der Werte. Der *Quartilsabstand* (engl. *interquartile range, IQR*) bezeichnet die Differenz zwischen dem oberen und dem unteren Quartil, also $Q_3 - Q_1$ und umfasst daher 50% der Verteilung. Der Quartilsabstand wird als Streuungsmaß verwendet.

Varianz:

Die Varianz V ist ein Streuungsmaß, d.h. ein Maß für die Abweichung einer Variablen von ihrem Erwartungswert. Sie resultiert aus der Summe der quadratischen Abweichungen vom Mittelwert. Wegen der Unübersichtlichkeit der Quadratischen Einheit bedient man sich der Varianz-Wurzel – der Standardabweichung.

Standardabweichung:

Die Standardabweichung s ist ein Maß für die Streuung der Werte einer Variablen um ihren Mittelwert. Je näher s bei 0 liegt, desto homogener ist die Stichprobe. Sie ergab sich aus der Wurzel des Quotienten der Fehlerquadrate dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen. Die im Ergebnistext angegebenen Daten repräsentieren den Mittelwert \pm der Standardabweichung.

3.5.6 Graphische Auswertung

3.5.6.1 Box-and-Whisker-Plot

Box-and-Whisker-Plots sind besonders geeignet, um mehrere Stichproben miteinander zu vergleichen. Die Box umfasst 50% der Daten und wird von den beiden Quartilen begrenzt. Damit entspricht die Länge der Box dem sog. Interquartilsabstand (s. Kap. 3.5.5). Innerhalb der Box ist der Median eingezeichnet.

Die Whiskers (engl. Schnurrhaare) erstrecken sich von den Rändern der Box bis zum Maximum bzw. Minimum. Die Länge der Whisker beträgt maximal das 1,5-fache des Interquartilsabstands und wird immer durch einen Wert aus den Daten bestimmt⁴¹⁰. Werte, die über dieser Grenze liegen, wurden separat mit einem Kreis in das Diagramm eingetragen und als Ausreißer bezeichnet. Extremwerte von mehr als das Dreifache des Interquartilsabstands wurden durch einen Stern markiert. Zusätzlich wird der Mittelwert eingetragen. Je größer der Abstand zwischen dem Mittelwert und dem Median ist, desto schief ist die Verteilung.

© LEONID
LADYSHENSKIJ

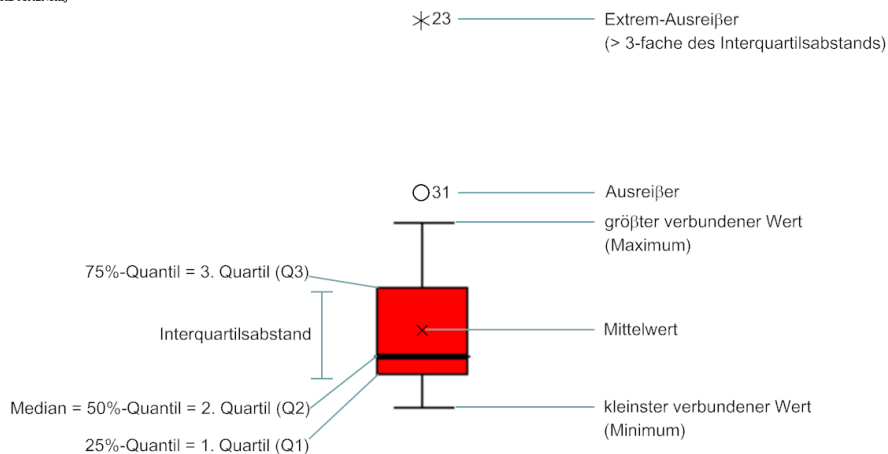


Abb. 3.6
Box-Plot

3.5.6.2 Histogramm / Häufigkeitspolygon

Das Histogramm ist die graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung von Messwerten. Es besteht aus Balken, die direkt nebeneinander stehen. Verbindet man die oberen Balkenmitten miteinander, erhält man ein Häufigkeitspolygon.

Bei unseren Versuchen ließ sich mit einem Häufigkeitspolygon der zeitliche Verlauf der Häufigkeitsverteilung von einzelnen untersuchten Merkmalen und von mehreren Merkmalen im zeitlich bezogenen Expressionsvergleich übersichtlich darstellen.

3.5.6.3 Streudiagramm (engl. Scatterplot)

Zur graphischen Darstellung eines Zusammenhanges entsprechend dem Korrelationskoeffizienten nach Bravais und Pearson (s. Kap. 3.5.4.3.) und zur Prüfung der Linearität bzw. der Nicht-Linearität des Ergebnisses dienen die Streudiagramme. Die Wertepaare zweier statistischer Merkmale werden in ein Koordinatensystem eingetragen, wodurch sich eine Punktwolke ergibt. Das unabhängige Merkmal, d.h. die Einflussgröße, wird dabei dem x-Wert zugeordnet, das abhängige Merkmal, d.h. die Zielgröße – dem y-Wert. Besteht ein annähernd linearer Zusammenhang bzw. die Punktwolke hat eine Ellipsenform, lässt sich mittendurch die sog. *Regressionsgerade* legen (s. Abb. 3.5).

Aus dem Streudiagramm lassen sich ermitteln:

- **Die Art des Zusammenhangs:** Ist die Steigung der Regressionsgeraden positiv – ist der Zusammenhang gleichsinnig, bei einer negativen Steigung ist er gegensinnig.
- **Die Stärke des Zusammenhangs:** Je näher die Punkte an der Regressionsgerade liegen, desto stärker ist der Zusammenhang. Streuen die Punkte weit um die Gerade, ist der Zusammenhang schwach.

3.6 Verwendete Arbeitsmittel

3.6.1 Laborgeräte

Laborgerät	Bezeichnung / Typ	Hersteller
Autoklaviergerät		Hartmann
Backofen		Heraeus
Brutschrank	Function Line	Heraeus
Eismaschine	AF-10	Scotsman
Eisschrank –20°C / +4°C	Economic super	Bosch AG
Eisschrank –80°C	Nuaire Ultralow Freezer –85	Zapf Instrumente
Elektrophoresekammer		Biometra
Gelschlitten		Eigenproduktion Charité CBF
Grafikdrucker	Digital Graphic Printer UP-D890	Biometra
Homogenisator	Pellet Pestle Motor	Sigma-Aldrich
Kühlzentrifuge +4°C	Megafuge 1. OR	Heraeus
Elektronische Laborwaage	DMS 580	Kern Elektronik
Mikrowellenherd	Microwave 800 Nr. 6127	Privileg
pH-Meter	Digital 646	Knick
Photometer	Spectrophotometer DU 640i	Beckman-Coulter
Pipetten	reference	Eppendorf
Präzisionswaage		Sartorius
Thermozykler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Sorval Superspeed RC-2B	Kendro
UV-Transilluminator	BioDocAnalyze System	Biometra
Vortexer	VF2	IKA-Labortechnik
Wasserbad		GFL

Tab. 3.6 Verwendete Laborgeräte

3.6.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung / Typ	Hersteller
Einmalhandschuhe		Ansell-Medical
Einmalpipetten		Biozym
Falcon-Tubes	15 ml, 50 ml	Sarstedt
Feintücher	Kim Wipe lite	Kimberley-Clark
Fotopapier	K 65 HM-CE	Mitsubishi
Homogenisierspatel	Pellet Pestles	Sigma-Aldrich
Kryotubes	1,5 ml mit Schraubverschluss	Brand
PCR-Tubes	0,2 ml, Deckel flach / konisch	Biozym
Pipettenspitzen	a) 10, 100, 1000 ml; unsteril b) 10, 100, 1000 ml; mit Filtertip; RNAse-frei	a) Eppendorf b) Biozym
Reaktionsgefäße	a) 0,5 / 1,5 / 2,0 ml; Safe-Lock b) 0,5 / 1,5 / 2,0 ml; RNAse-frei	a) Eppendorf b) Eppendorf
Waageschalen		Merck

Tab. 3.7 Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.6.3 Puffer und Chemikalien

Artikel	Bezeichnung / Erläuterung	Hersteller
Agarose	SeaKem LE Agarose	BioWhittaker
Aqua bidest.	Aqua-Spüllösung, steril	Delta Pharma
Biotherm Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase	Rapidozym
Bromphenolblau		Sigma-Aldrich
cDNA-Synthese-Kit		Promega
Chloroform		Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC)		Sigma-Aldrich
DNA-Längenstandard	Marker VIII	Roche
DNase I	RNAse-frei	Roche
dNTP's	ATP, CTP, GTP, TTP	AB-Gene
Dimethylsulfoxid (DMSO)	6%	Merck
EDTA als Dihydrat	Ethylenediaminetetraacetic acid	Merck
Ethanol absolut	Dab 9 reinst	Merck
Ethidiumbromid	1%-ige wässrige Lösung	Merck
Isopropanol		Merck
Kaliumchlorid (KCl)		Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)		Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	als Hexahydrat	Merck
Primer	Spezifische Sequenzen (s. Kap. 3.3.2 und 3.3.3)	TIB Molbiol
RNAse Zap	Oberflächenaktiver RNAse-Inhibitor	Ambion
RNAsin		Promega
Sucrose		Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)amino-methanhydrochlorid (Tris-HCl)		Merck
Trizol LS Reagent	zur RNA-Isolierung	Gibco BRL

Tab. 3.8 Eingesetzte Puffer und Chemikalien

3.6.4 Software

Programm	Bezeichnung / Erläuterung	Hersteller
MS Excel 2007	Tabellenkalkulation	Microsoft Corporation
MS Word 2007	Textverarbeitung	Microsoft Corporation
BioDocAnalyze Software	Dokumentation der Elektrophorese	Biometra biomedizinische Analytik GmbH
Scion Image beta 4.0.3	Auswertung der Gelbanden	Scion Corporation
SPSS 13.0	Statistikprogramm	SPSS Incorporation
ArcSoft PhotoStudio 5.5	Grafikprogramm	ArcSoft Incorporation
SmartDraw 2008	Grafikprogramm	SmartDraw.com

Tab. 3.9 Verwendete Software

3.7 Tierversuchsantrag

Alle Tierversuche wurden entsprechend den gesetzlichen Tierversuchsrichtlinien angemeldet und entsprechend der Genehmigung durchgeführt. Die Genehmigung gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes wurde am 06.02.2002 erteilt (Genehmigungsnummer: G 0164/01).

4 Ergebnisse

4.1 Krankheitssymptomatik

Alle virusinfizierten Tiere zeigten über die Versuchsdauer eine ähnliche Symptomatik, die sich durch Bewegungsarmut, Ataxie und reduziertes Fressverhalten auszeichnete. Die ersten Symptome traten nach ungefähr vier Tagen p.i. auf, rasch fortschreitend innerhalb der nächsten Tage. Das glatte, glänzende Fell wurde stumpf und struppig. Die Mäuse wurden zunehmend apathisch, bis sie kaum mehr Nahrung zu sich nahmen. Die Symptomatik stellte sich spätestens bis zum achten Tag bei allen infizierten Mäusen ein. Eine relevante Verringerung der Symptome trat bis zur Sakrifizierung nicht auf.

Bei den Tieren der Kontrollgruppen waren keine klinisch-pathologischen Auffälligkeiten während des gesamten experimentellen Verlaufs zu beobachten.

4.2 Mortalität

Bis zur Einleitung der Narkose starb keine der untersuchten Mäuse an der Krankheitssymptomatik. 19 der insgesamt 60 Mäuse starben im Rahmen der Narkoseeinleitung und der invasiven Ermittlung hämodynamischer Daten. Folgende Tiere waren betroffen: vier Mäuse aus der Gruppe K₄, vier Mäuse aus der Gruppe K₇, vier Mäuse aus der Gruppe K₂₈, drei Mäuse aus der Gruppe I₄, drei Mäuse aus der Gruppe I₇ und eine Maus aus der Gruppe I₂₈. Somit konnte die Erhebung der hämodynamischen Parameter für insgesamt 41 Tiere erfolgen. Die Ergebnisse auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR wurden bei allen 60 Mäusen erhoben.

4.3 Körper- und Herzgewichte der Versuchstiere

Der H-Test nach Kruskal-Wallis erreicht für das Körpergewicht der untersuchten Tiere nicht das Signifikanzniveau ($p = 0,384$), sodass Vergleiche der einzelnen Gruppen mit dem U-Test nicht durchgeführt werden können. Am H-Test nahmen insgesamt 41 Tiere teil ($n = 41$).

Dagegen lässt sich nachweisen, dass die Wertegruppen der untersuchten Tiere für das Herzgewicht gemäß dem Kruskal-Wallis-H-Test aus unterschiedlichen Grundgesamtheiten stammen ($p < 0,001$). Auf dieser Basis können für das Herzgewicht Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test zwischen den untersuchten Gruppen durchgeführt werden:

Am Ende der akuten Phase der Virusmyokarditis verringert sich hochsignifikant das Herzgewicht der infizierten Mäuse gegenüber den nicht infizierten. In der subakuten Phase lässt sich

kein signifikanter Unterschied zwischen der infizierten Gruppe und der Kontrollgruppe feststellen. Auch in der chronischen Phase lässt sich keine Signifikanz in der Veränderung des Herzgewichts zwischen den infizierten und nicht infizierten Tieren eruieren.

	Mittelwert infizierte Gruppe		Mittelwert Kontrollgruppe		Signifikanz	Tierzahl			
I ₄ ↔ K ₄	I ₄	84,48 ± 5,58 mg	K ₄	89,94 ± 4,01 mg	p = 0,007	I ₄	n = 7	K ₄	n = 6
I ₇ ↔ K ₇	I ₇	85,70 ± 5,86 mg	K ₇	88,62 ± 8,09 mg	p = 0,481	I ₇	n = 7	K ₇	n = 6
I ₂₈ ↔ K ₂₈	I ₂₈	96,08 ± 3,53 mg	K ₂₈	99,57 ± 6,94 mg	p = 0,529	I ₂₈	n = 9	K ₂₈	n = 6

Tab. 4.1 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der Herzgewichte der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Trotz des statistisch signifikanten Unterschieds zwischen der infizierten subakuten Gruppe I₇ und der infizierten chronischen Gruppe I₂₈ kann die temporäre Herzgewichtserhöhung nicht als relevant gewertet werden, da es zwischen K₂₈ und I₂₈ keinen signifikanten Unterschied gibt. Dasselbe gilt für den Vergleich zwischen den Tieren im spätakuten und im chronischen Infektionsstadium. Auch sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den spätakut und subakut infizierten Tieren zu verzeichnen.

	Mittelwert mit Standardabweichung				Signifikanz
I ₄ ↔ I ₇	I ₄	84,48 ± 5,58 mg	I ₇	85,70 ± 5,86 mg	p = 0,684
I ₇ ↔ I ₂₈	I ₇	85,70 ± 5,86 mg	I ₂₈	96,08 ± 3,53 mg	p < 0,001
I ₄ ↔ I ₂₈	I ₄	84,48 ± 5,58 mg	I ₂₈	96,08 ± 3,53 mg	p < 0,001

Tab. 4.2 Mann-Whitney-U-Test: Herzgewichte-Vergleich der infizierten Gruppen untereinander

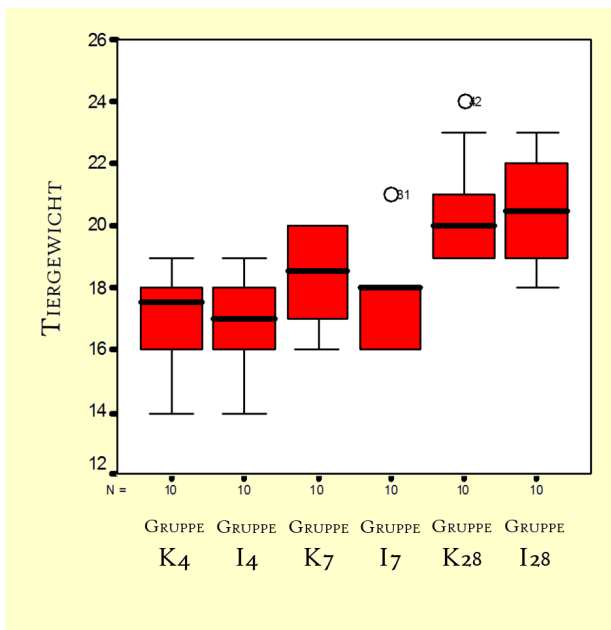


Abb. 4.1 Box-Plot: Körpergewichte in g in den Versuchsgruppen

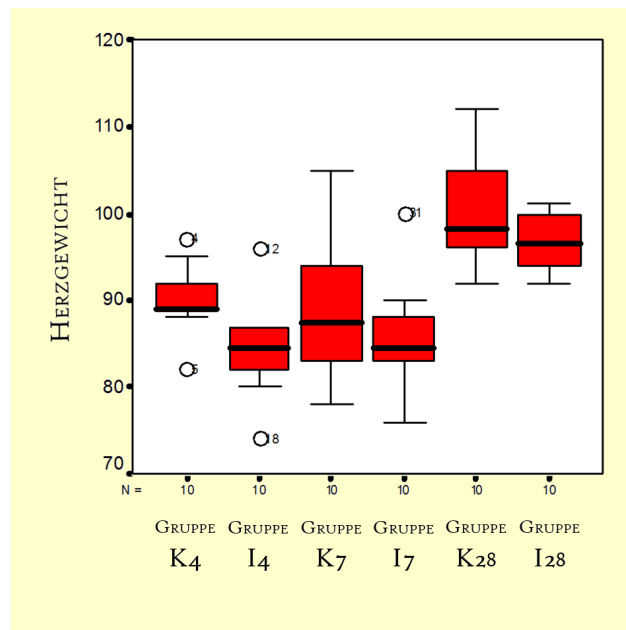


Abb. 4.2 Box-Plot: Herzgewichte in g in den Versuchsgruppen

Außer der Verminderung des Herzgewichts bei Tieren in der spätakuten Myokarditis, kann in der Bilanz auf keine weiteren relevanten Veränderungen der Herz- und Körpergewichte während der gesamten Experimentzeit geschlossen werden.

4.4 Hämodynamik

Mit Hilfe invasiver Diagnostik wurden folgende hämodynamischen Parameter ermittelt: linksventrikulärer endsystolischer Druck (LVsP), linksventrikuläre Auswurffraktion (EF), endsystolisches Volumen (ESV), enddiastolisches Volumen (EDV) und Schlagvolumen (SV). Die Anzahl der insgesamt untersuchten Tiere beträgt 41 ($n = 41$).

Alle fünf Wertegruppen der hämodynamischen Parameter können mittels H-Test unterschiedlichen Grundgesamtheiten zugeordnet werden: für SV $p < 0,05$, für LVsP, EF, ESV und EDV $p < 0,001$. Somit kann eine signifikante Varianz zwischen den sechs Versuchsgruppen angenommen und Einzelvergleiche durchgeführt werden.

4.4.1 Linksventrikulärer endsystolischer Druck (LVsP)

LVsP wird als linksventrikuläre Wandspannung in der systolischen Phase der Herzaktion gemessen und ist ein Maß für die Nachlast des Herzens.

In der endenden akuten Phase der CVB-3-Infektion ist ein Anstieg von LVsP bei infizierten Tieren gegenüber den nicht infizierten Tieren zu verzeichnen, welcher jedoch aufgrund der α -Adjustierung nach Bonferroni nicht als signifikant zu werten ist. Auch in der subakuten Infektionsphase ist der Unterschied zwischen der infizierten und der Kontrollgruppe nicht signifikant. In der chronischen Infektionsphase beobachtet man einen höchstsignifikanten Druckabfall in der infizierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

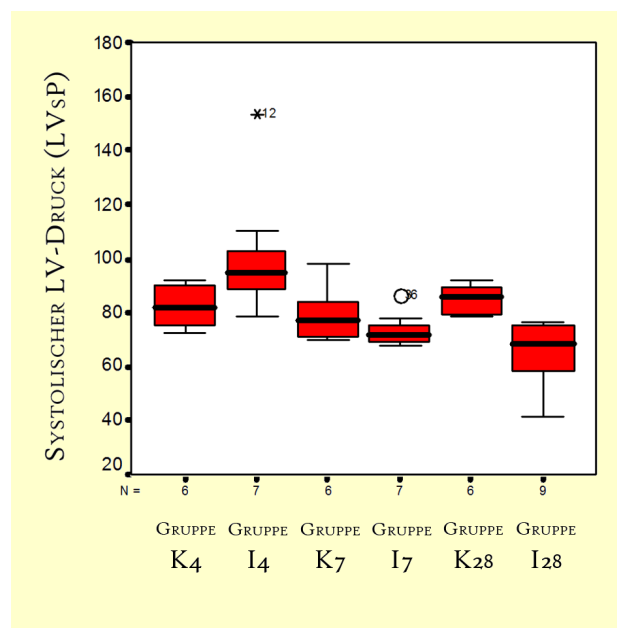


Abb. 4.3 Box-Plot: Linksventrikulärer systolischer Druck (LVsP) in mmHg

	Mittelwert infizierte Gruppe		Mittelwert Kontrollgruppe		Signifikanz	Tierzahl			
I ₄ ↔ K ₄	I ₄	101,16 ± 25,13 mmHg	K ₄	82,42 ± 8,72 mmHg	p = 0,035	I ₄	n = 7	K ₄	n = 6
I ₇ ↔ K ₇	I ₇	73,57 ± 6,51 mmHg	K ₇	79,62 ± 10,91 mmHg	p = 0,445	I ₇	n = 7	K ₇	n = 6
I ₂₈ ↔ K ₂₈	I ₂₈	65,10 ± 12,12 mmHg	K ₂₈	85,08 ± 5,36 mmHg	p < 0,001	I ₂₈	n = 9	K ₂₈	n = 6

Tab. 4.3 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich von LVsP der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Der zeitliche Verlauf in den infizierten Gruppen zeichnet sich durch einen tendenziell abfallenden LVsP von der spätakuten zur chronischen Phase aus. Die Unterschiede zwischen der spätakuten und subakuten und zwischen der spätakuten und chronischen Phase sind hoch- bzw. höchstsignifikant. Allerdings wird das Signifikanzniveau zwischen der subakuten und der chronischen Phase nicht erreicht.

	Mittelwert mit Standardabweichung				Signifikanz
I ₄ ↔ I ₇	I ₄	101,16 ± 25,13 mmHg	I ₇	73,57 ± 6,51 mmHg	p = 0,002
I ₇ ↔ I ₂₈	I ₇	73,57 ± 6,51 mmHg	I ₂₈	65,10 ± 12,12 mmHg	p = 0,299
I ₄ ↔ I ₂₈	I ₄	101,16 ± 25,13 mmHg	I ₂₈	65,10 ± 12,12 mmHg	p < 0,001

Tab. 4.4 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich von LVsP der infizierten Gruppen untereinander

4.4.2 Linksentrikuläre Auswurfraction (EF, ejection fraction)

In der spätakuten Phase der Erkrankung lässt sich keine signifikante Veränderung der Auswurfraction darstellen. Dagegen beobachtet man im subakuten Infektionsstadium eine hochsignifikant verminderte Auswurfraction bei den infizierten Mäusen gegenüber den nicht infizierten. Auch im chronischen Stadium stellt sich die EF der infizierten Gruppe höchstsignifikant vermindert gegenüber der Kontrollgruppe dar.

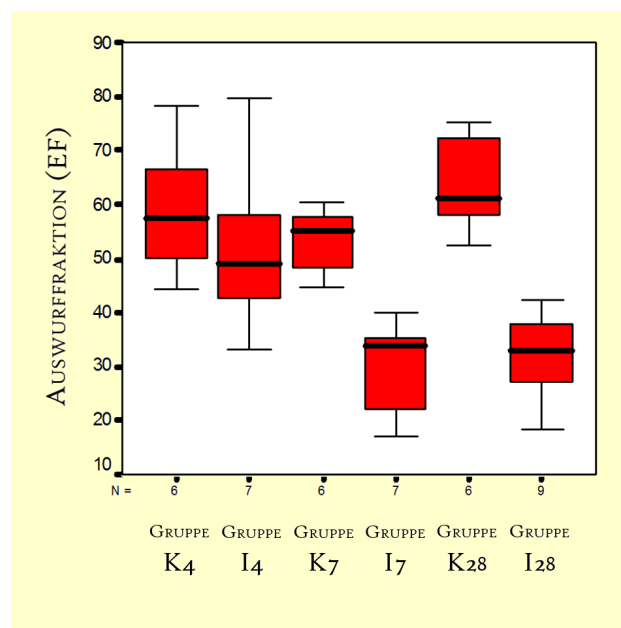


Abb. 4.4 Box-Plot: Auswurfraction (EF) in %

	Mittelwert infizierte Gruppe		Mittelwert Kontrollgruppe		Signifikanz	Tierzahl			
I ₄ ↔ K ₄	I ₄	51,93 ± 15,40 %	K ₄	58,94 ± 12,64 %	p = 0,366	I ₄	n = 7	K ₄	n = 6
I ₇ ↔ K ₇	I ₇	29,34 ± 8,84 %	K ₇	53,59 ± 5,97 %	p = 0,001	I ₇	n = 7	K ₇	n = 6
I ₂₈ ↔ K ₂₈	I ₂₈	31,30 ± 7,93 %	K ₂₈	63,42 ± 8,73 %	p < 0,001	I ₂₈	n = 9	K ₂₈	n = 6

Tab. 4.5 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der Auswurfractionen der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Vergleicht man nur die infizierten Tiergruppen miteinander, so wird deutlich, dass sich die Auswurfraction erst am 7. Infektionstag signifikant vermindert zeigt und so bis ins chronische Stadium verbleibt.

		Mittelwert mit Standardabweichung				Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow I_7$	I_4	51,93 ± 15,40 %	I_7	29,34 ± 8,84 %	$p = 0,011$	
$I_7 \leftrightarrow I_{28}$	I_7	29,34 ± 8,84 %	I_{28}	31,30 ± 7,93 %	$p = 0,758$	
$I_4 \leftrightarrow I_{28}$	I_4	51,93 ± 15,40 %	I_{28}	31,30 ± 7,93 %	$p = 0,008$	

Tab. 4.6 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der Auswurfractionen der infizierten Gruppen miteinander

4.4.3 Endsystolisches Volumen (ESV)

Im auslaufenden akuten Erkrankungsstadium der infizierten Tiere ist keine Änderung des Blutvolumens am Ende der systolischen Herzaktion im Vergleich zu den gesunden Tieren zu verzeichnen. Die subakute Phase der Infektion zeichnet sich durch hochsignifikant erhöhte endsystolische Volumina der infizierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe aus. In der chronischen Phase bleibt das ESV in der infizierten Gruppe im Gegenteil zur nicht infizierten Gruppe hochsignifikant erhöht.

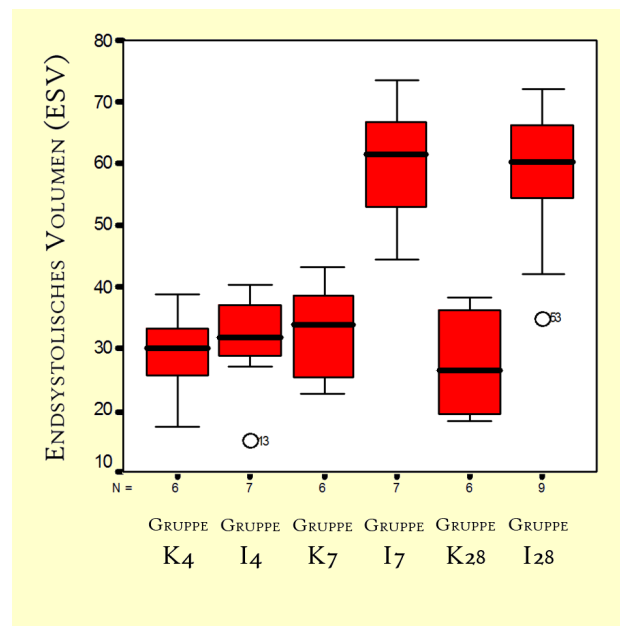


Abb. 4.5 Box-Plot: Endsystolisches Volumen (ESV) in ml

		Mittelwert infizierte Gruppe	Mittelwert Kontrollgruppe	Signifikanz	Tierzahl				
$I_4 \leftrightarrow K_4$	I_4	31,27 ± 8,56 ml	K_4	29,26 ± 7,64 ml	$p = 0,534$	I_4	n = 7	K_4	n = 6
$I_7 \leftrightarrow K_7$	I_7	59,83 ± 10,37 ml	K_7	33,02 ± 7,77 ml	$p = 0,001$	I_7	n = 7	K_7	n = 6
$I_{28} \leftrightarrow K_{28}$	I_{28}	57,69 ± 12,57 ml	K_{28}	27,58 ± 8,38 ml	$p = 0,002$	I_{28}	n = 9	K_{28}	n = 6

Tab. 4.7 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich von ESV der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Zwischen den infizierten Gruppen der spätakuten und der subakuten Phase sowie zwischen der spätakuten und der chronischen Phase kommt es zu einer hochsignifikanten Erhöhung des endsystolischen Volumens. In der chronischen Phase gibt es, verglichen mit der subakuten Phase, keine Veränderungen.

		Mittelwert mit Standartabweichung			Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow I_7$	I_4	31,27 ± 8,56 ml	I_7	59,83 ± 10,37 ml	$p = 0,001$
$I_7 \leftrightarrow I_{28}$	I_7	59,83 ± 10,37 ml	I_{28}	57,69 ± 12,57 ml	$p = 0,758$
$I_4 \leftrightarrow I_{28}$	I_4	31,27 ± 8,56 ml	I_{28}	57,69 ± 12,57 ml	$p = 0,001$

Tab. 4.8 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich von ESV der infizierten Gruppen untereinander

4.4.4 Enddiastolisches Volumen (EDV)

Infizierte Mäuse im terminalen Akutstadium der Myokarditis zeigen zunächst ein vermindertes enddiastolisches Volumen im Vergleich zu den Kontrollmäusen. In der subakuten Phase zeigt sich keine signifikante Veränderung des EDV bei den infizierten Tieren gegenüber den nicht infizierten. Das chronische Stadium zeichnet sich durch ein gegenüber den Kontrolltieren erhöhtes enddiastolisches Volumen bei den Erkrankten aus.

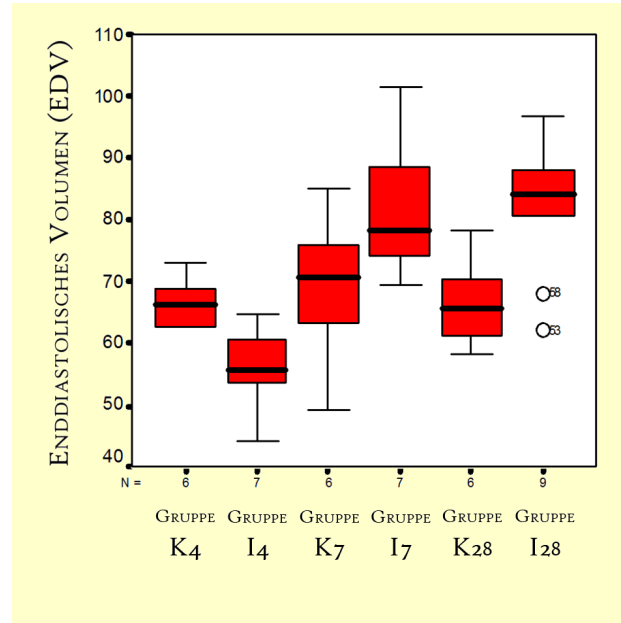


Abb. 4.6 Box-Plot: Enddiastolisches Volumen (EDV) in ml

		Mittelwert infizierte Gruppe		Mittelwert Kontrollgruppe		Signifikanz	Tierzahl		
$I_4 \leftrightarrow K_4$	I_4	56,17 ± 6,88 ml	K_4	66,65 ± 4,04 ml	$p = 0,014$	I_4	n = 7	K_4	n = 6
$I_7 \leftrightarrow K_7$	I_7	82,08 ± 11,34 ml	K_7	69,16 ± 12,52 ml	$p = 0,138$	I_7	n = 7	K_7	n = 6
$I_{28} \leftrightarrow K_{28}$	I_{28}	82,06 ± 10,84 ml	K_{28}	66,58 ± 7,06 ml	$p = 0,012$	I_{28}	n = 9	K_{28}	n = 6

Tab. 4.9 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich von EDV der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Der infektiöse Verlauf gestaltet sich durch ein hochsignifikant erhöhtes EDV in der subakuten und in der chronischen Phase gegenüber der spätakuten Phase. Die Werte zwischen der subakuten und der chronischen Phase erreichen nicht das Signifikanzniveau.

		Mittelwert mit Standartabweichung			Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow I_7$	I_4	56,17 ± 6,88 ml	I_7	82,08 ± 11,34 ml	$p = 0,001$
$I_7 \leftrightarrow I_{28}$	I_7	82,08 ± 11,34 ml	I_{28}	82,06 ± 10,84 ml	$p = 0,918$
$I_4 \leftrightarrow I_{28}$	I_4	56,17 ± 6,88 ml	I_{28}	82,06 ± 10,84 ml	$p = 0,001$

Tab. 4.10 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich von EDV der infizierten Gruppen untereinander

4.4.5 Schlagvolumen (SV)

Auf den ersten Blick ist ein Abfall des Schlagvolumens bei den erkrankten Tieren im spätakuten Infektionsstadium zu vermuten, der Unterschied zur Kontrollgruppe ist jedoch nicht signifikant. Auch zeichnet sich die subakute Erkrankungsphase nach der α -Adjustierung nach Bonferroni durch keinen signifikanten SV-Abfall aus. Dennoch stellt sich ein deutlicher signifikanter Abfall des Schlagvolumens in der chronischen Erkrankungsphase bei der infizierten Gruppe gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe dar.

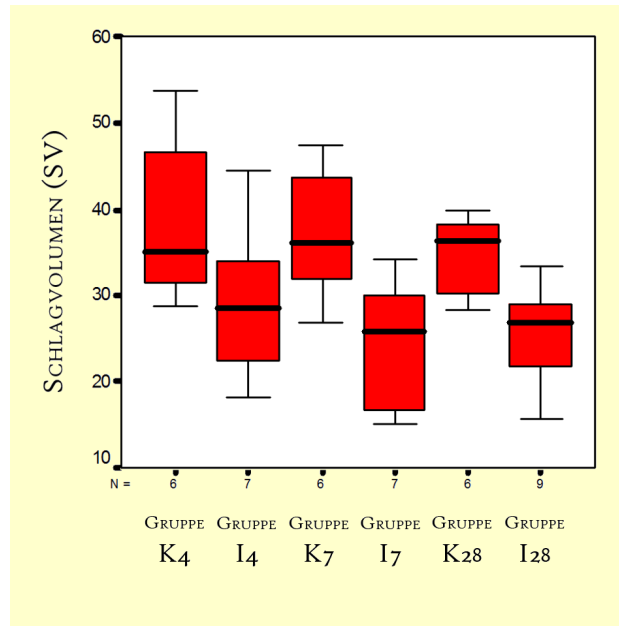


Abb. 4.7 Box-Plot: Schlagvolumen (SV) in ml

	Mittelwert infizierte Gruppe	Mittelwert Kontrollgruppe	Signifikanz	Tierzahl			
I ₄ ↔ K ₄	I ₄ 29,13 ± 9,15 ml	K ₄ 38,44 ± 9,83 ml	p = 0,073	I ₄	n = 7	K ₄	n = 6
I ₇ ↔ K ₇	I ₇ 24,04 ± 7,97 ml	K ₇ 36,97 ± 7,63 ml	p = 0,035	I ₇	n = 7	K ₇	n = 6
I ₂₈ ↔ K ₂₈	I ₂₈ 25,69 ± 5,85 ml	K ₂₈ 34,83 ± 4,65 ml	p = 0,012	I ₂₈	n = 9	K ₂₈	n = 6

Tab. 4.11 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der Schlagvolumina der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Der temporäre Verlauf der Erkrankung zeigt keine signifikanten Veränderungen zwischen den infizierten Versuchsgruppen.

	Mittelwert mit Standardabweichung				Signifikanz
I ₄ ↔ I ₇	I ₄	29,13 ± 9,15 ml	I ₇	24,04 ± 7,97 ml	p = 0,383
I ₇ ↔ I ₂₈	I ₇	24,04 ± 7,97 ml	I ₂₈	25,69 ± 5,85 ml	p = 0,681
I ₄ ↔ I ₂₈	I ₄	29,13 ± 9,15 ml	I ₂₈	25,69 ± 5,85 ml	p = 0,606

Tab. 4.12 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der Schlagvolumina der infizierten Gruppen untereinander

4.5 Nachweis enteroviraler RNA

Mittels RT-PCR in Kombination mit der nested-PCR kann in 23 der insgesamt 30 infizierten Tiere enterovirale RNA nachgewiesen werden. Die sieben Mäuse, bei denen der Nachweis einer Viruspersistenz fehlschlägt, befanden sich alle im chronischen Infektionsstadium (Gruppe I₂₈),

	Mittelwert / Standardabweichung
I ₄	5,29 ± 2,53
I ₇	2,82 ± 1,18
I ₂₈	1,03 ± 1,09

Tab. 4.13 OD-Werte der CVB-3-RNA aus RT- und nested-PCR

während in allen virusinokulierten Tieren des 4. und 7. Sakrifizierungstages (Gruppe I₄ und I₇) das CVB-3-Genom nachgewiesen werden kann. Der Nachweis enteroviraler RNA fällt bei allen Kontrolltieren negativ aus (Abb. 4.8).

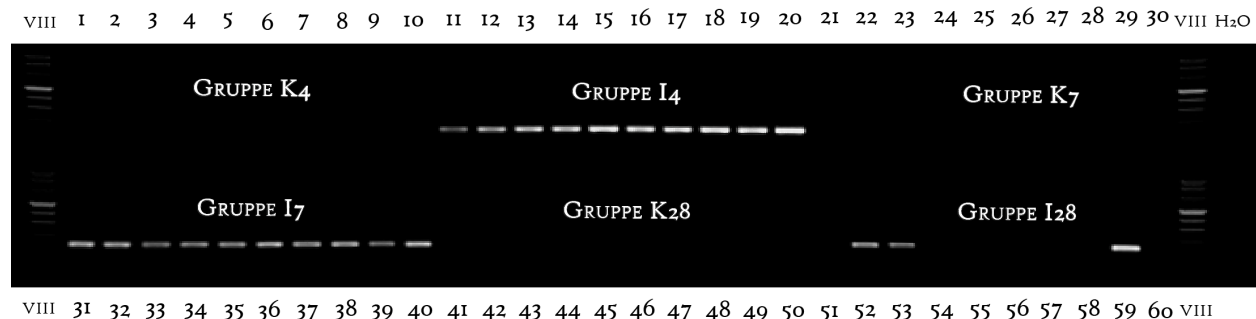


Abb. 4.8 CVB-3-Nachweis mittels RT-PCR und nested-PCR (Darstellung im 2%-igen Ethidiumbromid-gefärbten Agarose-Gel; VIII = DNA-Längenmarker, Spur 1 – 10: nicht infizierte Tiere der Gruppe K₄, Spur 11 – 20 infizierte Tiere der Gruppe I₄, Spur 21 – 30 nicht infizierte Tiere der Gruppe K₇, Spur 31 – 40 infizierte Tiere der Gruppe I₇, Spur 41 – 50 nicht infizierte Tiere der Gruppe K₂₈, Spur 51 – 60 infizierte Tiere der Gruppe I₂₈, H₂O = Negativkontrolle)

4.6 Veränderungen der mRNA-Expression

4.6.1 Semiquantitative RT-PCR

Die statistische Auswertung mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis zeigt, dass alle untersuchten Wertegruppen nicht einer Grundgesamtheit zuzuordnen sind, sodass die Nullhypothese (Gleichheit zwischen den beobachteten Gruppen für eine Variable) widerlegt werden kann. Als Wahrscheinlichkeiten für den Fehler 1. Art ergeben sich beim Kruskal-Wallis-Test für die mRNA-Expressionen von IL-6, IL-10, IFN- γ , p67phox, gp91phox, MnSOD, Angiotensinogen, AT_{1A}⁻, AT_{1B}⁻ und AT₂-Rezeptor Höchstsignifikanzen ($p < 0,001$), für die mRNA-Expressionen von TGF- β_1 und p47phox Hochsignifikanzen ($p = 0,001$). Auf dieser Basis können Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U-Test zwischen den Versuchsgruppen vorgenommen werden. Die folgenden Daten wurden bei allen 60 Tieren erhoben ($n = 60$).

4.6.1.1 IL-6

In der infizierten Gruppe der späten Infektionsphase kommt es gegenüber der nicht infizierten Kontrolle zu einer deutlichen und höchstsignifikanten Erhöhung der IL-6-Expression. In der subakuten Phase ist in der infizierten Gruppe ebenfalls ein höchstsignifikanter Anstieg der IL-6-Expression zu verzeichnen. Zu einer Erhöhung der Expression in der infizierten Gruppe gegenüber der nicht infizierten Gruppe kommt es auch in der chronischen Infektionsphase. Diese Veränderung kann als statistisch hochsignifikant gewertet werden.

	Mittelwert infizierte Gruppe		Mittelwert Kontrollgruppe		Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow K_4$	I_4	$1,56 \pm 0,26$	K_4	$0,78 \pm 0,33$	$p < 0,001$
$I_7 \leftrightarrow K_7$	I_7	$1,91 \pm 0,19$	K_7	$0,69 \pm 0,17$	$p < 0,001$
$I_{28} \leftrightarrow K_{28}$	I_{28}	$1,02 \pm 0,17$	K_{28}	$0,69 \pm 0,17$	$p = 0,001$

Tab. 4.14 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der IL-6-Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Vergleicht man die Expression von IL-6 im temporären Verlauf der infizierten Gruppen, so ist ein hochsignifikanter Anstieg von der spätakuten zur subakuten Phase und ein höchstsignifikanter Abfall der Expression von der spätakuten und subakuten zur chronischen Infektionsphase zu verzeichnen.

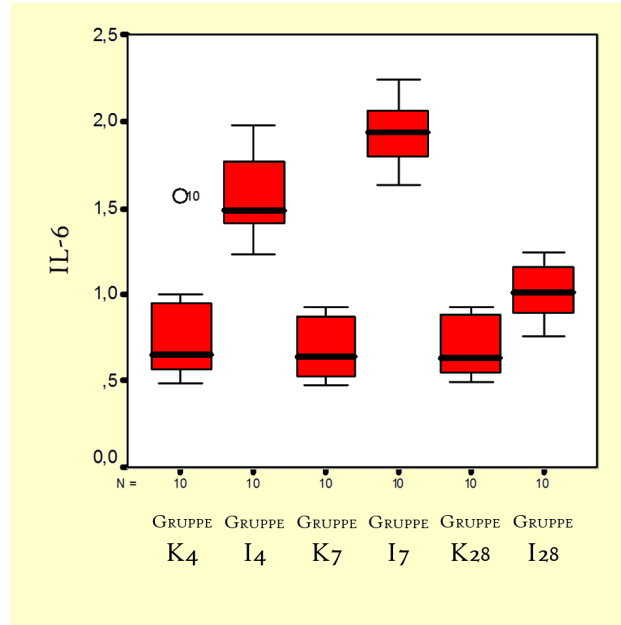


Abb. 4.9

Box-Plot: IL-6-Expression

	Mittelwert mit Standardabweichung				Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow I_7$	I_4	$1,56 \pm 0,26$	I_7	$1,91 \pm 0,19$	$p = 0,004$
$I_7 \leftrightarrow I_{28}$	I_7	$1,91 \pm 0,19$	I_{28}	$1,02 \pm 0,17$	$p < 0,001$
$I_4 \leftrightarrow I_{28}$	I_4	$1,56 \pm 0,26$	I_{28}	$1,02 \pm 0,17$	$p < 0,001$

Tab. 4.15 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der IL-6-Expression der infizierten Gruppen untereinander

4.6.1.2 IL-10

Ähnlich wie bei IL-6 kommt es auch hier in der infizierten Gruppe zu einer höchstsignifikant verstärkten Expression von IL-10-mRNA im spätakuten Infektionsstadium. Auch in der subakuten Phase ist die IL-10-Expression gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe deutlich erhöht. Die infizierte Gruppe der chronischen Infektionsphase weist gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls eine hochsignifikant erhöhte Expression auf.

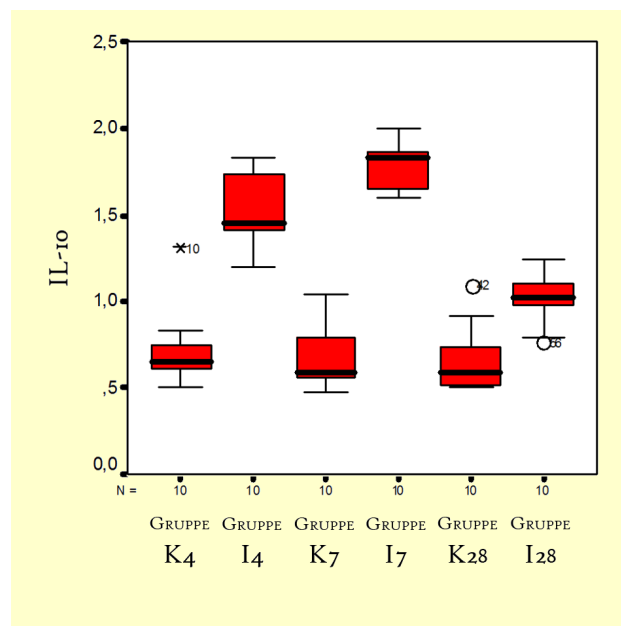


Abb. 4.10 Box-Plot: IL-10-Expression

	Mittelwert infizierte Gruppe		Mittelwert Kontrollgruppe		Signifikanz
I ₄ ↔ K ₄	I ₄	1,50 ± 0,22	K ₄	0,72 ± 0,23	p < 0,001
I ₇ ↔ K ₇	I ₇	1,79 ± 0,13	K ₇	0,67 ± 0,18	p < 0,001
I ₂₈ ↔ K ₂₈	I ₂₈	1,01 ± 0,15	K ₂₈	0,67 ± 0,20	p = 0,001

Tab. 4.16 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der IL-10-Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Im temporären Verlauf der infizierten Versuchsgruppen ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der spätakuten und der subakuten Gruppe, wobei beide Wertegruppen höchstsignifikant von der chronischen Gruppe differieren.

	Mittelwert mit Standardabweichung				Signifikanz
I ₄ ↔ I ₇	I ₄	1,50 ± 0,22	I ₇	1,79 ± 0,13	p = 0,003
I ₇ ↔ I ₂₈	I ₇	1,79 ± 0,13	I ₂₈	1,01 ± 0,15	p < 0,001
I ₄ ↔ I ₂₈	I ₄	1,50 ± 0,22	I ₂₈	1,01 ± 0,15	p < 0,001

Tab. 4.17 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der IL-10-Expression der infizierten Gruppen untereinander

4.6.1.3 INF-γ

Die virale Infektion führt im terminalen Akutstadium zu einer eindeutigen Zunahme der Interferon-γ-Expression, verglichen mit der zugehörigen Kontrollgruppe. In der subakuten Gruppe bewirkt die Infektion mit CVB-3 eine fast 3-fach höhere mRNA-Expression von INF-γ. Ein höchstsignifikanter Unterschied lässt sich auch bei der Expression von INF-γ im chronischen Infektionsstadium zwischen der infizierten Gruppe und der Kontrollgruppe feststellen.

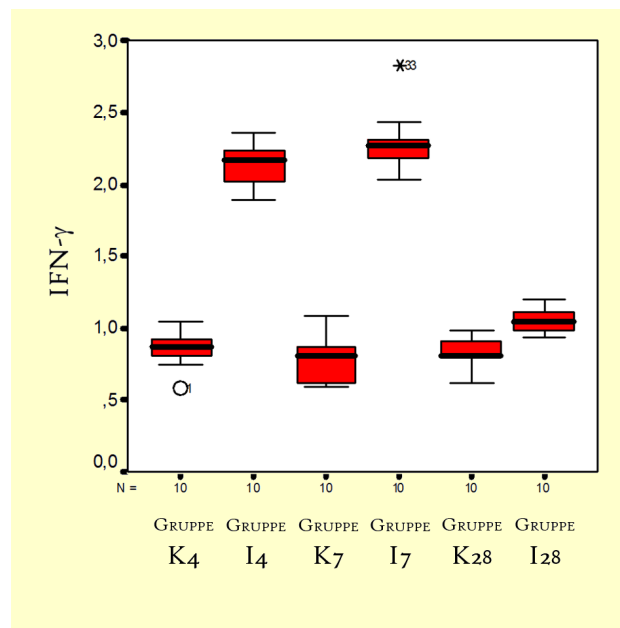


Abb. 4.11 Box-Plot: INF-γ-Expression

	Mittelwert infizierte Gruppe		Mittelwert Kontrollgruppe		Signifikanz
I ₄ ↔ K ₄	I ₄	2,14 ± 0,15	K ₄	0,86 ± 0,13	p < 0,001
I ₇ ↔ K ₇	I ₇	2,29 ± 0,22	K ₇	0,80 ± 0,15	p < 0,001
I ₂₈ ↔ K ₂₈	I ₂₈	1,06 ± 0,09	K ₂₈	0,83 ± 0,10	p < 0,001

Tab. 4.18 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der INF-γ-Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Im infektiösen Gesamtverlauf der INF- γ -Expression ist eine signifikante Verschiebung zwischen der spätakuten und der subakuten Gruppe nicht zu verzeichnen, dagegen sinkt die Expression in der chronischen Phase, verglichen mit den beiden anderen infizierten Gruppen, stark ab.

	Mittelwert mit Standardabweichung				Signifikanz
I ₄ ↔ I ₇	I ₄	2,14 ± 0,15	I ₇	2,29 ± 0,22	p = 0,123
I ₇ ↔ I ₂₈	I ₇	2,29 ± 0,22	I ₂₈	1,06 ± 0,09	p < 0,001
I ₄ ↔ I ₂₈	I ₄	2,14 ± 0,15	I ₂₈	1,06 ± 0,09	p < 0,001

Tab. 4.19 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der INF- γ -Expression der infizierten Gruppen untereinander

4.6.1.4 TGF- β_1

Die Werteunterschiede zwischen den infizierten Gruppen am 4. und am 7. Tag p.i. sind gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen nicht signifikant. Die Expression in der infizierten chronischen Gruppe zeigt dagegen einen höchstsignifikanten Abfall gegenüber der Kontrollgruppe.

	Mittelwert infizierte Gruppe		Mittelwert Kontrollgruppe		Signifikanz
I ₄ ↔ K ₄	I ₄	1,04 ± 0,09	K ₄	1,00 ± 0,11	p = 0,481
I ₇ ↔ K ₇	I ₇	1,08 ± 0,40	K ₇	1,01 ± 0,16	p = 0,912
I ₂₈ ↔ K ₂₈	I ₂₈	0,77 ± 0,11	K ₂₈	1,00 ± 0,06	p < 0,001

Tab. 4.20 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der TGF- β_1 -Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Vergleicht man nur die infizierten Tiergruppen miteinander, so wird deutlich, dass sich die TGF- β_1 -Expression in der spätakuten und der subakuten Gruppe nicht unterscheidet, d.h. es ist kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Die infizierte chronische Gruppe zeigt eine hochsignifikante Expressionsverminderung gegenüber der subakuten Gruppe und eine höchstsignifikante Verminderung gegenüber der spätakuten Gruppe.

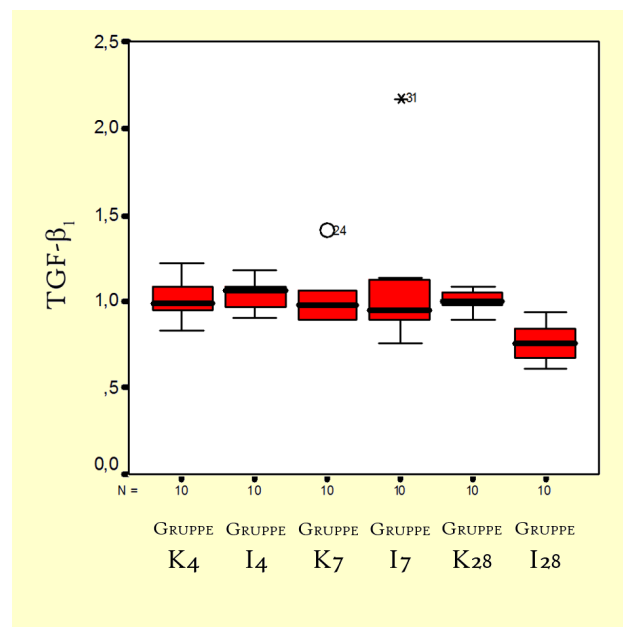


Abb. 4.12 Box-Plot: TGF- β_1 -Expression

		Mittelwert mit Standartabweichung			Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow I_7$	I_4	$1,04 \pm 0,09$	I_7	$1,08 \pm 0,40$	$p = 0,353$
$I_7 \leftrightarrow I_{28}$	I_7	$1,08 \pm 0,40$	I_{28}	$0,77 \pm 0,11$	$p = 0,002$
$I_4 \leftrightarrow I_{28}$	I_4	$1,04 \pm 0,09$	I_{28}	$0,77 \pm 0,11$	$p < 0,001$

Tab. 4.21 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der TGF- β_1 -Expression der infizierten Gruppen miteinander

4.6.1.5 p47phox

Die Expression von p47phox zeigt im endenden akuten Stadium einen Anstieg von der Kontrollgruppe zu der jeweiligen infizierten Gruppe, der sich als hochsignifikant darstellt. Bei den Tieren in der subakuten Infektionsphase lässt sich ebenfalls ein hochsignifikanter Anstieg der Expression in der infizierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe beobachten. In der chronischen Phase ist keine Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe und der infizierten Gruppe zu eruieren.

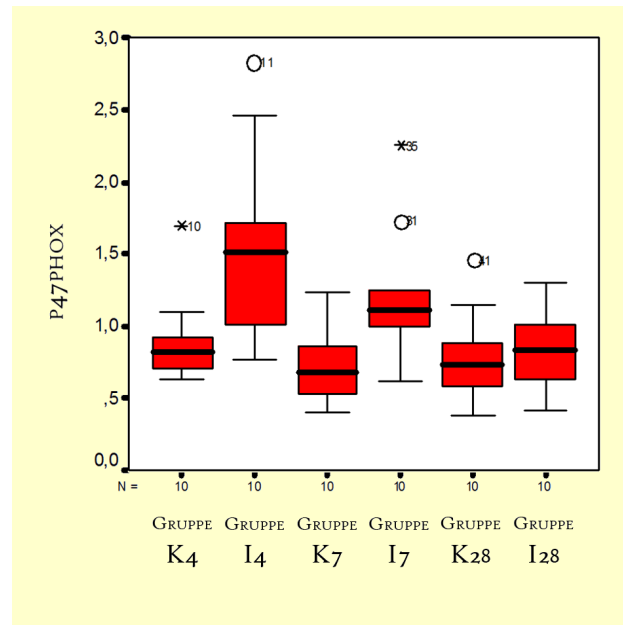


Abb. 4.13 Box-Plot: p47phox-Expression

		Mittelwert infizierte Gruppe	Mittelwert Kontrollgruppe	Signifikanz	
$I_4 \leftrightarrow K_4$	I_4	$1,54 \pm 0,66$	K_4	$0,90 \pm 0,31$	$p = 0,007$
$I_7 \leftrightarrow K_7$	I_7	$1,22 \pm 0,46$	K_7	$0,74 \pm 0,27$	$p = 0,007$
$I_{28} \leftrightarrow K_{28}$	I_{28}	$0,83 \pm 0,29$	K_{28}	$0,80 \pm 0,31$	$p = 0,796$

Tab. 4.22 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der p47phox-Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Im temporären Verlauf lässt sich eine abfallende Expressionstendenz vermuten, die aber nur zum Teil signifikant untermalt werden kann. Als nicht signifikant stellt sich der Unterschied zwischen der spätakuten und der subakuten Gruppe sowie, nach der α -Adjustierung nach Bonferroni, auch zwischen der subakuten und der chronischen Gruppe dar. Die Expressionsverminderung von der spätakuten zur chronischen Gruppe ist hochsignifikant. In der chronischen Phase entspricht die Expressionshöhe praktisch dem Ausgangsniveau (Kontrollgruppen).

		Mittelwert mit Standartabweichung			Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow I_7$	I_4	$1,54 \pm 0,66$	I_7	$1,22 \pm 0,46$	$p = 0,315$
$I_7 \leftrightarrow I_{28}$	I_7	$1,22 \pm 0,46$	I_{28}	$0,83 \pm 0,29$	$p = 0,043$
$I_4 \leftrightarrow I_{28}$	I_4	$1,54 \pm 0,66$	I_{28}	$0,83 \pm 0,29$	$p = 0,005$

Tab. 4.23 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der p47phox-Expression zwischen den infizierten Gruppen

4.6.1.6 p67phox

Im spätakuten Infektionsstadium kann bei der p67phox-Expression aufgrund der vorgenommenen α -Adjustierung nach Bonferroni der Anstieg in der infizierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe nicht als statistisch signifikant gewertet werden. Ferner sind sowohl im subakuten als auch im chronischen Stadium der Infektion keine signifikanten Expressionsänderungen feststellbar.

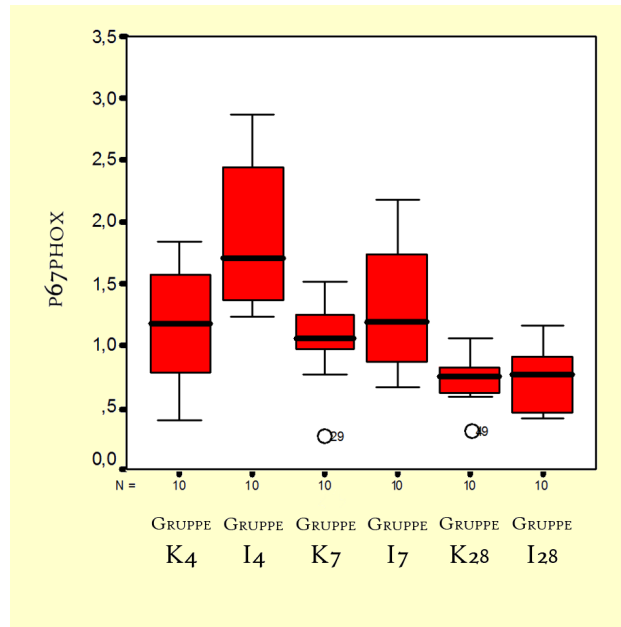


Abb. 4.14

Box-Plot: p67phox-Expression

	Mittelwert infizierte Gruppe	Mittelwert Kontrollgruppe	Signifikanz
I ₄ ↔ K ₄	I ₄ 1,86 ± 0,58	K ₄ 1,16 ± 0,48	p = 0,019
I ₇ ↔ K ₇	I ₇ 1,31 ± 0,52	K ₇ 1,04 ± 0,35	p = 0,481
I ₂₈ ↔ K ₂₈	I ₂₈ 0,77 ± 0,26	K ₂₈ 0,73 ± 0,20	p = 0,684

Tab. 4.24 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der p67phox-Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Im Gesamtverlauf lässt sich eine Expressionsminderung von p67phox zwischen den infizierten Gruppen erkennen. Der Expressionsunterschied zwischen der spätakuten und der subakuten Phase ist durch die α -Adjustierung nach Bonferroni nicht signifikant. Dagegen lässt sich der Expressionsabfall von der subakuten zur chronischen Phase als statistisch signifikant und von der spätakuten zur chronischen Phase als höchstsignifikant belegen.

	Mittelwert mit Standardabweichung				Signifikanz
I ₄ ↔ I ₇	I ₄	1,86 ± 0,58	I ₇	1,31 ± 0,52	p = 0,043
I ₇ ↔ I ₂₈	I ₇	1,31 ± 0,52	I ₂₈	0,77 ± 0,26	p = 0,015
I ₄ ↔ I ₂₈	I ₄	1,86 ± 0,58	I ₂₈	0,77 ± 0,26	p < 0,001

Tab. 4.25 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der p67phox-Expression zwischen den infizierten Gruppen

4.6.1.7 gp91Phox

In der spätakuten Infektionsphase der CVB-3-Infektion ist ein höchstsignifikanter Anstieg von gp91phox-Expression zu verzeichnen. Eine ebenfalls hochsignifikante Expressionsveränderung lässt sich in der subakuten Phase der Erkrankung darstellen. Zwischen der Kontrollgruppe und

der infizierten Gruppe im chronischen Stadium ist im Expressionsverhalten keine Signifikanz zu eruieren.

	Mittelwert infizierte Gruppe	Mittelwert Kontrollgruppe	Signifikanz
I ₄ ↔ K ₄	I ₄ 1,75 ± 0,68	K ₄ 0,72 ± 0,24	p < 0,001
I ₇ ↔ K ₇	I ₇ 1,27 ± 0,27	K ₇ 0,66 ± 0,41	p = 0,001
I ₂₈ ↔ K ₂₈	I ₂₈ 0,92 ± 0,22	K ₂₈ 0,87 ± 0,29	p = 0,529

Tab. 4.26 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der gp91phox-Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Der infektiöse Verlauf zeigt eine abfallende Tendenz von der spätakut infizierten zu der chronisch infizierten Tiergruppe. Eine hohe Signifikanz besteht zwar zwischen der spätakuten und chronischen und zwischen der subakuten und chronischen, nicht aber zwischen der spätakuten und subakuten Gruppe.

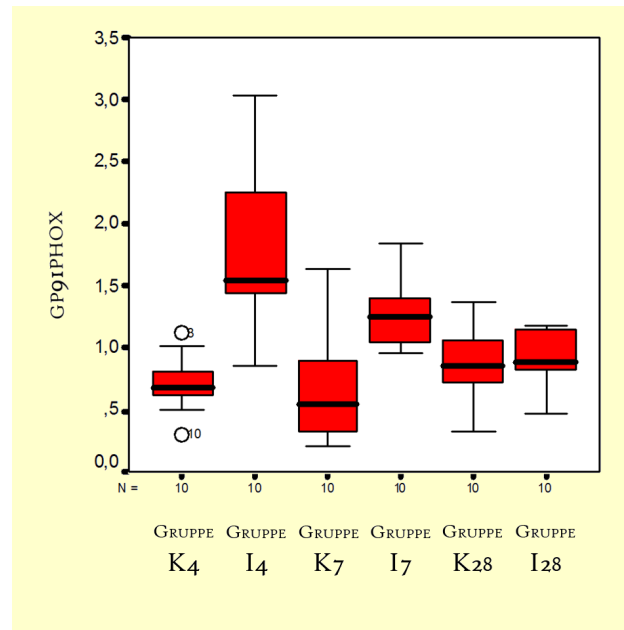


Abb. 4.15
Box-Plot: gp91phox-Expression

	Mittelwert mit Standardabweichung	Signifikanz
I ₄ ↔ I ₇	I ₄ 1,75 ± 0,68 I ₇ 1,27 ± 0,27	p = 0,063
I ₇ ↔ I ₂₈	I ₇ 1,27 ± 0,27 I ₂₈ 0,92 ± 0,22	p = 0,005
I ₄ ↔ I ₂₈	I ₄ 1,75 ± 0,68 I ₂₈ 0,92 ± 0,22	p = 0,002

Tab. 4.27 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der gp91phox-Expression der infizierten Gruppen untereinander

4.6.1.8 MnSOD

Die akute Infektion führt in der Versuchsgruppe I₄ zu einem deutlichen, höchstsignifikanten Anstieg der Expression von MnSOD gegenüber der Kontrollgruppe. Bei der mRNA-Expression in der infizierten Gruppe des subakuten Stadiums zeigt sich ebenfalls eine statistisch höchstsignifikante Erhöhung. Vergleicht man in der chronischen Phase der Infektion die infizierten und die nicht infizierten Tiere, so zeigt sich hier eine hochsignifikante Expressionserhöhung bei den infizierten Tieren gegenüber der Kontrollgruppe.

	Mittelwert infizierte Gruppe		Mittelwert Kontrollgruppe		Signifikanz
I ₄ ↔ K ₄	I ₄	2,03 ± 0,16	K ₄	1,07 ± 0,20	p < 0,001
I ₇ ↔ K ₇	I ₇	1,80 ± 0,13	K ₇	1,03 ± 0,13	p < 0,001
I ₂₈ ↔ K ₂₈	I ₂₈	1,25 ± 0,14	K ₂₈	1,02 ± 0,11	p = 0,004

Tab. 4.28 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der MnSOD-Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Die Verlaufswerte der infizierten Tiere deuten auf eine klar abnehmende Tendenz in der MnSOD-Expression von der spätakuten zur chronischen Phase der Erkrankung hin. Auch statistisch sind die Messwerte zwischen den einzelnen infizierten Gruppen hoch- und höchstsignifikant unterschiedlich.

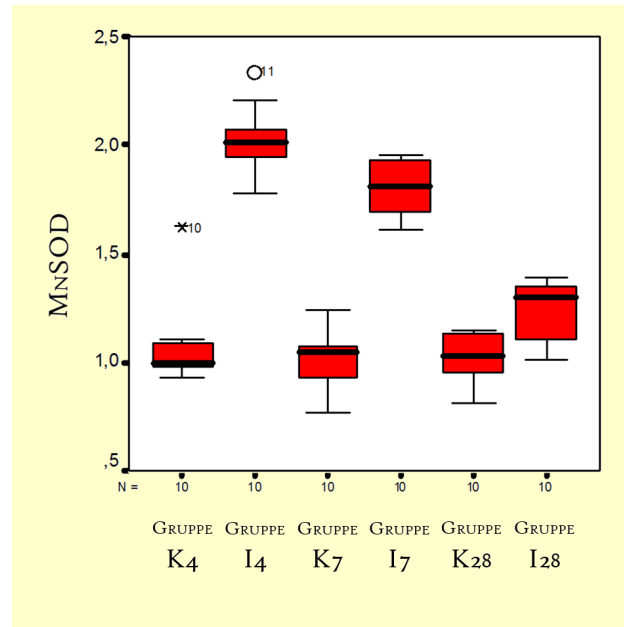


Abb. 4.16

Box-Plot: MnSOD-Expression

	Mittelwert mit Standardabweichung				Signifikanz
I ₄ ↔ I ₇	I ₄	2,03 ± 0,16	I ₇	1,80 ± 0,13	p = 0,002
I ₇ ↔ I ₂₈	I ₇	1,80 ± 0,13	I ₂₈	1,25 ± 0,14	p < 0,001
I ₄ ↔ I ₂₈	I ₄	2,03 ± 0,16	I ₂₈	1,25 ± 0,14	p < 0,001

Tab. 4.29 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der MnSOD-Expression zwischen den infizierten Gruppen

4.6.1.9 Angiotensinogen

Die Expression von Angiotensinogen in der terminalen Akutphase der Infektion ist in der infizierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe höchstsignifikant erhöht. Ebenfalls höchstsignifikant stellt sich die Zunahme der Expression in der subakuten Phase bei infizierten Tieren gegenüber den Kontrolltieren dar. Die chronisch erkrankten Tiere wiesen eine höchstsignifikante Erhöhung von Angiotensinogen gegenüber von Kontrolltieren auf.

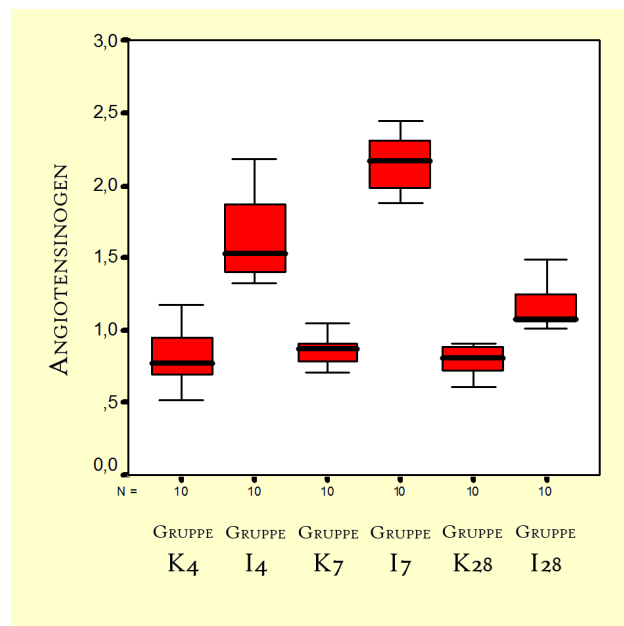


Abb. 4.17 Box-Plot: Angiotensinogen-Expression

		Mittelwert infizierte Gruppe		Mittelwert Kontrollgruppe	Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow K_4$	I_4	$1,63 \pm 0,29$	K_4	$0,83 \pm 0,22$	$p < 0,001$
$I_7 \leftrightarrow K_7$	I_7	$2,14 \pm 0,20$	K_7	$0,87 \pm 0,12$	$p < 0,001$
$I_{28} \leftrightarrow K_{28}$	I_{28}	$1,15 \pm 0,16$	K_{28}	$0,79 \pm 0,11$	$p < 0,001$

Tab. 4.30 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der Angiotensinogen-Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Die temporäre Dynamik von Angiotensinogen zeichnet sich primär durch einen Anstieg der Expression vom spätakuten zum subakuten Stadium, und durch einen höchstsignifikanten Abfall in der chronischen Gruppe gegenüber den beiden anderen.

		Mittelwert mit Standardabweichung		Signifikanz	
$I_4 \leftrightarrow I_7$	I_4	$1,63 \pm 0,29$	I_7	$2,14 \pm 0,20$	$p < 0,001$
$I_7 \leftrightarrow I_{28}$	I_7	$2,14 \pm 0,20$	I_{28}	$1,15 \pm 0,16$	$p < 0,001$
$I_4 \leftrightarrow I_{28}$	I_4	$1,63 \pm 0,29$	I_{28}	$1,15 \pm 0,16$	$p < 0,001$

Tab. 4.31 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der Angiotensinogen-Expression der infizierten Gruppen untereinander

4.6.1.10 AT_{1A}-Rezeptor

Die Expression des AT_{1A}-Rezeptors bei spätakut infizierten Tieren verringert sich gegenüber den jeweiligen Kontrolltieren höchstsignifikant. Auch bei der Gruppe in der subakuten Phase ist eine Verminderung der AT_{1A}-Rezeptor-Expression zu verzeichnen. In der chronischen Phase der Infektion ist, vergleichend mit nicht infizierten Tieren, keine signifikante Veränderung in der Expression des AT_{1A}-Rezeptors vorhanden.

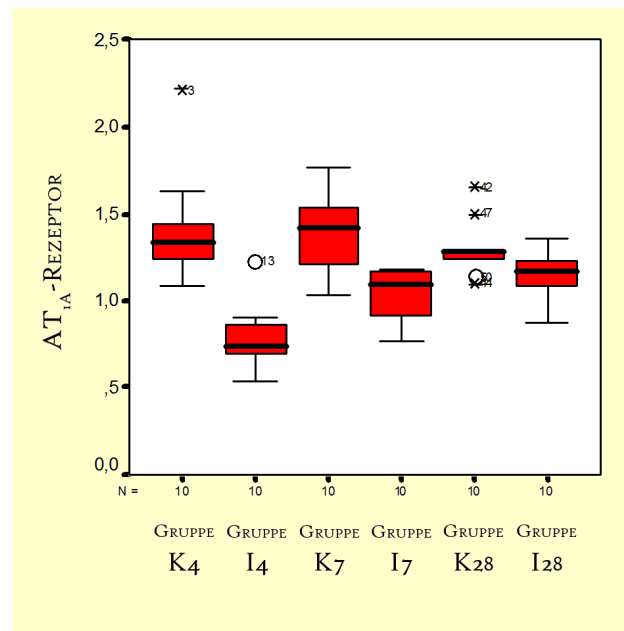


Abb. 4.18 Box-Plot: AT_{1A}-Rezeptor-Expression

		Mittelwert infizierte Gruppe		Mittelwert Kontrollgruppe	Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow K_4$	I_4	$0,78 \pm 0,19$	K_4	$1,42 \pm 0,31$	$p < 0,001$
$I_7 \leftrightarrow K_7$	I_7	$1,04 \pm 0,16$	K_7	$1,40 \pm 0,21$	$p = 0,001$
$I_{28} \leftrightarrow K_{28}$	I_{28}	$1,15 \pm 0,14$	K_{28}	$1,30 \pm 0,16$	$p = 0,075$

Tab. 4.32 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der AT_{1A}-Rezeptor-Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Tendenziell „normalisiert“ sich die im finalen Akutstadium verringerte Expression bis zum chronischen Stadium. Allerdings stellt sich dieser Prozess als statistisch signifikant nur zwischen dem spätakuten und dem subakuten und zwischen dem spätakuten und dem chronischen Stadium dar.

		Mittelwert mit Standardabweichung				Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow I_7$	I_4	$0,78 \pm 0,19$	I_7	$1,04 \pm 0,16$	$p = 0,005$	
$I_7 \leftrightarrow I_{28}$	I_7	$1,04 \pm 0,16$	I_{28}	$1,15 \pm 0,14$	$p = 0,143$	
$I_4 \leftrightarrow I_{28}$	I_4	$0,78 \pm 0,19$	I_{28}	$1,15 \pm 0,14$	$p = 0,001$	

Tab. 4.33 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der AT_{1A} -Rezeptor-Expression der infizierten Gruppen untereinander

4.6.1.11 AT_{1B} -Rezeptor

Durch die semiquantitative RT-PCR kann in infizierten Myokardproben des spätakuten Infektionsstadiums eine höchstsignifikant erhöhte Expression von AT_{1B} -Rezeptor-mRNA gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden. Bei den infizierten Tieren in der subakuten Infektionsphase kommt es zu einer höchstsignifikanten Anhebung der mRNA-Expression für AT_{1B} -Rezeptor auf beinahe das 3-fache. Auch in der chronischen Phase der Infektion ist die Expression von AT_{1B} -Rezeptor in der infizierten Gruppe höher als in der Kontrollgruppe.

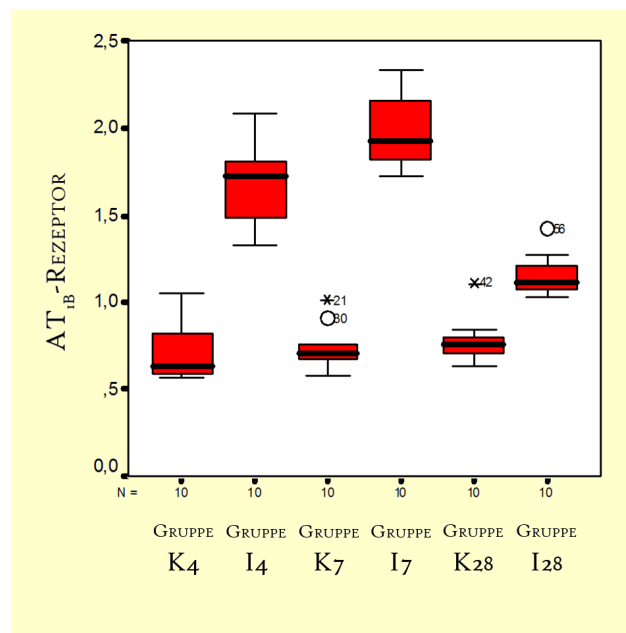


Abb. 4.19 Box-Plot: AT_{1B} -Rezeptor-Expression

		Mittelwert infizierte Gruppe	Mittelwert Kontrollgruppe	Signifikanz	
$I_4 \leftrightarrow K_4$	I_4	$1,68 \pm 0,25$	K_4	$0,72 \pm 0,17$	$p < 0,001$
$I_7 \leftrightarrow K_7$	I_7	$1,97 \pm 0,20$	K_7	$0,73 \pm 0,13$	$p < 0,001$
$I_{28} \leftrightarrow K_{28}$	I_{28}	$1,15 \pm 0,12$	K_{28}	$0,78 \pm 0,13$	$p < 0,001$

Tab. 4.34 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der AT_{1B} -Rezeptor-Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Der chronologische Verlauf gestaltet sich durch die in die subakute Phase signifikant steigende Expression des AT_{1B} -Rezeptors mit folgendem Abfall in der chronischen Phase. Sowohl zwischen der subakuten und der chronischen Phase als auch zwischen der spätakuten und der chronischen Phase besteht eine sehr hohe Signifikanz.

		Mittelwert mit Standartabweichung			Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow I_7$	I_4	$1,68 \pm 0,25$	I_7	$1,97 \pm 0,20$	$p = 0,011$
$I_7 \leftrightarrow I_{28}$	I_7	$1,97 \pm 0,20$	I_{28}	$1,15 \pm 0,12$	$p < 0,001$
$I_4 \leftrightarrow I_{28}$	I_4	$1,68 \pm 0,25$	I_{28}	$1,15 \pm 0,12$	$p < 0,001$

Tab. 4.35 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der AT_{1B}-Rezeptor-Expression der infizierten Gruppen untereinander

4.6.1.12 AT₂-Rezeptor

Der AT₂-Rezeptor wird in infizierten Tieren der spätakuten Gruppe höchstsignifikant niedriger exprimiert als in den Vergleichstieren der Kontrollgruppe. In der virusinfizierten Gruppe liegt die Genexpression von AT₂-Rezeptor in der subakuten Phase hochgradig unter der Expression der nicht infizierten Kontrollgruppe. Die chronisch infizierte Gruppe weist auf eine etwas höhere Expression als die Kontrollgruppe hin, es zeigt sich jedoch keine statistische Signifikanz.

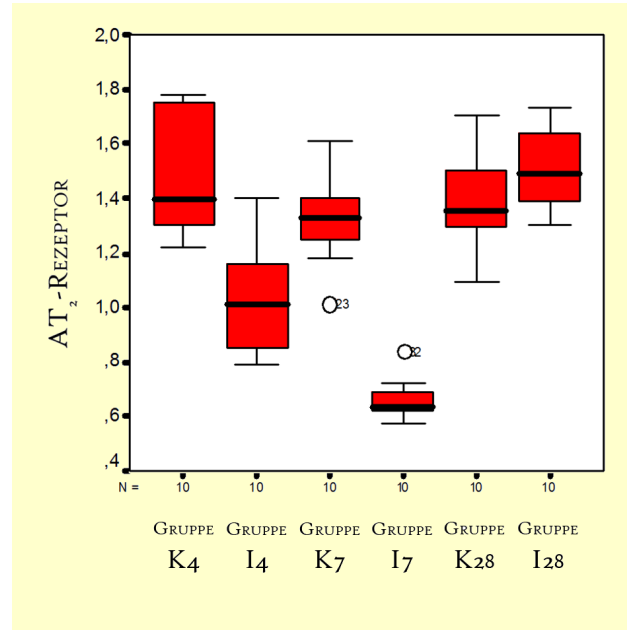


Abb. 4.20 Box-Plot: AT₂-Rezeptor-Expression

		Mittelwert infizierte Gruppe	Mittelwert Kontrollgruppe	Signifikanz	
$I_4 \leftrightarrow K_4$	I_4	$1,02 \pm 0,19$	K_4	$1,46 \pm 0,22$	$p < 0,001$
$I_7 \leftrightarrow K_7$	I_7	$0,66 \pm 0,08$	K_7	$1,32 \pm 0,16$	$p < 0,001$
$I_{28} \leftrightarrow K_{28}$	I_{28}	$1,51 \pm 0,15$	K_{28}	$1,40 \pm 0,18$	$p = 0,105$

Tab. 4.36 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der AT₂-Rezeptor-Expression der infizierten Gruppen mit den zugehörigen Kontrollgruppen

Im infektiösen Verlauf wird deutlich, dass die AT₂-Rezeptor-Expression bis in die subakute Phase abnimmt, was durch die Signifikanz der Werte belegt wird. Im chronischen Stadium wird der Rezeptor wieder stärker exprimiert. Die Werteunterschiede zwischen allen drei infizierten Gruppen sind höchstsignifikant.

		Mittelwert mit Standartabweichung			Signifikanz
$I_4 \leftrightarrow I_7$	I_4	$1,02 \pm 0,19$	I_7	$0,66 \pm 0,08$	$p < 0,001$
$I_7 \leftrightarrow I_{28}$	I_7	$0,66 \pm 0,08$	I_{28}	$1,51 \pm 0,15$	$p < 0,001$
$I_4 \leftrightarrow I_{28}$	I_4	$1,02 \pm 0,19$	I_{28}	$1,51 \pm 0,15$	$p < 0,001$

Tab. 4.37 Mann-Whitney-U-Test: Vergleich der AT₂-Rezeptor-Expression der infizierten Gruppen untereinander

4.6.2 Pearson-Korrelation

Um genauere Vergleichsergebnisse auch von der prae-infectionem-Situation zu bekommen, wurden die Kontrolltiere in die Berechnung der Pearson-Korrelation miteinbezogen. Damit beinhaltet die Kalkulation insgesamt 60 Tiere (n = 60), von welchen 30 infiziert waren.

Bei der Berechnung des Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizienten (Kap. 3.5.4.3) zeigt sich ein sehr hoher Zusammenhang zwischen der Expression der Zytokine IL-6 und IL-10 untereinander. Eine sehr hohe Korrelation ist auch zwischen der Expression dieser beiden inflammatorischen Zytokinen zu den Expressionen von IFN- γ , Angiotensinogen, AT_{1B}-Rezeptor und MnSOD zu verzeichnen.

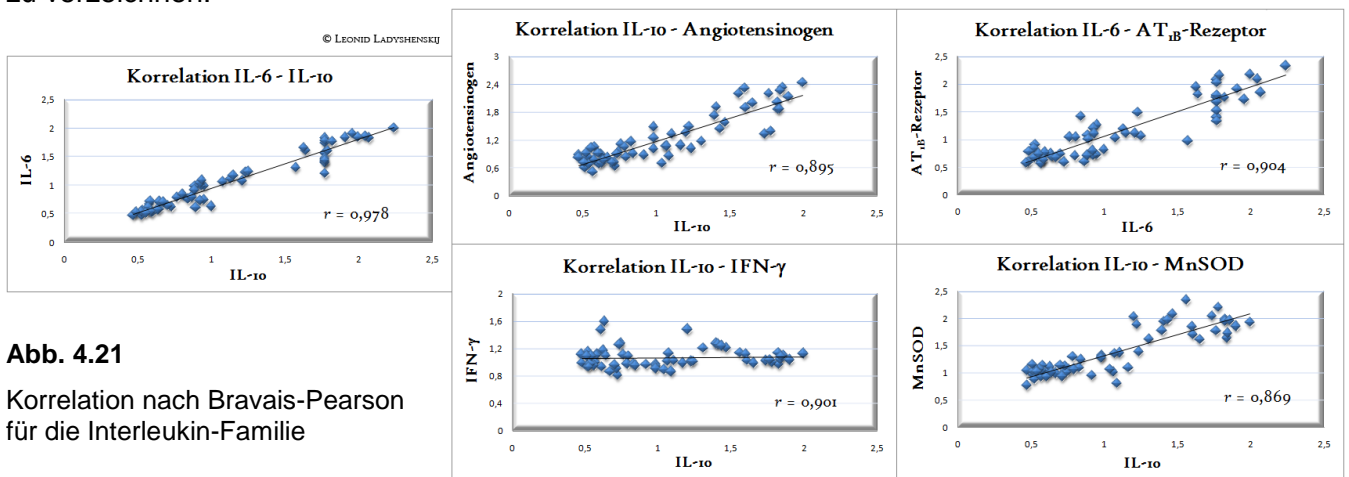


Abb. 4.21
Korrelation nach Bravais-Pearson für die Interleukin-Familie

Es berechnet sich eine gleichsinnige (positive) Korrelation zwischen der MnSOD-Expression und der Expression der drei beobachteten Subunits der NADPH-Oxidase. Während die MnSOD-Expression mit der Angiotensinogen- und AT_{1B}-Rezeptor-Expression eine positive Korrelation ergibt, hat die Korrelation der MnSOD-Expression mit der AT_{1A}- und der AT₂-Rezeptor-Expression eine negative Wertigkeit. Außerdem lässt sich ein sehr hoher gleichsinniger Zusammenhang zwischen der MnSOD-Expression und der IFN- γ -Expression eruieren.

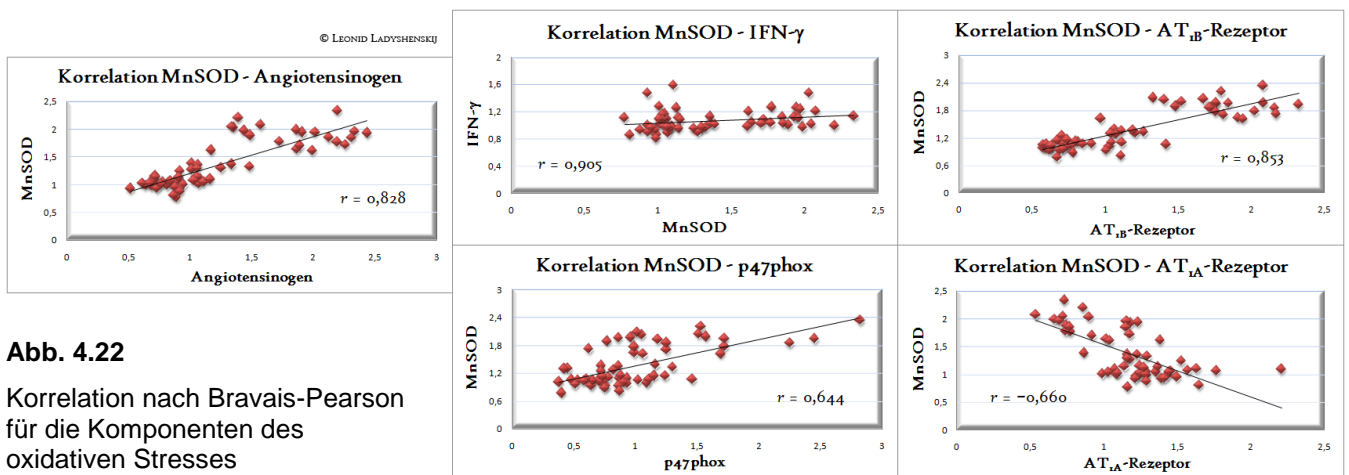
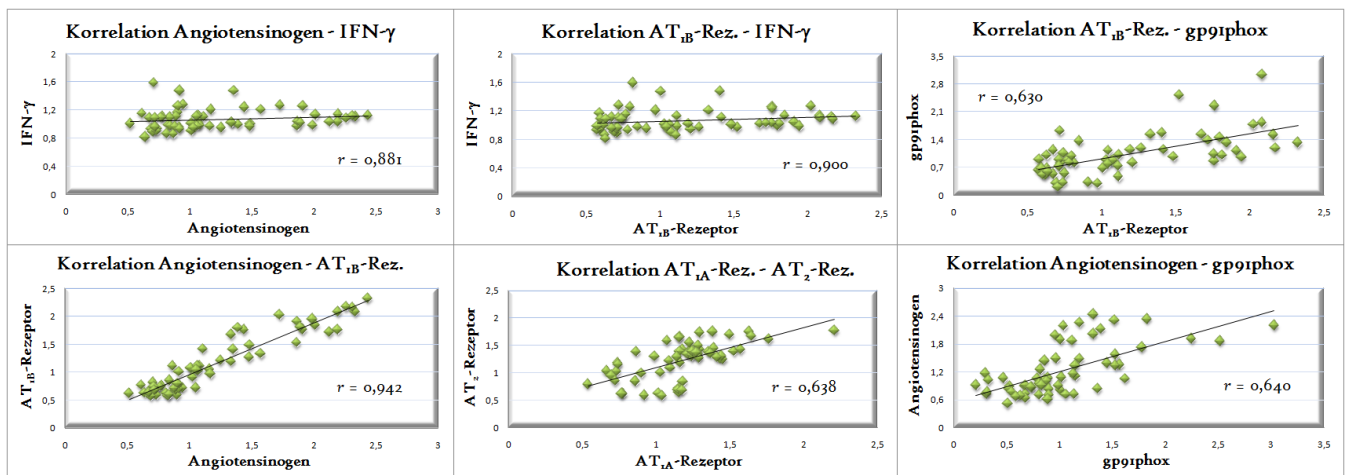


Abb. 4.22
Korrelation nach Bravais-Pearson für die Komponenten des oxidativen Stresses

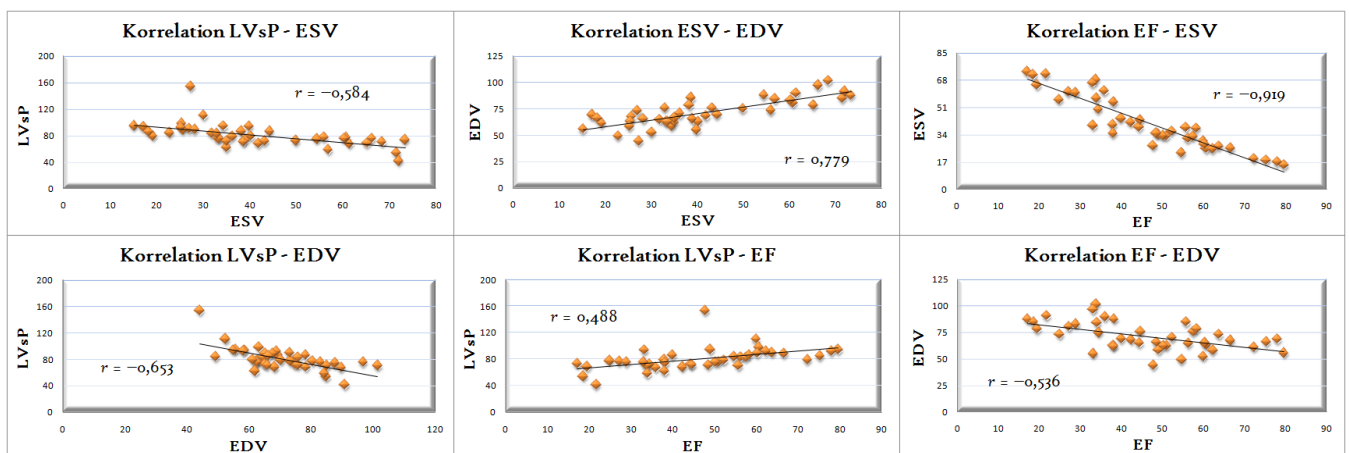
Innerhalb des RAAS lassen sich eine positive Korrelation des Angiotensinogens mit dem AT_{1B}-Rezeptor und eine reziproke (negative) Korrelation mit dem AT_{1A}- und dem AT₂-Rezeptor feststellen. Dabei zeigt sich auch eine deutliche positive Korrelation zwischen der AT_{1A}- und der AT₂-Rezeptor-Expression, nicht aber zwischen den Expressionen von AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor. Weiterhin lässt sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen IFN- γ und Angiotensinogen, aber auch zwischen IFN- γ und AT_{1B}-Rezeptor festhalten. Zu den drei Untereinheiten der NADPH-Oxidase sind positive Korrelationen seitens der Angiotensinogen- und der AT_{1B}-Rezeptor-Expression zu verzeichnen.



© LEONID LADYSHENSKIJ

Abb. 4.23 Korrelation nach Bravais-Pearson für die Vertreter des kardialen RAAS

Signifikante Korrelationen bestehen bei den hämodynamischen Parametern LVsP, ESV, EDV, EF und SV untereinander. Zwischen der Auswurfraction und der Expression von inflammatorischen Zytokinen sowie von Elementen des RAAS (Angiotensinogen und AT_{1B}-Rezeptor) lassen sich mittlere und hohe gegensinnige Korrelationen nachweisen.

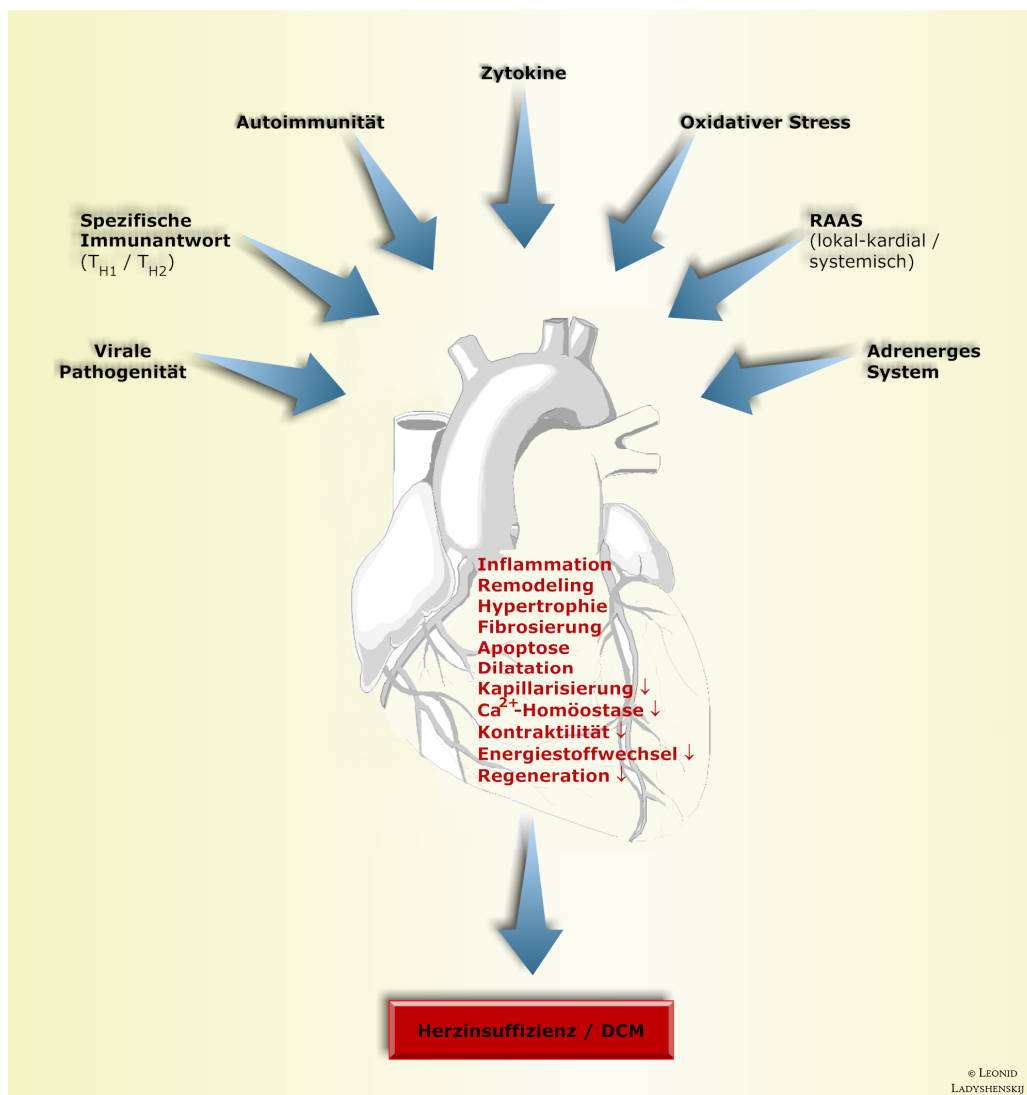


© LEONID LADYSHENSKIJ

Abb. 4.24 Korrelation nach Bravais-Pearson für die hämodynamischen Parameter

5 Diskussion

Die Myokarditis ist ein hochkomplexes Krankheitsbild, welches sich aus vielen pathologischen Komponenten zusammensetzt. In zahlreichen vorausgegangenen klinischen und experimentellen Studien konnte bereits eine große Zahl von Pathomechanismen der Myokarditis in Erfahrung gebracht sowie Konzepte für verschiedenartige Therapieansätze entworfen werden. Dennoch konnte bis heute kein wirkungsvolles kausales Behandlungskonzept abgeleitet werden, weswegen der Standard der gegenwärtigen Myokarditis-Behandlung auf symptomatischen Maßnahmen beruht. In dieser Arbeit wurde versucht, klinische Myokarditis-Erscheinungen und einzelne Komponenten der pathogenetischen Mechanismen, wie Immunmodulation, myokardiales Remodeling, oxidativer Stress und kardiales Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, im zeitlichen Verlauf der Erkrankung zu beobachten und das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Systeme darzustellen. Mit diesem Ziel wurde die kardiale mRNA-Expression von den Vertretern der pro- und antiinflammatorischen Zytokine, der matrixaktiven Substanzen, des Angiotensin-II-Systems, der kardialen NADPH-Oxidase und des körpereigenen antioxidativen Systems



während der akuten, subakuten und chronischen Phase der CVB-3-Myokarditis gemessen.

Abb. 5.1

Mediatoren und Pathomechanismen der Myokarditis

5.1 Klinische Erscheinung und Mortalität

Sowohl der Grad der Symptomatik als auch die Rate der Mortalität an der viralen Myokarditis hängen von vielen Parametern ab, wie z.B. genetische Prädisposition des jeweiligen Mausstamms, Alter und Geschlecht der Versuchstiere^{176,177}, Umgebungseinflüsse, der Typ des verwendeten Coxsackievirus¹³⁸. Beeinflusst auch durch die spezielle Aufgabenstellung der einzelnen Experimente, sind Vergleiche der Mortalitätsraten und der Schwere der Krankheitssymptomatik bei experimenteller Myokarditis nicht sinnvoll^{411,412}.

Alle untersuchten Tiere der Gruppen I₇ und I₂₈ zeigten deutliche progrediente Krankheitssymptomatik. Die Mäuse im chronischen Myokarditis-Stadium waren äußerlich schwer krank. Da die ersten Symptome erst nach dem 4. Tag p.i. einsetzten, war bei den, am 4. Tag p.i. sakrifizierten Mäusen (Gruppe I₄), die Klinik nicht eindeutig zu eruieren. Dennoch waren auch diese Mäuse an Myokarditis erkrankt, was aus den untersuchten Hämodynamik- und Expressionsparametern deutlich wurde. Keines der Versuchstiere verstarb als Folge der Erkrankung, auch nicht diejenigen im chronischen Myokarditis-Stadium. Die 19 umgekommenen Mäuse verstarben als Folge der Narkoseeinleitung und der invasiven Diagnostik. Sie unterschieden sich nicht wesentlich von anderen Tieren der gleichen Versuchsgruppe.

5.2 Körper- und Herzgewichte

In unserer Studie ließen sich keine signifikanten Veränderungen des Körpergewichts der Versuchsmäuse beobachten. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz wird häufig trotz des Erkrankungszustands ein gleichbleibendes oder sogar steigendes Körpergewicht durch Natrium- und Wasserretention im Rahmen von Kompensationsmechanismen registriert. Oft wird jedoch im fortgeschrittenen Stadium eine Körpergewichtsabnahme aufgrund der verminderten Nahrungszufuhr festgestellt⁴¹³.

Das Körpergewicht ist bei allen Versuchstieren in unserem Experiment annähernd gleich geblieben (für K- und I-Gruppen Maximalgewicht 22 g, Minimalgewicht 18 g). Auch ließ sich keine tendenzielle Entwicklung während der CVB-3-Myokarditis beobachten. Möglicherweise handelt es sich um eine genetische Eigenschaft des SWR/J-Stammes. Ungeachtet der verminderten Nahrungsaufnahme, wäre die Gewichtsstase auch durch die eingeschränkte physische Aktivität erklärbar.

Im akuten Myokarditis-Stadium stellt sich eine geringgradige Abnahme des Herzgewichtes ein. Eine leichte Gewichtsminderung bis ins subakute Stadium konnte auch in anderen Studien beobachtet werden⁴¹⁴, während im chronischen Verlauf eine deutliche Erhöhung des Herzgewicht-

tes beschrieben wurde, welche durch das myokardiale Remodeling und zunehmende Fibrosierung begründet war⁴¹³.

In unserem Experiment stieg im chronischen Erkrankungsstadium (Gruppe I₂₈) das Herzgewicht im Vergleich zu den früheren Infektionsphasen (Gruppen I₄ und I₇) deutlich an, aber auch dasjenige, von der dazugehörenden Kontrollgruppe K₂₈, sodass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den infizierten Tieren und den Kontrolltieren gab. Aus diesem Grund wäre es falsch, die Zunahme an Herzgewicht bei den chronisch erkrankten Mäusen als Myokarditisverursacht zu werten. Warum es gerade bei den Gruppen I₂₈ und K₂₈ zur gleichsinnigen Herzgewichtserhöhung kam, ist ungewiss. Da es sich um genetisch identische Mäuse handelt, könnten Umwelteinflüsse, wie z.B. die örtliche Lage der beiden Käfige, dieses Phänomen bewirkt haben. Auch der Altersunterschied zwischen den einzelnen Mäusegruppen (21 Tage zwischen I₇ und I₂₈, 24 Tage zwischen I₄ und I₂₈) könnte eine Rolle spielen. Eine klare, eindeutige Erklärung konnte unsererseits jedoch nicht eruiert werden.

Parallel zu der Gewichtsabnahme des Herzens in der akuten Phase zeigte sich ein vermindertes enddiastolisches Kammervolumen und Schlagvolumen sowie eine leichte Minderung der Auswurfraction (s. Kap. 5.3).

5.3 Hämodynamik

Durch die Messung der hämodynamischen Funktionsparameter sind die subjektiven Einschätzungen des Beobachters bezüglich der klinischen Symptomatik und des Ausmaßes der Erkrankung objektivierbar. Damit nehmen die hämodynamischen Messungen eine wichtige Position in der Analyse und der Schwerebeurteilung der Myokarditis-verursachten kardialen Schäden ein. Nur auf diese Weise können die erhobenen Daten auch mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen verglichen werden.

Das linksventrikuläre Myokard wurde in bisherigen Untersuchungen als der Hauptwirkungsort der kardiotropen Coxsackieviren beschrieben⁴¹⁵. Ferner wurde die Linksherzinsuffizienz als eine der schwersten Folgen der akuten Virusmyokarditis identifiziert⁴¹⁶. Aus diesem Grund beschränkte sich in der vorliegenden Studie die Erhebung hämodynamischer Parameter auf den linken Ventrikel. Intrakardiale Druckmessungen unterliegen einer großen Empfindlichkeit gegenüber methodischen Fehlern⁴¹⁷. Deshalb wurden die hämodynamischen Messungen von der erfahrenen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. C. Tschöpe (Institut für Kardiologie und Pulmologie, Charité Campus Benjamin Franklin, Charité-Universitätsmedizin) durchgeführt. Um individuelle Messschwankungen zu vermeiden, wurden alle Messungen der SWR/J-Studie von einer Person durchgeführt. Einer stabilen Lokalisation des Herzkatheters während der Messung wird

eine große Bedeutung zugeteilt. Um dies zu gewährleisten, erfolge die Katheterisierung über die A. carotis externa und nicht am offenen Thorax.

Die ermittelten hämodynamischen Parameter erlauben Rückschlüsse auf die Leistungsfähigkeit des Herzens im jeweiligen Erkrankungsstadium. Die Bestimmung linksventrikulärer Volumina, der linksventrikulären Auswurfraction und des linksventrikulären systolischen Drucks ermöglicht die Quantifizierung von Preload (Vorlast) und Afterload (Nachlast) des Herzens sowie die indirekte Beurteilung der Kontraktilität^{418,419}.

5.3.1 Linksventrikulärer systolischer Druck (LVsP)

Im Laufe der Myokarditis-bedingten Herzinsuffizienz wird das neuroadrenerge System zum Zweck der Kompensation aktiviert. Der Sympathikus bewirkt über α_1 -Adrenozeptoren eine periphere Gefäßkonstriktion zur Gewährleistung ausreichender Organdurchblutung. Die Folge ist die Zunahme des Aortendrucks, welcher im Sinne des Afterloads am Ende der Systole durch die Kontraktionsarbeit des linken Ventrikels überwunden werden muss. Bei deutlicher Reduktion der kontraktile Elemente sorgt die erhöhte Nachlast für eine noch stärkere Einschränkung der Pumpfunktion.

LVsP ist der Maß für die maximale Wandspannung in der Systole. Dabei wird LVsP durch den Afterload, gegen welchen der Ventrikel zu pumpen hat, direkt beeinflusst⁴²⁰. Deshalb resultiert aus der Aktivierung der Kompensationsmechanismen zunächst ein Anstieg von LVsP. Die durch die Kompensationsmechanismen gleichzeitig bewirkte Steigerung der Vorlast und der Herzfrequenz hat eine vermehrte und beschleunigte Füllung des Ventrikels und Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVedP) zum Ausgleich der Herzinsuffizienz zur Folge³⁴². Die Kontraktilitätsreserve des linken Ventrikels ist von seiner Fähigkeit, die erhöhte systolische Wandspannung zu erzeugen und aufrechtzuerhalten, abhängig. Bei der Ventrikeldilatation des insuffizienten Herzens ist dies erschwert: zur Erzeugung eines bestimmten Innendruckes des Ventrikels ist eine um so größere Kraftentfaltung seitens der Myokardfaser notwendig, je größer der Radius des Hohlraums

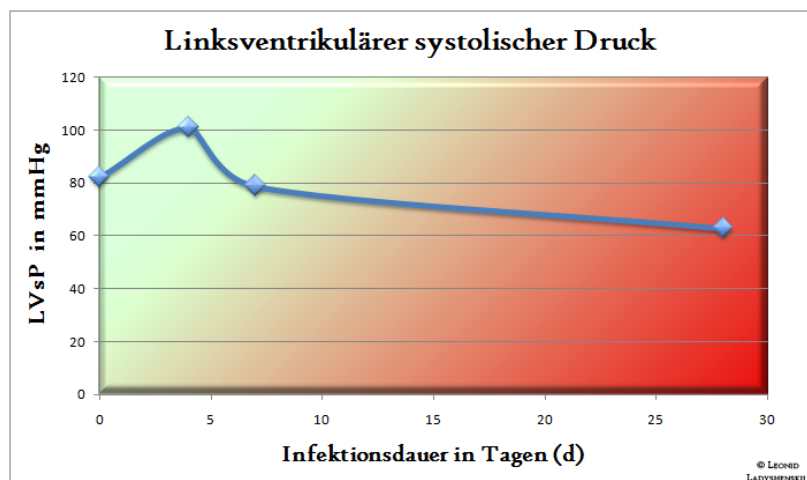


Abb. 5.2 Temporäre Dynamik von LVsP im Verlauf der CVB-3-induzierten Myokarditis

Die durch die Kompensationsmechanismen gleichzeitig bewirkte Steigerung der Vorlast und der Herzfrequenz hat eine vermehrte und beschleunigte Füllung des Ventrikels und Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVedP) zum Ausgleich der Herzinsuffizienz zur Folge³⁴². Die Kontraktilitätsreserve des linken Ventrikels ist von seiner Fähigkeit, die erhöhte systolische Wandspannung zu erzeugen und aufrechtzuerhalten, abhängig. Bei der Ventrikeldilatation des insuffizienten Herzens ist dies erschwert: zur Erzeugung eines bestimmten Innendruckes des Ventrikels ist eine um so größere Kraftentfaltung seitens der Myokardfaser notwendig, je größer der Radius des Hohlraums

und je geringer die Wanddicke der Kammer ist. Im Folgenden versagen die Kompensationsmechanismen, und es kommt zur kardialen Dekompensation mit Abnahme von Afterload und LVsP³⁴².

In der vorliegenden Arbeit bestätigten sich die Veränderungen von LVsP im Verlauf der CVB-3-Myokarditis: in der akuten Erkrankungsphase (0. – 4. Tag p.i.) ließ sich eine Erhöhung von LVsP vermuten, während der Druck in der subakuten Phase (4. – 7. Tag p.i.) abfiel und sich in der chronischen Phase (7. – 28. Tag p.i.) noch mehr verminderte. Dieses Ergebnis stimmt auch mit den Ergebnissen der experimentellen Studie mit CVB-3-infizierten DBA/2-Mäusen überein, bei welchen eine signifikante Senkung von LVsP vom 7. bis 10. Tag p.i. zu beobachten war⁷⁴.

5.3.2 Ventrikuläres enddiastolisches Volumen (EDV) und Ventrikuläres endsystolisches Volumen (ESV)

Beim gesunden Menschen werden bei der Systole über 50% des EDV (= Auswurfraction) aus dem Ventrikel geschleust. Das im Ventrikel verbliebene Restvolumen wird als das endsystolische Ventrikelvolumen bezeichnet. Das ESV besteht zum größten Teil aus dem systolischen Reservevolumen, das die eigentliche Leistungsreserve des Ventrikels ist, und aus sehr kleinem verbleibenden Anteil des Restblutes, dem Residualvolumen, welches selbst bei stärkerer Kontraktion eines gesunden Herzens nicht mobilisierbar ist³⁴².

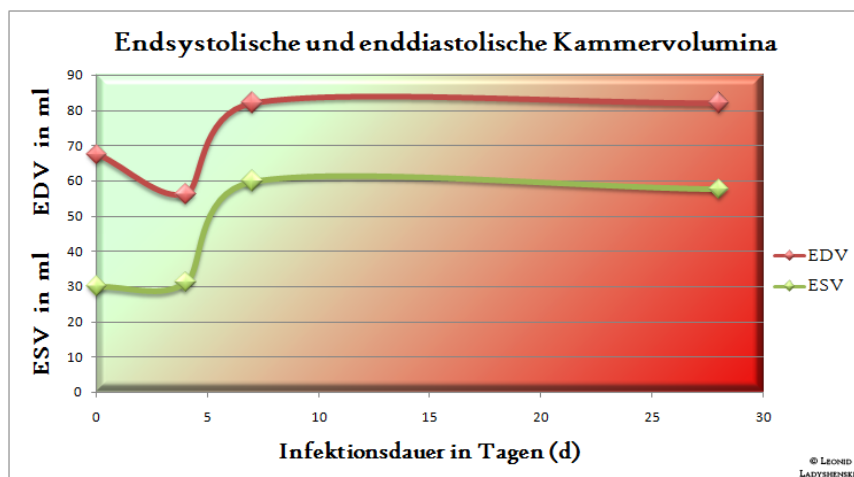


Abb. 5.3 Temporäre Dynamik der linksventrikulären Kammervolumina im Verlauf der CVB-3-induzierten Myokarditis

Infolge der geschilderten Kompensationsmechanismen und des myokardialen Remodelings finden sich in den fortgeschrittenen Stadien der Myokarditis bzw. bei der DCM dilatierte Ventrikel mit einer verminderten Dehnbarkeit und einer herabgesenkten Kontraktilität⁴¹⁸. Die Folge ist ein deutlich erhöhtes enddiastolisches Ventrikelvolumen

und gesteigerter enddiastolischer Ventrikeldruck. Bereits in Ruhe sind beim insuffizienten Herzen die mittleren Schlagvolumina vermindert und lassen sich nur unwesentlich bei körperlicher Belastung steigern. Als Folge der verminderten Auswurfraction entstehen stark vergrößerte Restblutmengen, die das Mehrfache von denjenigen am gesunden Herzen betragen. Da die

vergrößerte Restblutmenge aber nicht mehr als systolische Leistungsreserve verfügbar ist, stellt sie ein enorm vergrößertes Residualvolumen dar, welches nicht mehr mobilisierbar ist³⁴².

Auch in unserer Arbeit konnten deutlich erhöhte enddiastolische Volumina, beginnend in der subakuten Myokarditis-Phase (4. – 7. Tag p.i.), und im ganzen Verlauf der chronischen Phase (7. – 28. Tag p.i.) nachgewiesen werden. Im akuten Stadium (0. – 4. Tag p.i.) konnte das EDV durch die zu diesem Zeitpunkt noch bestehende Wirkung der kompensatorischen Mechanismen sogar etwas herabgesenkt werden. Auch das ESV konnte gemäß unseren Versuchen im Akutstadium noch konstant gehalten werden, stieg jedoch deutlich in den folgenden beiden Stadien an und entsprach damit der oben beschriebenen erhöhten Restblutmenge bzw. dem daraus resultierenden vergrößerten Residualvolumen. Zu bedenken ist, dass sich EDV und ESV sicherlich noch gegenseitig beeinflussen: verbleibt nach der Systole eine größere Residualblutmenge im Ventrikel, steigt nach der Diastole das EDV noch zusätzlich an, und umgekehrt – schafft das insuffiziente Herz, die vergrößerte enddiastolische Ausgangsblutmenge nicht komplett herauszuwerfen, steigt das ESV, so dass sich das pathognomische System selber noch zusätzlich potenziert.

5.3.3 Schlagvolumen (SV) und linksventrikuläre Auswurfraction (EF)

Das erhöhte EDV bewirkt durch die steigende Ventrikelwandspannung die Abnahme der Längenverkürzungen der Myofasern und senkt durch die myokardiale Kontraktilitätsminderung weiter den Herzauswurf (= Schlagvolumen)⁴²¹. Die linksventrikuläre Auswurfraction stellt das prozentuale Verhältnis von Schlagvolumen zu enddiastolischem Ventrikelvolumen dar ($EF = \frac{SV}{EDV}$)

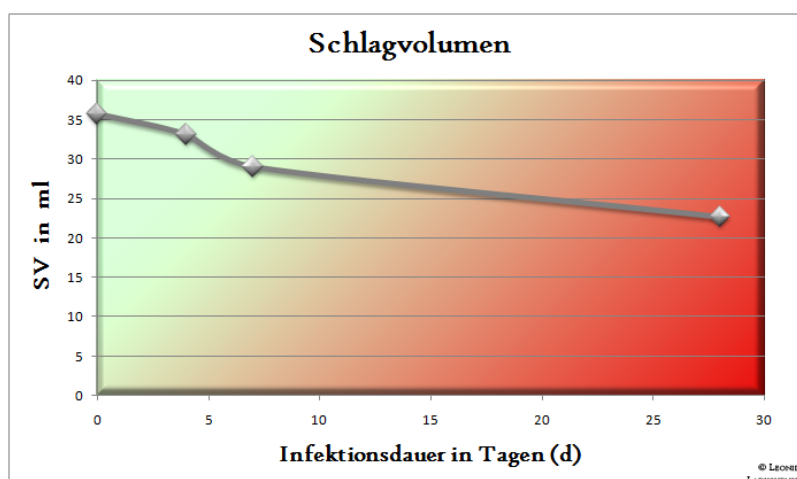


Abb. 5.4 Temporäre Dynamik des Schlagvolumens im Verlauf der CVB-3-induzierten Myokarditis

und beträgt im Normalfall, wie oben erwähnt, über 50%. Die Auswurfraction des linken Ventrikels wird sowohl von der Inotropie als auch vom Preload und Afterload bestimmt⁴²². Die damit verbundene Zunahme der Ventrikelgröße geht wiederum mit einer beträchtlichen Abnahme der Auswurfraction einher. Aus diesem Grund repräsentiert die Auswurfraction ein klinisch

brauchbares Korrelat der Kontraktilität³⁴². Auch die Beziehung zwischen dem enddiastolischen Volumen und der Auswurfraction erscheint als geeignet, um die Kontraktilität bei Druck- und Volumenbelastungen quantitativ zu erfassen⁴²².

Besonders im chronischen Stadium (28. Tag p.i.) zeigte sich in unserer Studie die linksventrikuläre Auswurfraction

deutlich vermindert, während in der akuten und subakuten Myokarditis-Phase (0. – 7. Tag p.i.) die aktivierten Kompensationsmechanismen eine annähernde Konstanz erhalten konnten. Aufgrund der großen Standartabweichungen in der Auswertung des Schlagvolumens waren die meisten Ergebnisse statistisch nicht signifikant. Dennoch deuten unsere Werte auf insignifikante SV-Minderung in den ersten beiden Myokarditis-Phasen hin (s. Abb. 4.7). Als eindeutig ließ sich die SV-Senkung im chronischen Myokarditis-Stadium interpretieren.

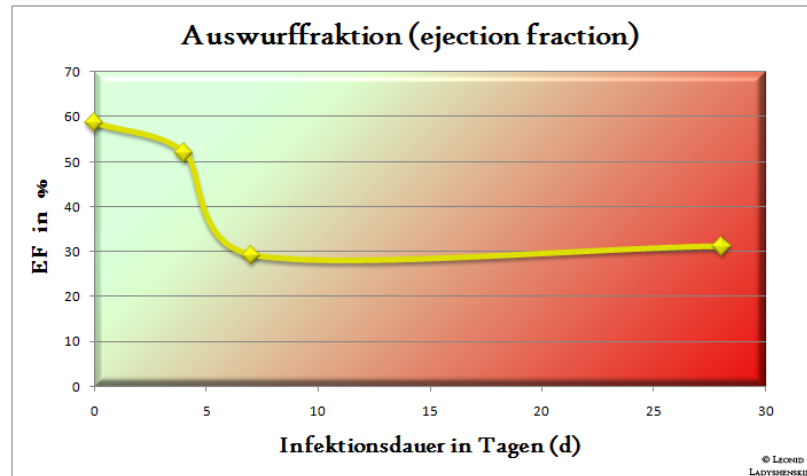


Abb. 5.5 Temporäre Dynamik der Auswurfraction im Verlauf der CVB-3-induzierten Myokarditis

5.3.4 Erfassung des hämodynamischen Wandels im Verlauf der CVB-3-Myokarditis

In unseren Versuchen zeigten sich deutliche stadienspezifische hämodynamische Veränderungen. Offenbar konnten die Kompensationsmechanismen bis zur Initialisierung der subakuten Phase (0. – 4. Tag p.i.) die beginnende kardiale Insuffizienz ausgleichen: Bei nicht eindeutig interpretierbarer Schlagvolumen-Dynamik konnte, unseren Werten nach, ein tendenzieller SV-Abfall vermutet werden, während die Auswurfraction bis zur subakuten Phase nahezu konstant blieb. Laut der Formel $EF = \frac{SV}{EDV}$ ist dies nur durch eine EDV-Verringerung zu erreichen.

Tatsächlich konnte EDV in dieser akuten Myokarditis-Phase zunächst herabgesetzt werden, was unter anderem durch einen kompensatorisch erhöhten LVsP ermöglicht wurde. Dem entsprechend ließ sich auch eine positive Korrelation zwischen LVsP und EF feststellen. Dagegen war die Korrelation zwischen LVsP und den Ventrikelvolumina gegensinnig, weil aus einer erhöhten Wandspannung ein kleineres Ventrikelvolumen resultiert. Das ESV blieb ebenfalls bis in den Beginn der subakuten Phase unverändert. Im Laufe der subakuten Phase (4. – 7. Tag p.i.) war eine starke Zunahme der endsystolischen und enddiastolischen Volumina sowie eine drastische Abnahme der Auswurfraction zu verzeichnen: die EF fiel um insgesamt ca. 50% ab,

d.h. von initial 59% auf 29%! Die Kompensation durch LVsP-Steigerung konnte nicht mehr gewährleistet werden, so dass LVsP ebenfalls deutlich herabsank. In der restlichen subakuten und chronischen Phase der Myokarditis (7. – 28. Tag p.i.) wurde weder eine Verbesserung noch eine Verschlechterung des deutlich für eine progressive Herzinsuffizienz sprechenden hämodynamischen Status eruiert.

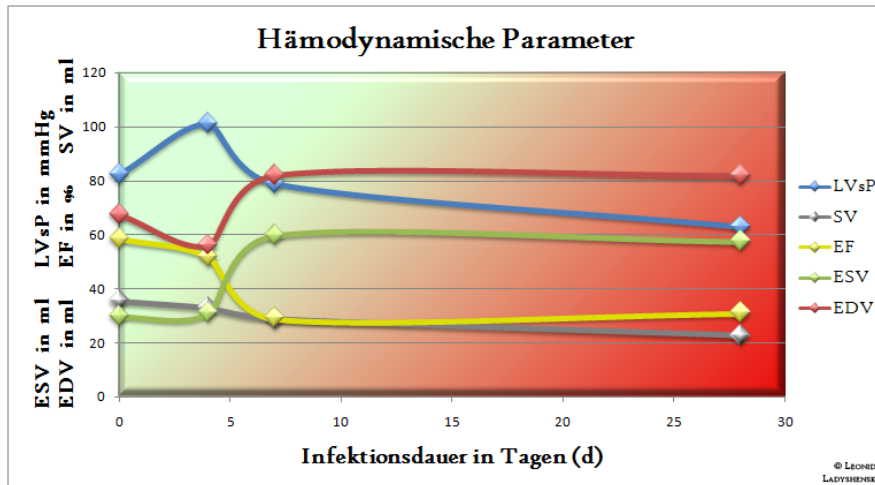


Abb. 5.6 Temporäre Dynamik von LVsP, Schlagvolumen, Auswurf-fraction und linksventrikulärer Kammervolumina im Verlauf der CVB-3-induzierten Myokarditis

Im akuten Modell der murinen Myokarditis wurden in einer experimentellen Studie analoge frühzeitige Veränderungen der hämodynamischen Parameter mit erhöhtem Afterload und LVsP am 4. Tag p.i. mit endokrinen und neurohumoralen Veränderungen in Verbindung gebracht⁴²³. Während Inflammation und kardiales Remodeling in dieser akuten Phase noch unbedeutend sind, können die direkte virale Aktivität und β -adrenerge Stimulation bereits ab dem 1. Tag p.i. eine diastolische Dysfunktion mit gestörter Vertriekelrelaxation verursachen^{123,424}. Dagegen sind in der subakuten und chronischen Phase andere Ursachen für die gestörte ventrikuläre Funktion verantwortlich: Aus den zytotoxischen viralen Effekten, kombiniert mit körpereigener inflammatorischer Immunantwort in der subakuten Myokarditis-Phase, resultieren Myozytolyse, interstitielles Ödem und frühe Veränderungen der ECM-Zusammensetzung. Die chronische Myokarditis-Phase ist gekennzeichnet durch gravierende Beeinträchtigungen der ventrikulären Funktion, verursacht durch virale Persistenz und Zusammenbruch der ECM-Struktur. Den unseren Ergebnissen sehr ähnliche Resultate erbrachte eine experimentelle Studie mit EMCV-induzierter Myokarditis bei DBA/2-Mäusen: am 1. Tag p.i. manifestierte sich eine gesteigerte kontraktile Herzfunktion mit erhöhten LVedP und EF; am 7. Tag p.i. war das EDV deutlich erhöht, während EF und LVsP signifikant sanken; zwischen 9. und 14. Tag p.i. waren LVsP und EF weiterhin vermindert, das EDV und LVedP blieben deutlich erhöht; zwischen dem 4. und 14. Tag p.i. wurde insgesamt eine Abnahme der kontraktilen Funktion festgestellt⁴²⁵.

Für die vorliegende Arbeit lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Coxsackievirus-induzierte Myokarditis durch die Zerstörung des Herzmuskelgewebes eine erhebliche Ein-

schränkung der kardialen Leistungsfähigkeit mit schließlich dekompensierter Herzinsuffizienz verursachte, was auch den klinischen Zustand der Versuchstiere erklären würde.

5.4 Virale Persistenz

Die Viruspersistenz ist bei Myokarditis-Patienten mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert¹⁷. Durch das weitere Bestehen der Erreger im Myokard wird die chronisch-entzündliche Reaktion mit kardialer Infiltration durch T-Zellen und Makrophagen aufrechterhalten^{22,80}. Daraus resultiert die Chronifizierung der Myokarditis mit Myozytolysen und allmählichem Verlust der kontraktile Elemente⁸¹. Ferner kann durch die Viruspersistenz eine antikardiale Autoimmunität bewahrt bleiben¹⁰⁶.

DBA/1-Mäuse, welche den Virus in der Myokarditis-Frühphase vollständig zu eliminieren vermögen, neigten nicht zur Entwicklung eines chronischen Stadiums: diese Tiere boten keinerlei Anzeichen für eine inflammatorische Antwort oder linksventrikuläre Dysfunktion nach der ausgeheilten Akutphase⁷⁵. Die Chronifizierung der Myokarditis ist jedoch nicht ausschließlich im Zusammenhang mit einer Viruspersistenz zu betrachten. Auch die Supprimierung von T-Lymphozyten führte trotz fehlender Viruselimination zu einer effektiven Reduktion sowohl der kardialen Entzündung als auch der Herzmuskelnekrose¹⁴¹. Somit kann das Ausmaß der Erkrankung durchaus auch von der Art der Immunantwort (T_{H1} - / T_{H2} -Antwort) abhängen¹⁵⁹.

In externen Studien konnte die virale RNA im Myokard mittels In-situ-Hybridisierung ca. 20 Tage p.i.¹⁴⁷ und mittels PCR bis zu 90 Tage p.i. belegt werden^{148,149}. In unseren Versuchen wurde das Virusgenom in allen CVB-3-infizierten Mäuseherzen der akuten und der subakuten Gruppe nachgewiesen, wobei das Genomsignal der subakut infizierten Tiere bereits deutlich abgeschwächt war. Bei lediglich drei Mäusen der infizierten Gruppe I_{28} ließ sich die virale Persistenz auch in der chronischen Phase bestätigen. Das heißt, dass die Viruspersistenz am 28. Tag p.i. 30% betrug. Jedoch korreliert diese grobe Angabe mit der deutlich sinkenden und dennoch gleichzeitig persistierenden Expression der inflammatorischen Zytokine (IL-6, IL-10, IFN- γ) in

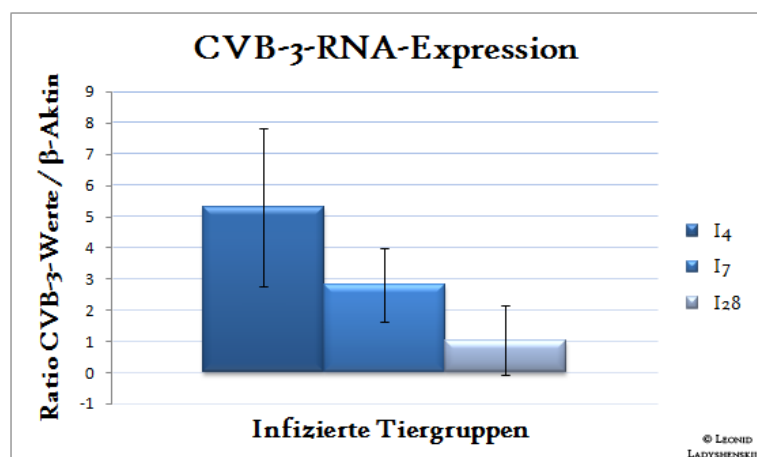


Abb. 5.7 Viruspersistenz im Verlauf der CVB-3-Myokarditis
Erklärung: Die Signalstärken der viralen RNA aus dem 2%-igem Ethidiumbromid-Agarose-Gel (s. Abb. 4.8) wurden in OD-Werte umgerechnet; das Verhältnis der RNA-OD zu β -Aktin-OD wurde berechnet und graphisch dargestellt.

der chronischen Myokarditis-Phase, wodurch die Abhängigkeit der kardialen Inflammation von der viralen Persistenz nochmals belegt wird.

5.5 mRNA-Expression von Zytokinen und matrixaktiven Substanzen im Verlauf der viralen Myokarditis

Wie bereits in den theoretischen Grundlagen dargestellt, besetzen Zytokine in der Pathogenese der viralen Myokarditis eine Schlüsselrolle. Sie sind für CAR- und CAM's-Induktion, für die Regulation von myokardialem Remodeling und von zellulären Prozessen, für die Immunantwort, Autoimmunmechanismen und für viele andere Funktionen essentiell. Allerdings ist der Einfluss einzelner Zytokine, z.B. auf die Hämodynamik, auf das Remodeling usw., *in vivo* durch das komplexe Zusammenspiel mit anderen Zytokinen und aktivierten Substanzen sehr schwer zu beurteilen. Somit ergeben sich auch für die Ergebnisse der vorliegenden Studie Limitationen.

5.5.1 Regulation von IFN- γ im Verlauf der viralen Myokarditis

IFN- γ gehört zu den proinflammatorischen T_{H1}-Zytokinen¹²³. In experimentellen Studien gelang der früheste Nachweis von IFN- γ bei Myokarditis ab 3. Tag p.i.¹²⁴. Bei CVB-3-induzierter Myokarditis wurde der IFN- γ -Expressionsanstieg bis zum 7. Tag p.i. beobachtet, während die IFN- γ -mRNA bis in die chronischen Myokarditis-Stadien persistierte¹³⁴. Bei einer EMCV-Infektion konnten erhöhte IFN- γ -Werte sogar bis zum 80. Tag p.i. nachgewiesen werden¹²³. Über IFN- γ wird die zelluläre Immunantwort mit Aktivierung der Makrophagen und CTL's vermittelt, wodurch einerseits die frühe Viruselimination möglich wird, andererseits Inflammationsschäden am Myokard verursacht werden^{161,165}.

Entsprechend kontrovers sind auch die Ergebnisse diverser Studien ausgefallen: So konnte z.B. veranschaulicht werden, dass IFN- γ -defiziente Mäuse eine schwere chronische CVB-3-Myokarditis und DCM entwickelten, während bei Wild-Typ-Mäusen reduzierte Mastzelldegranulation, verminderte Fibrose und geringere Expression profibrotischer Zytokine (TGF- β_1 , IL-1 β , IL-4) zu verzeichnen waren⁴²⁶. Dieses Ergebnis wurde durch eine Studie mit CVB-3-infizierten BALB/c-Mäusen bestätigt, wobei IFN- γ gegen die Entwicklung einer schwerwiegenden chronisch-viralen Myokarditis, Perikarditis und DCM eine schützende Funktion aufwies⁴²⁷. Der Mechanismus dieser Aktivität wurde durch Inhibierung von IL-4 und von Mastzelldegranulation durch IFN- γ erklärt. Insofern würde die Wirkung der durch Mastzelldegranulation freigesetzten Histamine, IL-1 β , IL-4 und TGF- β_1 auf myokardiale Fibroblasten mit nachfolgender Proliferation und Kollagensynthese unterbrochen und damit eine myokardiale Fibrosierung verhindert wer-

den⁴²⁶. Eine exogene IFN- γ -Applikation vor oder zeitgleich mit CVB-3-Infektion senkte signifikant die Mortalität in BALB/c- und C57BL/6-Mäusen¹⁹⁰. Dagegen ließ sich in den Herzen transgener Mäuse eine IFN- γ -vermittelte chronische Kardiotoxizität mit linksventrikulärer Dilatation und gestörter systolischer Funktion eruieren. Der schädliche Einfluss von IFN- γ zeigte sich dabei ausschließlich an der Herzmuskulatur, während glatte und quergestreifte Muskulatur keine pathologischen Veränderungen aufwies⁴²⁸. TNF- α -Expression, wessen kardiotoxische Eigenschaften ausreichend belegt sind^{429,430}, wird ebenfalls durch IFN- γ stimuliert. Auch über diesen Weg sind die negativen Effekte von IFN- γ erklärbar. Die zelluläre Spezifität der IFN- γ -Wirkung ausschließlich auf die Herzmuskelzellen kann durch die effiziente Expression der TNF- α -Rezeptor-Moleküle durch Kardiomyozyten erklärt werden^{431,432}.

Sowohl die antiviralen als auch die schädlichen IFN- γ -Wirkungen werden auch über NO-Aktivierung und den nitrosaminen Stress vermittelt, wobei die Viruselimination in der akuten Myokarditis-Phase stattfindet, und die NO-bewirkte Myozyten-Apoptose eher in den chronischen Stadien beobachtet wird.

In unserer Studie wurde bewiesen, dass IFN- γ , einen Expressionsanstieg in der akuten und subakuten Phase (0. – 7. Tag p.i.) erfährt, was als Reaktion auf das virale Agens zu deuten ist. Offensichtlich werden in diesem Zeitabschnitt IFN- γ -getriggerte Systeme aktiviert, die

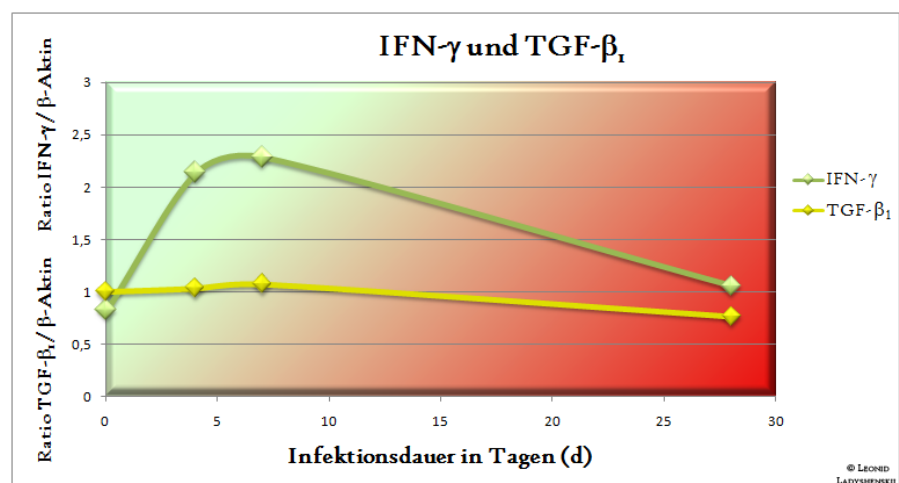


Abb. 5.8 Temporäre Regulation von IFN- γ und TGF- β_1 bei CVB-3-induzierter Myokarditis.

antiviral und immunmodulierend wirken. So ließ sich eine deutliche Steigerung der Entzündungsparameter (IL-6 und IL-10) sowie des oxidativen Stresses in dieser Phase beobachten. Gleichzeitig fiel eindeutig die virale Persistenz. Die Induktion des AT₂-Rezeptors durch IFN- γ ³⁵⁹ ließ sich in unseren Versuchen nicht bestätigen. Eher zeigte sich ein AT₂-Rezeptor-Abfall, welcher möglicherweise nach initialer IFN- γ -Induktion über den AT₁-Rezeptor³⁷⁸ als Negativrückkopplung durch IFN- γ verursacht werden könnte. Im zweiten Teil der subakuten und in der chronischen Phase (7. – 28. Tag p.i.) erfuhr IFN- γ eine Down-Regulation. Dennoch war am 28. Tag p.i. die Expression von IFN- γ in den infizierten Tieren gegenüber den nicht infizierten

signifikant gesteigert. Das heißt, dass während der chronischen Myokarditis IFN- γ weiterhin wirksam bleibt. Ein Grund hierfür könnte die chronische virale Persistenz sein, welche als Stimulus für die weitere IFN- γ -Produktion fungiert und über diesen Weg eine chronische, nitrosamine Kardiotoxizität hervorruft.

Als resümierendes Bild der meisten Fremdarbeiten und des vorliegenden Experiments sind erhöhte IFN- γ -Konzentrationen nur während des akuten Myokarditis-Stadiums „erwünschenswert“. Aus diesen Erkenntnissen resultiert ein möglicher Schutzmechanismus gegen die Entwicklung einer chronischen Myokarditis: exakte, zeitlich limitierte Kinetik der kardialen IFN- γ -Sekretion mit maximaler Expression während der akuten Myokarditis-Phase. Inzwischen ist die pharmakologische Anwendung von rekombinanten, bakteriellen und humanen Interferonen weit verbreitert. Als therapeutischer Ansatz wäre eine experimentelle IFN- γ -Applikation während der akuten Myokarditis-Phase denkbar. Das körpereigene IFN- γ kann in situ auch durch Cycloferone (z.B. N-methyl-N-(α ,D-glucopyranosyl)-ammonium-10-methylencarboxylatacrydon)⁴³³ induziert werden. Im Falle einer bereits eingetretenen chronischen Myokarditis könnte eine Interferon-Inhibition erfolgen. Als Inhibitor können z.B. IFN- γ -neutralisierende Antikörper wirken. Weiterhin wäre zu diesem Zweck der Einsatz von biologisch inaktiven, um den IFN- γ -Rezeptor konkurrierenden Substanzen (IFN- γ -Analoga), wie z.B. das B9R-Protein⁴³⁴, denkbar.

5.5.2 Regulation von IL-10 im Verlauf der viralen Myokarditis

Der wichtigste natürliche IFN- γ -Inhibitor ist IL-10. Als bedeutendstes antiinflammatorisches T_{H2}-Zytokin hemmt es auch andere proinflammatorische Zytokine, wie IL-6, IL-1 β , TNF- α . Gleichzeitig wird die T_{H1}-Antwort inhibiert, während die T_{H2}-Antwort gefördert wird⁴³⁵. In diversen Studien mit CVB-3-induzierter Myokarditis wurde ein Anstieg der IL-10-Expression in der akuten und subakuten Phase mit Maximalwerten am 12. Tag p.i. verifiziert, während fallende Werte in den chronischen Stadien gemessen wurden^{218,310}. Größtenteils stimmt das auch mit unseren Ergebnissen überein.

Ähnlich wie für IFN- γ wurden auch für IL-10 auseinanderweichende Resultate bezüglich des Einflusses auf den Krankheitsverlauf in experimentellen Studien geboten: Eine exogene IL-10-Applikation reduzierte den Schweregrad, Mortalität und kardiale Dysfunktion bei der Autoimmunmyokarditis²¹⁹ und bis zum 14. Tag p.i. auch bei einer Virusmyokarditis⁴³⁶. Andererseits war die Erhöhung der IL-10-Serum-Konzentration bei Patienten mit akuter Myokarditis mit einer schlechteren kurzfristigen Prognose verbunden⁴³⁷. Der letztgenannte Effekt ist auf die Inhibition von IFN- γ und somit auf eine IL-10-vermittelte virale Persistenz zurückzuführen¹⁹⁵. Die

unterdrückte antivirale NO-vermittelte IFN- γ -Wirkung in der akuten Myokarditis-Phase war mit einer gesteigerten Letalität assoziiert^{195,196}.

In unseren nichtmodulierten Versuchen stieg die IL-10-Expression während der akuten und subakuten Myokarditis-Phase (0. – 7. Tag p.i.) adäquat den proinflammatorischen Zytokinen IFN- γ und IL-6 an. Zu interpretieren ist dieses Ergebnis als eine gegenregulatorische Maßnahme bei „drohender“ Inflammation. Quantitativ überwogen allerdings eindeutig die proinflammatorischen Zytokine, insbesondere IFN- γ , sowohl in der Expressionsmenge als auch im Expressionsanstieg, so dass der Myokarditis-Verlauf im akuten Stadium als IFN- γ -bestimmend zu werten ist. Während die IL-10-Konzentration auch im subakuten und chronischen Stadium (7. – 28. Tag p.i.) simultan dem IFN- γ und IL-6 abfiel, blieben auch hier die proinflammatorischen Zytokine vorherrschend. Im ganzen Verlauf der Erkrankung zeigt IL-10 zu IL-6 eine sehr hohe Korrelation.

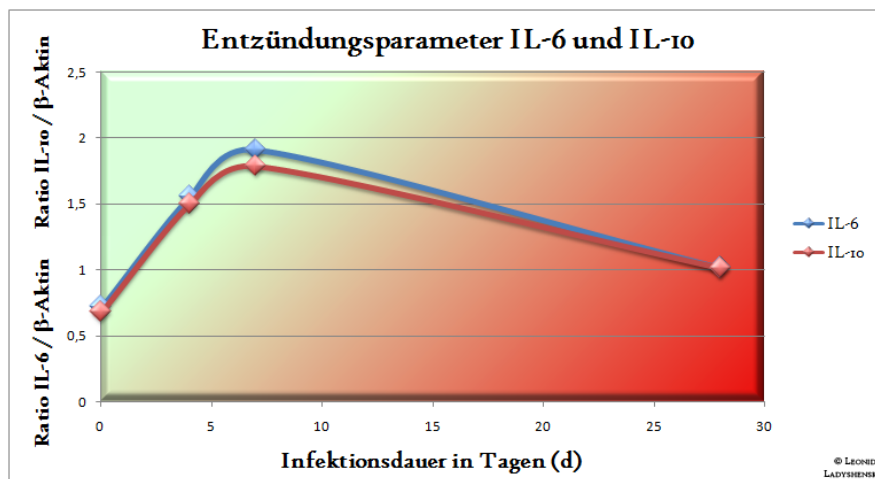


Abb. 5.9 Dynamik des Entzündungsgeschehens bei CVB-3-induzierter Myokarditis anhand der myokardialen Expression der inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-10.

Die infolge der viralen Infektion aktivierten Monozyten und Makrophagen produzieren IL-10, welches dann seine Synthesestätten inhibiert. Damit verringert IL-10 einerseits die eigene Produktion, andererseits werden dadurch die durch die Makrophagen gebildeten Stickoxide supprimiert. Dass dieser

Effekt den Fähigkeiten von IL-10 zu verdanken ist, untermauert der temporäre Expressionsverlauf: während IL-10 erst in der chronischen Myokarditis-Phase eine abfallende Tendenz zeigte, war der oxidative Stress bereits im subakuten Stadium deutlich supprimiert. In diesem Fall muss davon ausgegangen werden, dass die IL-10-Produktion zum großen Teil von B- und T_{H2}-Lymphozyten übernommen wird. Eine nicht zu vernachlässigende gleichsinnige Korrelation der IL-10-Expression mit den Expressionen von Angiotensinogen und AT_{1B}-Rezeptor spricht eher für eine antagonistische, konkurrierende Funktion der beiden Systeme als für eine direkte Interaktion: Aus Fremdarbeiten ist eine Ang-II-vermittelte IL-6- und TNF- α -Induktion über den AT₁-Rezeptor und die JAK/STAT-Kaskade bekannt³⁷¹, während IL-10 die Expression dieser proinflammatorischen Zytokine zu inhibieren vermag.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die infizierten Mäuse die akute Myokarditis dank der Dominanz von IFN- γ überlebt haben, aber die Infektion, wegen der inflammatorischen Persistenz und einer unzureichenden Inhibierung seitens des IL-10, in der subakuten Phase nicht ausheilen konnten und eine chronische Myokarditis entwickelten. So wäre in folgenden experimentellen Studien zu erforschen, ob ein gezielter, zeitbezogener Einfluss auf die IL-10-Expression von Nutzen wäre. Die Drosselung der IL-10-Expression in den akuten Myokarditis-Stadien (und damit gleichzeitiges Ausbleiben der IFN- γ -Hemmung) und eine IL-10-Stimulation in den chronischen Stadien (mit gleichzeitiger IFN- γ -Inhibierung) könnte sich möglicherweise als sinnvoll erweisen. Exogen zugeführtes humanes α -Thrombin steigert die IL-10-Produktion in mononukleären Blutzellen und in Monozyten⁴³⁸. Außerdem besteht die Möglichkeit einer rekombinanten IL-10-Applikation oder eines IL-10-Gentransfers zur Erhöhung der endogenen IL-10-Konzentration. Eine selektive Inhibierung von IL-10 wird durch Antisense-Peptide und Immunmodulatoren (z.B. AS101), welche die IL-10-Expression auf transkriptioneller Ebene hemmen, erreicht^{439,440}.

5.5.3 Regulation von IL-6 im Verlauf der viralen Myokarditis

IL-6 ist ein überwiegend proinflammatorisches Zytokin, welches als einziges T_{H2}-Zytokin die Stimulierung der Makrophagen herbeiführt²⁰⁵. Außerdem ist IL-6 für die Differenzierung und Aktivierung von B-Lymphozyten und für die Regulation der Akute-Phase-Reaktion verantwortlich^{206,207}. Über die Stimulation der B-Zell-Differenzierung zu Plasmazellen und der Antikörperproduktion ist IL-6 ein Träger der humoralen Immunantwort¹⁶⁶.

Bei einer CVB-3-induzierten Myokarditis konnte bei NMRI-Mäusen vom 3. bis 7. Tag p.i. eine Expressionserhöhung von IL-6 verzeichnet werden¹³⁴. Aus einer anderen Quelle, ebenfalls an einer CVB-3-Myokarditis eruiert, ist ein gesteigerter IL-6-Nachweis zwischen dem 5. und 10. Tag p.i. bekannt¹³³.

Auch in unseren Ergebnissen ließ sich ein deutlicher Anstieg von IL-6 bis in die Mitte der subakuten Phase (7. Tag p.i.) beobachten. Der gesamte Expressionsverlauf korreliert sehr hoch mit dem von IL-10 (s. Abb. 5.9). Die wahrscheinlichsten Gründe dafür sind zunächst die Aktivierung der T_{H2}-Antwort, wodurch es zur simultanen Produktion beider Zytokine kommt. Die IL-6-vermittelte Makrophagenaktivierung führt im Sinne eines gegenregulatorischen Regelkreises zur Produktionssteigerung des antagonistisch wirkenden IL-10. Als das verantwortliche Zytokin für eine schnelle Aktivierung der Immunantwort und für die Inhibierung der viralen Replikation ist IL-6 in dieser frühen Myokarditis-Phase unentbehrlich. Allerdings zeigte sich in unseren Versuchen eine sich zwar langsam vermindernde, aber dennoch deutlich persistierende

IL-6-Expression in subakutem und chronischem Myokarditis-Stadium. Zusammen mit IFN- γ hält IL-6 damit die gewebeschädigende Inflammation aufrecht. Über die Makrophagenaktivierung wäre auch eine IL-6-unterstützte NO-Produktion mit allen ihren Vor- und Nachteilen denkbar. Entsprechend ließen sich in unserer Arbeit Korrelationen zwischen IL-6 und der Entwicklung des oxidativen Stresses, insbesondere zum kompensierenden MnSOD feststellen (s. Kap. 5.6.2).

Bekanntlich sprechen sowohl IL-6 als auch Ang II den JAK/STAT-Transduktionsweg an (s. Tab. 2.9), sodass gewisse Gemeinsamkeiten zu erwarten waren. Außerdem stimuliert Ang II über denselben Weg die IL-6-Expression. Tatsächlich ließ sich eine starke Korrelation zwischen den Expressionen von IL-6, Angiotensinogen und AT_{1B}-Rezeptor beobachten, nicht aber zur AT_{1A}-Rezeptor-Expression. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die „klassischen“, bekannten Ang-II-Wirkungen vornehmlich über den AT_{1B}-Rezeptor vermittelt werden, während die Wirkung über den AT_{1A}-Rezeptor antagonistisch, vielleicht sogar antiinflammatorisch sein könnte. Eine dem IL-6 konträre Wirkung scheint Ang II auch über den AT₂-Rezeptor zu entfalten. Allerdings wurden die beiden Rezeptoren AT_{1A} und AT₂ in der Akutphase der Myokarditis stark herunterreguliert und in den anschließenden Stadien nicht ausreichend wieder hochreguliert, sodass eine Kompensation der AT_{1B}-Rezeptor-vermittelten Wirkungen und möglicherweise der IL-6-Inflammation nicht eintreten konnte.

In diversen experimentellen Studien wurde versucht, die Funktion von IL-6 in der Myokarditis zu erörtern. So bewirkte eine pharmakologische IL-6-Inhibierung mittels Amiodaron eine verminderte myokardiale Schädigung bei EMCV-induzierter Myokarditis in Labormäusen⁴⁴¹. Die kritische Rolle von IL-6 in der viral-induzierten Myokarditis wurde auch bei C3H/HeJ-Mäusen demonstriert: durch die Überexpression von IL-6 resultierte eine signifikante myokardiale Schädigung mit beschleunigter Gewebeerteration und verminderter Viruselimination⁴⁴². Auch bei IL-6 scheint die phasengebundene Expression eine bedeutende Rolle in der viralen Myokarditis zu spielen: Die exogene Applikation von IL-6 in der Frühphase einer Myokarditis reduzierte die zelluläre Infiltration, Gewebsnekrose, virale Titer und Mortalität⁴⁴³, wohingegen die kontinuierliche Gabe zu stärkeren Gewebeschäden führte^{442,443}.

Ähnliche Schlussfolgerungen können auch aus der vorliegenden Arbeit resultiert werden: Im Sinne einer therapeutischen Option sollte bei der viralen Myokarditis IL-6, so wie auch IFN- γ , in der Spätphase inhibiert werden (z.B. durch exogene IL-10-Applikation, Amiodaron⁴⁴¹, IL-6-Rezeptor-Antikörper Tocilizumab⁴⁴⁴), während im myokarditischem Frühstadium die Stimulierung der IL-6-Expression (z.B. durch das bakterielle Endotoxin LPS, das Fibrinogenabbauprodukt D u.a.)⁴⁴⁵ oder eine exogene IL-6-Substitution von Nutzen sein könnte.

5.5.4 Regulation von TGF- β_1 im Verlauf der viralen Myokarditis

TGF- β_1 ist ein antiinflammatorischer T_{H2}-Wachstumsfaktor, welcher beide Lymphozytenarten (B- und T-Zellen) sowie Makrophagen inhibiert. Bedeutsam ist die Funktion von TGF- β_1 beim myokardialen Remodeling, wobei die Kollagensynthese stimuliert und der enzymatische ECM-Abbau verringert wird^{269,446}.

In diversen experimentellen Studien wurde die Zweideutigkeit der TGF- β_1 -Modulation veranschaulicht: Durch eine experimentelle Erhöhung von TGF- β_1 wurde eine myokardiale Fibrose verursacht^{447,448}. Eine aktive Inhibierung des Zytokins bewirkte einerseits die Reduktion der kardialen Fibrose²⁰¹, andererseits eine gesteigerte Ventrikeldilatation und Mortalität⁴⁴⁹. Für TGF- β_1 konnten auch hämodynamische Effekte nachgewiesen werden: der arterielle Blutdruck wird durch den stimulierenden TGF- β_1 -Effekt auf das vasokonstriktorische Endothelin erhöht^{450,451}, eine Blockade von TGF- β_1 verbessert die diastolische Funktion²⁰¹.

Zum zeitlichen Expressionsverlauf von TGF- β_1 bei viraler Myokarditis gibt es bisher nur wenige Erkenntnisse. Eine erhöhte TGF- β_1 -Expression persistierte bei der CVB-3-Myokarditis in NMRI-Mäusen bis zum 98. Tag p.i.⁴⁵². Sowohl bei NMRI- als auch bei BALB/c-Mäusen mit einer CVB-3-Myokarditis ließ sich ein TGF- β_1 -Anstieg in der akuten Myokarditis-Phase feststellen^{448,452}.

In unserer Arbeit konnte keine signifikante Expressionserhöhung von TGF- β_1 während der gesamten Versuchslaufzeit nachgewiesen werden (s. Abb. 5.8). Mehrere Ursachen kämen dafür infrage: Einerseits könnte angenommen werden, dass TGF- β_1 während unserer experimentell induzierten CVB-3-Myokarditis nicht oder kaum reguliert wird. Dagegen sprechen aber die Resultate anderer Arbeitsgruppen und die bereits erwiesene TGF- β_1 -Funktion beim myokardialen Remodeling und beim Inflamationsprozess. Insbesondere in der akuten Erkrankungsphase wäre eine TGF- β_1 -Aktivierung mit seiner antiinflammatorischen Wirkung als Reaktion auf die virale Replikation zu erwarten. Bei dennoch niedrigen Expressionswerten ist also eine Inhibierung von TGF- β_1 in diesem Stadium stark anzunehmen. IFN- γ , welches gerade im akuten und subakuten Stadium seine Höchstwerte erreicht, vermag, die Fibroblastenproliferation und damit auch die Kollagensynthese zu reduzieren. Dies erreicht IFN- γ einerseits durch eine direkte Inhibierung von IL-4, einem potenten Induktor der TGF- β_1 -Expression, und andererseits durch die Supprimierung der Mastzelldegranulation⁴²⁶. Da TGF- β_1 insbesondere bei der Mastzelldegranulation freigesetzt wird, könnte IFN- γ auf diesem doppelten Weg die Inhibierung von TGF- β_1 herbeiführen.

Eine neutrale Regulation von TGF- β_1 in der akuten Myokarditis-Phase ist aber nicht unbedingt als nachteilig zu bewerten. Zwar würde im subakuten Stadium ein zusätzlicher antiinflammatorischer TGF- β_1 -Effekt als Gegenspieler zu den vorherrschenden proinflammatorischen Zytokinen von Vorteil sein, das myokardiale Remodeling würde dennoch beschleunigt werden.

Im chronischen Myokarditis-Stadium (28. Tag p.i.) war eine geringgradige, aber signifikante TGF- β_1 -Expressionsminderung zu verzeichnen. Da gerade in dieser Phase eine ausgeprägte Ventrikeldilatation mit Herzinsuffizienz vorliegt, wäre hier eine zusätzliche TGF- β_1 -induzierte Muskelfibrosierung nicht vom Vorteil für den Krankheitsverlauf. Diese These konnte auch durch externe Studien untermauert werden: die Inhibierung der TGF- β_1 -mRNA-Expression bei der chronischen Herzinsuffizienz bewirkte die Reduzierung des fibrotischen Matrixumbaus⁴⁵³ und verbesserte bei der postmyokarditischen DCM die klinische Ausprägung⁴⁵⁴. Mit der zusätzlichen positiven Beeinflussung der diastolischen Funktion könnte eine aktive Inhibierung von TGF- β_1 im chronischen Stadium vom Nutzen für den Krankheitsverlauf sein. In der Krebsforschung werden bereits seit einigen Jahren TGF- β -Rezeptor-Kinase-Inhibitoren (TRKI) eingesetzt, welche die TGF- β -induzierte Transkription, Genexpression und Apoptose supprimieren⁴⁵⁵. In der Klinik können außerdem TGF- β -bindende Proteine, rekombinante Proteine oder TGF- β -Antikörper zur Hemmung von TGF- β_1 verwendet werden⁴⁵⁶.

5.5.5 T_H-Regulation im Verlauf der viralen Myokarditis

Die körpereigene Immunabwehr ist entscheidend für die Pathogenese der akuten Myokarditis und für den Verlauf der chronischen Stadien. Einerseits entstehen durch die Immunantwort sekundäre Schäden am Herzgewebe bei primär angestrebter Viruselimination, zum Teil verursacht durch eine partielle Aselektivität gegen die viralen Bestandteile⁴⁵⁷. Andererseits wird Zellproliferation und -migration stimuliert, was mit einer gesteigerten MMP- und Zytokinproduktion verbunden ist. Ein pathologisches Remodeling und kardiale Dysfunktion sind das Resultat^{117,245}.

Trotz der gemeinsamen Hochregulation von T_{H1}- und T_{H2}-Zytokinen, schien durch die in unseren Experimenten eruierte Expressionserhöhung von IFN- γ als eines der Schlüsselenzyme der T_{H1}-Immunantwort im akuten und subakuten Stadium der CVB-3-Myokarditis eine T_{H1}-Antwort zu dominieren. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit den in anderen Arbeitsgruppen gezeigten Verhältnissen^{133,173}. IFN- γ stimuliert die T_{H1}-Differenzierung, während die T_{H2}-Antwort durch IFN- γ gehemmt wird^{169,170}. IL-6 gehört zwar zu den T_{H2}-Zytokinen, weist aber überwiegend proinflammatorische, IFN- γ -synergische Eigenschaften auf, so dass die beiden Zytokine im inflammatorischen Sinne das alleine fungierende IL-10 deutlich überwiegen. Die verstärkte Expression von

IL-10 lässt auf eine entgegenregulierende Inhibierung der T_{H1} -Antwort und die Induktion der T_{H2} -Antwort schließen. Ein kompensatorischer IL-10-Anstieg könnte aber auch aufgrund der minimalen Expression von TGF- β_1 , welches teilweise IL-10-synchrone antiinflammatorische Funktionen besitzt, zustande kommen. In der akuten und subakuten Myokarditis-Phase stiegen die Expressionswerte der infizierten gegenüber den nicht infizierten Tieren für IFN- γ um das 2,9-fache, für IL-6 um das 2,8-fache und für IL-10 um das 2,7-fache an. Gerade diese beiden Phasen zeichnen sich sowohl durch die initiierte und fortschreitende zelluläre Infiltration mit NK-Zellen und Makrophagen^{120,125} als auch durch beginnende histologische Veränderungen in Form von Myozytennekrose und Apoptose¹¹⁹ aus.

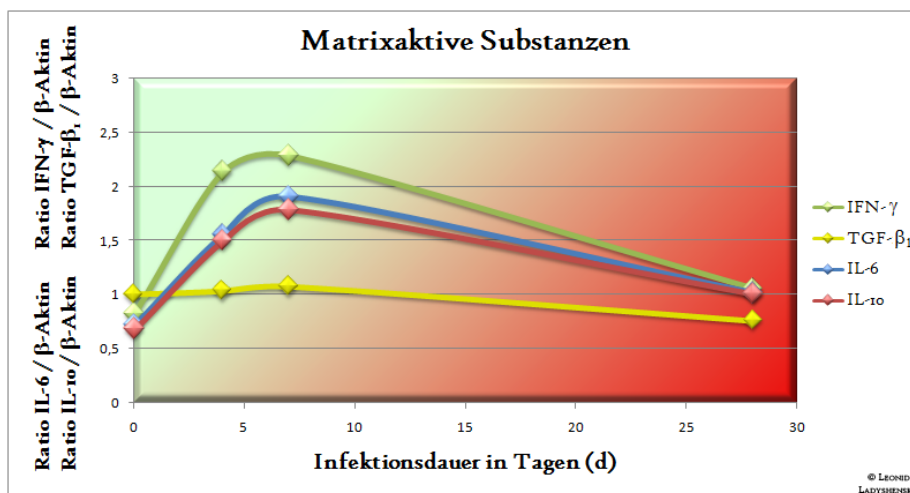


Abb. 5.10 Temporäre Dynamik von Zytokinen und extrazellulären matrixaktiven Substanzen bei CVB-3-induzierter Myokarditis.

In der Mehrheit der Arbeiten wird die T_{H1} -Antwort als kardiopathogen bezeichnet¹⁸⁰. Es gibt aber auch Studien, welche dies widerlegen und eindeutig T_{H1} -protektive Effekte postulieren. Aus dieser Sicht wäre eine einfache Modulation mit Stimulierung der einen oder der anderen

T_H -Antwort nicht sinnvoll, da Zytokine beider T_H -Populationen innerhalb der speziellen T_H -Antwort unterschiedliche stimulierende Effekte und gleichzeitig antagonisierende Wirkungen auf andere Zytokine beider T_H -Subtypen haben können. Der zeitliche Verlauf der T_{H1} - und T_{H2} -Immunantwort bzw. die Expression der für die T_H -Subtypen spezifischen Zytokine könnte daher zur Erarbeitung präziserer Therapieoptionen beitragen. Möglicherweise wäre eine zeitlich beschränkte Modulation mit Stimulierung der einen oder der anderen T_H -Antwort in unterschiedlichen Myokarditis-Stadien von Bedeutung für den Erkrankungsverlauf. Pauschalisieren darf man das aber nicht: wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, sind die Zytokine primär in Anbetracht ihrer spezifischen Funktion und nicht der banalen T_H -Zugehörigkeit aufzufassen und zu modulieren. So erscheint es eher sinnvoll, nur bestimmte Anteile einer T_H -Antwort zu bestimmten Zeitpunkten aktivieren oder inhibieren zu lassen.

5.6 Oxidativer Stress bei viraler Myokarditis

Der oxidative Stress wird bei der viralen Myokarditis durch Zytokine und Inflammation induziert⁴⁵⁸. Eine gesteigerte Phagozytoseaktivität während der unspezifischen Immunabwehr geht obligat mit einem hohen Sauerstoffverbrauch einher, was ebenfalls zur Aktivierung des oxidativen Stresses führt⁴⁵⁹. Die körpereigenen antioxidativen Reserven werden schnell aufgebraucht, so dass die Progression der Radikalbildung nicht mehr kompensiert werden kann²⁸⁹.

Andersherum gibt es auch Hinweise darauf, dass eine verminderte Antioxidantienkonzentration das Induktionsrisiko der akuten Virusmyokarditis erhöht²⁸⁹. Bei Labormäusen, die mit einem benignen (avirulenten) Stamm des Coxsackie-B3-Virus infiziert wurden, manifestierte sich eine Myokarditis erst nach einem diätetisch induzierten oxidativen Stress. Während bei der oxidativ gestressten Maus veränderte immunologische Funktionen festgestellt wurden, entwickelten normal ernährte Mäuse keine Myokarditis⁴⁶⁰. Damit konnte veranschaulicht werden, dass der oxidative Stress nicht nur tiefgreifende Effekte im Wirt verursacht, sondern auch das Pathogen selbst beeinflussen kann: der avirulente Virus wurde durch die Einwirkung des oxidativen Stresses, vermutlich infolge der viralen Genommutation, virulent⁴⁶¹.

Die Auswirkungen des oxidativen Stresses am Myokardgewebe sind Schädigungen der Zellmembranen und der Nukleinsäurebasen, Störungen der intrazellulären Kalziumhomöostase mit Senkung der kardialen Kontraktionsfähigkeit, Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und Glykolyse, Induktion der Apoptose mit myokardialem Remodeling und Begünstigung der kardialen Inflammation. So konnten der entzündliche Prozess sowie Kardiomyozytenschäden durch die Inhibierung der NADPH-Oxidase bei einer akuten Herztransplantatabstoßung deutlich herabgesenkt werden⁴⁶².

Eine mögliche Fehlerquelle in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnte in der maschinellen Beatmung der Labormäuse zu finden sein. Eine Narkose unter Sauerstoffbeatmung kann nämlich mit einem erhöhten oxidativen Stress bei Abnahme von Antioxidantien assoziieren³⁰³.

5.6.1 Regulation der NADPH-Oxidase im Verlauf der viralen Myokarditis

Die wichtigste Quelle für die kardiale ROS-Bildung ist die NADPH-Oxidase. Als bedeutsame Nox-Induktoren fungieren Zytokine (IL-1 β , TNF- α , TGF- β) und Angiotensin II³¹⁵. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression der einzelnen NADPH-Subunits im Verlauf der Myokarditis gemessen. Während gp91phox in die Zytomembran integriert ist, befinden sich p47phox und p67phox im nichtaktivierten Zustand im Zytoplasma und werden erst bei der Aktivierung des Enzyms an gp91phox gebunden.

Leider liegen bisher keine Daten aus externen Studien zu den Expressionen der Nox-Subunits p47phox, p67phox und gp91phox während einer Myokarditis vor. Mit Sicherheit aber konnte unsere Arbeitsgruppe die Initialisierung des oxidativen Stresses während der akuten CVB-3-Myokarditis belegen. Mit nur geringgradigen Expressionsunterschieden ließ sich in unserem Experiment eine deutliche Expressionssteigerung für die Subunits p47phox und gp91phox in der akuten Myokarditis-Phase (0. – 4. Tag p.i.) feststellen. Entsprechend der α -Adjustierung nach Bonferroni verfehlte der Expressionsanstieg von p67phox knapp das Signifikanzniveau. Die p47phox-Expression stieg um den Faktor 1,7 und die von gp91phox um den Faktor 2,4. Dass die einzeln inaktiven Nox-Subunits gleichzeitig eine synergistische Expressionssteigerung aufweisen, spricht für die Komplexbindung der Untereinheiten und damit für die Aktivierung der NADPH-Oxidase.

Die Aktivierung der Nox im akuten Myokarditis-Stadium ist als Folge der Zytokin-vermittelten Inflammation und Immunabwehr zu werten. Der zustande gekommene oxidative Stress ist mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Progression der viralen Myokarditis verantwortlich. Nicht weniger bedeutend ist die Oxidantien-vermittelte Chronifizierung der Erkrankung durch die Erhöhung der Erreger-Virulenz: auch in einigen chronisch infizierten Tieren war das virale Genom vorfindbar (s. Abb. 4.8).

Dass Ang II als wichtiger Nox-Induktor fungiert, zeigen auch die Ergebnisse unserer Arbeit: es ließ sich ein hoher Korrelationszusammenhang zwischen Angiotensinogen und allen drei Nox-Subunits nachweisen. In Fremdarbeiten wird die Ang-II-

vermittelte Nox-Aktivierung dem AT_{1B} -Rezeptor zugeteilt³¹⁵. Tatsächlich besteht auch laut unseren Resultaten eine hohe Korrelation zwischen dem AT_{1B} -Rezeptor und den beiden Subunits p47phox und gp91phox. Dagegen ließ sich zum AT_{1A} -Rezeptor kaum eine relevante Beziehung nachweisen. Ob aber der oxidative Stress über den AT_{1B} -Rezeptor induziert wird, ist sehr fraglich, weil in diesem Falle kein ersichtlicher Regulationsmechanismus aktiviert werden würde. Da der Organismus jedoch im Normalfall rückkoppelnde Schutzfunktionen initialisiert, und der

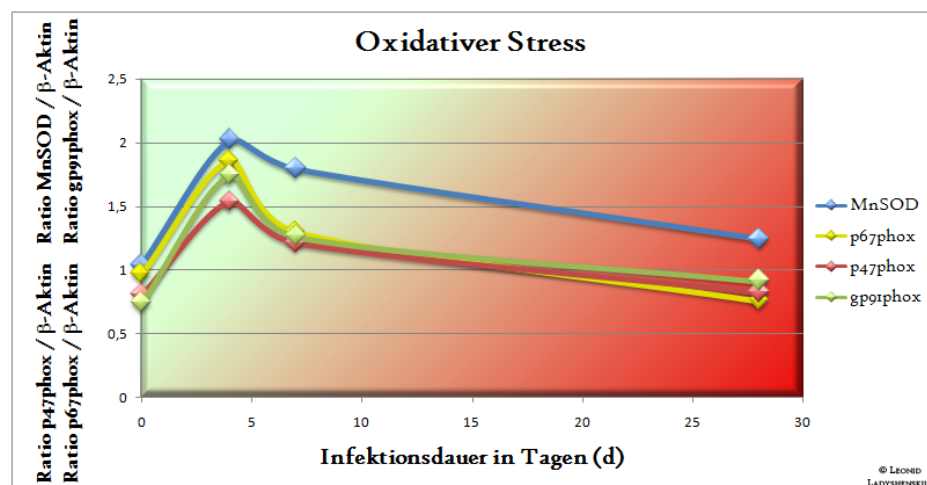


Abb. 5.11 Temporäre Dynamik des oxidativen Stresses bei CVB-3-induzierter Myokarditis anhand der Aktivierung der NADPH-Oxidase sowie der MnSOD-Expression

AT_{1A}-Rezeptor im myokarditischen Krankheitsverlauf nicht auf neutralem Niveau verblieb, sondern aktiv herunterreguliert wurde, ist eher zu vermuten, dass AT_{1B} in diesem Fall der kompensatorisch aktivierte Rezeptor ist, und über den AT_{1A}-Rezeptor die primäre Ang-II-vermittelte Nox-Induktion erfolgt.

Während in der subakuten Phase (7. Tag p.i.) die Werte noch erhöht blieben, sankt die Expressionsstärke der Nox-Subunits im weiteren Verlauf deutlich ab, bis in der chronischen Phase (28. Tag p.i.) nahezu die Ausgangswerte erreicht wurden. Dieses Ergebnis spricht in erster Linie dafür, dass der oxidative Stress mit der Chronifizierung der Erkrankung erlischt. Dieses Phänomen kann mit der Herunterregulation der proinflammatorischen Zytokine und der Abnahme der Inflammation in den fortgeschrittenen Myokarditis-Stadien zusammenhängen. Ferner sinkt im chronischen Stadium die Angiotensinogen-Expression (s. Kap. 5.7.1) und damit auch die stimulierende Wirkung des wichtigen Nox-Induktors – Ang II. Möglicherweise werden auch die Effekte von Ang II gedrosselt, indem die AT_{1A}-Rezeptor-Expression herunterreguliert wird (s. Kap. 5.7.2).

Es wäre sicherlich falsch zu behaupten, dass der oxidative Stress nur schädlich ist, und um jeden Preis neutralisiert werden müsste. Wie im Kapitel 5.5.1 dargestellt, ist z.B. der nitrosamine Stress in Verbindung mit den IFN- γ -Wirkungen wesentlich an der Viruselimination in der akuten Myokarditis-Phase beteiligt. Speziell die NADPH-Oxidase ist jedoch eine direkte ROS-Quelle und bringt hochtoxische Substanzen hervor, welche starke Schäden am kardialen Gewebe hervorrufen. Die durch die Nox gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies bewirken außerdem die Akkumulation des Arginin-Derivats ADMA, welches als endogener Hemmstoff der iNOS fungiert und damit die schützende antivirale NO-Funktion unterbricht⁴⁶³. Aus dieser Sicht könnte die Inaktivierung der Nox in den akuten und subakuten Erkrankungsstadien vom enormen Vorteil für den Myokarditis-Verlauf sein. Am effektivsten würden Antikörper gegen die einzelnen Nox-Subunits fungieren, da die letzteren sich in diesem Fall nicht binden könnten, und die Nox inaktiv bliebe. Inzwischen sind auf dem pharmakologischen Markt p47phox-, p67phox-, gp91phox- und p22phox-Antikörper verfügbar. Die Aktivierung und Stimulierung des antioxidativen Systems würde mit Sicherheit einen spürbaren positiven Effekt erbringen (s. Kap. 5.6.2). In anderen Arbeiten konnte die Down-Regulation der NADPH-Oxidase mit AT₁-Rezeptor-Blockern herbeigeführt werden³¹⁸. An dieser Stelle wäre zusätzlich interessant, ausschließlich den Effektor-Rezeptor, und nicht den wahrscheinlich kompensierenden Rezeptor, zu blockieren. Entsprechend den oben dargelegten Überlegungen könnte die AT_{1A}-Rezeptor-Blockade effektiv sein. Ebenfalls sehr wirkungsvoll wäre die Unterbrechung der RAAS-Kaskade (s. Abb. 2.16): Antagonisten, Antikörper oder Rezeptor-Blocker für Renin, Cathepsin, Tonin, Trypsin und ACE. Ein beschleunigter Abbau von Ang II durch die Substitution von Aminopeptidasen und Angio-

tensinasen könnte die körpereigene antioxidative Arbeit erleichtern. Auf der Zytokin-Ebene erscheint die Inhibition der Nox-stimulierenden IL-1 β und TNF- α als sinnvoll.

Auch Statine sollen eine Nox-Hemmung vermitteln. Diese Substanzgruppe vermag, die Isoprenylierung der Nox-Proteinuntereinheiten zu reduzieren⁴⁶⁴. So werden teilweise die nicht über die Cholesterinsenkung erklärbaren protektiven Statine-Wirkungen erklärt.

5.6.2 Regulation von MnSOD im Verlauf der viralen Myokarditis

Die MnSOD stellt im Herzen die primäre und wichtigste endogene Abwehr gegenüber ROS-Aktivitäten dar. In mehreren Studien wurde bestätigt, dass die MnSOD bei steigendem Anfall von Radikalen drastisch hochreguliert werden kann^{328,329}. Es ist außerdem bekannt, dass die MnSOD-Produktion direkt durch ROS und durch proinflammatorische Zytokine (TNF- α , TNF- β , IL-1 α , IL-1 β) über NF- κ B-Transkriptionsweg stimuliert wird. Dieser Vorgang wird als protektiver Rückkopplungsmechanismus bei schädigenden Wirkungen der entzündlichen und oxidativen Prozesse gewertet^{330,331}.

Obwohl die bedeutende Funktion von MnSOD in der viralen Myokarditis schon längere Zeit bekannt ist, gibt es nur wenige Daten aus experimentellen Studien, welche die Expression von MnSOD im Verlauf der viralen Myokarditis beschreiben. In einer tierexperimentellen Arbeit mit EMCV-Myokarditis war eine Induktion der MnSOD-Expression besonders in der akuten Myokarditis-Phase dargestellt⁴⁶⁵. In BALB/c-Mäusen, infiziert mit dem Enzephalomyokarditisvirus, zeigte sich die Expressionssteigerung von MnSOD vom 3. bis 5. Tag p.i. auf fast das 5-fache im Vergleich zu den Ausgangswerten. Vom 5. bis 14. Tag p.i. kam es anschließend zu einer Expressionsminderung bis annähernd auf die Werte der nicht infizierten Kontrollgruppen⁴⁶⁶.

Unsere Ergebnisse aus einer CVB-3-infizierten SWR/J-Maus weichen von den oben beschriebenen insofern ab, dass trotz abfallender Tendenz die MnSOD-Expressionswerte bis ins chronische Myokarditis-Stadium (28. Tag p.i.) signifikant erhöht blieben. Die maximalen Werte wurden auch bei uns am 4. Tag p.i., d.h. am Ende der akuten und Beginn der subakuten Phase, gemessen. Dabei waren die Werte auf fast das 1,9-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Bereits in der Mitte der subakuten Phase (7. Tag p.i.) ließ sich eine geringgradige Expressionsminderung feststellen. Auch weiterhin fielen die Werte bis ins chronische Stadium (7. bis 28. Tag p.i.) tendenziell ab. Insgesamt lässt sich die Entwicklung der MnSOD-Expression simultan den drei untersuchten Subunits der NADPH-Oxidase beschreiben (s. Abb. 5.11). Auch aus statistischer Sicht ergeben sich hier signifikante positive Korrelationen. Im Gegensatz zu der quantitativ bewertet unbedeutenden Mehrexpression von MnSOD in der Akutphase, war die

MnSOD-Expression in der subakuten und chronischen Phase deutlich höher als die der Nox-Subunits. Dieses Ergebnis kann gut mit der oben beschriebenen „bedarfsorientierten“ Hochregulation von MnSOD erklärt werden. Die verlangsamte Down-Regulation fand, unseren Daten nach, erst nach einem deutlichen Rückgang des oxidativen Stresses statt.

Es ließ sich auch eine hochsignifikante gleichsinnige Korrelation zwischen MnSOD und den inflammatorischen Zytokinen IL-6, IL-10 und IFN- γ eruieren. Ein Einfluss der hier untersuchten Zytokine auf MnSOD-Expression konnte bei der viralen Myokarditis durch Fremdarbeiten bisher nicht festgestellt werden. Dafür wurde in HeLa-Zellen, in myenterischen Plexusneuronen (MPN's) und in Hepatozyten eine MnSOD-Induktion durch IL-6 nachgewiesen^{467,468,469}. In Gliazellen, Neuronen und Melanom-Zellen konnte auch eine IFN- γ -vermittelte MnSOD-Aktivierung erfolgen^{321,470}. Interessanterweise war beim Multiplen Myelom umgekehrt eine Hemmung von IL-6 durch MnSOD über die Inaktivierung von AP-1 (wichtiger Mediator der IL-6-Expression) zu eruieren⁴⁷¹. Ob dies auch für die Myokarditis zutrifft, steht bisher offen, könnte aber theoretisch einen antiinflammatorischen Schutzmechanismus darstellen. Dafür würden auch die entgegengesetzten Wirkungen von MnSOD und IL-6 in monoblastischen Zellen sprechen, wobei IL-6 die Apoptose zu induzieren vermochte, während MnSOD diesen Effekt hemmte⁴⁷². Eine weitergehende Erforschung von diesen Interaktionen speziell bei der viralen Myokarditis könnte zur Erarbeitung neuer therapeutischer Schutzmechanismen gegen den oxidativen Stress beitragen.

Viele Parallelen lassen sich zwischen der MnSOD-Expression und der Dynamik des kardialen RAAS im Verlauf der CVB-3-Myokarditis feststellen: dass MnSOD eine kompensatorische Funktion erfüllt, zeigt auch die hochpositive Korrelation zwischen MnSOD und Angiotensinogen, der Ang-II-Vorstufe, welches seinerseits die Nox zu aktivieren vermag. Eine hochpositive Korrelation ließ sich auch zur Expression des AT_{1B}-Rezeptors nachweisen. Ob es sich hierbei um Synergismus oder Divergenz handelt, ist nicht spontan zu beantworten. Verfolgt man aber die oben aufgeführten Überlegungen – die Nox würde über den AT_{1A}-Rezeptor aktiviert werden – so dürfte Ang II über den AT_{1B}-Rezeptor den oxidativen Stress reduzieren und damit MnSOD-synergistisch wirken. Als gegensinnige Korrelate zur MnSOD enttarnen sich der AT_{1A}- und der AT₂-Rezeptor. Während die Herunterregulation der AT_{1A}-Rezeptor-Expression als Antwort auf den expansiven oxidativen Stress verstanden werden kann, ist die Rolle des AT₂-Rezeptors noch genauer zu analysieren: würde Ang II über den AT₂-Rezeptor eine antioxidative, MnSOD-synergistische Wirkung entfalten, so müsste die AT₂-Rezeptor-Expression in den initialen Myokarditis-Phasen als Antwort auf den wachsenden oxidativen Stress hochreguliert werden. Tatsache ist aber, dass der AT₂-Rezeptor aktiv herunterreguliert wird, was vielfältige Schlüsse zur Folge haben kann. Eine detailliertere Analyse erfolgt im Kapitel 5.7.3.

In unserem Experiment haben wir nochmals bestätigen können, dass die MnSOD-Produktion in deutlichem Maße auf natürlichem Weg im Laufe der viralen Myokarditis induziert wird. Eine aktive externe MnSOD-Applikation erscheint im Laufe der Erkrankung nicht sinnvoll, da, wie im Kapitel 2.6.6 bereits beschrieben, eine MnSOD-Akkumulation ohne sekundäre, nichtenzymatische Antioxidantien den oxidativen Stress sogar verstärken könnte. Auch für die Myokarditis trifft es zu, dass ein verminderter antioxidativer Status vorherrscht, so dass das Wasserstoffperoxid, welches aus dem Superoxidanion durch die MnSOD gebildet wurde, nicht weiter reduziert werden kann. Bei Akkumulation kann auch Wasserstoffperoxid Membran- und Zellschäden verursachen³³². Daraus resultiert, dass zur vollständigen antioxidativen Funktionsentfaltung von MnSOD während der Myokarditis eine ausreichende externe Applikation von nichtenzymatischen Antioxidantien zu gewährleisten ist. Trotz der Plausibilität dieser Aussage verliefen viele bisherige Studien zur antioxidativen Therapie frustant^{473,474,475}. Eine Erklärung dafür war die systemische und nicht auf das betroffene Organ lokalisierte Wirksamkeit der oral supplementierten Antioxidantien, so dass die effektive Konzentration im oxidativ gestressten Gebiet bei weitem nicht erreicht wird. Die Verabreichung von Vitamin E und β -Carotin erwies sich sogar als mortalitätssteigernd^{476,477}! Die schädlichen Wirkungen werden damit verbildlicht, dass Antioxidantien selbst zu Radikalen konvertieren könnten, und so neue ROS-Kettenreaktionen verursachen⁴⁷⁸. Auf dieser Grundlage erscheint eine externe Applikation von nichtenzymatischen Antioxidantien (Selen, β -Carotin, Vitamine E und C) während der Myokarditis als nicht gerechtfertigt. Ob die Applikation von enzymatischen Antioxidantien, wie z.B. Glutathionperoxidase und Katalase, eine positive unterstützende Funktion erbringen könnte, wäre noch zu prüfen.

Außer der gezielten Hemmung der Nox, könnte es auch sinnvoll sein, das protektive NO zu erhöhen. Bei vorliegender Endotheldysfunktion verbesserte die Applikation des NOS-Substrats L-Arginin die endotheliale Funktionalität der A. brachialis⁴⁷⁹. Alternativ können NOS-Enhancer eingesetzt werden, welche die NO-Synthese verstärken. So schützte das AVE9488 im Mausmodell gegen Ischämie-Reperfusionsschäden⁴⁸⁰. Die meisten NO-Funktionen werden über die lösliche Guanylatzyklase (sGC) vermittelt. Dieser intrazelluläre NO-Rezeptor kann sowohl maximal stimuliert als auch NO-unabhängig aktiviert werden. Riociguat, ein sGC-Stimulator, verbesserte in einer klinischen Studie das kardiale Schlagvolumen, die Belastungskapazität und den pulmonalen Gefäßwiderstand⁴⁸¹. Bei vorliegender Herzinsuffizienz konnte durch den sGC-Aktivator Cinaciguat das Herzzeitvolumen deutlich gesteigert werden⁴⁸². Als eine weitere Therapieoption gelten Phosphodiesterase-5-Inhibitoren, welche durch die Hemmung des cGMP-Abbaus die protektiven NO-Effekte verstärken.

5.7 Rolle des kardialen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in der viralen Myokarditis

Angiotensin II nimmt mit anderen RAAS-Komponenten eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des kardiovaskulären Systems ein. Während das systemische RAAS unter physiologischen Bedingungen eher bei akuter kardialer Dekompensation einsetzt, entfaltet das lokale kardiale RAAS eher bei Chronifizierung der kardialen Erkrankung seine Wirkung. Dennoch ist das lokal-kardiale RAAS vom systemischen reno-vaskulären RAAS funktionell nicht komplett trennbar. Im Laufe der viralen Myokarditis kommt es infolge der fortschreitenden kardialen Dekompensation zur chronischen Aktivierung der neurohumoralen Systeme, wie das systemische RAAS und adrenerges Nervensystem. Die dadurch bedingten Vasokonstriktion, Vor- und Nachlasterhöhungen erzwingen ein fortschreitendes kardiales Remodeling (vgl. Abb. 2.12 „Circulus vitiosus“). Es ergibt sich ein Summationseffekt mit dem kardialen RAAS, wodurch die Herzdekompensation noch beschleunigt wird.

Lokales RAAS	Spezifische Wirkungen
Kardiales RAAS	<ul style="list-style-type: none"> ○ Direkte zelluläre Ang-II-Effekte ○ Positive Inotropie (→ ↑ O₂-Bedarf) ○ Sympathikus-Aktivierung ○ Diastolische Dysfunktion ○ Koronare Vasokonstriktion ○ Protoonkogen-Expression ○ Arrhythmien ○ Ischämie ○ Myokardhypertrophie ○ Myokardfibrose
Vaskuläres RAAS	<ul style="list-style-type: none"> ○ Arterielle Vasokonstriktion ○ Nachlasterhöhung ○ Venöse Vasokonstriktion ○ Vorlasterhöhung ○ Regionale Perfusionsstörung
Renales RAAS	<ul style="list-style-type: none"> ○ Na⁺-Rückresorption im prox. Tubulus ○ ↑ zirkulierendes Blutvolumen ○ Arterielle Konstriktion ○ ↓ renaler Blutfluss / ↓ GFR

Tab. 5.1 Lokale Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systeme bei kardialer Insuffizienz

5.7.1 Regulation von Angiotensinogen im Verlauf der viralen Myokarditis

Für die lokale Expression sowohl der Ang-II-Vorstufe – Angiotensinogen – als auch der einzelnen Rezeptorentypen und -subtypen im kardialen Gewebe während einer Myokarditis liegen kaum Daten aus externen Studien zum Vergleich vor. In der murinen viralen Myokarditis, induziert durch den Enzephalomyokarditisvirus, ließ sich eine deutliche Konzentrationssteigerung von Ang I und Ang II im Gewebe des linken Ventrikels am 30. Tag p.i. beobachten, während am 120 Tag p.i. die Konzentrationen der beiden Angiotensine nicht mehr erhöht waren. Daten aus Expressionsmessungen in der akuten und subakuten Phase der Myokarditis wurden bei dieser Studie leider nicht erhoben⁴⁸³.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der CVB-3-Myokarditis ein steiler Anstieg der Angiotensinogen-Expression im Herzwert in der akuten und in der subakuten Erkrankungsphase (0. – 7. Tag p.i.). Dabei stiegen die Werte auf das 2,5-fache der Ausgangswerte (Kontrollgruppe).

pen). In der chronischen Phase (28. Tag p.i.) ließ sich ein deutlicher Abfall der Expressionsstärke beobachten. Dennoch lag der Expressionslevel von Angiotensinogen am 28. Tag p.i. noch deutlich höher als jener von der Kontrollgruppe. Fest steht: Bei viraler, CVB-3-induzierter Myokarditis kommt es bereits in der akuten Infektionsphase zur Induktion des RAAS und Steigerung der kardialen Ang-II-Synthese (s. Abb. 5.12).

Eine sehr hohe gleichsinnige Korrelation ließ sich statistisch zwischen der Angiotensinogen-Expression und der Expression inflammatorischer Zytokine IL-6, IL-10 und IFN- γ feststellen. Dieser Zusammenhang ist gut auf die Ergebnisse vorangegangener Studien übertragbar, aus welchen die Aktivierung von IL-6 und IFN- γ durch Ang II bekannt ist³⁷¹. Die Korrelation mit IL-10 ergibt sich aus dem kompensatorischen IL-10-Anstieg als Antwort auf die Überexpression proinflammatorischer Zytokine.

Eine hochsignifikante positive Korrelation ergab sich auch aus der Expression von Angiotensinogen und MnSOD. Es ist bekannt, dass Ang II die Nox aktiviert und damit den oxidativen Stress induziert^{315,380}. Ang II aktiviert auch gleichzeitig NF- κ B³⁷⁷, wodurch einerseits die Inflammation vorangetrieben wird, andererseits theoretisch auch MnSOD induziert werden könnte. Dieser Sachverhalt wurde bisher in keiner anderen Arbeit als offensichtlich interpretiert. Dennoch sprechen zwei Fakten eindeutig dafür: 1. Es besteht eine sehr hohe Korrelation zwischen den Angiotensinogen- und MnSOD-Expressionen. 2. Die MnSOD-Induktion durch Zytokine erfolgt in den Mitochondrien ebenfalls über den NF- κ B-Transduktionsweg^{330,331}. Eine Ang-II-vermittelte Initialisierung von MnSOD könnte im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus bei steigendem oxidativen Stress verstanden werden. Die Aktivierung der Nox durch Ang II wird in unserem Experiment insbesondere durch die signifikante gleichsinnige Korrelation zwischen Angiotensinogen und den drei untersuchten Nox-Subunits p47phox, p67phox und gp91phox untermauert.

5.7.2 Expression des Ang-II-AT₁-Rezeptors im Verlauf der viralen Myokarditis

Die Effektor-Substanz des RAAS – Angiotensin II – wirkt auf das Myokard über seine beiden Rezeptoren AT₁ und AT₂, wobei der AT₁-Rezeptor bei Nagetieren in die Untergruppen AT_{1A} und AT_{1B} unterteilt wird. Die meisten seiner Funktionen verwirklicht Ang II über den AT₁-Rezeptor³⁵⁹. Hierzu gehören einerseits myokardiales Remodeling durch Induktion der Kardiomyozytenhypertrophie, Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese, andererseits inflammatorische Progression durch Stimulierung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ) und Aktivierung von NF- κ B, ICAM-I, VCAM-I und MCP-I^{377,378}. Vermittelt durch den AT₁-Rezeptor

induziert Ang II auch den kardialen oxidativen Stress über die Aktivierung der NADPH-Oxidase³¹⁵ und stimuliert die lokale Aldosteron-Produktion und -Sekretion³⁸¹.

Während quantitative Unterschiede zwischen der AT_{1A}- und der AT_{1B}-Rezeptor-Expression beschrieben wurden, waren funktionelle Differenzen der beiden Subtypen im kardialen Gewebe bisher nicht bekannt³⁸⁶. Dennoch wurde in der Laborratte eine eindeutige Regulation der beiden Subtypen in kardialen Fibroblasten nachgewiesen³⁵⁷. Die Subtypen AT_{1A} und AT_{1B} weisen mit 95%-iger Übereinstimmung eine sehr hohe Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz auf, gleichartige Affinität für Ang-II-Analoga und Verwendung von Ca²⁺ als intrazellulären Second messenger^{385,387}. Die Abwesenheit von AT_{1A}-Rezeptor bei AT_{1A}-Rezeptor-defizienten Mäusen wurde durch Hochregulation des AT_{1B}-Rezeptors teilweise kompensiert und umgekehrt⁴⁸⁴, was für die funktionelle Analogie der beiden Rezeptor-Subtypen sprechen würde.

Auch wenn die zeitliche Dynamik der Rezeptorexpression während der viralen Myokarditis nicht durch andere Studien aufgrund bisher fehlender Untersuchungen in diesem Bereich geprüft werden kann, können die lokalen Rezeptor-Expressionen bei gesunden Individuen (Ausgangswerte) verglichen werden: In einer tierexperimentellen Arbeit wurde veranschaulicht, dass neonatale kardiale Ratten-Fibroblasten bedeutend mehr AT_{1A}-Rezeptor exprimieren als AT_{1B}-Rezeptor⁴⁸⁵. Dieses Ergebnis wurde durch eine andere Studie an Rattenherzen bestätigt: während in den Kardiofibroblasten die AT_{1A}- über der AT_{1B}-Rezeptor-Expression prädominierte, überwiegte in den Kardiomyozyten die mRNA-Expression des AT_{1B}-Rezeptors³⁵⁷. Die Verhältniszahl von der Expression des AT_{1A}-Rezeptors zu der des AT_{1B}-Rezeptors in den Herzen erwachsener Ratten betrug 1,2⁴⁸⁶ oder 1,75 laut einer anderen Studie⁴⁸⁷.

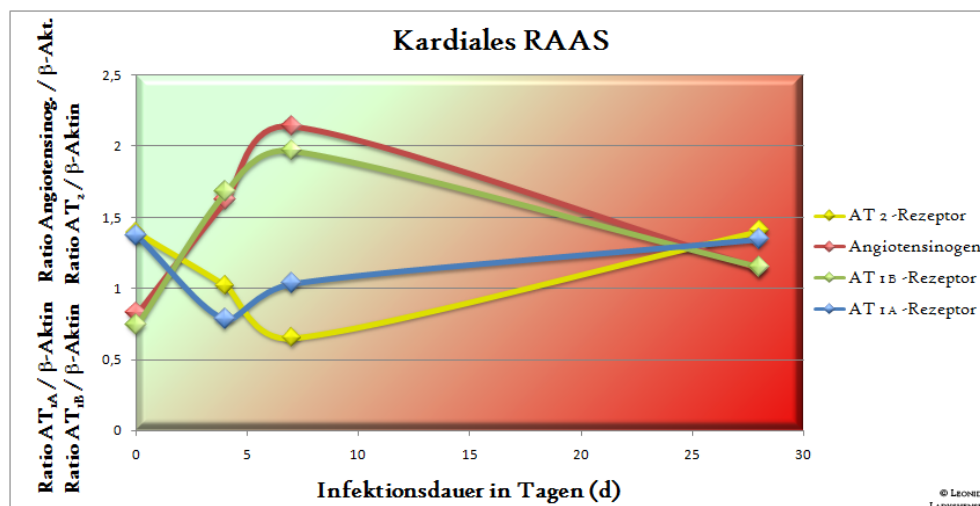


Abb. 5.12 Temporäre Dynamik des kardialen Renin-Angiotensin-Systems bei CVB-3-induzierter Myokarditis anhand der Expression von Angiotensinogen- und von Angiotensin-II-Rezeptoren

Die von unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten ergaben eine deutlich höhere basale AT_{1A}-Rezeptor-Expression in Kontrollieren als die, des AT_{1B}-Rezeptors, was mit den Ergebnissen einiger oben genannter Studien

übereinstimmt. Die Verhältniszahl (ratio) von AT_{1A} - zu AT_{1B} -Rezeptor betrug in unserer Arbeit 1,84. In der akuten Myokarditis-Phase (0. – 4. Tag p.i.) stieg die Expression des AT_{1B} -Rezeptors drastisch an, während die des AT_{1A} -Rezeptors deutlich fiel. Bereits am 4. Tag p.i. erreichte die mRNA-Expression von AT_{1B} -Rezeptor das 2,3-fache des Ausgangswertes und in der subakuten Phase am 7. Tag p.i. – das 2,7-fache. In der chronischen Phase, am 28. Tag p.i., war die AT_{1B} -Rezeptor-Expression stark herabgesunken, lag aber noch deutlich über jener der zugehörigen Kontrollgruppe. Am 4. Tag p.i. zeigte sich die Expression des AT_{1A} -Rezeptors um das 1,8-fache vermindert, in der subakuten Phase (7. Tag p.i.) fand eine mittelgradige Expressionssteigerung statt, wonach dieses Level bis in die chronische Phase (28. Tag p.i.) nahezu konstant blieb.

Bei diesen Ergebnissen ist von einer gleichsinnigen Funktion der beiden AT_1 -Rezeptor-Subtypen bei der viralen Myokarditis nicht auszugehen. Divergente Funktionen der Subtypen passen nicht in das Bild der experimentellen Vorarbeiten, bei welchen eine hohe Ähnlichkeit der Rezeptor-vermittelten Funktionen von AT_{1A} und AT_{1B} nahe gelegt wurde^{385,387}. Dennoch handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit um statistisch höchstsignifikante Ergebnisse, welche nicht zu vernachlässigen sind.

Aufgrund unserer Daten ist eine eher antagonistische Funktion der Rezeptor-Subtypen AT_{1A} und AT_{1B} zu vermuten, was auch durch eine signifikante gegensinnige Korrelation belegt wird. Der zunächst quantitativ überlegene AT_{1A} -Rezeptor wird in der Akutphase schnell herunterreguliert, was divergent gedeutet werden könnte: a) es handelt sich um einen Kompensationsmechanismus bei schädigenden Ang-II-Effekten über den AT_{1A} -Rezeptor, oder b) – der eigentliche Effektor-Rezeptor des Ang II ist AT_{1B} , und AT_{1A} ist der „benigne“ Gegenspieler. Dasselbe kann natürlich auch umgekehrt auf den AT_{1B} -Rezeptor zutreffen. Im Verlauf der Erkrankung zeigen sich nämlich eine positive Korrelation zwischen dem AT_{1A} - und dem AT_2 -Rezeptor und eine hochsignifikante gleichsinnige Korrelation zwischen AT_{1B} -Rezeptor und Angiotensinogen. Trotz dieser Spekulationen scheint der AT_{1A} -Rezeptor der Effektor-Rezeptor von Ang II zu sein. Dafür spricht z.B., sowohl in externen Studien als auch in dieser Arbeit, nachgewiesene basale Dominanz von AT_{1A} , d.h. die Prävalenz des AT_{1A} -Rezeptors bei gesunden Individuen. Auch die gegensinnige Korrelation zwischen dem kompensatorisch angestiegenen MnSOD, bei u.a. durch Ang II verursachen oxidativen Stress, und den eventuell ebenfalls kompensatorisch fallenden AT_{1A} -Werten, könnte die letztgenannte Theorie unterstützen. Mäuse, denen das Gen für den AT_{1A} -Rezeptor entzogen wurde, sind durch tiefen Blutdruck und hohe zirkulierende Renin-Spiegel charakterisiert. Man konnte auch veranschaulichen, dass diese Mäuse zusätzlich ein geringeres linksventrikuläres Remodeling und verbessertes Überleben nach einem Herzinfarkt aufweisen³⁵⁶. Man sollte aber auch beachten, dass es in der Rezeptorspezifität und in der funk-

tionellen Unterteilung des AT₁-Rezeptors zwischen dem kardialen RAAS und dem renalen RAAS eine Diskrepanz in der Rollenverteilung geben kann!

Interessanterweise passt die Expressionsentwicklung des AT_{1B}-Rezeptors auf die im Kapitel 2.7.3.2 beschriebene modulatorische und schützende Funktion des AT₂-Rezeptors: Bei einer basal niedrigen Expression findet nach der Infektion mit dem Coxsackievirus und einsetzender Inflammation eine drastische Expressionssteigerung statt, adäquat deren des Angiotensinogens. Demgemäß zeigt sich auch eine sehr hohe Korrelation zwischen der Expression des AT_{1B}-Rezeptors und jener der inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-10 und INF- γ .

Dennoch muss die Frage nach der spezifischen Funktion des AT_{1A}- und des AT_{1B}-Rezeptors bei Myokarditiden vorerst offen bleiben und bedarf einer ausgiebigen Erforschung, da die dargestellten Veränderungen eine wichtige Rolle in der Myokarditis-Pathogenese spielen könnten. Ein experimenteller Ansatzpunkt wäre z.B. der selektive Antagonismus des einen oder des anderen Rezeptors, oder separate spezifische pharmakologische Einflüsse auf beide Rezeptor-Typen. Aufgrund der hohen Homologie in der Aminosäuresequenz der beiden Rezeptor-Subtypen dürfte es schwierig sein, spezifische Antikörper nur gegen den AT_{1A}- oder nur gegen AT_{1B}-Rezeptor herzustellen. Dennoch wäre das ein wichtiger Forschungsschritt, 1. zum Nachweis der beiden Rezeptor-Typen beim Menschen, und 2. wegen der enormen klinischen Bedeutung bei der Myokarditis. Erster möglicher Forschungsschritt wäre die Überprüfung der heute in der Klinik intensiv eingesetzten AT₁-Rezeptor-Antagonisten (Sartane): über welchen der beiden Rezeptor-Subtypen entfalten diese Substanzen ihre Wirkung? Weiterhin wäre nachzuweisen, ob Sartane auch direkt am Kardiomyozyten oder in der ECM wirksam sind, und ob der kardial-effektive AT₁-Rezeptor-Subtyp mit dem im renalen und vaskulären System übereinstimmt. Daraus könnte dann abgeleitet werden, warum der Gegenspieler bei Eintreten eines pathologischen Krankheitsbildes, wie des einer infektiösen Myokarditis, hoch- bzw. herunterreguliert wird.

5.7.3 Expression des Ang-II-AT₂-Rezeptors im Verlauf der viralen Myokarditis

Dem AT₂-Rezeptor wird eine modulatorische Funktion bei pathologischen kardialen Prozessen zugeteilt, indem er AT₁-Rezeptor-vermittelte Wirkungen kompensiert³⁹⁰. Im Verlauf von kardio-vaskulären Erkrankungen wurde eine Hochregulation des AT₂-Rezeptors beschrieben^{359,488}. Genauere Daten bei Myokarditis-Verläufen wurden bisher jedoch nicht veröffentlicht. Ang II soll über den AT₂-Rezeptor Vasodilatation, Zelldifferenzierung, Regeneration und Apoptose bewirken, während Proliferation, Myokardhypertrophie und myokardiales Remodeling inhibiert wer-

den. Bei gezielter Inhibierung des AT₁-Rezeptors mit Sartanen ist ebenfalls eine gesteigerte AT₂-Rezeptor-Expression beobachtet worden⁴⁸⁸.

Aus Studien mit embryonalen und neonatalen Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten ist bekannt, dass AT₁-Rezeptoren (dabei wurde das Expressionsprofil von AT_{1A} und AT_{1B} summiert) zahlenmäßig gegenüber den AT₂-Rezeptoren deutlich dominieren³⁵⁷. Andererseits zeigte eine in-situ-autoradiographische Studie dass die Proportion der AT₁-Rezeptoren zu AT₂-Rezeptoren in den Herzen gesunder E19-Ratten nahezu gleich ist⁴⁸⁹. Auch in neonatalen Ratten konnte mittels Membranbindungsassay veranschaulicht werden, dass das neonatale Rattenherz AT₁- und AT₂-Rezeptoren in gleichen Mengen produziert, und dass die kardiale Hypertrophie die Stimulation beider Subtypen auf mRNA- und Protein-Ebene herbeiführt⁴⁹⁰. In einer anderen experimentellen Arbeit ließ sich in den Rattenherzen eine signifikante Expressionssteigerung der AT₂-Rezeptoren nach einem verursachten Myokardinfarkt beobachten, während das Aktivitätsprofil der AT₁-Rezeptoren gleich blieb³⁵⁸.

Die oben genannten Beobachtungen aus anderen Studien zeigen, dass die Ergebnisse bezüglich der kardialen AT₂-Rezeptor-Expression und damit auch der spezifischen AT₂-Funktion stark auseinanderweichen. Hierzu gehört auch das, von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Experiment, bei welchem, entgegen aller Erwartungen, die Expression des AT₂-Rezeptors im Laufe der CVB-3-Myokarditis herunterreguliert wurde (s. Abb. 5.12). Der Expressionsabfall ließ sich bis in die Mitte der subakuten Myokarditis-Phase (0. – 7. Tag p.i.) verfolgen und war hier um das 2-fache des Ausgangswertes vermindert. Am 28. Tag p.i. war zwischen der infizierten und der nicht infizierten Tiergruppe keine statistische Signifikanz zu errechnen, d.h. dass die Expressionsraten im chronischen Stadium wieder in den prae-infectionem-Bereich anstiegen. Vergleicht man nun die Summe aus den basalen AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor-Expressionen bei den Kontrolltieren mit dem mittleren Ausgangswert der AT₂-Rezeptor-Expression, so ergibt sich eine ca. 1,5-fach höhere basale AT₁-Rezeptor-Expression gegenüber der Expression des AT₂-Rezeptors in nicht infizierten SWR/J-Mäusen.

Aus diesen Ergebnissen wird eine gegenregulatorische Wirkung des AT₂-Rezeptors, wie sie in anderen Studien beschrieben wurde, nicht ersichtlich. Auch findet keine kompensatorische Hochregulation statt, im Gegenteil wird die AT₂-Expression noch weiter herabgesenkt. Möglicherweise wird ein solcher Verlauf durch die in der akuten Myokarditis-Phase ebenfalls abnehmende Expression des prävalierenden AT_{1A}-Rezeptors verursacht, wofür auch die gleichsinnige Korrelation spricht. Dementsprechend zeigt sich eine reziproke Korrelation zwischen der Expression des AT₂-Rezeptors und des Angiotensinogens.

Ohne vergleichbare Studienergebnisse gestaltet sich die Auswertung der vorliegenden Daten als sehr schwierig. Einerseits könnte der AT₂-Rezeptor in der CVB-3-Myokarditis eine ganz andere Funktion annehmen, als es ihm im Verlauf anderer Erkrankungen zugeteilt wurde: Die negative Korrelation zur MnSOD-Produktion könnte z.B. als prooxidative Wirkung gedeutet werden. Auch die erwartete Hochregulation bei steigendem oxidativen Stress und der scheinbare modulatorische Effekt bei pathologischem kardialen Prozess fehlen. Was wäre aber, wenn es sich beim AT₂-Rezeptor um einen direkten funktionellen Antagonisten zum AT₁-Rezeptor, oder besser – zum Ang-II-Effektor-Rezeptor, handeln würde? Das heißt, dass die Expressionssteigerung von AT₂ nur durch eine gesteigerte AT₁-Rezeptoraktivierung provoziert werden würde, um an dieser Stelle ein funktionelles Gegengewicht zu erzeugen? Sollte diese These zutreffen, und, entsprechend der obigen Überlegungen, der AT_{1A}-Rezeptor als der Effektor-Rezeptor von Ang II fungieren, dürfte der AT₂-Rezeptor gar nicht hochreguliert werden, weil die Aktivität des AT_{1A}-Rezeptors nicht gesteigert ist. Im Gegenteil – im Laufe des pathologischen Prozesses wird sie gehemmt, sodass die simultane Herunterregulierung des funktionellen Gegenspielers – AT₂-Rezeptor – als plausibel erscheint. Bei genauer Betrachtung sprechen dafür auch die Feinheiten des temporären Verlaufs: zunächst findet bis zum 4. Tag p.i. die Expressionsminderung von AT_{1A} statt, während die Herunterregulierung von AT₂ etwas verspätet einsetzt, als ob es auf den AT_{1A}-Verlauf erst reagieren müsste. Erst am 7. Tag p.i. erreicht die AT₂-Rezeptor-Expression die niedrigsten Werte und gleicht sich im chronischen Stadium, wie auch AT_{1A}, den Ausgangswerten an.

Zur Klärung der spezifischen AT₂-Rezeptor-Funktion bei viraler Myokarditis sind allerdings weitergehende Untersuchungen notwendig. Von besonderem Interesse wäre die Stimulation der kardialen AT₂-Expression bei gleichzeitiger Registrierung des Erkrankungsverlaufes.

5.7.4 Optionen zur Beeinflussung des kardialen RAAS in der viralen Myokarditis

Zusammenfassend erscheinen nach der oben durchgeführten Analyse der AT_{1A}-Rezeptor als der Effektor-Rezeptor von Ang II, der AT₂-Rezeptor als direkter AT_{1A}-Modulator und der AT_{1B}-Rezeptor als protektiver Kompensator der gesamten Ang-II-Wirkungen im Laufe des kardialen pathologischen Prozesses zu fungieren.

Eine therapeutische Beeinflussung des kardialen RAAS kann auf jeder Stufe der RAAS-Kaskade (s. Abb. 2.16) vorgenommen werden: In erster Linie handelt es sich um die Verhinderung der Angiotensin-II-Bildung. Die Unterbrechung der katalytischen Reaktion von Angiotensinogen zu Ang I kann durch Renin-Inhibitoren (z.B. Aliskiren), aber auch durch Cathepsin-Antagonisten (Epoxybernsteinsäurederivate, Serinprotease-Inhibitoren – z.B. Ser-

pin B4) erfolgen. Die letzteren hemmen außerdem die direkte Umwandlung von Angiotensinogen zu Ang II und von Ang I zu Ang II. Die heute weit verbreiteten ACE-Hemmer (z.B. Captopril, Enalapril) unterbrechen die Proteolyse von Ang I zu Ang II. Einige Studien postulieren, dass die klinische Wirksamkeit der ACE-Hemmer, aber auch die der Ang-II-Rezeptor-Antagonisten³¹⁸, auf der Hemmung der NADPH-Oxidase beruhen. So konnte in Mäusen ein Ang-II-induzierter Bluthochdruck durch die Deletion des NOX1-Gens gesenkt werden⁴⁹¹. Die besonders für die kardiale Synthese von Ang II aus Ang I bedeutsame Serinprotease Chymase kann durch spezifische Serinprotease-Inhibitoren, Chymostatin und PMSF antagonisiert werden.

Weiterhin könnte die Wirkung von Ang II gehemmt, stimuliert oder anderweitig über spezifische Rezeptoren beeinflusst werden: Klassischerweise werden AT₁-Rezeptor-Antagonisten (Sartane) zur Unterdrückung der Ang-II-Wirkung eingesetzt. Spezifische AT_{1A}- oder AT_{1B}-Blocker sind bislang nicht verfügbar. Wie im Kapitel 5.7.3 bereits erwähnt, wäre ein AT₂-Rezeptor-Agonismus (z.B. mit Compound 21) während viraler Myokarditis zu erforschen. Möglicherweise könnten hier die sonst supprimierten Ang-II-Effekte mit positivem Einfluss auf den Krankheitsverlauf in Erscheinung treten. Ein beschleunigter Ang-II-Abbau könnte durch Stimulation oder Substitution der Aminopeptidase A und Angiotensinase erreicht werden. Die gleichzeitige Hemmung der negativen kardialen Aldosteronwirkungen (Kardiomyozytenhypertrophie, Induktion der ROS-Bildung, inflammatorische Stimuli) könnte einen zusätzlichen spürbaren Nutzen erbringen. Die heute breit eingesetzten Blocker des intrazellulären Aldosteronrezeptors (z.B. Spironolacton, Eplerenon) sind effektive Therapeutika der Herzinsuffizienz, nicht allein durch die diuretische, sondern auch durch die direkte lokal-kardiale Wirksamkeit.

5.8 Quintessenz

Die CVB-3-Infektion der SWR/J-Mäuse hatte in dem von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experiment die Entwicklung einer chronischen Myokarditis mit viraler Persistenz, chronischer Inflammation, Aktivierung des kardialen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und Induktion des oxidativen Stresses zur Folge. Der Einfluss der einzelnen Systeme auf die extrazelluläre Matrix führte zu einer linksventrikulären Dysfunktion mit reduzierter Auswurfraction. Das Gesamtbild der chronischen Erkrankung ähnelte dem einer Dilatativen Kardiomyopathie. Die daran beteiligte Pathogenese beinhaltet die körpereigene Immunantwort auf den chronisch-entzündlichen Prozess und myokardiales Remodeling.

Das Ziel dieser Arbeit war, nicht nur die zeitliche Expressionsdynamik der einzelnen Komponenten im Verlauf der CVB-3-Myokarditis zu erfassen, sondern nach Möglichkeit, auch die komplexen Zusammenhänge der einzelnen Systeme während der viralen Myokarditis darzustellen.

len. Perspektivisch sollen sich aus dieser Arbeit zwei Aspekte ableiten: 1. Entwicklung von streng Zeit- und Stadium-orientierten präzisierten Therapieansätzen bei viral induzierter Myokarditis. 2. Erarbeitung von Kombinationstherapien zur Erfassung nicht nur einer pathogenetischen Komponente, sondern aller wichtigen, an der viralen Myokarditis beteiligten Systeme. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann man deutlich ableiten, dass eine sich nur auf einen Pathomechanismus fixierte Therapie automatisch einen anderen Pathomechanismus vernachlässigt. Dabei können die extern nicht modulierten Systeme auf einem anderen Weg die gleichen, oder sogar noch zusätzliche anderweitige Schäden, analog dem therapeutisch unterdrückten System, verursachen. Abgesehen davon, dass die Pathogenese der Myokarditis noch unzureichend erforscht ist, könnte der dargelegte Sachverhalt die Ursache für eine bis heute fehlende konsequente und effektive Therapie der viralen Myokarditis bedeuten.

Die widersprüchlichen Ergebnisse externer Studien bezüglich der Expression und Funktion einzelner Parameter kommen möglicherweise durch die Nicht-Berücksichtigung der Komplexität und der gegenseitigen Beeinflussung der vielen an der Myokarditis beteiligten Pathomechanismen zustande. Die einzelnen Einflussfaktoren müssen vorher ausgeschaltet oder neutralisiert werden, um die isolierte Wirkung eines Parameters auf den Organismus herauszufiltern, was sich bei der Vielzahl der bereits nachgewiesenen und der noch nicht nachgewiesenen Einflussfaktoren als sehr schwierig erweisen dürfte.

Als Limitation der vorliegenden Arbeit muss darauf hingewiesen werden, dass hier nur Daten zur Genexpression der verschiedenen Systeme eruiert wurden. Somit sind die erhobenen Ergebnisse nicht zwingend auf die Proteinebene zu übertragen. Eine weitere Limitierung der Resultate des dargestellten Versuchsablaufs (s. Kap. 3.1.3) liegt in der Einschränkung der Messungen an nur drei unterschiedlichen Zeitpunkten. Es wird dabei angenommen, dass die Tendenzen der Expressionsraten während des Phasenverlaufs nicht unterbrochen werden. Dass zwischen unseren Messpunkten keine weiteren Expressionsschwankungen stattfanden, kann allerdings nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

6 Zusammenfassung

Unter den Enteroviren gilt der Coxsackievirus-B3 (CVB-3) als einer der hochpathogenen kardiotropen Erreger einer akuten Myokarditis. Die natürliche Folge der Inflammation, der gestörten Zytokin- und Peptidasen-Sekretion ist die Beeinträchtigung der myokardialen extrazellulären Matrix (ECM) und deren Regulationsmechanismen mit myokardialem Remodeling, Umgestaltung der Herzgeometrie, kardialer Dysfunktion und Chronifizierung der Erkrankung. Pathologische ECM-Veränderungen sind nicht nur mit einer relevanten Inflammation und Viruspersistenz assoziiert, sondern auch mit der Induktion des oxidativen Stresses und der Aktivität des lokal-kardialen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Aufgabe dieser Arbeit war die Untersuchung der Aktivität einzelner Einflusssysteme in verschiedenen Myokarditis-Stadien sowie Darstellung von Zusammenhängen zwischen den unterschiedlichen pathogenetischen Mechanismen.

In 6 Wochen alten männlichen SWR/J-Mäusen wurde durch intraperitoneale Injektion von 1×10^5 PFU des CVB-3 (Nancy strain) eine akute virale Myokarditis induziert. Nach der Erfassung hämodynamischer Daten erfolgten die Analysen des Herzgewebes an den Tagen 4, 7 und 28 post infectionem (p.i.) mittels semiquantitativer RT-PCR.

Nach initialer Steigerung des linksventrikulären systolischen Drucks (LVsP) und konstant gebliebener Auswurfraction (EF) in der akuten Myokarditis-Phase (bis zum 4. Tag p.i.), ließ sich in der subakuten und chronischen Phase (4. – 28. Tag p.i.) ein deutlicher LVsP-, EF- und Schlagvolumen-Abfall sowie eine signifikante Zunahme der endsystolischen und enddiastolischen Volumina (ESV, EDV) als Ausdruck einer Herzinsuffizienz beobachten. Das virale Genom wurde am 4. und 7. Tag p.i. zu 100%, am 28. Tag p.i. zu 30% nachgewiesen. Bis in die subakute Phase (0. – 7. Tag p.i.) war die Expressionssteigerung der inflammatorischen Zytokine IL-6 (2,8-fach), IL-10 (2,7-fach) und IFN- γ (2,9-fach) zu verzeichnen; in der chronischen Phase fiel der Expressionslevel ab, blieb jedoch auch noch am 28. Tag p.i. signifikant erhöht. Insgesamt stellte sich eine Prädominanz der T_{H1} -Immunantwort heraus. Dagegen ließ sich bei TGF- β in gesamtem Myokarditis-Verlauf lediglich eine geringgradige Down-Regulation (1,3-fach) am 28. Tag p.i. feststellen. Ihren Expressions-Peak erreichten die Subunits der NADPH-Oxidase p47phox (1,7-fach), p67phox (1,6-fach) und gp91phox (2,4-fach) sowie auch MnSOD (1,9-fach) ebenfalls am 4. Tag p.i., wonach bis zum Tag 28 p.i. eine Expressionsminderung stattfand. Die kardiale Angiotensinogen-Expression erreichte am 7. Tag p.i. ihr Maximum (2,5-fach), ähnlich wie auch die des AT_{1B} -Rezeptors (2,7-fach). Parallel hierzu wurde die Expression von AT_{1A} -Rezeptor (1,8-fach) bis zum 4. Tag p.i. und von AT_2 -Rezeptor (2,0-fach) bis zum 7. Tag p.i. deutlich herunterreguliert. In der chronischen Phase kehrten die Expressionswerte

der RAAS-Faktoren in die Ausgangsbereiche zurück. Zwischen den Einzelkomponenten des RAAS, der oxidativen und inflammatorischen Systeme wurden in den zeitlichen Expressionsverläufen hochsignifikante gleich- und gegensinnige Korrelationen eruiert.

Virale Persistenz, chronisch-induzierte Inflammation, die Wirkung von oxidativen Radikalen und von Angiotensin II auf das Myokard verursachen in der Gesamtheit eine Progression und Chronifizierung der Erkrankung. Dabei ist gerade das hochkomplexe Zusammenspiel der speziellen Systeme und die gegenseitige Beeinflussung der Einzelkomponenten für das myokardiale Remodeling, Übergang in die Dilatative Kardiomyopathie und Therapieresistenz verantwortlich. Insgesamt hat die vorliegende Arbeit deutlich gemacht, dass neue experimentelle und therapeutische Ansätze nur unter der Beachtung der zeitgebundenen Einflüsse einzelner pathogener Systeme und ihrer Komponenten und der gegenseitigen Beeinflussung der einzelnen Pathomechanismen erarbeitet werden sollten (Abb. 6.1).

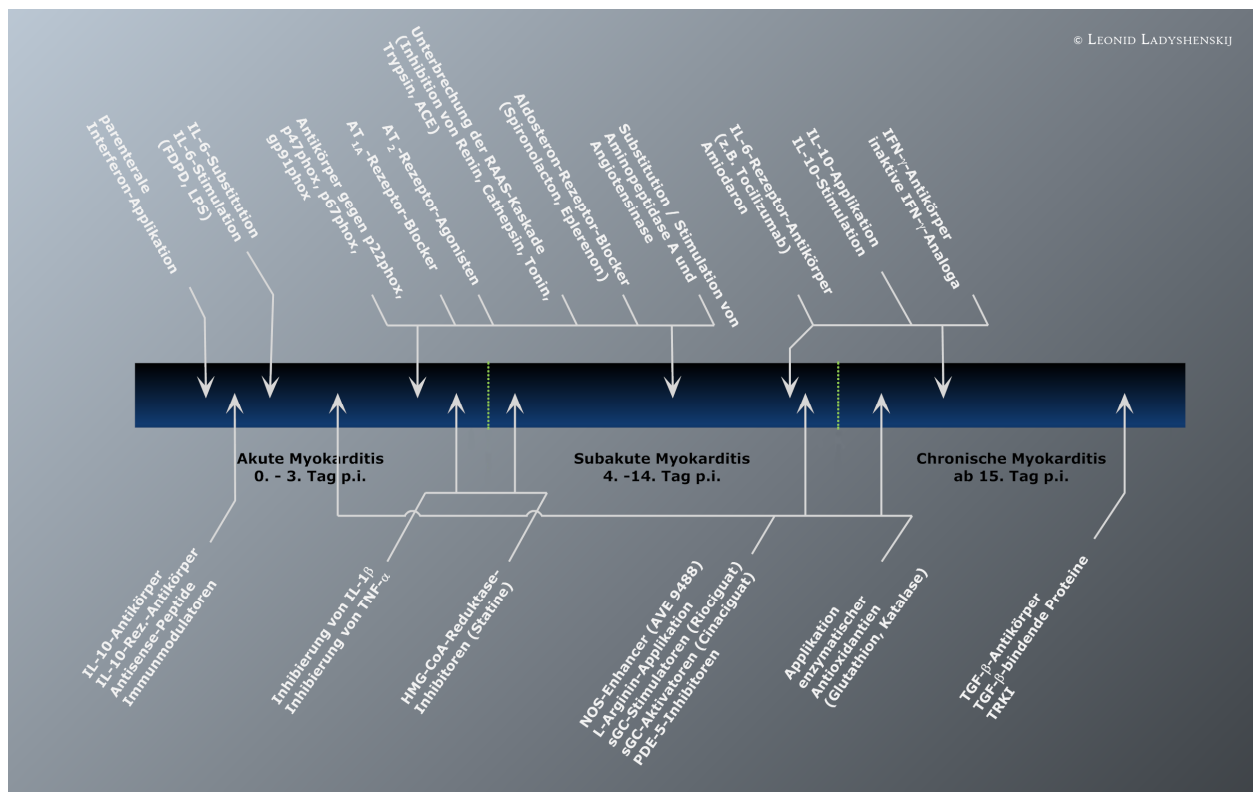


Abb. 6.1 Optionen der medikamentös-therapeutischen Intervention bei experimenteller viraler Myokarditis unter Berücksichtigung der zeitlichen, stadienspezifischen Abfolge.

7 Abkürzungsverzeichnis und chemische Substanzen

ACE	angiotensin converting enzyme (Angiotensin- sinumwandlungsenzym = Kininase II)	Da	Dalton (Molekulargewichtsangabe)
ADMA	asymmetrisches Dimethyl-Arginin	DAF	decay accelerating factor (Zerfall-beschleunigender Faktor = CD55)
ADP	Adenosindiphosphat	DCM	Dilatative Kardiomyopathie
AHA	American Heart Association	DEPC	Diethylpyrocarbonat
AKS	akutes Koronarsyndrom	DEPC-H ₂ O	DEPC-behandeltes Aqua bidest.
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	DMSO	Dimethylsulfoxid
AMV	avian myeloblastosis virus (Vogelmyeloblastenleukämievirus)	DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
Ang	Angiotensin	cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
ANP	atriales natriuretisches Peptid	ssDNA	single stranded DNA (Einzelstrang-DNA)
AP	Aktivierungsprotease	DNase	Desoxyribonuklease
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser	EBV	Epstein-Barr-Virus
ARVC	arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie)	ECM	extracellular matrix (extrazelluläre Matrix)
ASS	Acetylsalicylsäure	EDV	enddiastolisches Ventrikelvolumen
AT-Rezeptor	Angiotensin-Rezeptor	EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (Ethylen-diamintetraessigsäure)
ATP	Adenosintriphosphat	EF	ejection fraction (Auswurfraction)
ATPase	Adenosintriphosphatase	EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
Bcl-2	B-Zell-Leukämie-2-Protein	EMCV	Enzephalomyokarditisvirus
Ca ²⁺	Kalzium-Ion	ERK	extracellular signal-regulated kinase
Ca-ATPase	Kalzium-Adenosintriphosphatase	ESV	endsystolisches Ventrikelvolumen
CAM	cellular adhesion molecule (Zelladhäsionsmolekül)	ET	Endothelin
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor	FAD	Flavinadenindinukleotid
CAT	catalase (Katalase)	FDPD	fibrinogen degradation product D (Fibrinogenabbauprodukt D)
CD	cluster of differentiation (Differenzierungscluster)	bFGF	basic fibroblast growth factor (basischer Fibroblastenwachstumsfaktor)
Cl ₂	molekulares Chlor	sGC	soluble guanylate cyclase (lösliche Guanylatzyklase)
CMV	cytomegalovirus (Zytomegalievirus)	GFR	glomeruläre Filtrationsrate
COX	Cyclooxygenase	GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor)
CRP	C-reaktives Protein	cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CTL	cytotoxic T-lymphocyte (zytotoxischer T-Lymphozyt)	gp	Glykoprotein
CTP	Cytidintriphosphat	GSH-Px	Glutathionperoxidase
CVA	Coxsackievirus A	GTP	Guanosintriphosphat
CVB	Coxsackievirus B		

H ⁺	Wasserstoff-Ion	MgCl ₂	molekulares Magnesiumchlorid
H ₂ O	Wasser-Molekül	MHC	major histocompatibility complex (Histokompatibilitätshauptkomplex)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	MMLV	moloney murine leukaemia virus (Moloney-Maus-Leukämie-Virus)
HCM	Hypertrophische Kardiomyopathie	MMP	Matrixmetalloproteinase
HIV	human immunodeficiency virus (menschliches Immundefizienzvirus)	MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A	mox	mitogen-aktivierte Oxidase
HSP	heat shock induced protein (Hitzeschockprotein)	MPN	myenterisches Plexusneuron
HTLV	human thymic-cell leukemia virus (humanes T-Zell-Leukämievirus)	MPO	Myeloperoxidase
ICAM	intracellular adhesion molecule (intrazelluläres Adhäsionsmolekül)	MS	Microsoft
IFN	Interferon	MT-MMP	membran-type MMP (membranständige MMP)
IGF	insulin-like growth factor (insulinartiger Wachstumsfaktor)	MWW-Test	Mann-Whitney-Wilcoxon-Test
Ig	Immunglobulin	Na ⁺	Natrium-Ion
IL	Interleukin	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
InfCM	Inflammatorische Kardiomyopathie	NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
i.p.	intraperitoneal	NAD ⁺	oxidiertes NAD
IP ₃	Inositoltriphosphat	NADH	reduziertes NAD
ISFC	International Society and Federation of Cardiology	NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (= Nikotinsäureamiddinukleotidphosphat)
JAK	Janus-activating kinase (Januskinase)	NADP ⁺	oxidiertes NADP
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase	NADPH	reduziertes NADP
KCl	Kaliumchlorid	NF-κB	nuclear factor kappa B (Zellkernfaktor kappa B)
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	NGF	nerve growth factor (Nervenwachstumsfaktor)
LDL	low density lipoprotein	NK-Zelle	natürliche Killerzelle
LOX-1	low density lipoprotein oxidized receptor 1	NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
LPO	Lipidperoxid	NO [•]	Nitritoxidradikal
LPS	Lipopolysaccharid	NOS	nitric oxide synthetase (Stickoxidsynthase)
LVedP	left ventricular enddiastolic pressure (linksventrikulärer enddiastolischer Druck)	iNOS	induced nitric oxide synthetase (induzierbare Stickoxidsynthase)
LVNC	linksventrikuläre Non-Compaction	NO _x	nitrogen oxide (Stickstoffoxid)
LVsP	left ventricular systolic pressure (linksventrikulärer systolischer Druck)	Nox	NADPH-Oxidase
MAP	mitogen-aktiviertes Protein	NS	Nervensystem
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase	NSAID	nonsteroidal anti-inflammatory drug (nicht-steroidales Antiphlogistikum)
MCP	monocyte chemoattractant protein (Monozyten-chemotaktisches Protein)	dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat

O ₂	molekularer Sauerstoff	SPSS	statistical package for the social sciences
O ₂ ^{•-}	Superoxidradikal	STAT	signal transducers and activators of transcription
OCl ⁻	Hypochlorit (Chloridooxygenat)	SV	Schlagvolumen
OD	optical density (optische Dichte)	TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
ONOO	Peroxynitrit	TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
PAF	platelet-activating factor (plättchenaktivierender Faktor)	TGF	transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1	T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	TIMP	tissue inhibitor of metalloproteases (Gewebehemmer von Metalloproteinasen)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)	TNF	tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
PDGF	platelet-derived growth factor (thrombozytenabgeleiteter Wachstumsfaktor)	tPa	tissue plasminogen activator (Gewebsplasminaktivator)
PFU	plaque forming unit (plaquebildende Einheit)	TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
PGE	Prostaglandin E	TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
PGF	Prostaglandin F	TRKI	TGF-β receptor kinase inhibitor
pH	potentia hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration)	TTP	Thymidintriphosphat
phox	phagocyte oxidase	UV	ultraviolett
p.i.	post infectionem (nach der Infektion)	VP	virales Protein
PKC	Proteinkinase C	VCAM	vascular cell adhesion molecule (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
PLA ₂	Phospholipase A2	WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid	w/v	Mischungsverhältnis: Gewicht zu Volumen
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor		
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System		
RAS	Renin-Angiotensin-System		
RCM	Restriktive Kardiomyopathie		
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)		
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)		
ssRNA	single stranded RNA (Einzelstrang-RNA)		
RNase	Ribonuklease		
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffverbindung)		
RSNO	S-Nitrosothiole		
RT	reverse Transkriptase		
RT-PCR	reversed transcription PCR		
SCD	sudden cardiac death (plötzlicher Herztod)		
-SH	Thiolgruppe		
SOD	Superoxiddismutase		

8 Lebenslauf

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

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

9 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Leonid Ladyshenskij, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Interaktion zwischen myokardialer Inflammation, Expression von matrixaktiven Substanzen, oxidativem Stress und kardialem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System am Modell der murinen Myokarditis“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und keine sonstigen Hilfsmittel oder Literatur als die angegebenen benutzt wurden.

Berlin, den 25. Januar 2010

Leonid Ladyshenskij.

10 Danksagung

Für die Möglichkeit, am Institut wissenschaftlich arbeiten zu können, danke ich Herrn Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiss.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Pauschinger, der mir das Dissertationsthema überließ und die experimentelle Arbeit in seinem Labor ermöglichte. Prof. Dr. Pauschinger unterstützte mich während des gesamten experimentellen Verlaufs bis zur schriftlichen Verfassung der Dissertation.

Zu einem besonderen Dank bin ich Herrn Prof. Dr. sc. med. G. Linß verpflichtet. Seine freundlichen Hilfestellungen zur Verarbeitung der Ergebnisse und Gestaltung der Dissertationsschrift trugen wesentlich zur endgültigen Fassung der Arbeit bei.

Herr Prof. Dr. med. J. Albes beteiligte sich aktiv und entscheidend an der Vollendung der vorliegenden Dissertation, weswegen ich ihm sehr verbunden bin. Als sehr wichtig empfand ich die durch Prof. Dr. Albes vermittelte kritisch-konstruktive Beurteilung der gesammelten Informationen sowie der abgeleiteten Schlussfolgerungen.

Ein spezieller Dank gilt Herrn Dr. med. Sebastian Leschka für seine ständige Ansprechbarkeit bei auftretenden Fragen und seine unermüdliche Motivation in schwierigen Phasen der Arbeit. Die ständige Bereitschaft von Dr. Leschka zur Problemdiskussion, Hilfeleistung bei praktischen Problemen und Unterstützung während der schriftlichen Verarbeitung waren wesentlich für das Gelingen des Projekts.

Für die freundliche und geduldige Unterstützung in allen theoretischen und praktischen Belangen, ihre Hilfe bei der Auswertung der Messungen, der Darstellung der Ergebnisse und bei der statistischen Beurteilung möchte ich meiner Tutorin Frau Susanne Rutschow, meiner Doktorandenkollegin Frau Anneke Weitz und der wissenschaftlichen MTA Frau Kerstin Puhl vielmals danken.

Weiterhin habe ich Herrn Prof. Dr. med. C. Tschöpe und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe die Durchführung der hämodynamischen Untersuchungen zu verdanken.

Von ganzem Herzen möchte ich den Dank meinen Eltern Anna und Igor für ihre moralische Unterstützung, ständige Bereitschaft zur Steigerung meines Antriebs und wiederholte Weisung auf die Wichtigkeit des Projekts aussprechen. Meinem Großvater Naum, meiner Schwester Florina, Jakov und Natalia habe ich die praktische Unterstützung in schwierigen Zeiten zu verdanken.

Der größte Dank gilt allerdings meiner Frau Elena und meinem Sohn Lior für ihre Geduld und Verständnis in der Zeit der Dissertationsverfassung. Ohne die von diesen beiden Menschen aufgebrachte Motivation und Aufopferung bei gleichzeitigem Verzicht auf so einige Freuden des Lebens, wäre die Fertigstellung dieser Dissertationsarbeit unmöglich gewesen!

11 Literaturquellen

- ¹ Schultheiss HP, Kühl U: **Krankheiten des Myokards: Myokarditiden**. In: Gerok W, Huber C, Meinertz T eds.: **Die Innere Medizin**. Schattauer Verlag (2006): 250-257.
- ² Hufnagel G; Pankuweit S; Portig I et al.: **Akut- und chronisch entzündliche Erkrankungen des Myokards**. *Herzzentrum der Philipps-Universität, Marburg* (2004): online <http://www.uni-marburg.de/herzzentrum/hzb6.htm>
- ³ 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: 1077-1084.
- ⁴ Sauvant G, Bossart W, Kurrer MO et al.: **Diagnose und Verlauf bei Myokarditis: eine Erhebung in den Medizinischen Kliniken des Universitätsspitals Zürich im Zeitraum von 1980 bis 1998**. *Schweiz Med Wochenschr* (2000) 130: 1265-1271.
- ⁵ Kienast W, Häusler H-J: **Leitlinien zur Diagnostik und Therapie in der Pädiatrischen Kardiologie: Myokarditis**. *Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie* (2009) *AWMF online (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften)*:online <http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/II/023-025.htm>
- ⁶ Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A et al.: **A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis**. *N Engl J Med* (1995) 333: 269-275.
- ⁷ Cooper LT, Berry GJ, Shabetai R: **Idiopathic giant-cell myocarditis: natural history and treatment**. *N Engl J Med* (1997) 336: 1860-1866.
- ⁸ D'Ambrosio A, Patti G, Manzoli A et al.: **The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review**. *Heart* (2001) 85: 499-504.
- ⁹ McCarthy RE, Boehmer JP, Hruban RH et al.: **Long-term outcome of fulminant myocarditis as compared with acute (nonfulminant) myocarditis**. *N. Engl. J. Med.* (2000) 342: 690-695.
- ¹⁰ Klingel K, Stephan S, Sauter M et al.: **Pathogenesis of murine enterovirus myocarditis: Virus dissemination and immune cell targets**. *J Virol* (1996) 70: 8888-8895.
- ¹¹ 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: 1807-1816.
- ¹² 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: 841-842.
- ¹³ Andersson B, Caidahl K, Waagstein F: **Idiopathic dilated cardiomyopathy among Swedish patients with congestive heart failure**. *Eur Heart J* (1995)16: 53-60.
- ¹⁴ Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C et al.: **Randomized, Placebo-Controlled Study for Immunosuppressive Treatment of Inflammatory Dilated Cardiomyopathy: Two-Year Follow-Up Results**. *Circulation* (2001) 104: 39-45.
- ¹⁵ Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss HP et al.: **Advances in the immunohistological diagnosis of inflammatory cardiomyopathy**. *Eur Heart J Supplement* (2002) 4: I54-I62.
- ¹⁶ Pauschinger M, Noutsias M, Kühl U et al.: **Antiviral therapy in viral heart disease**. *Herz* (2004) 29: 618-623.
- ¹⁷ Why HJ, Meany BT, Richardson PJ et al.: **Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy**. *Circulation* (1994) 89: 2582-2589.
- ¹⁸ Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R et al.: **Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis**. *Circulation* (2008) 118: 639-648.
- ¹⁹ Fujioka S, Kitaura Y, Ukimura A et al.: **Evaluation of viral infection in the myocardium of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy**. *J Am Coll Cardiol* (2000) 36: 1920-1926.
- ²⁰ Sigusch HH, Reinhardt D, Figulla HR: **Klinisches Bild und Differentialdiagnose von Kardiomyopathie und Myokarditis**. *Med Klin* (1998) 93: 236-239.
- ²¹ Kandolf R, Klingel K, Zell R et al.: **Molecular mechanisms in the pathogenesis of enteroviral heart disease: Acute and persistent infections**. *Clin Immunol Immunopathol* (1993) 68: 1153-1158.
- ²² Maisch B, Pausch R, Hufnagel G et al.: **The neglected role of DNA-viruses in chronic myocarditis and dilated cardiomyopathy**. *Eur Heart J* (1997) 18: 515.

- ²³ Kühl U, Pauschinger M, Schultheiss HP: **Ätiopathogenetische Differenzierung der entzündlichen Kardiomyopathie.** *Internist* (1997) 38: 590-601.
- ²⁴ Corvisart JN: **Essai sur les maladies et les lésions organique du coeur.** *Gates J MMSS* (1812) 182: 299-303.
- ²⁵ Sobernheim JF: **Praktische Diagnostik der inneren Krankheiten mit vorzüglicher Rücksicht auf pathologische Anatomie.** *Hirschwald, Berlin* (1837) 118.
- ²⁶ Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD et al.: **Myocarditis. A histopathologic definition and Classification.** *Am J Cardiovasc Pathol* (1987) 1: 3-14.
- ²⁷ Lieberman EB, Hutchins GM, Herskowitz A et al.: **Clinicopathologic description of myocarditis.** *J Am Coll Cardiol* (1991) 18: 1617-1626.
- ²⁸ Chapman NM, Tramcy S, Gauntt CJ et al.: **Molecular detection and identification of enterovirus using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization.** *J Clin Microbiol* (1990) 9: 843-850.
- ²⁹ Tracy S, Hufnagel G, Chapman N: **Interesting problems in enteroviral inflammatory heart disease.** *Herz* (1992) 17: 79-84.
- ³⁰ Bowles NE, Richardson PJ, Olsen EG et al.: **Detection of Coxsackie B virus RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy.** *Lancet* (1986) 1: 1120-1123.
- ³¹ Archard LC, Khan MA, Soteriou BA et al. **Characterization of Coxsackie B virus RNA in myocardium from patients with dilated cardiomyopathy by nucleotide sequencing of reverse transcription-nested polymerase chain reaction products.** *Hum Pathol* (1998) 29: 578-584.
- ³² 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: 466-472.
- ³³ Pauschinger M, Kühl U, Doerner A et al.: **Nachweis enteroviraler RNA in endomyokardialen Biopsien bei inflammatorischer Kardiomyopathie und idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie.** *Z Kardiol* (1998) 87: 443-52.
- ³⁴ Baboonian C, Treasure T: **Meta-analysis of the association of enteroviruses with human disease.** *Heart* (1997) 78: 539-543.
- ³⁵ Pauschinger M, Doerner A, Fuentes-Garcia FJ et al.: **Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis.** *Circulation* (1999) 99: 889-895.
- ³⁶ Pauschinger M, Bowles NE, Fuentes-Garcia FJ et al.: **Detection of adenoviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis.** *Circulation* (1999) 99:1348-1354.
- ³⁷ Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F et al.: **Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders.** *Circulation* (2003) 107: 857-863.
- ³⁸ Kühl 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: 887-893.
- ³⁹ Klingel K, Selinka HC, Sauter M et al.: **Molecular mechanisms in enterovirus and parvovirus B19 myocarditis and inflammatory cardiomyopathy.** *Eur Heart J* (2002) 4: 8-12.
- ⁴⁰ Pankuweit S, Ruppert V, Eckhardt H et al.: **Pathophysiology and aetiological diagnosis of inflammatory myocardial diseases with a special focus on parvovirus B19.** *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* (2005) 52: 344-347.
- ⁴¹ Gowrishankar K, Rajajee S: **Varied manifestations of viral myocarditis.** *Indian J Pediatr* (1994) 61: 75-78.
- ⁴² Salvi A, Dreas L, Di Lenarda A et al: **Clinical presentation and evolution in treated and untreated myocarditis.** In: Baroldi G, Camerini F, Goodwin JF eds.: **Advances in Cardiomyopathies.** *Springer Verlag, Berlin* (1990) 316-24.
- ⁴³ Baboonian C, Davies MJ, Booth JC et al.: **Coxsackie B viruses and human heart disease.** *Curr Top Microbiol Immunol* (1997) 223: 31-52.
- ⁴⁴ Joy J, Rao YY, Raveendranath M et al.: **Coxsackie viral myocarditis: A clinical and echocardiographic study.** *Indian Heart J* (1990) 42: 441-444.
- ⁴⁵ Naegeli B: **Myokarditis: Diagnostik und Verlauf.** *Kardiovaskuläre Medizin* (2004) 7: 248-257.
- ⁴⁶ Javett SN, Heyman S, Mundel B et al.: **Myocarditis in the newborn infant.** *J Pediatr* (1956) 48: 1-22.
- ⁴⁷ Cambridge G, MacArthur CG, Waterson AP et al.: **Antibodies to Coxsackie B viruses in congestive cardiomyopathy.** *Br Heart J* (1979) 41: 692-696.

- ⁴⁸ Martino TA, Liu P, Sole MJ: **Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy.** *Circ Res* (1994) 74: 182-188.
- ⁴⁹ Gifford R, Dalldorf G: **The morbid anatomy of experimental coxsackie virus infection.** *Am J Pathol* (1951) 27: 1047-1064.
- ⁵⁰ Wilson F, Miranda Q, Chason J et al.: **Residual pathologic changes following murine Coxsackie A and B myocarditis.** *Am J Pathol* (1969) 55: 253-265.
- ⁵¹ Herskowitz A, Wolfgram LJ, Rose NR et al.: **Coxsackie B3 murine myocarditis: A pathologic spectrum of myocarditis in genetically defined inbred strains.** *J Am Coll Cardiol* (1987) 9: 1311-1319.
- ⁵² Morita H: **Experimental coxsackie B3 virus myocarditis in golden hamsters. Light and electron microscopy findings in a long-term follow-up study.** *Jpn Circ J* (1981) 45: 713.
- ⁵³ Abelmann WH, Adesanya CO, Goldberg WP et al.: **Depressed myocardial function in subacute experimental virus myocarditis.** In: Fleckenstein A, Rona G eds.: **Pathophysiology and Morphology of Myocardial Cell Alteration.** University Park Press, Baltimore, USA (1975): 535-542.
- ⁵⁴ Melnick JL: **Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses.** In: Fields BN eds.: **Virology.** Raven Press, New York, USA (1990): 549-605.
- ⁵⁵ Liu PP, Opavsky MA: **Viral myocarditis: receptors that bridge the cardiovascular with the immune system?** *Circ Res* (2000) 86: 253-254.
- ⁵⁶ Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G et al.: **Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5.** *Science* (1997) 275: 1320-1323.
- ⁵⁷ Kovalenko VN: **Myocarditis and dilated cardiomyopathy: Problems of diagnostics and treatment.** *Ukrainian J Cardiol* (2004): 35-40.
- ⁵⁸ Clements GB: **Characteristics of viruses inducing cardiac disease.** In: Banatvala JE eds.: **Viral infections in the heart.** Edward Arnold, London, UK (1993): 1-22.
- ⁵⁹ Huber SA: **Experimental studies Part 1: Animal models: immunological aspects.** In: Banatvala JE eds.: **Viral infections in the heart.** Edward Arnold, London, UK (1993): 82-109.
- ⁶⁰ Rueckert RR, Fields BN, Minor I eds.: **Picornaviridae: The viruses and their replication.** *Virology*, Lippincott-Raven, Philadelphia (1990): 609-654.
- ⁶¹ Kandolf R: **Enterovirale Myokarditis und dilatative Kardiomyopathie.** *Med Klin* (1998) 93: 215-222.
- ⁶² El-Hagrassy MM, Banatvala JE, Coltart DJ: **Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in patients with cardiac and other diseases.** *Lancet* (1980) 2: 1160-1162.
- ⁶³ Muckelbauer JK, Kremer M, Minor I et al.: **The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 angstrom resolution.** *Structure* (1995) 3: 653-667.
- ⁶⁴ Bultmann BD, Klingel K, Sotlar K et al.: **Parvovirus B19: a pathogen responsible for more than hematologic disorders.** *Virchows Arch* (2003) 442: 8-17.
- ⁶⁵ Kühl U, Pauschinger M, Bock T et al.: **Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction.** *Circulation* (2003) 108: 945-950.
- ⁶⁶ Poller W, Fechner H, Noutsias M et al.: **Highly variable expression of virus receptors in the human cardiovascular system Implications for cardiotropic viral infections and gene therapy.** *Z Kardiol* (2002) 91: 978-991.
- ⁶⁷ Noutsias M, Fechner H, de Jonge H et al.: **Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections.** *Circulation* (2001) 104: 275-280.
- ⁶⁸ Ito M, Kodama M, Masuko M, et al.: **Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis.** *Circ Res* (2000) 86: 275-280.
- ⁶⁹ Fechner, H., Noutsias, M., Tschoepe et al.: **Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism.** *Circulation* (2003) 107: 876-882.
- ⁷⁰ Bowles NE, Javier Fuentes-Garcia F et al.: **Analysis of the coxsackievirus B-adenovirus receptor gene in patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy.** *Mol Genet Metab* (2002) 77: 257-259.
- ⁷¹ Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP et al.: **Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy.** *Circulation* (1999) 99: 2124-2131.

- ⁷² Vallbracht KB, Schwimmbeck PL, Seeberg B et al.: **Endothelial dysfunction of peripheral arteries in patients with immunohistologically confirmed myocardial inflammation correlates with endothelial expression of human leukocyte antigens and adhesion molecules in myocardial biopsies.** *J Am Coll Cardiol* (2002) 40:515-20
- ⁷³ Badorff C, Lee GH, Lamphear BJ et al.: **Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy.** *Nat Med* (1999) 5: 320-326.
- ⁷⁴ Herzum M, Weller R, Jomaa H et al.: **Left ventricular hemodynamic parameters in the course of acute experimental coxsackievirus B3 myocarditis.** *J Mol Cell Cardiol* (1995) 27:1573-1580.
- ⁷⁵ Klingel K, Hohenadl C, Canu A et al.: **Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation.** *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89: 314-318.
- ⁷⁶ 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.
- ⁷⁷ Carthy CM, Granville DJ, Watson KA et al.: **Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells.** *J Virol* (1998) 72: 7669-7675.
- ⁷⁸ Henke A, Launhardt H, Klement K et al.: **Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva.** *J Virol* (2000) 74: 4284-4290.
- ⁷⁹ Badorff C, Noutsias M, Kühl U et al.: **Cell-mediated cytotoxicity in hearts with dilated cardiomyopathy: correlation with interstitial fibrosis and foci of activated T lymphocytes.** *J Am Coll Cardiol* (1997) 27: 429-434.
- ⁸⁰ Wessely R, Henke A, Zell R et al.: **Low-level expression of a mutant coxsackieviral cDNA induces a myocytotoxic effect in culture: an approach to the study of enteroviral persistence in cardiac myocytes.** *Circulation* (1998) 98: 450-457.
- ⁸¹ Noutsias M, Pauschinger M, Schultheiss HP et al.: **Cytotoxic perforin+ and TIA-1+ infiltrates are associated with cell adhesion molecule expression in dilated cardiomyopathy.** *Eur J Heart Fail* (2003) 5: 469-479.
- ⁸² Hufnagel G, Pankuweit S, Maisch B: **Therapy of dilated cardiomyopathies with and without inflammation.** *Med Klin* (1998) 93: 240-251.
- ⁸³ Rose NR, Herskowitz A, Neumann DA: **Autoimmunity in myocarditis: Models and mechanisms.** *Clin Immunol Immunopathol* (1993) 68: 95-99.
- ⁸⁴ Schwimmbeck P, Badorff C, Rohn G et al.: **The role of sensitized T-cells in myocarditis and dilated cardiomyopathy.** *Int Journal of Cardiology* (1996) 54: 117-125.
- ⁸⁵ Herzum M, Maisch B: **Humoral and cellular immune reactions to the myocardium in myocarditis.** *Herz* (1992) 17: 91-97.
- ⁸⁶ Li Y, Bourlet T, Andreoletti L et al.: **Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy.** *Circulation* (2000) 101: 231-234.
- ⁸⁷ Liu PP, Mason JW: **Advances in the understanding of myocarditis.** *Circulation* (2001) 104: 1076-1082.
- ⁸⁸ Gauntt CJ, Higdon AL, Arizpe HM et al.: **Epitopes shared between coxsackievirus B3 (CVB3) and normal heart tissue contribute to CVB3-induced murine myocarditis.** *Clin Immunol Immunopathol* (1993) 68: 129-134.
- ⁸⁹ Carlquist JF, Menlove RL, Murray MB et al.: **HLA class II (DR and DQ) antigen associations in idiopathic dilated cardiomyopathy. Validation study and meta-analysis of published HLA association studies.** *Circulation* (1991) 83: 515-522.
- ⁹⁰ Oldstone MBA, Dryberg T, Fujinami R: **Mimicry by virus of host molecules – Implications for autoimmune disease.** *Prog Immunol* (1986): 787-795.
- ⁹¹ Lawson CM: **Evidence for mimicry by viral antigens in animal models of autoimmune disease including myocarditis.** *Cell Mol Life Sci* (2000) 57: 552-560.
- ⁹² Herskowitz A, Ahmed-Ansari A, Neumann DA et al.: **Induction of major histocompatibility complex antigens within the myocardium of patients with active myocarditis: a nonhistologic marker of myocarditis.** *J Mol Cell Cardiol* (1990) 15: 624-632.
- ⁹³ Seko Y, Yamazaki T, Shinkai Y et al.: **Cellular and molecular bases for the immunopathology of the myocardial cell damage involved in acute viral myocarditis with special reference to dilated cardiomyopathy.** *Jpn Circ J* (1992) 56: 1062-1072.
- ⁹⁴ Zimin YI, Sumarokov AV, Tereshchenko SE: **Immune cytotoxic mechanism of myocardial lesion in non-specific Myocarditis and idiopathic dilated cardiomyopathy.** *Cor Vasa* (1988) 30: 127-134.

- ⁹⁵ Cafario AL, Mahon NJ, McKenna WJ: **Cardiac autoantibodies to myosin and other heart-specific autoantigens in myocarditis and dilated cardiomyopathy.** *Autoimmunity* (2001) 34: 199-204.
- ⁹⁶ Dec GW, Palacios I, Yasuda T et al.: **Antimyosin antibody cardiac imaging: its role in the diagnosis of myocarditis.** *J Am Coll Cardiol* (1990) 16: 97-104.
- ⁹⁷ Lauer B, Schannwell M, Kühl U et al.: **Antimyosin autoantibodies are associated with deterioration of systolic and diastolic left ventricular function in patients with chronic myocarditis.** *J Am Coll Cardiol* (2000) 35: 11-18.
- ⁹⁸ Wolf PG, Kühl U, Schultheiss HP: **Laminin distribution and autoantibodies to laminin in dilated cardiomyopathy and myocarditis.** *Am Heart J* (1989) 117: 1303-1309.
- ⁹⁹ Maisch B, Weyerer O, Hufnagl G et al.: **The vascular endothelium as target of humoral autoreactivity in myocarditis and rejection.** *Z Kardiol* (1989) 78: 95-99.
- ¹⁰⁰ Maisch B, Outzen H, Roth D et al.: **Prognostic determinants in conventionally treated myocarditis and perimyocarditis – focus on antimyolemmal antibodies.** *Eur Heart J* (1991) 12: 81-87.
- ¹⁰¹ Schultheiss HP: **The mitochondrion as antigen in inflammatory heart disease.** *Eur Heart J* (1987) 8: 203-210.
- ¹⁰² Schultheiss HP: **Dysfunction of the ADP/ATP carrier as a causative factor for the disturbance of the myocardial energy metabolism in dilated cardiomyopathy.** *Basic Res Cardiol* (1992) 87: 311-320.
- ¹⁰³ Jahns R, Boivin V, Siegmund C et al.: **Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure.** *Circulation* (1999) 99: 649-654.
- ¹⁰⁴ Dorner A, Schulze K, Rauch U et al.: **Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy.** *Mol Cell Biochem* (1997) 174: 261-269.
- ¹⁰⁵ Wallukat G, Morwinski M, Kowal K et al.: **Autoantibodies against the beta-adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: beta-adrenergic agonism without desensitization.** *Eur Heart J* (1991) 12: 178-181.
- ¹⁰⁶ Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC et al.: **Immunomodulatory treatment strategies in inflammatory cardiomyopathy: current status and future perspectives.** *Expert Rev Cardiovasc Ther* (2004) 2: 37-51.
- ¹⁰⁷ Schulze K, Becker BF, Schauer R et al.: **Antibodies to ADP-ATP carrier – an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy – impair cardiac function.** *Circulation* (1990) 81: 959-969.
- ¹⁰⁸ Warraich RS, Noutsias M, Kazak I et al.: **Immunoglobulin G3 cardiac myosin autoantibodies correlate with left ventricular dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy: immunoglobulin G3 and clinical correlates.** *Am Heart J* (2002) 143: 1076-1084.
- ¹⁰⁹ Maisch B, Ristic AD, Hufnagel G et al.: **Pathophysiology of viral myocarditis: the role of humoral immune response.** *Cardiovasc Pathol* (2002) 11: 112-122.
- ¹¹⁰ Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S et al.: **Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio.** *Circulation* (1999) 99: 2750-2756.
- ¹¹¹ Matsumori A: **Cytokines in myocarditis and cardiomyopathies.** *Curr Opin Cardiol* (1996) 11: 302-309.
- ¹¹² Hunter JJ, Chien KR: **Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure.** *N Engl J Med* (1999) 341: 1276-1283.
- ¹¹³ Li J, Schwimmbeck PL, Tschöpe C, et al.: **Collagen degradation in a murine myocarditis model: relevance of matrix metalloproteinase in association with inflammatory induction.** *Cardiovasc Res* (2002) 56: 235-247.
- ¹¹⁴ Uyttenhove C, Coulie PG, van Snick J: **T-Cell Growth and Differentiation induced by Interleukin-HP1 / IL-6, The Murine Hybridoma / Plasmocytoma Growth Factor.** *J Exp Med* (1988) 167: 1417-1427.
- ¹¹⁵ Furukawa Y, Kobuke K, Matsumori A: **Role of cytokines in autoimmune myocarditis and cardiomyopathy.** *Autoimmunity* (2001) 34: 165-168.
- ¹¹⁶ Hirano T, Akira S, Taga T et al.: **Biological and clinical aspects of Interleukin-6.** *Immunol Today* (1990) 11: 443-448.
- ¹¹⁷ Kawai C: **From myocarditis to cardiomyopathy: Mechanisms of inflammation and cell death. Learning from the past to the future.** *Circulation* (1999) 96: 3549-3554.
- ¹¹⁸ McKenna CJ, Codd MB, McCann HA et al.: **Idiopathic dilated cardiomyopathy: familial prevalence and HLA distribution.** *Heart* (1997) 77:549-552.
- ¹¹⁹ Rose NR, Hill S: **The pathogenesis of postinfectious myocarditis.** *Clin Immunol Immunopathol* (1996) 80: 92-9
- ¹²⁰ Feldman AM, McNamara DM: **Myocarditis.** *N Engl J Med* (2000) 343: 1388-1398.

- ¹²¹ Herzum M, Ruppert V, Kuytz B et al.: **Coxsackievirus B3 infection leads to cell death of cardiac myocytes.** *J Mol Cell Cardiol* (1994) 26: 907-913.
- ¹²² 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) 68:159-169.
- ¹²³ Shioi T, Matsumori A, Sasayama S: **Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice.** *Circulation* (1996) 94: 2930-2937.
- ¹²⁴ Matsumori A: **Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cardiomyopathy: role of viruses, cytokines and nitric oxide.** *Jpn Circ J* (1997) 61: 275-291.
- ¹²⁵ 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) 84:788-795.
- ¹²⁶ Maisch B, Portig I, Ristic A et al.: **Definition of inflammatory cardiomyopathy (myocarditis): on the way to consensus. A status report.** *Herz* (2000) 25: 200-209.
- ¹²⁷ Godeny EK, Gauntt CJ: **Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3 viral-induced myocarditis.** *J Immunol* (1986) 137: 1695-1702.
- ¹²⁸ Godeny EK, Gauntt CJ: **Interferon and natural killer cell activity in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis.** *Eur Heart J* (1987) 8: 433-435.
- ¹²⁹ Godeny EK, Gauntt CJ: **Murine natural killer cells limit coxsackie virus B3 replication.** *J Immunol* (1987) 139: 913-918.
- ¹³⁰ Seko Y, Ahinkai Y, Kawasaki A et al.: **Evidence of perforin-mediated cardiac myocyte injury in acute murine myocarditis caused by coxsackie virus B3.** *J Pathol* (1993) 170: 53-58.
- ¹³¹ Lodge PA, Herzum M, Olszewski J et al.: **Coxsackievirus B3 myocarditis. Acute and chronic forms of the disease caused by different immunopathogenic mechanisms.** *Am J Pathol* (1987) 128: 455-463.
- ¹³² Henke A, Mohr C, Sprenger H et al.: **Coxsackievirus B3-induced production of tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 in human monocytes.** *J Immunol* (1992) 148: 2270-2277.
- ¹³³ 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: 105-108.
- ¹³⁴ Schmidtke M, Glück B, Merkle I et al.: **Cytokine profiles in heart, spleen, and thymus during the acute stage of experimental coxsackievirus B3-induced chronic myocarditis.** *J Med Virol* (2000) 61: 518-526.
- ¹³⁵ 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) 69: 360-367.
- ¹³⁶ Seko Y, Matsuda H, Kato K et al.: **Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3.** *J Clin Invest* (1993) 91: 1327-1336.
- ¹³⁷ Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A et al.: **Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice.** *J Am Coll Cardiol* (1986) 7: 868-872.
- ¹³⁸ Woodruff JF: **Viral myocarditis: A review.** *Am J Pathol* (1980) 101: 427-464.
- ¹³⁹ Kawai C, Takatsu T: **Clinical and experimental studies on cardiomyopathy.** *N Engl J Med* (1975) 293: 592-97.
- ¹⁴⁰ Kishimoto C, Abelmann WH: **Monoclonal antibody therapy for prevention of acute coxsackievirus B3 myocarditis in mice.** *Circulation* (1989) 79: 1300-1308.
- ¹⁴¹ Woodruff JF, Woodruff JJ: **Involvement of T lymphocytes in the pathogenesis of Coxsackie virus B3 heart disease.** *J Immunol* (1974) 113: 1726-1734.
- ¹⁴² Kishimoto C, Kuribayashi K, Masuda T et al.: **Immunologic behavior of lymphocytes in experimental viral myocarditis: Significance of T lymphocytes in the severity of myocarditis and silent myocarditis in BALB/c-nu/nu mice.** *Circulation* (1985) 71: 1247-1254.
- ¹⁴³ Schwimmbeck PL, Huber SA, Schultheiss HP: **The role of T cells in coxsackieB-induced disease.** In: Tracy S, Chapman NM, Mahy BWJ eds.: **The coxsackie B viruses.** Springer Verlag, Berlin (1997): 283-303.
- ¹⁴⁴ Kishimoto C, Kuribayashi K, Fukuma K et al.: **Immunologic identification of lymphocyte subsets in experimental murine myocarditis with encephalomyocarditis virus: different kinetics of lymphocyte subsets between the heart and the peripheral blood, and significance of Thy 1.2 + (pan T) and Lyt 1+, 23+ (immature T) subsets in the development of myocarditis.** *Circulation* (1987) 61: 715-725.
- ¹⁴⁵ Huber SA, Lodge PA: **Coxsackievirus B3 myocarditis in BALB/c mice: evidence for autoimmunity to myocyte antigens.** *Am J Pathol* (1984) 116: 21-29.

- ¹⁴⁶ Estrin M, Huber SA: **Coxsackievirus B3 induced myocarditis: Autoimmunity is L3T4 T-helper cell and IL-2 independent in BALB/c mice.** *Am J Pathol* (1987) 127: 335-341.
- ¹⁴⁷ Cronin ME, Love LA, Miller F et al.: **The natural history of encephalomyocarditis virus-induced myositis and myocarditis in mice: viral persistence demonstrated by in situ hybridization.** *J Exp Med* (1988) 168: 1639-1648.
- ¹⁴⁸ Kyu B, Matsumori A, Sato Y et al.: **Cardiac persistence of cardioviral RNA detected by polymerase chain reaction in a murine model of dilated cardiomyopathy.** *Circulation* (1992) 86: 522-530.
- ¹⁴⁹ Wee L, Liu P, Penn L et al.: **Persistence of viral genome into late stage of murine myocarditis detected by polymerase chain reaction.** *Circulation* (1992) 86: 1605-1614.
- ¹⁵⁰ Neu N, Rose NR, Beisel KW et al.: **Cardiac myosin induces myocarditis in genetically predisposed mice.** *J Immunol* (1987) 139: 3630-3636.
- ¹⁵¹ Neu N, Beisel KW, Traystman MD et al.: **Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to coxsackievirus B3 induced myocarditis.** *J Immunol* (1987) 138: 2488-2492.
- ¹⁵² Smith SC, Allen PM: **Myosin-induced acute myocarditis is a T cell mediated disease.** *J Immunol* (1991) 147: 2141-2147.
- ¹⁵³ Cunningham MW, Antone SM, Gulizia JM et al.: **Cytotoxic and viral neutralizing antibodies crossreact with streptococcal M protein, enteroviruses, and human cardiac myosin.** *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89: 1320-4.
- ¹⁵⁴ Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM: **Differential effects of myocarditic variants of coxsackievirus B3 in inbred mice.** *Lab Invest* (1991) 64: 55-64.
- ¹⁵⁵ 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) 62:149-158.
- ¹⁵⁶ 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: 355-360.
- ¹⁵⁷ Lane JR, Neumann DA, Lafond-Walker A et al.: **Interleukin 1 or tumor necrosis factor can promote Coxsackie B3-induced myocarditis in resistant B10.A mice.** *J Exp Med* (1992) 175: 1123-1129.
- ¹⁵⁸ Mason JW: **Viral latency: a link between myocarditis and dilated cardiomyopathy?** *J Mol Cell Cardiol* (2002) 34: 695-698.
- ¹⁵⁹ Fairweather DL, Kaya Z, Shellam G et al.: **From infection to autoimmunity.** *J of Autoimmun* (2001) 16: 175-186.
- ¹⁶⁰ Mosmann TR, Sad S: **The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more.** *Immunol Today* (1996) 17:138-146.
- ¹⁶¹ Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW et al.: **Two types of murine helper T cell clones. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** *J Immunol* (1986) 136: 2348-2357.
- ¹⁶² Nakamura T, Karnogawa Y, Bottomly K et al.: **Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4+ T cells following activation of naive CD4+ T cells.** *J Immunol* (1997) 158: 1085-1094.
- ¹⁶³ Swain SL, Weinberg AD, English M et al.: **IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors.** *J Immunol* (1990) 145: 3796-3806.
- ¹⁶⁴ Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS et al.: **Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by listeria-induced macrophages.** *Science* (1993) 260: 547-549.
- ¹⁶⁵ Sher A, Coffman RL: **Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines.** *Annu Rev Immunol* (1992) 10: 385-409.
- ¹⁶⁶ Abbas AK, Lichtmann AHT, Pober JS: **Cytokines. Cellular and molecular immunology.** 2nd Saunders (1994).
- ¹⁶⁷ Romagnani S: **The Th1/Th2 paradigm.** *Immunol Today* (1997) 18: 263-266.
- ¹⁶⁸ Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG et al.: **Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.** *J Exp Med* (1993) 177: 1199-1204.
- ¹⁶⁹ Parronchi P, De Carli M, Manetti R et al.: **IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones.** *J Immunol* (1992) 149: 2977-83.
- ¹⁷⁰ Maggi E, Parronchi P, Manetti R et al.: **Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones.** *J Immunol* (1992) 148: 2142-2147.

- ¹⁷¹ Lucey DR, Clerici M, Shearer GM: **Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory disease.** *Clin Microbiol Rev* (1996) 9: 532-562.
- ¹⁷² Liles WC, Van Voorhis C: **Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response.** *J Infect Dis* (1995) 172: 1573-1580.
- ¹⁷³ Lenzo JC, Mansfield JP, Sivamoorthy S et al.: **Cytokine expression in murine cytomegalovirus-induced myocarditis: modulation with interferon-alpha therapy.** *Cell Immunol* (2003) 223: 77-86.
- ¹⁷⁴ Okura Y, Takeda K, Honda S et al.: **Recombinant murine interleukin-12 facilitates induction of cardiac myosin-specific helper T cells in rats.** *Circ Res* (1998) 82: 1035-1042.
- ¹⁷⁵ Shioi T, Matsumori A, Nishio R et al.: **Protective role of interleukin-12 in viral myokarditis.** *J Mol Cell Cardiol* (1997) 29: 2327-2334.
- ¹⁷⁶ Huber SA, Kupperman J, Newell MK: **Hormonal regulation of CD4+ T-cell responses in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice.** *J Virol* (1999) 73: 4689-4695.
- ¹⁷⁷ Huber SA, Pfaeffle B: **Differential Th1 and Th2 cell responses in male and female BALB/c mice infected with coxsackievirus Group B Type 3.** *J Virol* (1994) 68: 5126-5132.
- ¹⁷⁸ Afanasyeva M, Wang Y, Kaya Z et al.: **Experimental autoimmune myocarditis in A/J mice is an interleukin-4-dependent disease with a Th2 phenotype.** *Am J Pathol* (2001) 159: 193-203.
- ¹⁷⁹ Seko Y, Takahashi N, Azuma M et al.: **Effects of in vivo administration of anti-B7-1/B7-2 monoclonal antibodies on murine acute myocarditis caused by coxsackievirus B3.** *Circ Res* (1998) 82: 613-618.
- ¹⁸⁰ Fuse K, Kodama M, Ito M et al.: **Polarity of helper T cell subsets represents disease nature and clinical course of experimental autoimmune myocarditis in rats.** *Clin Exp Immunol* (2003) 134: 403-408.
- ¹⁸¹ Long CS: **The Role of Interleukin-1 in the Failing Heart.** *Heart Failure Reviews* (2001) 6: 81-64.
- ¹⁸² Sasayama S, Matsumori A, Kihara Y: **New insights into the pathophysiological role for cytokines in heart failure.** *Cardiovas Res* (1999) 44: 557-564.
- ¹⁸³ Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO: **TH1 and TH2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune disease.** *Immunol Today* (1995) 16: 34-38.
- ¹⁸⁴ Falcone M, Sarvetnick N: **Cytokines that regulate autoimmune responses.** *Curr Opin Immunol* (1999) 11:670-6
- ¹⁸⁵ Walter JP: **How are cytokines activated in heart failure?** *Eur J Heart Failure* (1999) 1: 309-312.
- ¹⁸⁶ Nian M, Lee P, Khaper N et al.: **Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling.** *Circ Res* (2004) 94: 1543-1553.
- ¹⁸⁷ Hühn MH, Hultcrantz M, Lind K et al.: **IFN-gamma production dominates the early human natural killer cell response to Coxsackievirus infection.** *Cell Microbiol* (2008) 10: 426-36.
- ¹⁸⁸ Zaragoza C, Ocampo CJ, Saura M et al.: **Nitric oxide inhibition of coxsackievirus replication in vitro.** *J Clin Invest* (1997) 100: 1760-1767.
- ¹⁸⁹ Costa-Pereira AP, Williams TM, Strobl B et al.: **The antiviral response to gamma interferon.** *J Virol* (2002) 76: 9060-9068.
- ¹⁹⁰ Henke A, Zell R, Martin U et al.: **Direct interferon-gamma-mediated protection caused by a recombinant coxsackievirus B3.** *Virology* (2003) 315: 335-344.
- ¹⁹¹ Horwitz MS, La CA, Fine C, et al.: **Pancreatic expression of interferon-gamma protects mice from lethal coxsackievirus B3 infection and subsequent myocarditis.** *Nat Med* (2000) 6: 693-697.
- ¹⁹² Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL et al.: **Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses.** *Annu Rev Immunol* (2003) 21: 713-758.
- ¹⁹³ Bogdan C: **Nitric oxide and the immune response.** *Nat Immunol* (2001) 2: 907-916.
- ¹⁹⁴ Jarasch N, Martin U, Kamphausen E et al.: **Interferon-gamma-induced activation of nitric oxide-mediated antiviral activity of macrophages caused by a recombinant coxsackievirus B3.** *Viral Immunol* (2005) 18: 355-64
- ¹⁹⁵ Nishii M, Inomata T, Takehana H et al.: **Serum levels of interleukin-10 on admission as a prognostic predictor of human fulminant myocarditis.** *J Am Coll Cardiol* (2004) 44: 1292-1297.
- ¹⁹⁶ Knowlton KU, Yajima T: **Interleukin-10: biomarker or pathologic cytokine in fulminant myocarditis?** *J Am Coll Cardiol* (2004) 44: 1298-1300.

- ¹⁹⁷ Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB et al.: **Production of Transforming growth factor β by human T Lymphocytes and its potential role in the regulation of T-cell growth.** *J Exp Med* (1986) 163: 1037.
- ¹⁹⁸ Zhang X, Giangreco L, Broome HE et al.: **Control of CD4 effector fate: transforming growth factor β 1 and interleukine 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion.** *J Exp Med* (1995) 182: 699.
- ¹⁹⁹ Okura Y, Yamamoto T, Goto S et al.: **Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats.** *J Mol Cell Cardiol* (1997) 29: 491-502.
- ²⁰⁰ Horwitz MS, Knudsen M, Ilic A et al.: **Transforming growth factor-beta inhibits coxsackievirus-mediated autoimmune myocarditis.** *Viral Immunol* (2006) 19: 722-733.
- ²⁰¹ Kuwahara F, Kai H, Tokuda K et al.: **Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats.** *Circulation* (2002) 106: 130-135.
- ²⁰² Yun SH, Shin JO, Lim BK et al.: **Change in the cells that express connective tissue growth factor in acute Coxsackievirus-induced myocardial fibrosis in mouse.** *Virus Res* (2007) 126: 62-68.
- ²⁰³ Hu SY, Wang XD, Tang XS: **The role of apoptosis in herpes simplex virus I type myocarditis of mouse.** *Zhong Yao Cai* (2007) 30: 989-991.
- ²⁰⁴ Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA et al.: **Cardiac myocyte produce Interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions.** *Circulation* (1999) 99: 546-551.
- ²⁰⁵ Ruppert J, Peters JH: **IL-6 and IL-1 enhance the accessory activity of human blood monocytes during differentiation to macrophages.** *J Immunol* (1991) 146: 144-149.
- ²⁰⁶ Van Snick J: **Interleukin-6: an overview.** *Annu Rev Immunol* (1990) 8: 253-278.
- ²⁰⁷ Klausen T, Olsen NV, Poulsen TD et al.: **Hypoxemia increases serum interleukin-6 in humans.** *Eur J Appl Physiol* (1997) 76: 480-482.
- ²⁰⁸ Kukielka GL, Smith CW, Manning AM et al.: **Induction of Interleukin-6 Synthesis in the myocardium.** *Circulation* (1995) 92: 1866-1875.
- ²⁰⁹ Eriksson U, Kurrer MO, Schmitz N et al.: **Interleukin-6-deficient mice resist development of autoimmune myocarditis associated with impaired upregulation of complement C3.** *Circulation* (2003) 107: 320-325.
- ²¹⁰ Kanda T, Takahashi T: **Interleukin-6 and cardiovascular diseases.** *Jpn Heart J* (2004) 45: 183-193.
- ²¹¹ Zhang H, Wang HY, Bassel-Duby R et al.: **Role of interleukin-6 in cardiac inflammation and dysfunction after burn complicated by sepsis.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2007) 292: H2408-2416.
- ²¹² Jung F, Palmer L, Zhou N et al.: **Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes.** *Circ Res* (2000) 86: 319-325.
- ²¹³ Hofmann P, Schmidtke M, Stelzner A et al.: **Suppression of proinflammatory cytokines and induction of IL-10 in human monocytes after coxsackievirus B3 infection.** *J Med Virol* (2001) 64: 487-498.
- ²¹⁴ Damás JK, Aukrust P, Ueland T et al.: **Monocyte chemoattractant protein-1 enhances and interleukin-10 suppresses the production of inflammatory cytokines in adult rat cardiomyocytes.** *Basic Res Cardiol* (2001) 96: 345-352.
- ²¹⁵ Meador BM, Krzyszton CP, Johnson RW et al.: **Effects of IL-10 and age on IL-6, IL-1beta, and TNF-alpha responses in mouse skeletal and cardiac muscle to an acute inflammatory insult.** *J Appl Physiol* (2008) 104:991-7
- ²¹⁶ Constant SL, Bottomly K: **Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches.** *Annu Rev Immunol* (1997) 15: 297-322.
- ²¹⁷ Seghaye MC, Duchateau J, Bruniaux J et al.: **Interleukin-10 release related to cardiopulmonary bypass in infants undergoing cardiac operations.** *J Thorac Cardiovasc Surg* (1996) 111: 545-553.
- ²¹⁸ Henke A, Zell R, Ehrlich G et al.: **Expression of immunoregulatory cytokines by recombinant coxsackievirus B3 variants confers protection against virus-caused myocarditis.** *J Virol* (2001) 75: 8187-8194.
- ²¹⁹ Watanabe K, Nakazawa M, Fuse K et al.: **Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin-10 by electroporation.** *Circulation* (2001) 104: 1098-1100.
- ²²⁰ Kaya Z, Dohmen KM, Wang Y et al.: **Cutting edge: a critical role for IL-10 in induction of nasal tolerance in experimental autoimmune myocarditis.** *J Immunol* (2002) 168: 1552-1556.
- ²²¹ Palaniyandi SS, Watanabe K, Ma M et al.: **Inhibition of mast cells by interleukin-10 gene transfer contributes to protection against acute myocarditis in rats.** *Eur J Immunol* (2004) 34: 3508-3515.

- ²²² Stumpf C, Lehner C, Yilmaz A et al: **Decrease of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in patients with advanced chronic heart failure.** *Clinical Science* (2003) 105: 45-50.
- ²²³ Touyz RM, Schiffrin EL: **Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells.** *Pharmacol Rev* (2000) 52: 639-672.
- ²²⁴ Matsumori A: **Treatment Options in Myocarditis.** *Herz* (2007) 32: 452-456.
- ²²⁵ Theuer J, Dechend R, Muller DN et al.: **Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats.** *BMC Cardiovasc Disord* (2002) 2: 3.
- ²²⁶ Bishop JE, Laurent GJ: **Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart.** *Eur Heart J* (1995) 16: 38-44.
- ²²⁷ Boudreau NJ, Jones PL: **Extracellular matrix and integrin signalling : the shape of things to come.** *Biochem J* (1999) 339: 481-488.
- ²²⁸ Aplin AE, Howe AK, Juliano R: **Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth.** *Curr Opin Cell Biol* (1999) 11: 737-744.
- ²²⁹ Tan LB, Jalil J, Pick R et al.: **Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II.** *Circ Res* (1991) 69:1185-95.
- ²³⁰ Weber KT, Pick R, Silver MA et al.: **Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle.** *Circulation* (1990) 82:1387-1401.
- ²³¹ Pauschinger M, Chandrasekharan K, Li J et al.: **Remodeling der extrazellulären Matrix bei dilatativer Kardiomyopathie.** *Herz* (2002) 27: 677-682.
- ²³² Bishop JE, Greenbaum R, Gibson DG et al.: **Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease.** *J Mol Cell Cardiol* (1990) 22: 1157-1165.
- ²³³ Pickering JG, Boughner DR: **Fibrosis in the transplanted heart and its relation to donor ischemic time. Assessment with polarized light microscopy and digital image analysis.** *Circulation* (1990) 81: 949-958.
- ²³⁴ Schaper J, Speiser B: **The extracellular matrix in the failing human heart.** *Basic Res in Cardiol* (1992) 87:303-9
- ²³⁵ Yoshikane H, Honda M, Goto Y et al.: **Collagen in dilated cardiomyopathy-scanning electron microscopic and immunohistochemical observations.** *Jpn Circ J* (1992) 56: 899-910.
- ²³⁶ Li YY, McTiernan CF, Feldman AM: **Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling.** *Cardiovasc Res* (2000) 46: 214-224.
- ²³⁷ Weil J, Schunkert H: **Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz;** *Clin Res Cardiol* (2006) 95: 1-17.
- ²³⁸ Saraste A, Piikki K, Kallajoki M et al.: **Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation.** *Eur J Clin Invest* (1999) 29: 380-386.
- ²³⁹ Takano H, Hasegawa H, Nagai T et al.: **Implication of Cardiac Remodeling in Heart Failure: Mechanism and Therapeutic Strategies.** *Intern Med* (2003) 42: 465-469.
- ²⁴⁰ Kempf T, Drexler H, Wollert KC: **Pathophysiologie der Herzinsuffizienz.** *Internist* (2007) 48: 899-908.
- ²⁴¹ Weber KT: **Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network.** *J Am Coll Cardiol* (1986) 13: 1637-1652.
- ²⁴² Weber KT, Janicki JS, Shroff SG et al.: **Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied non-human primate myocardium.** *Circ Res* (1988) 62: 757-765.
- ²⁴³ Maisch B, Rupp H: **Myokardfibrose: ein kardiopathophysiologischer Januskopf.** *Herz* (2006) 31: 260-268.
- ²⁴⁴ Pelouch V, Dixon IM, Golfman L et al.: **Role of extracellular matrix proteins in heart function.** *Mol Cell Biochem* (1993) 129: 101-120.
- ²⁴⁵ Kishimoto C, Kitazawa M, Hiraoka Y et al.: **Extracellular matrix remodeling in coxsackievirus B3 myocarditis.** *Clin Immunol Immunopathol* (1997) 85: 47-55.
- ²⁴⁶ Mendes LA, Picard MH, Dec GW et al.: **Ventricular remodeling in active myocarditis. Myocarditis Treatment Trial.** *Am Heart J* (1999) 138: 303-308.
- ²⁴⁷ Marjjanowski MMH, Teeling P, Mann J et al.: **Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the Type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment.** *J Am Coll Cardiol* (1992) 25: 1263-1272.
- ²⁴⁸ Gunja-Smith Z, Morales A, Romanelli R et al.: **Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy. Role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links.** *Am J Pathol* (1996) 148: 1639-1645.

- ²⁴⁹ Li YY, Feng Y, McTiernan CF et al.: **Downregulation of matrix metalloproteinases and reduction in collagen damage in the failing human heart after support with left ventricular assist devices.** *Circulation* (2001) 104: 1147-1152.
- ²⁵⁰ Pauschinger M, Doerner A, Remppis A et al.: **Differential myocardial abundance of collagen type I and type III mRNA in dilated cardiomyopathy: effects of myocardial inflammation.** *Cardiovasc Res* (1998) 37: 123-129.
- ²⁵¹ Woessner JF Jr.: **Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.** *FASEB J* (1991) 5: 2145-2154.
- ²⁵² DeClerck YA, Yean TD, Lu HS et al.: **Inhibition of autoproteolytic activation of interstitial procollagenase by recombinant metalloproteinase inhibitor MI/TIMP-2.** *J Biol Chem* (1991) 266: 3893-3899.
- ²⁵³ Ward RV, Hembry RM, Reynolds JJ et al.: **The purification of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 from its 72 kDa progelatinase complex. Demonstration of the biochemical similarities of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1.** *Biochem J* (1991) 278: 179-187.
- ²⁵⁴ Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B et al.: **Biochemical characterization of human collagenase-3.** *J Biol Chem* (1996) 271: 1544-1550.
- ²⁵⁵ Murphy G, Nguyen Q, Cockett MI et al.: **Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant.** *J Biol Chem* (1994) 269: 6632-6636.
- ²⁵⁶ He CS, Wilhelm SM, Pentland AP et al.: **Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase.** *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86: 2632-2636.
- ²⁵⁷ Murphy G, Allan JA, Willenbrock F et al.: **The role of the C-terminal domain in collagenase and stromelysin specificity.** *J Biol Chem* (1992) 267: 9612-9618.
- ²⁵⁸ Sato H, Takino T, Okada Y et al.: **A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells.** *Nature* (1994) 370: 61-65.
- ²⁵⁹ Ries C, Petrides PE: **Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease.** *Biol Chem Hoppe Seyler* (1995) 376: 345-355.
- ²⁶⁰ Manabe I, Takayuki S, Nagai R: **Gene Expression in Fibroblasts and Fibrosis: Involvement in Cardiac Hypertrophy.** *Circ Res* (2002) 91: 1103-1113.
- ²⁶¹ Lee RT: **Matrix metalloproteinase inhibition and the prevention of heart failure.** *Trends Cardiovasc Med* (2001) 11: 202-205.
- ²⁶² Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH et al.: **Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice.** *Circulation* (1999) 99: 3063-3070.
- ²⁶³ Asakura M, Kitakaze M, Takashima S et al.: **Cardiac Hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: Metalloproteinase Inhibitors as a new therapy.** *Nat Med* (2002) 8: 35-40.
- ²⁶⁴ Spinale FG, Coker ML, Krombach SR et al.: **Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure: effects on left ventricular dimensions and function.** *Circ Res* (1999) 85: 364-376.
- ²⁶⁵ Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK et al.: **Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro.** *Proc Natl Acad Sci USA* (1986) 83: 4167-4171.
- ²⁶⁶ Roberts AB, Sporn MB: **Transforming growth factor beta.** *Adv Cancer Res* (1988) 51: 107-145.
- ²⁶⁷ Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP et al.: **Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors.** *Circ Res* (1991) 69: 483-490.
- ²⁶⁸ Seeland U, Haeuseler C, Hinrichs R et al.: **Myocardial fibrosis in transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)) transgenic mice is associated with inhibition of interstitial collagenase.** *Eur J Clin Invest* (2002) 32: 295-303.
- ²⁶⁹ Hu CP, Dandapat A, Liu Y et al.: **Blockade of hypoxia-reoxygenation-mediated collagen type I expression and MMP activity by overexpression of TGF-beta1 delivered by AAV in mouse cardiomyocytes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2007) 293: H1833-H1838.
- ²⁷⁰ Dollery CM, McEwan JR, Henney AM: **Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease.** *Circ Res* (1995) 77: 863-868.
- ²⁷¹ Koshy PJ, Lundy CJ, Rowan AD et al.: **The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.** *Arthritis Rheum* (2002) 46: 961-967.

- ²⁷² Scharffetter K, Heckmann M, Hatamochi A et al.: **Synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on collagen synthesis of human skin fibroblasts in vitro.** *Exp Cell Res* (1989) 181: 409-419.
- ²⁷³ Rezzonico R, Burger D, Dayer JM: **Direct contact between T lymphocytes and human dermal fibroblasts or synoviocytes down-regulates types I and III collagen production via cell-associated cytokines.** *J Biol Chem* (1998) 273: 18720-18728.
- ²⁷⁴ McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC Jr et al.: **Regulation of tumor necrosis factor a processing by a metalloproteinase inhibitor.** *Nature* (1994) 370: 558-561.
- ²⁷⁵ Gearing AJH, Beckett P, Christodoulou M et al.: **Processing of tumor necrosis factor a precursor by metalloproteinases.** *Nature* (1994) 370: 555-557.
- ²⁷⁶ Kassiri Z, Oudit GY, Sanchez O et al.: **Combination of tumor necrosis factor-alpha ablation and matrix metalloproteinase inhibition prevents heart failure after pressure overload in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 knock-out mice.** *Circ Res* (2005) 97: 380-390.
- ²⁷⁷ Turner NA, Mughal RS, Warburton P et al.: **Mechanism of TNFalpha-induced IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones.** *Cardiovasc Res* (2007) 76: 81-90.
- ²⁷⁸ Mauviel A: **Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression.** *J Cell Biochem* (1993) 53: 288-295.
- ²⁷⁹ Grimm D, Huber M, Jabusch HC et al.: **Extracellular matrix proteins in cardiac fibroblasts derived from rat hearts with chronic pressure overload: effects of beta-receptor blockade.** *J Mol Cell Cardiol* (2001) 33: 487-501.
- ²⁸⁰ Galboiz Y, Shapiro S, Lahat N et al.: **Modulation of monocytes matrix metalloproteinase-2, MT1-MMP and TIMP-2 by interferon-gamma and -beta: implications to multiple sclerosis.** *J Neuroimmunol* (2002) 131: 191-200.
- ²⁸¹ Leonardi A, Cortivo R, Fregona I et al.: **Effects of Th2 cytokines on expression of collagen, MMP-1, and TIMP-1 in conjunctival fibroblasts.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* (2003) 44: 183-189.
- ²⁸² Silacci P, Dayer JM, Desgeorges A et al.: **Interleukin (IL)-6 and its soluble receptor induce TIMP-1 expression in synoviocytes and chondrocytes, and block IL-1-induced collagenolytic activity.** *J Biol Chem* (1998) 273: 13625-13629.
- ²⁸³ Horio T: **Pathophysiological role of cytokines in heart failure.** *Nippon Rinsho* (2006) 64: 843-847.
- ²⁸⁴ Haugen E, Täng MS, Isic A et al.: **TNFalpha antagonist upregulates interleukin-6 in rats with hypertensive heart failure.** *Int J Cardiol* (2008) 130: 64-68.
- ²⁸⁵ Yu Y, Zhang ZH, Wei SG et al.: **Central gene transfer of interleukin-10 reduces hypothalamic inflammation and evidence of heart failure in rats after myocardial infarction.** *Circ Res* (2007) 101: 304-312.
- ²⁸⁶ Stumpf C, Petzi S, Seybold K et al.: **Atorvastatin enhances interleukin-10 levels and improves cardiac function in rats after acute myocardial infarction.** *Clin Sci (Lond)* (2009) 116: 45-52.
- ²⁸⁷ Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML: **The inflammatory response in myocardial infarction.** *Cardiovasc Res* (2002) 53: 31-47.
- ²⁸⁸ Remme WJ: **Pharmacological Modulation of Cardiovascular Remodeling: A Guide to Heart Failure Therapy.** *Cardiovascular Drugs and Therapy* (2003) 17: 349-360.
- ²⁸⁹ Xie B, Zhou JF, Lu Q et al.: **Oxidative stress in patients with acute coxsackie virus myocarditis.** *Biomed Environ Sci* (2002) 15: 48-57.
- ²⁹⁰ Zhao MH, Fu W, Yuan W et al.: **A study of time window for oxidative stress associated with myocardial ischemia and reperfusion.** *Clin Med J* (1996) 109: 926-929.
- ²⁹¹ Zhong P, Li ZL, Wu HC et al.: **Clinical study of changes of urotensin II in patients with congestive heart failure.** *Di Xi Jun Yi Da Xue Xue Bao* (2003) 23: 121-123.
- ²⁹² Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V et al.: **Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF.** *EMBO J* (1993) 12: 3095-3104.
- ²⁹³ Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B et al.: **Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation.** *J Biol Chem* (1992) 267: 5317-5323.
- ²⁹⁴ Blaustein AS, Schine L, Brooks WW: **Influence of exogenously generated oxidant species on myocardial function.** *Am Journal Physiol* (1986) 250: 595-599.
- ²⁹⁵ Jackson CV, Mickelson JK, Pope TK: **O2 free radical-mediated myocardial and vascular dysfunction.** *Am J Physiol* (1986) 251: 1225-1231.

- ²⁹⁶ Schimke I, Haberland A: **Sauerstoffradikale und Herz-Kreislaufferkrankungen: Pathogenetische Mechanismen, therapeutische Möglichkeiten.** *Z Kardiologie* (1993) 82: 601-609.
- ²⁹⁷ Hiraoka Y, Kishimoto C, Takada H et al.: **Role of oxygen derived free radicals in the pathogenesis of coxsackievirus B3 myocarditis in mice.** *Cardiovasc Res* (1993) 27: 957-961.
- ²⁹⁸ Xi L, Hess ML, Kukreja RC: **Ischemic preconditioning in isolated perfused mouse heart: reduction in infarct size without improvement of postischemic ventricular function.** *Moll Cell Biochem* (1998) 186: 69-77.
- ²⁹⁹ Goldhaber JL, Weiss JN: **Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities.** *Hypertension* (1992) 20: 118-127.
- ³⁰⁰ Nakanishi K, Hamada K, Hara N et al.: **Renal hemodynamic interaction of nitric oxide and angiotensin II.** *Nippon Jinzo Gakki Shi* (1998) 40: 567-572.
- ³⁰¹ Li PF, Dietz R, von Harsdorf R: **Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes by proliferation and expression of transforming growth factor - beta 1 in cardiac fibroblasts.** *FEBS Lett* (1999) 448: 206-210.
- ³⁰² Singal PK, Khaper N, Kumar D et al.: **The role of oxidative stress in the genesis of heart disease.** *Cardiovasc Res* (1998) 40: 426-432.
- ³⁰³ Sokalska M: **Totale antioxidative Kapazität bei am Herzen operierten Kindern.** *Dissertation, RWTH Aachen* (2003).
- ³⁰⁴ Kytö V, Lapatto R, Lakkisto P et al.: **Glutathione depletion and cardiomyocyte apoptosis in viral myocarditis.** *Eur J Clin Invest* (2004) 34: 167-175.
- ³⁰⁵ Glück B, Merkle I, Dornberger G et al.: **Expression of inducible nitric oxide synthase in experimental viral myocarditis.** *Herz* (2000) 25: 255-260.
- ³⁰⁶ Sies H, Stahl W, Klotz LO et al.: **Oxidativer Stress: vom molekularen Mechanismus zur Klinik.** *Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Medizinische Fakultät* (2003): 101-116.
- ³⁰⁷ Badorff C, Fichtlscherer B, Rhoads RE et al.: **Nitric oxide inhibits dystrophin proteolysis by coxsackieviral protease 2A through S-nitrosylation: a protective mechanism against enteroviral cardiomyopathy.** *Circulation* (2000) 102: 2276-2281.
- ³⁰⁸ Shimojo T, Hiroe M, Ishiyama S et al.: **Nitric oxide induces apoptotic death of cardiomyocytes via a cyclic-GMP-dependent pathway.** *Exp Cell Res* (1999) 247: 38-47.
- ³⁰⁹ Moore KW, de Waal MR, Coffman RL et al.: **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.** *Annu Rev Immunol* (2001) 19: 683-765.
- ³¹⁰ Szalay G, Sauter M, Hald J et al.: **Sustained nitric oxide synthesis contributes to immunopathology in ongoing myocarditis attributable to interleukin-10 disorders.** *Am J Pathol* (2006) 169: 2085-2093.
- ³¹¹ Munzel T, Hink U, Heizer T et al.: **Role for NADPH/NADH oxidase in the modulation of vascular tone.** *Ann NY Acad Science* (1999) 874: 386-400.
- ³¹² Suh YA, Arnold RS, Lassegue B et al.: **Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1.** *Nature* (1999) 401: 79-82.
- ³¹³ Curnutte JT, Kuver R, Babior BM: **Activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils.** *J Biol Chem* (1987) 262: 6450-6452.
- ³¹⁴ Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME et al.: **Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II.** *Proc Natl Acad Sci USA* (1997) 94: 14483-14488.
- ³¹⁵ Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD et al.: **Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells.** *Circ Res* (1994) 74: 1141-1148.
- ³¹⁶ Sanchez M, Lodi F, Vera R et al.: **Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta.** *J Nutr* (2007) 137: 910-915.
- ³¹⁷ Yoshida LS, Tsunawaki S: **Expression of NADPH oxidases and enhanced H₂O₂-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor-alpha.** *Int Immunopharmacol* (2008) 8: 1377-1385.
- ³¹⁸ Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T et al.: **Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect.** *Hypertens Res* (2007) 30: 1119-1128.
- ³¹⁹ Shinozaki K, Nishio Y, Ayajiki K et al.: **Pitavastatin restores vascular dysfunction in insulin-resistant state by inhibiting NAD(P)H oxidase activity and uncoupled endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide production.** *J Cardiovasc Pharmacol* (2007) 49: 122-130.

- ³²⁰ Zhang Q, Malik P, Pandey D et al.: **Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2008) 28: 1627-1633.
- ³²¹ Kifle Y, Monnier J, Chesrown SE et al.: **Regulation of the manganese superoxide dismutase and inducible nitric oxide synthase gene in rat neuronal and glial cells.** *J Neurochem* (1996) 66: 2128-2135.
- ³²² Hightower LE: **Heat Shock, Stress Proteins, Chaperones, and Proteotoxicity.** *Cell* (1991) 66: 191-197.
- ³²³ Morimoto RI: **Cells in Stress: Transcriptional Activation of Heat Shock Genes.** *Science* (1991) 259: 1409-10.
- ³²⁴ Beck MA, Shi Q, Morris VC et al.: **Benign coxsackievirus damages heart muscle in iron-loaded vitamin E-deficient mice.** *Free Radic Biol Med* (2005) 38: 112-116.
- ³²⁵ Mil'chakov VI, Demurov EA, Gerasimov AM et al.: **Protective effect of superoxide dismutase in experimental myocarditis.** *Biull Eksp Biol Med* (1982) 94: 28-31.
- ³²⁶ Das KC, Lewis-Molock Y, White CW: **Thiol modulation of TNF alpha and IL-1 induced MnSOD gene expression and activation of NF-kappa B.** *Mol Cell Biochem* (1995) 148: 45-57.
- ³²⁷ McCord JM: **The importance of oxidant-antioxidant balance.** In: Montagnier L, Olivier R, Pasquier C eds.: **Oxidative stress in cancer, AIDS, and neurodegenerative diseases.** *CRC Press* (1997): 1-7.
- ³²⁸ Kinscherf R, Deigner HP, Usinger C et al.: **Induction of manganese superoxide dismutase by oxidized-LDL – Its Relevance in Atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemic rabbits.** *FASEB J* (1997) 11: 1317-28.
- ³²⁹ Visner GA, Dougall WC, Wilson JM et al.: **regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response.** *J Biol Chem* (1990) 265: 2856-2864.
- ³³⁰ Wong GH, Goeddel DB: **Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism.** *Science* (1988) 242: 941-944.
- ³³¹ Warner BB, Stuart L, Gebb S et al.: **Redox regulation of manganese superoxide dismutase.** *Am J Physiol* (1996) 271: L150-L158.
- ³³² Zhong W, Oberley LW, Oberley TD et al.: **Inhibition of cell growth and sensitization to oxidative damage by overexpression of manganese superoxide dismutase in rat glioma cells.** *Cell Growth Differ* (1996) 7: 1175-86.
- ³³³ Kinscherf R, Claus R, Wagner M et al.: **Apoptosis caused by Oxidized-LDL is manganese superoxide dismutase and p53-dependent.** *FASEB J* (1998) 12: 461-467.
- ³³⁴ Braun T: **Differenzierung und Proliferation von Zellen während der Entwicklung und Regeneration.** *Tätigkeitsbericht, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim* (2005): 259-267.
- ³³⁵ Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T et al.: **Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia.** *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92: 6264-6268.
- ³³⁶ Morten KJ, Ackrell BA, Melov S: **Mitochondrial reactive oxygen species in mice lacking superoxide dismutase 2: attenuation via antioxidant treatment.** *J Biol Chem* (2006) 281: 3354-3359.
- ³³⁷ Jin M, Wilhelm MJ, Lang RE et al.: **Endogenous tissue renin-angiotensin systems.** *Am J Med* (1988) 84: 28-36
- ³³⁸ Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D et al.: **Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report.** *Cardiovasc Drugs Ther* (2002) 16: 149-160.
- ³³⁹ Paul M, Schunkert H: **Detection of angiotensin converting enzyme mRNA in the rat heart by use of the polymerase chain reaction (PCR).** *Agents Actions Suppl* (1992) 38: 384-391.
- ³⁴⁰ Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS et al.: **Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and m-RNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy: Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation.** *J Clin Invest* (1990) 86: 1913-1923.
- ³⁴¹ Tonnesen MG, Klempner MS, Austen KF et al.: **Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G.** *J Clin Invest* (1982) 69: 25-30.
- ³⁴² Erdmann E: **Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße, Kap. 5 – Chronische Herzinsuffizienz,** *Springer Verlag, 6. Aufl., Berlin* (2006): 217-335.
- ³⁴³ Yamada H, Fabris B, Allen AM: **Localization of angiotensin converting enzyme in rat heart.** *Circ Res* (1991) 68: 141-151.
- ³⁴⁴ Müller DN, Fischli W, Clozel JP et al.: **Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake.** *Circ Res* (1998) 82: 13-20.

- ³⁴⁵ Ihara M, Urata H, Kinoshita A et al.: **Increased chymase-dependent angiotensin II formation in human atherosclerotic aorta.** *Hypertension* (1999) 33: 1399-1405.
- ³⁴⁶ Johnston CI, Risvanis J: **Preclinical pharmacology of angiotensin II receptor antagonists: update and outstanding issues.** *Am J Hypertens* (1997) 10: 306-310.
- ³⁴⁷ Wei CHCH, Tian B, Perry G et al.: **Differential ANG II generation in plasma and tissue of mice with decreased expression of the ACE gene.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2002) 282: H2254-H2258.
- ³⁴⁸ Hollenberg NK, Fisher NDL, Price DA: **Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system.** *Hypertension* (1998) 32: 387-392.
- ³⁴⁹ Husain A, Li M, Graham RM: **Do studies with ACE N- and C-domain-selective inhibitors provide evidence for a non-ACE, non-chymase angiotensin II-forming pathway?** *Circ Res* (2003) 93: 91-93.
- ³⁵⁰ Matsumoto T, Wada A, Tsutamoto T et al.: **Chymase inhibition prevents cardiac fibrosis and improves diastolic dysfunction in the progression of heart failure.** *Circulation* (2003) 107: 2555-2558.
- ³⁵¹ Wolf G, Mentzel S, Assmann KJ: **Aminopeptidase A: a key enzyme in the intrarenal degradation of angiotensin II.** *Exp Nephrol* (1997) 5: 364-369.
- ³⁵² Abrahamsen CT, Pullen MA, Schnackenberg CG et al.: **Effects of angiotensins II and IV on blood pressure, renal function, and PAI-1 expression in the heart and kidney of the rat.** *Pharmacology* (2002) 66: 26-30.
- ³⁵³ Li N, Zimpelmann J, Cheng K et al.: **The role of angiotensin converting enzyme 2 in the generation of angiotensin 1-7 by rat proximal tubules.** *Am J Physiol Renal Physiol* (2005) 288: F353-F362.
- ³⁵⁴ Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE: **Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats.** *Hypertension* (2005) 45: 1-7.
- ³⁵⁵ Regitz-Zagrosek V, Unger T: **Angiotensin-Rezeptorantagonisten – Therapeutischer Einsatz bei Hypertonie und Herzinsuffizienz.** *Uni-Med, Bremen* (2003).
- ³⁵⁶ Burnier M: **Angiotensin II type 1 receptor blockers.** *Circulation* (2001) 103: 904-912.
- ³⁵⁷ Matsubara H, Kanasaki M, Murasawa S et al.: **Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture.** *J Clin Invest* (1994) 93:1592-1601.
- ³⁵⁸ Busche S, Gallinat S, Bohle RM et al.: **Expression of angiotensin AT(1) and AT(2) receptors in adult rat cardiomyocytes after myocardial infarction. A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction study.** *Am J Pathol* (2000) 157: 605-611.
- ³⁵⁹ Clemenz M, Steckelings UM, Unger T: **Regulationsmechanismen des Renin-Angiotensin-Systems im kardiovaskulären System.** In: Ganten D, Ruckpaul K: **Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen.** Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (2006): 377-407.
- ³⁶⁰ Kambayashi Y, Nagata K, Ichiki T et al.: **Insulin and insulinlike growth factor-induced expression of angiotensin type 2 receptor in vascular smooth muscle cells.** *Eur J Biochem* (1996) 239: 558-565.
- ³⁶¹ Horiuchi M, Hayashida W, Akishita M et al.: **Interferon-gamma induces AT(2) receptor expression in fibroblasts by Jak/STAT pathway and interferon regulatory factor-1.** *Circ Res* (2000) 86: 233-240.
- ³⁶² Kambayashi Y, Bardhan S, Inagami T: **Peptide growth factors markedly decrease the ligand binding of angiotensin II type 2 receptor in rat cultured vascular smooth muscle cells.** *Biochem Biophys Res Commun* (1993) 194: 478-482.
- ³⁶³ Ichiki T, Kambayashi Y, Inagami T: **Multiple growth factors modulate mRNA expression of angiotensin II type-2 receptor in R3T3 cells.** *Circ Res* (1995) 77: 1070-1076.
- ³⁶⁴ Bader M, Peters J, Baltatu O et al.: **Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research.** *J Mol Med* (2001) 79: 76-102.
- ³⁶⁵ Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW: **Molecular biology of the renin-angiotensin system.** *Circulation* (1993) 87: 1816-1828.
- ³⁶⁶ Murphy TH, Takeuchi K, Alexander RW: **Molecular cloning of AT 1 angiotensin receptors.** *Am J Hypertens* (1992) 5: 236-242.
- ³⁶⁷ Timmermann PBMWM, Wong PC, Chiu AT et al.: **Angiotensin II receptors and angiotensin II receptors antagonists.** *Pharmacol Rev* (1993) 45: 205-251.
- ³⁶⁸ Kaschina E, Unger T: **Angiotensin AT1/AT2 receptors: Regulation, signalling and function.** *Blood Press* (2003) 12: 70-88.

- ³⁶⁹ Wolf G: **Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System – komplexer als bisher gedacht.** *Med Klin* (2005) 100: 471-477.
- ³⁷⁰ Mascareno E, Siddiqui MA: **The role of Jak/STAT signaling in heart tissue renin-angiotensin system.** *Mol Cell Biochem* (2000) 212: 171-175.
- ³⁷¹ Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O et al.: **Inflammation and angiotensin II.** *Int J Biochem Cell Biol* (2003) 35: 881-900.
- ³⁷² Weber KT: **Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation.** *Circulation* (1997) 96: 4065-4082.
- ³⁷³ Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ et al.: **TGF-beta 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II.** *J Clin Invest* (2002) 109: 787-796.
- ³⁷⁴ Skultetyova D, Filipova S, Riecanaky I et al.: **The role of angiotensin type 1 receptor in inflammation and endothelial dysfunction.** *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov* (2007) 2: 23-27.
- ³⁷⁵ Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Nakaya H et al.: **Effects of AT1 receptor antagonist on proteoglycan gene expression in hypertensive rats.** *Hypertens Res* (2001) 24: 165-172.
- ³⁷⁶ Fischer JW, Stoll M, Hahn AW et al.: **Differential regulation of thrombospondin-1 and fibronectin by angiotensin II receptor subtypes in cultured endothelial cells.** *Cardiovasc Res* (2001) 51: 784-791.
- ³⁷⁷ Costanzo A, Moretti F, Burgio VL et al.: **Endothelial activation by angiotensin II through NFkappaB and p38 pathways: involvement of NFkappaB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin.** *J Cell Physiol* (2003) 195: 402-410.
- ³⁷⁸ Das UN: **Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule?** *Med Sci Monit* (2005) 11: 155-162.
- ³⁷⁹ Yamamoto K, Shioi T, Uchiyama K et al.: **Attenuation of virus-induced myocardial injury by inhibition of the angiotensin II type 1 receptor signal and decreased nuclear factor-kappa B activation in knockout mice.** *J Am Coll Cardiol* (2003) 42: 2000-2006.
- ³⁸⁰ Thannickal VJ, Fanburg BL: **Reactive oxygen species in cell signaling.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2000) 279: L1005-L1028.
- ³⁸¹ Delcayre C, Silvestre JS, Garnier A et al.: **Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling.** *Kidney Int* (2000) 57: 1346-1351.
- ³⁸² Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S et al.: **Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II typ-1 receptor.** *Nature* (1991) 351: 230-232.
- ³⁸³ Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK et al.: **Isolation of a cDNA encoding the vascular type- I angiotensin II receptor.** *Nature (Lond)* (1991) 351: 233-236.
- ³⁸⁴ Yoshida H, Kakuchi J, Guo DF et al.: **Analysis of the evolution of angiotensin II type I receptor gene in mammals (mouse, rat, bovine, and human).** *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 186: 1042-1049.
- ³⁸⁵ Iwai N, Inagami T: **Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor.** *FEBS (Fed Eur Biochem Soc) Lett* (1991) 177: 299-304.
- ³⁸⁶ Zhou Y, Dirksen WP, Chen Y et al.: **A major role for AT1b receptor in mouse mesenteric resistance vessels and its distribution in heart and neuroendocrine tissues.** *J Mol Cell Cardiol* (2005) 38: 693-696.
- ³⁸⁷ Kakar SS, Sellers JC, Devor DC et al.: **Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation.** *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 183: 1090-1096.
- ³⁸⁸ Gasparo M de, Catt KJ, Inagami T et al.: **International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.** *Pharmacol Rev* (2000) 52: 415-472.
- ³⁸⁹ Mauzy CA, Hwang O, Egloff AM et al.: **Cloning, expression, and characterization of a gene encoding the human angiotensin II type IA receptor.** *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 186: 277-284.
- ³⁹⁰ Carey RM: **Update on the role of the AT2 receptor.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2005) 14: 67-71.
- ³⁹¹ Yang Z, Bove CM, French BA et al.: **Angiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction.** *Circulation* (2002) 106: 106-111.
- ³⁹² Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM: **Update: role of the angiotensin type-2 (AT(2)) receptor in blood pressure regulation.** *Curr Hypertens Rep* (2000) 2: 198-201.
- ³⁹³ Nouet S, Nahmias C: **Signal transduction from the angiotensin AT2 receptor.** *Trends Endocrinol Metab* (2000) 11: 1-6.

- ³⁹⁴ Kayes-Wandover KM, White PC: **Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart.** *J Clin Endocrinol Metab* (2000) 85: 2519-2525.
- ³⁹⁵ Stockand JD, Meszaros JG: **Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2003) 284: H176-H184.
- ³⁹⁶ Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T et al.: **Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells.** *J Biol Chem* (1994) 269: 24316-24320.
- ³⁹⁷ Yoshida K, Kim-Mitsuyama S, Wake R et al.: **Excess aldosterone under normal salt diet induces cardiac hypertrophy and infiltration via oxidative stress.** *Hypertens Res* (2005) 28: 447-455.
- ³⁹⁸ Mazak I, Fiebeler A, Muller DN et al.: **Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells.** *Circulation* (2004) 109: 2792-2800.
- ³⁹⁹ Chomczynski P, Sacchi N: **Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction.** *Analytical Biochemistry* (1987) 162, 156-159.
- ⁴⁰⁰ Mullis KB, Faloona FA: **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.** *Methods Enzymol* (1987) 155: 335-350.
- ⁴⁰¹ online <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- ⁴⁰² Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al.: **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* (1988) 239: 487-491.
- ⁴⁰³ Abdi H: **Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons.** In: Salkind NJ eds.: **Encyclopedia of Measurement and Statistics.** Thousand Oaks, CA: Sage (2007).
- ⁴⁰⁴ Bortz J: **Statistik für Sozialwissenschaftler. Kap. Einfaktorielle Versuchspläne.** Springer Verlag, Berlin (1999): 237-278.
- ⁴⁰⁵ Mann H, Whitney D: **On a test of whether one of two variables is stochastically larger than the other.** *Annals of Mathematical Statistics* (1947) 18: 50-60.
- ⁴⁰⁶ Wilcoxon F: **Individual Comparisons by Ranking Methods.** *Biometrics Bulletin* (1945) 1: 80-83.
- ⁴⁰⁷ Kruskal WH, Wallis WA: **Use of ranks in one-criterion variance analysis.** *J Amer Stat Ass* (1952) 47: 583-621.
- ⁴⁰⁸ Bravais A: **Analyse mathématique sur les probabilités des erreurs de situation d'un point.** *Mém. prés. par divers savants à l'Acad. des sciences de l'Inst. de France* (1846), 2. Serie, 9: 255-332.
- ⁴⁰⁹ Pearson K: **Mathematical Contributions to the Theory of Evolution. VII. On the Correlation of Characters not Quantitatively Measurable.** *Philosophical Transactions of The Royal Society of London* (1901) Ser. A, 195: 1-47
- ⁴¹⁰ Tukey JW: **Exploratory Data Analysis. §2C – Box-and-Whisker Plots.** Addison-Wesley Publishing Company, Reading, MA (1977): 39-43.
- ⁴¹¹ Herskowitz A, Beisel KW, Wolfgram LJ et al.: **Coxsackievirus B3 murine myocarditis: wide pathologic spectrum in genetically defined inbred strains.** *Hum Pathol* (1985) 16: 671-673.
- ⁴¹² Wolfgram LJ, Beisel KW, Herskowitz A et al.: **Variations in the susceptibility to Coxsackievirus B3-induced myocarditis among different strains of mice.** *J Immunol* (1986) 136: 1846-1852.
- ⁴¹³ Baba T, Kanda T, Kobayashi I: **Reduction of cardiac endothelin-1 by angiotensin II type 1 receptor antagonist in viral myocarditis of mice.** *Life Sci* (2000) 67: 587-597.
- ⁴¹⁴ Kanda T, Koike H, Arai M et al.: **Increased severity of viral myocarditis in mice lacking lymphocyte maturation.** *Int J Cardiol* (1999) 68: 13-22.
- ⁴¹⁵ Hashimoto I: **Myocarditis in mice infected with coxsackievirus B3.** *Br J Exp Path* (1986) 67: 737-745.
- ⁴¹⁶ Maisch B: **Entzündliche Herzerkrankungen (Endokarditis, Myokarditis und Kardiomyopathien).** In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K eds.: **Lehrbuch der Inneren Medizin.** Urban & Schwarzenberg (1991): 1040-1068.
- ⁴¹⁷ Kennedy JW: **Cardiac hemodynamics.** In: Strandness DE, Summer DS eds.: **Hemodynamics for surgeons.** Grune & Stratton, New York, San Francisco, and London (1975): 47-72.
- ⁴¹⁸ Strauer BE: **Kriterien zur Beurteilung der Myokardkontraktilität am hypertrophierten und insuffizienten Herzen.** *Klin Wsehr* (1973) 51, 307-321.
- ⁴¹⁹ Scherpe A, Strauer BE: **Studies on the hemodynamic determinants of cardiac output.** *Verh Dtsch Ges Inn Med* (1976) 82: 1109-1113.
- ⁴²⁰ Yong SS, Bentivoglio LG, Marantiao V et al.: **From cardiac catheterization dates to haemodynamics parameters.** F.A. Davis company (1988) 3. ED.

- ⁴²¹ Strauer BE: **Belastungshämodynamik bei Patienten mit arterieller Hypertonie und eingeschränkter Koronarreserve.** *Am J Cardiol* (1979) 44: 999-1006.
- ⁴²² Ullrich KJ, Riecker G, Kramer K: **Das Druckvolumendiagramm des Warmblüterherzens.** *Pflügers Arch* (1954) 259: 481-489.
- ⁴²³ Tschöpe 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: 173-179.
- ⁴²⁴ Cassidy SC, McGovern JJ, Chan DP et al.: **Effects of commonly used adrenergic agonists on left ventricular function and systemic vascular resistance in young piglets.** *Am Heart J* (1997) 133: 174-183.
- ⁴²⁵ 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: 1506-1514.
- ⁴²⁶ Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Yusung SA et al.: **Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart.** *Am J Pathol* (2004) 165: 1883-1894.
- ⁴²⁷ 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: 261-269.
- ⁴²⁸ Reifenberg K, Lehr HA, Torzewski M et al.: **Interferon-gamma induces chronic active myocarditis and cardiomyopathy in transgenic mice.** *Am J Pathol* (2007) 171: 463-472.
- ⁴²⁹ Kubota T, McTiernan CF, Frye CS et al.: **Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- α .** *Circ Res* (1997) 81: 627-635.
- ⁴³⁰ Bryant D, Becker L, Richardson J et al.: **Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor- α .** *Circulation* (1998) 97: 1375-1381.
- ⁴³¹ Higuchi Y, McTiernan CF, Frye CB et al.: **Tumor necrosis factor receptors 1 and 2 differentially regulate survival, cardiac dysfunction, and remodeling in transgenic mice with tumor necrosis factor-alpha-induced cardiomyopathy.** *Circulation* (2004) 109: 1892-1897.
- ⁴³² Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J et al.: **Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium.** *Circulation* (1995) 92: 1487-1493.
- ⁴³³ Krasnov KA, Ashkinazi RI: **Biologically active substance on the basis of tetracyclic nitrogen heterocycles of pyrimidine row.** (2000) online www.patentstorm.us.
- ⁴³⁴ Seregin SV, Babkina IN, Nesterov AE et al.: **Comparative studies of gamma-interferon receptor-like proteins of variola major and variola minor viruses.** *FEBS Letters* (1996) 382: 79-83.
- ⁴³⁵ Li Y, Heuser JS, Kosanke SD et al.: **Protection against Experimental Autoimmune Myocarditis Is Mediated by IL-10-Producing T Cells that are controlled by Dendritic Cells.** *Am J Pathol* (2005) 167: 5-15.
- ⁴³⁶ Nishio R, Matsumori A, Shioi T et al.: **Treatment of experimental viral myocarditis with interleukin-10.** *Circulation* (1999) 100: 1102-1108.
- ⁴³⁷ Fuse K, Kodama M, Okura Y et al.: **Short-term prognostic value of initial serum levels of interleukin-10 in patients with acute myocarditis.** *Eur J Heart Fail* (2005) 7: 109-112.
- ⁴³⁸ Naldini A, Bernini C, Pucci A et al.: **Thrombin-mediated IL-10 up-regulation involves protease-activated receptor (PAR)-1 expression in human mononuclear leukocytes.** *Journal of Leukocyte Biology* (2005) 78: 736-744
- ⁴³⁹ Robertson TE, Nikolic-Paterson DJ, Tesch GH et al.: **Role of interleukin-10 in rat mesangioproliferative glomerulonephritis.** *Nephrology, Carlton* (2003) 8: 33-41.
- ⁴⁴⁰ Strassmann G, Kambayashi T, Jacob CO et al.: **The immunomodulator AS-101 inhibits IL-10 release and augments TNF alpha and IL-1 alpha release by mouse and human mononuclear phagocytes.** *Cell Immunol* (1997) 176: 180-185.
- ⁴⁴¹ Ito H, Ono K, Nishio R: **Amiodarone inhibits interleukin 6 production and attenuates myocardial injury induced by viral myocarditis in mice.** *Cytokine* (2002) 17: 197-202.
- ⁴⁴² 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: 1627-1635.
- ⁴⁴³ Kanda T, McManus JE, Nagai R et al.: **Modification of viral myocarditis in mice by interleukin-6.** *Circ Res* (1996) 78: 848-856.

- ⁴⁴⁴ Heinzl S: **Erster Interleukin-6-Hemmer gegen Arthritis.** www.aerztezeitung.de (2009).
- ⁴⁴⁵ Csala M, Léránt I, Bánhegyi G et al.: **Prostaglandin-independent stimulation of interleukin-6 production by fibrinogen degradation product D in perfused murine liver.** *Scand J Immunol* (1998) 48: 269-271.
- ⁴⁴⁶ Massague J: **The transforming growth factor-beta family.** *Annu Rev Cell Biol* (1990) 6: 597-641.
- ⁴⁴⁷ Zhao W, Zhao T, Chen Y et al.: **Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats.** *Mol Cell Biochem* (2008) 317: 43-50.
- ⁴⁴⁸ Cheng J: **Expression of TGF-beta 1 and proliferation of collagen in myocardium in viral myocarditis.** *Fa Yi Xue Za Zhi* (2000) 16: 208-209.
- ⁴⁴⁹ Frantz S, Hu K, Adamek A et al.: **Transforming growth factor beta inhibition increases mortality and left ventricular dilatation after myocardial infarction.** *Basic Res Cardiol* (2008) 103: 485-492.
- ⁴⁵⁰ Suthanthiran M, Li B, Song JO 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 USA* (2000) 97: 3479-3484.
- ⁴⁵¹ 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: 1435-1440.
- ⁴⁵² Glück B, Schmidtke M, Merkle I et al.: **Persistent expression of cytokines in the chronic stage of CVB3-induced myocarditis in NMRI mice.** *J Mol Cell Cardiol* (2001) 33: 1615-1626.
- ⁴⁵³ Ma M, Watanabe K, Wahed MI et al.: **Inhibition of progression of heart failure and expression of TGF-beta 1 mRNA in rats with heart failure by the ACE inhibitor quinapril.** *J Cardiovasc Pharmacol* (2001) 38: 51-54.
- ⁴⁵⁴ Juan W, Nakazawa M, Watanabe K et al.: **Quinapril inhibits progression of heart failure and fibrosis in rats with dilated cardiomyopathy after myocarditis.** *Mol Cell Biochem* (2003) 251: 77-82.
- ⁴⁵⁵ Halder SK, Beauchamp RD, Datta PK. **A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers.** *Neoplasia* (2005) 7: 509-521.
- ⁴⁵⁶ Saunier EF, Akhurst RJ. **TGF Beta Inhibition for Cancer Therapy.** *Curr Cancer Drug Targets* (2006) 6: 565-578.
- ⁴⁵⁷ Henke A, Huber SA, Stelzner A et al.: **The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis.** *J Virol* (1995) 69: 6720-6728.
- ⁴⁵⁸ Kishimoto C, Shioji K, Kinoshita M et al.: **Treatment of acute inflammatory cardiomyopathy with intravenous immunoglobulin ameliorates left ventricular function associated with suppression of inflammatory cytokines and decreased oxidative stress.** *Int J Cardiol* (2003) 91: 173-178.
- ⁴⁵⁹ Scarpa M, Rigo A, Maiorino M et al.: **Formation of alpha-tocopherol radical and recycling of alpha-tocopherol by ascorbat during peroxidation of phosphatidylcholine liposomes. An electron paramagnetic resonance study.** *Biochem Biophys Acta* (1984) 801: 215-219.
- ⁴⁶⁰ Beck MA, Handy J, Levander OA: **The role of oxidative stress in viral infections.** *Ann NY Acad Sci* (2000) 917: 906-912.
- ⁴⁶¹ Beck MA: **Nutritionally induced oxidative stress: effect on viral disease.** *Am J Clin Nutr* (2000) 71: 1676S-1681S.
- ⁴⁶² Szabolcs MJ, Sun J, Ma N et al.: **Effects of selective inhibitors of nitric oxide synthase-2 dimerization on acute cardiac allograft rejection.** *Circulation* (2002) 106: 2392-2396.
- ⁴⁶³ Wingle K, Schmidt HHHW: **Good stress, bad stress – The delicate balance in the vasculature.** *Dtsch Arztebl Int* (2009) 106: 677-684.
- ⁴⁶⁴ Vecchione C, Brandes RP: **Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice.** *Circ Res* (2002) 91: 173-179.
- ⁴⁶⁵ Matsumori A: **Detection of viral genomes in myocarditis.** *Rinsho Byori* (1995) 43: 358-364.
- ⁴⁶⁶ Suzuki H, Matsumori A, Matoba Y et al.: **Enhanced expression of superoxide dismutase messenger RNA in viral myocarditis. An SH-dependent reduction of its expression and myocardial injury.** *J Clin Invest* (1993) 91: 2727-2733.
- ⁴⁶⁷ Isoherranen K, Peltola V, Laurikainen L et al.: **Regulation of copper/zinc and manganese superoxide dismutase by UVB irradiation, oxidative stress and cytokines.** *J Photochem Photobiol B* (1997) 40: 288-293.
- ⁴⁶⁸ Valentine JF, Tannahill CL, Stevenot SA et al.: **Colitis and interleukin 1beta up-regulate inducible nitric oxide synthase and superoxide dismutase in rat myenteric neurons.** *Gastroenterology* (1996) 111: 56-64.

- ⁴⁶⁹ Dougall WC, Nick HS: **Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids.** *Endocrinology* (1991) 129: 2376-2384.
- ⁴⁷⁰ Raineri I, Huang TT, Epstein CJ et al.: **Antisense manganese superoxide dismutase mRNA inhibits the antiviral action of interferon-gamma and interferon-alpha.** *J Interferon Cytokine Res* (1996) 16: 61-68.
- ⁴⁷¹ Hodge DR, Xiao W, Peng B et al.: **Enforced expression of superoxide dismutase 2/manganese superoxide dismutase disrupts autocrine interleukin-6 stimulation in human multiple myeloma cells and enhances dexamethasone-induced apoptosis.** *Cancer Res* (2005) 65: 6255-6263.
- ⁴⁷² Champelovier P, Richard MJ, Seigneurin D: **Autocrine regulation of TPA-induced apoptosis in monoblastic cell-line U-937: role for TNF-alpha, MnSOD and IL-6.** *Anticancer Res* (2000) 20: 451-458.
- ⁴⁷³ Kris-Etherton PM, Lichtenstein AH, Howard BV et al.: **Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease.** *Circulation* (2004) 110: 637-641.
- ⁴⁷⁴ Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK et al.: **Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomized trials.** *Lancet* (2003) 361: 2017-2023.
- ⁴⁷⁵ Eidelman RS, Hollar D, Hebert PR et al.: **Randomized trials of vitamin E in the treatment and prevention of cardiovascular disease.** *Arch Intern Med* (2004) 164: 1552-1556.
- ⁴⁷⁶ Dotan Y, Pinchuk I, Lichtenberg D et al.: **Decision analysis supports the paradigm that indiscriminate supplementation of vitamin E does more harm than good.** *Arterioscler Vasc Biol* (2009) 29: 1304-1309.
- ⁴⁷⁷ Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL et al.: **Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis.** *JAMA* (2007) 297: 842-857.
- ⁴⁷⁸ Schafer ZT, Grassian AR, Song L et al.: **Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment.** *Nature* (2009) 461: 109-113.
- ⁴⁷⁹ Bai Y, Sun L, Yang T et al.: **Increase in fasting vascular endothelial function after short-term oral L-arginine is effective when baseline flow-mediated dilation is low: a metaanalysis of randomized controlled trials.** *Am J Clin Nutr* (2009) 89: 77-84.
- ⁴⁸⁰ Frantz S, Adamek A, Fraccarollo D et al.: **The eNOS enhancer AVE 9488: a novel cardioprotectant against ischemia reperfusion injury.** *Basic Res Cardiol* (2009) 104: 773-779.
- ⁴⁸¹ Mittendorf J, Weigand S, Alonso-Alija C et al.: **Discovery of riociguat (BAY 63-2521): a potent, oral stimulator of soluble guanylate cyclase for the treatment of pulmonary hypertension.** *ChemMedChem* (2009) 4: 853-865.
- ⁴⁸² Lapp H, Mitrovic V, Franz N et al.: **Cinaciguat (BAY 58-2667) improves cardiopulmonary hemodynamics in patients with acute decompensated heart failure.** *Circulation* (2009) 119: 2781-2788.
- ⁴⁸³ Kanda T, Adachi H, Ohno T et al.: **Myocardial beta-receptor and cardiac angiotensin alterations during the acute and chronic phases of viral myocarditis.** *Eur Heart J* (1994) 15: 686-690.
- ⁴⁸⁴ Oliverio MI, Best CF, Kim HS et al.: **Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: A role for AT1B receptors in blood pressure regulation.** *Am J Physiol* (1997) 272: F515-F520.
- ⁴⁸⁵ Schorb W, Booz GW, Dostal DE et al.: **Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts.** *Circ Res* (1993) 72: 1245-1254.
- ⁴⁸⁶ Iwai N, Inagami T, Ohmichi N et al.: **Differential regulation of rat AT1a and AT1b receptor mRNA.** *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 188: 298-303.
- ⁴⁸⁷ Kitami Y, Okura T, Marumoto K et al.: **Differential gene expression and regulation of type- I angiotensin II receptor subtypes in the rat.** *Biochem Biophys Res Commun* (1992) 188: 446-452.
- ⁴⁸⁸ Schulman IH, Raij L: **The angiotensin II type 2 receptor: what is its clinical significance?** *Curr Hypertens Rep* (2008) 10: 188-193.
- ⁴⁸⁹ Sechi LA, Griffin CA, Grady EF et al.: **Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart.** *Circ Res* (1992) 71: 1482-1489.
- ⁴⁹⁰ Suzuki J, Matsubara H, Urakami M et al.: **Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in the myocardial growth and hypertrophy.** *Circ Res* (1993) 73: 439-447.
- ⁴⁹¹ Bedard K, Krause KH: **The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology.** *Physiol Rev* (2007) 87: 245-313.